

Tesis de Doctorado en Biología

**Entre la limpieza y la integridad: un estudio de
distintos métodos de preparación de material
destinado a Colecciones de Historia Natural**

Albertina Inés Popp

Prefacio

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 04 de junio de 2019 y el 12 de diciembre de 2024, bajo la dirección de la Dra. Emma B. Casanave y la co-dirección de la Dra. Nora S. Sidorkewicz.

Lic. Albertina Inés Popp



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Subsecretaría de Posgrado

La presente tesis ha sido aprobada el 23/05/2025
mereciendo la calificación de 10 (SOBRESALIENTE)

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que de una manera u otra hicieron posible la realización de la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme apoyado económicamente otorgándome la beca doctoral.

Al Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR) y al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones.

A las Instituciones y Asociaciones que respaldaron económicamente algunas etapas involucradas en el desarrollo del trabajo: CONICET: PIP 11220200101668CO, Secretaría General de Ciencia y Tecnología - UNS (SGCyT-UNS): PGI 24/B233 y Programa de Financiamiento Parcial para realizar Estadías Breves en Centros de Investigación, Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación: PICT 03298/2020.

A mis directoras, Dras. Emma Casanave y Nora Sidorkewicz, por confiar en mí y guiarme en todos los aspectos relacionados con esta tesis.

Al Dr. Diego Castillo, quien fue co-director en la práctica, por su colaboración y apoyo en cada etapa del proceso.

Al Dr. Orlando Gallo por permitirme utilizar datos recolectados en el

marco de su tesis doctoral.

Al Servicio de Microscopía Electrónica del CCT-Bahía Blanca por la asistencia brindada.

Al Dr. Adrián Campelo por su ayuda con los procedimientos de eutanasia.

Al Servicio de Histología del INBIOSUR por la asistencia en el procesamiento de las muestras histológicas.

Al Dr. Diego Nabaes por su ayuda con los análisis estadísticos.

A los Dres. Itatí Olivares y Pablo Teta por permitirme acceder a las colecciones de los museos (La Plata y Bernardino Rivadavia).

A los Dres. Mercedes Lombarte y Lucas Brun por su colaboración con los análisis biomecánicos.

Al Dr. Nicolás Ottone y al Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos de la Universidad de la Frontera, por recibirme en Temuco y permitirme aprender con ustedes.

Al Lic. Franco Elichiry por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

A mis psicólogas por su guía durante este proceso.

A las Cátedras de Histología y Biología Celular, Taller de Introducción a las Ciencias Biológicas y Anatomía Comparada, por enseñarme cada día a ser docente.

A mis compañeras de tesis, Anita y Mariana, quienes fueron un soporte fundamental para avanzar.

A los *Pandenials*, sin quienes no hubiera llegado a recibirme de Profesora en Ciencias Biológicas.

A las *Flojitas de terraza*, por los Meets eternos y su apoyo constante.

A mis *Nanus* y *Uniditas*, por hacerme reír en los momentos oscuros y estar siempre.

A mis neuquinas, Micaela, Rocío R., Estefanía por estar siempre a pesar de los kilómetros.

A mis papás, Nazarena, Luz, Oscar y Willy, por su apoyo incondicional, por ser mi sostén en todo momento y por confiar en mí, incluso en los momentos en los que yo menos lo hacía.

A mi familia pampeana, por estar siempre y por ser mi refugio en los momentos más difíciles.

A mi familia bahiense, por dejarme compartir con ustedes los almuerzos de los domingos y tantos otros momentos.

A Juan, para quien no alcanzan las palabras de agradecimiento. Gracias por acompañarme, por ayudarme y, sobre todo, por ser un pilar durante este tiempo.

Agradezco profundamente a todos los que hicieron posible que este trabajo sea una realidad. Sin su ayuda, paciencia y aliento, no habría sido posible. Gracias por ser parte de esta travesía. Esta tesis también les pertenece.

“Seremos más fuertes cuanto más unidos estemos, y más débiles cuanto más divididos”

Albus Dumbledore

Resumen

Las colecciones de historia natural (CHN) forman parte del patrimonio de un país por ser fuente primaria de conocimiento y de información de la biodiversidad, tanto del pasado como del presente. Los métodos de preparación y conservación de los especímenes allí depositados juegan un rol preponderante en la calidad y cantidad de información que puede obtenerse a partir de ellos. En material esquelético, las técnicas convencionales de limpieza pueden afectar no solo a las capas superficiales (grietas, delaminación, aumento de porosidad) sino también a la estructura interna, llegándose en los casos más severos a la deformación o desintegración, y a la pérdida de material genético.

Los objetivos de esta tesis fueron, por un lado, evaluar los efectos de técnicas convencionales de preparación de material osteológico de mamíferos sobre sus características morfohistológicas, la cantidad y calidad del ADN y las propiedades biomecánicas; y por otro, evaluar la concentración y calidad del ADN en tejidos blandos y duros de mamíferos de distinta antigüedad, resguardados en diferentes colecciones científicas.

Para el primer objetivo, se ensayaron varias técnicas convencionales de limpieza de huesos: enterramiento, exposición a escarabajos, y distintas combinaciones de temperatura-tiempo de exposición-concentración de agentes químicos y enzimáticos. Los huesos post-tratamiento fueron

evaluados mediante microscopía electrónica de barrido (porcentaje de restos blandos, aspecto de la superficie ósea), histología de rutina, ensayos de flexión en tres puntos (análisis de propiedades biomecánicas) y técnicas moleculares (extracción de ADN para cuantificar concentración y pureza). Para el segundo objetivo se analizaron muestras de hueso y cuero de *Puma concolor* y *Lycalopex gymnocercus*, depositados en CHN de Argentina.

La digestión química con KOH a baja concentración (5 %), corto tiempo de exposición (2 horas) y temperaturas de 40-70°C, fue efectiva para eliminar tejidos blandos y mantener la integridad ósea. Sin embargo, combinaciones más agresivas provocaron daños importantes, incluyendo un aumento en porosidad y eventual desintegración del material. La digestión enzimática, menos eficaz en limpieza, permitió maximizar la concentración y pureza del ADN extraído, probablemente debido al efecto protector de los restos blandos sobre la superficie ósea. El tratamiento con escarabajos eliminó parcialmente el tejido blando, pero causó daños considerables en las superficies expuestas de los huesos. Los tratamientos de enterramiento fueron efectivos (0-3 % de restos), pero el deterioro óseo fue importante cuando el tiempo fue ≥ 30 días.

Los protocolos empleados para procesar las muestras de las CHN fueron eficientes para obtener ADN de calidad para amplificar *locus* de microsatélites. El uso de cueros es una mejor alternativa si los especímenes de mamíferos carnívoros no superan los 30 años de antigüedad, ya que representan fuentes confiables y mínimamente destructivas de ADN endógeno. Para muestras más antiguas puede considerarse el uso de material óseo.

Este trabajo proporciona una base para seleccionar protocolos que

garanticen durabilidad y utilidad de muestras en las CHN, enfatizando la necesidad de considerar el compromiso entre limpieza e integridad. También brinda información sobre las características que deberían tenerse en cuenta al seleccionar muestras depositadas en dichas colecciones, para asegurarse una mayor probabilidad de éxito en estudios con marcadores de microsatélites.

Abstract

Natural History Collections (NHCs) are part of a country's heritage, serving as a primary source of knowledge and information on biodiversity, both past and present. The preparation and preservation methods used for the specimens housed in these collections play a critical role in determining the quality and quantity of information that can be obtained from them. In skeletal material, conventional cleaning techniques can affect not only the surface layers (causing cracks, delamination, and increased porosity) but also the internal structure, leading, in severe cases, to deformation, disintegration, and the loss of genetic material.

The objectives of this thesis were twofold: first, to evaluate the effects of conventional mammalian osteological preparation techniques on their morphohistological characteristics, DNA quantity and quality, and biomechanical properties; and second, to assess DNA concentration and quality in soft and hard tissues from mammals of different ages.

For the first objective, several conventional bone-cleaning techniques were tested: burial, dermestid beetle exposure, and various combinations of temperature, exposure time, and concentrations of chemical and enzymatic agents. Post-treatment bones were evaluated using scanning electron microscopy (percentage of soft tissue remnants, bone surface appearance), routine histology, three-point bending tests (analysis of

biomechanical properties), and molecular techniques (DNA extraction to quantify concentration and purity). For the second objective, bone and skin samples from *Puma concolor* and *Lycalopex gymnocercus* housed in Argentine NHCs were analyzed.

Chemical digestion with low-concentration KOH (5 %), short exposure times (2 hours), and temperatures of 40-70°C was effective in removing soft tissues while maintaining bone integrity. However, more aggressive combinations caused significant damage, including increased porosity and eventual material disintegration. Enzymatic digestion, while less effective for cleaning, maximized the concentration and purity of extracted DNA, likely due to the protective effect of residual soft tissues on the bone surface. Beetle treatment partially removed soft tissue but caused considerable damage to exposed bone surfaces. Burial treatments were effective (0-3 % soft tissue remnants), but significant bone deterioration occurred in treatments lasting ≥ 30 days.

The protocols used to process NHC samples were efficient in obtaining DNA of sufficient quality to amplify microsatellite *loci*. The use of skins is a better alternative if carnivorous mammal specimens are less than 30 years old, as they represent reliable and minimally destructive sources of endogenous DNA. For older samples, the use of bone material may be considered.

This work provides a basis for selecting protocols that ensure the durability and utility of NHC samples, emphasizing the need to balance cleaning efficacy and structural integrity. It also offers insights into the characteristics to consider when selecting samples from NHCs to ensure a higher likelihood of success in studies using microsatellite markers.

Índice general

Capítulo 1. Introducción general	1
1.1 Objetivos específicos	6
1.2 Hipótesis de trabajo	7
Capítulo 2. Efectos de técnicas de limpieza de uso común en colecciones de historia natural sobre huesos de mamíferos . .	9
2.1 Introducción	9
2.2 Estudio preliminar	18
2.2.1 Obtención del material y tratamientos ensayados . .	19
2.2.2 Parámetros registrados	20
2.2.3 Resultados	23
2.3 Estudio definitivo	36
2.3.1 Materiales y métodos	36
2.3.1.1 Análisis macroscópico de la <i>performance</i> de los tratamientos y valoración de las técnicas implementadas	39
2.3.1.2 Análisis microscópico: eficacia en la remo- ción de tejidos blandos y efecto de los tra- tamientos sobre la superficie ósea	41
2.3.1.3 Efectos de los tratamientos sobre las pro- piedades biomecánicas del hueso	43

2.3.1.4	Efectos de los tratamientos sobre sobre la calidad y cantidad de ADN	47
2.3.1.5	Análisis estadísticos	47
2.3.2	Resultados	49
2.3.2.1	Análisis macroscópico de la <i>performance</i> de los tratamientos y valoración de las técnicas implementadas	49
2.3.2.2	Análisis microscópico: eficacia en la remo- ción de tejidos blandos y efecto de los tra- tamientos sobre la superficie ósea	59
2.3.2.3	Efectos de los tratamientos sobre las pro- piedades biomecánicas del hueso	69
2.3.2.4	Efectos de los tratamientos sobre sobre la calidad y cantidad de ADN	71
2.4	Discusión	73
2.4.1	Eficacia de limpieza e integridad ósea	73
2.4.2	Efectos de los tratamientos sobre las propiedades biomecánicas del hueso	82
2.4.3	Efectos de los tratamientos sobre la calidad y cantidad de ADN	85
Capítulo 3. Evaluación de la cantidad y calidad de ADN en cueros y huesos de mamíferos depositados en colecciones de historia natural		88
3.1	Introducción	88
3.2	Materiales y métodos	92
3.2.1	Muestreo	92

3.2.2	Extracción y amplificación, obtención de genotipos . . .	94
3.2.3	Análisis estadísticos	96
3.3	Resultados	97
3.3.1	Muestreo	97
3.3.2	Obtención de genotipos y análisis estadísticos	98
3.4	Discusión	102
Capítulo 4. Consideraciones finales y conclusiones.		107
Apéndices		113
A. Protocolo de extracción de fenol-cloroformo		114
B. Procedencia e identificación de las muestras depositadas en colecciones de historia natural		116
C. Protocolo de extracción de ADN con NaCl		119
D. Protocolo de extracción de ADN antiguo		121
E. Concentración de ADN obtenido para las muestras de zorro		124
F. Marcadores microsatélites utilizados		126

Índice de figuras

2.1	Tipos de fuerza que pueden operar sobre un hueso	17
2.2	Estudio preliminar: miembro posterior de rata Wistar luego de la remoción de tejidos blandos	23
2.3	Detalle de la grilla utilizada para el cálculo de la superficie ósea ocupada por restos de tejido blando en el estudio preliminar	23
2.4	Miembros posteriores de rata luego de los tratamientos de limpieza del estudio preliminar	27
2.5	Muestras correspondientes al Control del estudio preliminar.	29
2.6	Muestras correspondientes al tratamiento E/60 del estudio preliminar.	30
2.7	Muestras correspondientes al tratamiento KOH5 %/4h/40C del estudio preliminar	31
2.8	Muestras obtenidas en el estudio preliminar, por exposición a KOH5 % y 25°C	32
2.9	Muestras obtenidas en el estudio preliminar, por exposición a KOH5 % y 40°C.	33
2.10	Muestras obtenidas en el estudio preliminar, por exposición a distintas concentraciones de jabón enzimático a 25°C . . .	34

2.11	Muestras obtenidas en el estudio preliminar, por exposición a distintas concentraciones de jabón enzimático a 70°C durante 2 horas.	35
2.12	Ejemplo del campo de 600x400 píxeles sobre imágenes de MEB.	42
2.13	Principios empleados en la determinación de las propiedades mecánicas del hueso.	46
2.14	Aspecto general de un miembro posterior de rata correspondiente al Control del estudio definitivo.	57
2.15	Miembros posteriores de rata al finalizar los tratamientos de enterramiento del estudio definitivo.	57
2.16	Miembros posteriores de rata al finalizar los tratamientos de digestión química del estudio definitivo.	58
2.17	Miembros posteriores de rata al finalizar los tratamientos de digestión enzimática del estudio definitivo.	58
2.18	Evolución de un miembro posterior de rata expuesto a la acción de tenebrios en el estudio definitivo.	59
2.19	Porcentaje promedio (\pm error estándar) de tejidos blandos remanentes al finalizar los tratamientos del estudio definitivo.	62
2.20	Microfotografías que muestran la superficie ósea de muestras correspondientes al Control del estudio definitivo.	62
2.21	Microfotografías de huesos sometidos a los tratamientos de enterramiento del estudio definitivo.	63
2.22	Microfotografías de huesos sometidos a los tratamientos de digestión química con KOH al 5 % del estudio definitivo.	64

2.23	Microfotografías de huesos sometidos a los tratamientos de digestión química con KOH al 10 % del estudio definitivo. . .	65
2.24	Microfotografías de huesos sometidos a los tratamientos de digestión con jabón enzimático al 10 % del estudio definitivo.	66
2.25	Microfotografías de huesos sometidos a los tratamientos de digestión con jabón enzimático al 15 % del estudio definitivo.	67
2.26	Microfotografías de huesos sometidos a la limpieza con tenebrios, durante el estudio definitivo.	68
2.27	Valores promedio de parámetros obtenidos a partir de los análisis macroscópicos y microscópicos.	68
2.28	Concentración de ADN, relación A260/280 y relación A260/230 de los distintos tratamientos del estudio definitivo.	72
3.1	Obtención de muestra de hueso por perforación a partir de material óseo depositado en colecciones de historia natural. .	94
3.2	Material recolectado en las colecciones de historia natural. .	94
3.3	Número de muestras recolectadas en las colecciones de historia natural.	100
3.4	Éxito de genotipado según categoría del año de recolección y tipo.	100
3.5	Media y desvío estándar del éxito de genotipado de las muestras analizadas.	101
3.6	Concentración del ADN extraído (ng/μl) de las muestras de <i>Lycalopex gymnocercus</i>	102

Índice de tablas

2.1	Tratamientos ensayados durante el estudio preliminar	22
2.2	Estudio preliminar: efectividad de los diferentes tratamien- tos de limpieza en el análisis macroscópico	28
2.3	Estudio preliminar: efectividad de los diferentes tratamien- tos de limpieza en el análisis con MEB	28
2.4	Tratamientos correspondientes al estudio definitivo.	38
2.5	Aspectos evaluados en el estudio definitivo y muestras destinadas a cada análisis	39
2.6	Escala cualitativa de valores establecida para los tratamien- tos del estudio definitivo	40
2.7	Valores establecidos a partir del análisis microscópico del estudio definitivo.	43
2.8	Pesos promedio (\pm desvío estándar) de los miembros asignados al Control y a los distintos tratamientos.	56
2.9	Valores asignados a las variables olor durante el proceso, textura de tejidos blandos y facilidad de remoción de tejidos blandos, en los tratamientos de digestión química y enzimática.	56
2.10	Valores para las variables relativas al ensayo de flexión en tres puntos.	70

3.1	Enfoque de amplificaciones múltiples por marcador.	96
3.2	Estadísticos de los diferentes modelos testeados sobre el éxito de genotipado.	101
3.3	Parámetros correspondientes al modelo de regresión logística de mejor ajuste a los datos.	102
B.1	Procedencia de las muestras de <i>Puma concolor</i> depositados en colecciones de historia natural	117
B.2	Procedencia de las muestras de <i>Lycalopex gymnocercus</i> depositados en colecciones de historia natural	118
E.1	Concentración de ADN por muestra.	125
F.1	Set de marcadores microsatélites y condiciones de termoci- clado para <i>Puma concolor</i>	127
F.2	Set de marcadores microsatélites y condiciones de termoci- clado para <i>Lycalopex gymnocercus</i>	128

Capítulo 1

Introducción general

Las colecciones de historia natural (CHN) representan el patrimonio biológico de un país, región o localidad, por ser fuente primaria de conocimiento y de información de la biodiversidad, tanto de tiempo pasado como presente (Cook et al., 2020; Funk, 2018; Kemp, 2015). Las mismas proporcionan material contemporáneo e histórico de utilidad a la hora de responder a una amplia gama de preguntas, que van desde los impactos del cambio climático (Moritz et al., 2008; Rowe et al., 2015; Rubidge et al., 2012), hasta el desarrollo de enfermedades emergentes (Cook et al., 2020; Di Euliis et al., 2016; Dunnum et al., 2017). Estas colecciones, además, constituyen importantes fuentes para la descripción de los organismos, su origen, evolución e interrelaciones (Carrion-Bonilla & Cook, 2020; Schiaffini et al., 2013; Wandeler et al., 2007). 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 (Dures et al., 2019; Smulders et al., 2003). Es por ello que deben ser protegidas, mantenidas y debidamente curadas, garantizando su permanencia en el tiempo. En

el caso particular de Argentina, y para materiales correspondientes a mamíferos, existen varias colecciones científicas de gran importancia, albergando en su conjunto más de 60.000 especímenes, recolectados desde mediados del siglo XIX (Barquez & Díaz, 2014).

Idealmente, las CHN deberían disponer de protocolos estandarizados de preparación de muestras biológicas, almacenamiento y conservación, tendientes a obtener resultados óptimos y comparables, y a minimizar cualquier deterioro a corto, mediano o largo plazo, preservando así los especímenes para estudios futuros (J. E. Simmons & Muñoz-Saba, 2005). Además, dichos protocolos deberían estar ajustados al grupo taxonómico y al tipo de material que se pretende obtener. Si bien en nuestro país, en múltiples ocasiones, el almacenamiento y conservación de las muestras biológicas presenta dificultades de índole económica, no es menos cierto también que existen escasos trabajos que hayan testeado los efectos de la preservación o la *performance* de los distintos tejidos dentro de un contexto comparativo. Algunas sociedades científicas han oficializado la necesidad de profundizar en el tema. Por ejemplo, la Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM) constituyó una Comisión de Colecciones Sistemáticas, y entre sus objetivos establecen la necesidad de fijar una política de manejo estandarizada para las colecciones nacionales, de proponer lineamientos de manejo y uso de las colecciones según técnicas y métodos actuales, y de favorecer el intercambio entre instituciones, investigadores y estudiantes. Entre las actividades que se están realizando en tal sentido puede mencionarse el Primer Congreso Argentino de Conservación de Colecciones Científicas, que tuvo lugar del 12 al 15 de noviembre de 2024 en las instalaciones del Museo Argentino de Ciencias

Naturales “Bernardino Rivadavia” (Ciudad Autónoma de Buenos Aires).

El notorio incremento en sensibilidad y especificidad alcanzado por las técnicas de análisis de materiales biológicos en los últimos años, ha propiciado que los protocolos y prácticas involucradas en la colecta, procesamiento y almacenamiento dieran origen a la denominada “Ciencia del Bioespecimen” (Vaught, 2016; Vaught & Henderson, 2011). En este contexto, muchas instituciones a nivel mundial están realizando esfuerzos para el establecimiento de pautas concretas, que aseguren que el manejo del material incluya un amplio rango de políticas concernientes al ejemplar, sus datos, y a la estructura física involucrada, el biorrepositorio (Vaught & Henderson, 2011). Dichas pautas son organizadas en documentos formales que hacen hincapié en la importancia de seguir pasos apropiados, que resulten en la obtención de especímenes de máxima calidad para fines de investigación. De este modo, mientras que a nivel mundial se está avanzando en la generación de estos documentos, en nuestro país nos encontramos aún con una marcada ausencia de conocimiento que sirva de base para la elaboración de los mismos.

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 está promoviendo que en las colecciones se conserven las muestras (órganos y tejidos) *in vitro*. De ahí que, además de extremarse el cuidado en los procesos de narcotización y sacrificio, los ejemplares deban ser conservados en un rango de entre -20°C y -70°C , o en depósitos de nitrógeno líquido a -176°C (Sanchiz, 1994). La conservación en estas condiciones implica el establecimiento de criocolecciones, pero el gasto económico destinado

a su mantenimiento y la infraestructura que demandan constituyen a menudo una barrera infranqueable. Esta es la situación vigente en nuestro país, donde frecuentemente la imposibilidad de contar con este tipo de materiales, obliga a que los estudios a partir de ejemplares de museo dependan casi exclusivamente de elementos esqueléticos y pieles. Para este tipo de muestras, algunos autores han sugerido una relación entre la antigüedad del espécimen y la calidad del ADN obtenido (Ellegren, 1994; Pääbo et al., 1990). Además, si bien la degradación *post mortem* del mismo es inevitable por descomposición hidrolítica y oxidativa (Latham & Miller, 2019; Lindahl, 1993; Pääbo et al., 1990), ciertos factores relativos al tratamiento aplicado a las muestras durante su obtención y conservación pueden acelerar aún más este proceso (Gallo, 2020; L. M. Hall et al., 1997; McCormack et al., 2016; Pizzano et al., 2021; Prendini et al., 2002; N. B. Simmons & Voss, 2009; Töpfer et al., 2011; Wandeler et al., 2007; Willerslev & Cooper, 2005).

Los métodos de preparación y conservación también juegan un rol preponderante en la calidad y cantidad de información que puede obtenerse en cuanto a aspectos morfohistológicos. Los daños producidos por las técnicas convencionales de preparación de dientes y huesos, por ejemplo, pueden afectar no solo a las capas superficiales (grietas, delaminación, agujeros, aumento de porosidad) sino también a la estructura histológica, llegándose en los casos más severos a la deformación o incluso a la desintegración (Fernández-Jalvo & Marín-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, resulta fundamental determinar qué

alteraciones reconocidas en materiales de colección pueden estar vinculadas a procesos y agentes naturales y cuáles están asociadas a la preparación de los mismos. Esto permite interpretar con mayor certeza la historia tafonómica de los especímenes individuales y de las asociaciones en su conjunto (Fernández-Jalvo & Andrews, 2016b).

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. Sin embargo, el hallazgo del método que rinda los mejores resultados es una preocupación constante entre investigadores, técnicos forenses y curadores, sin existir aún un consenso generalizado (Bemis et al., 2004; Fenton et al., 2003; Leeper, 2015; Mairs et al., 2004; Majeed, 2009; Rennick et al., 2005; Steadman et al., 2006).

Por lo tanto, y en respuesta al problema planteado, en esta tesis se proponen como objetivos generales evaluar los efectos de técnicas de preparación de material osteológico de mamíferos frecuentemente utilizadas en colecciones de historia natural sobre sus características morfohistológicas, la calidad del ADN y las propiedades biomecánicas, a fin de establecer protocolos que optimicen su uso en investigación y docencia. A su vez, se plantea evaluar la cantidad y calidad del ADN de tejidos provenientes de especímenes de mamíferos depositados en colecciones de historia natural de Argentina, en función de su viabilidad para realizar estudios genéticos.

1.1. Objetivos específicos

1. Comparar distintas técnicas comúnmente utilizadas en las colecciones de historia natural para la preparación de material esquelético de mamíferos (enterramiento, digestión química, digestión enzimática, exposición a agentes biológicos), en términos de eficacia de remoción de tejidos blandos.
2. Analizar las ventajas y desventajas de las distintas técnicas ensayadas.
3. Evaluar los efectos de estas técnicas de preparación sobre las características morfohistológicas, las propiedades biomecánicas y la cantidad y calidad del ADN de huesos de mamíferos.
4. Evaluar la calidad del ADN extraído de tejidos comúnmente requeridos por investigadores (cuero y hueso) de dos especímenes de carnívoros depositados en colecciones de historia natural de Argentina, a fin de determinar las características del material que aseguren un mayor éxito en la obtención de información genética.
5. Evaluar la relación entre la antigüedad del espécimen, el tipo de muestra colectada, la concentración de ADN histórico extraído y la calidad del mismo.
6. Sentar las bases para la generación de protocolos que puedan ser establecidos como documentos formales para la preparación y conservación de especímenes de mamíferos, destinados a colecciones de investigación y docencia.

1.2. Hipótesis de trabajo

H1- Las diferentes técnicas para la preparación de material esquelético de mamíferos producen diferentes rendimientos en la remoción de tejidos blandos. Se postula que los mejores resultados en el grado de limpieza se obtienen en primer lugar por digestión química, en segundo lugar por tratamiento enzimático y, en última instancia, por enterramiento y exposición a agentes biológicos.

H2- Las distintas técnicas de preparación de material esquelético pueden provocar alteraciones en las características morfohistológicas del tejido óseo. Se postula que la magnitud de las alteraciones ocasionadas está inversamente relacionada con el grado de limpieza obtenido.

H3- Las altas temperaturas provocan desnaturalización del colágeno, efecto que se incrementa en el tiempo. Se postula que, en tratamientos por inmersión de huesos en agentes químicos y enzimáticos, se obtienen mejores resultados utilizando concentraciones más elevadas de los agentes a menor temperatura, que bajas concentraciones a mayor temperatura.

H4- La variación de los valores de pH del agua puede afectar la composición química del tejido óseo, tanto de sus componentes minerales como orgánicos. Se postula que las propiedades biomecánicas de los elementos esqueléticos resultarán más alteradas en los tratamientos de digestión química con un álcali fuerte que en los de enterramiento, digestión enzimática y exposición a agentes biológicos.

H5- La preparación de material esquelético de mamíferos mediante el uso de agentes químicos puede provocar una degradación del material genético contenido en él. Se postula que el enterramiento y la exposición a agentes biológicos permiten obtener ADN en mayor concentración y

pureza, y con menor nivel de contaminación, en comparación con métodos de limpieza química y enzimática.

H6- Los distintos tratamientos a los que son sometidos los ejemplares de museo para su conservación y exposición tienen un efecto significativo en la calidad y cantidad del ADN que pueda extraerse posteriormente de ellos. Se postula que, tanto para huesos como para pieles de mamíferos, la mejor forma de conservar la calidad del ADN es manteniendo la muestra libre de tratamiento químico, en un ambiente seco y en ausencia de luz.

H7- Los inevitables procesos de degradación del ADN *post mortem* vía descomposición hidrolítica y oxidativa se encuentran bien descritos. Por esto, se postula que el éxito en la obtención de un genotipo a partir de un espécimen de museo estará negativamente correlacionado con el tiempo que el material lleva depositado en la colección.

H8- El ADN contenido en la matriz ósea está mejor protegido que el que se encuentra en el epitelio, motivo por el cual las muestras provenientes de huesos tienden a producir tasas de amplificación más altas y con menos errores de genotipado. Se postula que el éxito de genotipado (en especímenes de antigüedad equivalente) será mayor en muestras procedentes de tejido óseo por sobre las de pieles.

Capítulo 2

Efectos de técnicas de limpieza de uso común en colecciones de historia natural sobre huesos de mamíferos

2.1. Introducción

A lo largo de la historia, las personas han conservado distintos tipos de elementos con diferentes objetivos. Desde la prehistoria, existen registros de la conservación de piezas por parte de diferentes culturas, como vasijas y utensilios de cocina. Pero con el tiempo, empezó a surgir la necesidad de guardar no solo objetos que podrían tener un fin utilitario, sino también de conservar cadáveres en forma de momias. De todas las culturas conocidas, fueron los egipcios los que se especializaron en esta temática y explotaron la momificación artificial con gran detalle, porque para ellos era trascendental conservar las características que mostraban las personas en vida. Las momias egipcias datan del 500 AC, pero no son las más antiguas: las de la cultura sudamericana Chinchorro datan del 7800 AC (Lynnerup, 2007).

La preservación de cadáveres por momificación no continuó su desarrollo al entrar en la Edad Media. Durante las Cruzadas, se tornó común hervir

los restos de seres humanos que morían en batalla (usualmente nobles), para facilitar el transporte de los mismos y enterrarlos en su lugar de origen. Esto ocasionó que el Papa Bonifacio VIII emitiera una bula papal en 1299, y luego otra en 1300, amenazando con la excomunión de aquellas personas que incurrieran en esa práctica (Leeper, 2015). Si bien esta bula no hablaba del uso de restos cadavéricos para el estudio anatómico, perjudicó el trabajo de los anatomistas, quienes empezaron a dudar en realizar disecciones (Leeper, 2015). Tal es así, que en 1482 un anatomista de la Universidad de Tübingen, en Alemania, solicitó permiso al Papa Sixto IV para realizar una disección (Leeper, 2015).

En 1543, todavía con la bula papal vigente, se publica *De Humani Corporis Fabrica*, donde Andreas Vesalius describe por primera vez un método de limpieza de huesos, que consistía en hervir los restos en una olla con agua común (Leeper, 2015). Este método de limpieza ha perdurado en la historia y se sigue usando en la actualidad, aunque se han desarrollado muchos otros (Fenton et al., 2003; Leeper, 2015; Mairs et al., 2004; Steadman et al., 2006; Thompson, 2015)

Con el advenimiento de la Ilustración en el siglo XVIII, resurgieron las prácticas olvidadas y la idea de compartir el conocimiento. Al alejarse el trabajo con cadáveres de la connotación religiosa, aumentó la necesidad de restos humanos para la creciente educación científica que se estaba produciendo. Para el siglo XIX, el interés en las técnicas de limpieza de huesos se asoció a la necesidad de crear colecciones de cráneos para los estudios craneométricos, y dicho interés se trasladó posteriormente a curadores de museos, anatomistas y taxidermistas, quienes comenzaron a publicar las metodologías que desarrollaban (Couse & Connor, 2015;

Steadman et al., 2006).

En la búsqueda de la técnica perfecta de limpieza de material osteológico, se presentan muchos factores a considerar según el resultado que se quiera obtener, como por ejemplo el tipo de animal a preparar, su tamaño e incluso cuál será el uso que se le dará (Husch et al., 2021). En un museo, el objetivo puede ser obtener piezas de exhibición, pero para las ciencias morfológicas y médicas el objetivo suele ser académico o científico, y para ello los huesos no deberían presentar daños superficiales, ni alteraciones en su estructura interna o en su material genético (Husch et al., 2021; Thompson, 2015). En el caso del ADN, por ejemplo, y tal como se mencionó en el capítulo anterior, la degradación *post mortem* es inevitable por descomposición hidrolítica y oxidativa (Latham & Miller, 2019; Lindahl, 1993; Pääbo et al., 1990), pero ciertos factores pueden acelerar aún más este proceso. 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 (Gallo, 2020; L. M. Hall et al., 1997; Pizzano et al., 2021; Prendini et al., 2002; N. B. Simmons & Voss, 2009; Töpfer et al., 2011; Wandeler et al., 2007; Willerslev & Cooper, 2005).

Existen muchos métodos para remover los tejidos blandos de los huesos, pero la falta de lineamientos estandarizados provoca que cada persona prepare el material según sus conocimientos o las costumbres del lugar donde trabaje, sin que ello asegure el mejor resultado posible (Leeper, 2015; Muñoz-Saba et al., 2020). Entre todas las técnicas de uso habitual, algunos establecimientos recurren a la descomposición cadavérica, proceso natural asociado a la degradación de los tejidos como producto de la autólisis

celular; la ventaja de esta metodología es que no conlleva trabajo manual ni el uso de ningún tipo de sustancia (Leeper, 2015). Pese a esto, no es una de las técnicas más recomendadas porque la descomposición produce olores desagradables, y la obtención de los huesos limpios puede demandar mucho tiempo (Leeper, 2015). Una forma de evitar estos problemas es la de enterrar los restos, pero esto aumenta el riesgo de perder piezas (Leeper, 2015).

El uso del agua como medio para eliminar los restos de tejidos blandos (maceración), es otro de los métodos seguros para limpiar huesos, porque tampoco involucra el uso de químicos (Steadman et al., 2006). Sin embargo, puede demandar desde semanas a meses según el tamaño de los restos (Fenton et al., 2003; Leeper, 2015), al tiempo que produce un olor nauseabundo (Steadman et al., 2006). Una alternativa para acelerar el proceso es aumentar la temperatura del agua para favorecer la proliferación bacteriana (Husch et al., 2021; Leeper, 2015; Maidment & Williams, 2023; Steadman et al., 2006), pero dicha proliferación puede provocar pérdidas de material orgánico, especialmente colágeno (C. I. Smith et al., 2002) y ADN (Jans, 2008). El ataque bacteriano puede frenarse sometiendo el hueso a ebullición durante algunas horas; sin embargo, ello puede alterar la estructura del tejido, provocando fragmentación de las fibras de colágeno y desnaturalización del ADN (Leeper, 2015), como así también aumento de la porosidad, lo que debilita al hueso (Ural & Vashishth, 2007; Yeni et al., 1997), y posibilita el acúmulo de tierra con el paso del tiempo (Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008; Husch et al., 2021; Maidment & Williams, 2023; Schwartz, 1977).

En el intento por disminuir los tiempos asociados a la limpieza de restos,

surgió la alternativa de combinar diferentes sustancias químicas con agua caliente, para lograr la maceración en cuestión de horas (Botero-González & Agudelo, 2019; Fenton et al., 2003). Estas técnicas permiten además disminuir los olores, desengrasar los huesos o incluso blanquearlos (Leeper, 2015). Entre las sustancias más utilizadas se encuentran el hipoclorito de sodio (conocido en nuestro país como lavandina) y el hidróxido de sodio (soda cáustica). Ambos compuestos son poco costosos, fáciles de obtener, y actúan por medio de la oxidación, desnaturalizando proteínas de microorganismos, por lo que juegan un papel importante también como desinfectantes (Leeper, 2015). Otro agente utilizado es el hidróxido de potasio que, como toda sustancia alcalina, actúa rompiendo el colágeno y otras proteínas (Collins et al., 2002; Steadman et al., 2006; White & Folkens, 2005); Fernández-Jalvo & Marín Monfort (2008) reportan buenos resultados con su uso y sugieren que podría ofrecer la ventaja adicional de preservar el ADN, pero no existen estudios concluyentes al respecto. Cualquiera sea el producto químico que se utilice, debe tenerse en cuenta que una exposición prolongada puede generar también la desmineralización del hueso, incrementando la fragilidad y la pérdida de integridad (Botero-González & Agudelo, 2019; Couse & Connor, 2015; Fenton et al., 2003; Mori, 1970; Steadman et al., 2006; Thompson, 2015). Además, el uso de los mismos conlleva la necesidad de extremar los cuidados en su manipulación, dado que pueden ser altamente corrosivos.

Otra forma de acelerar los tiempos de limpieza implica el uso de enzimas (Husch et al., 2021; Mairs et al., 2004; Thompson, 2015). Las enzimas proteolíticas inducen la hidrólisis de los enlaces peptídicos, actuando principalmente a nivel de los restos de músculos y tejidos

conectivos blandos (Leeper, 2015). Como toda enzima, tienen un rango de temperatura en el cual están activas, por lo que se deben tomar precauciones para evitar su desnaturalización (Leeper, 2015). Con el uso de estos productos se obtienen 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 (Fenton et al., 2003; Maidment & Williams, 2023; Mori, 1970). Las enzimas más utilizadas son papaína, pepsina, pancreatina y tripsina (Leeper, 2015), pero dichos productos resultan costosos y desprenden fuertes olores que pueden resultar irritantes para la mucosa olfatoria (Mairs et al., 2004). Para minimizar o evitar estos inconvenientes, se ha propuesto la utilización de detergentes comerciales para la ropa, a base de enzimas (Austin & Fulginiti, 2008; Leeper, 2015; Mairs et al., 2004; Mooney et al., 1982), que constituyen una opción económica, de fácil acceso y manipulación, al tiempo que disminuyen el desprendimiento de olores desagradables o irritantes (Leeper, 2015; Maidment & Williams, 2023; Mairs et al., 2004). El problema que se genera con estos productos es que no se conoce con exactitud su composición, lo que conlleva a un riesgo potencial de descalcificación ósea o ablandamiento (Thompson, 2015). Tampoco se conocen sus efectos sobre la calidad del ADN, pero se ha reportado disminución de las posibilidades de realizar investigaciones relacionadas al proteoma, metaboloma y lipidoma de los huesos sometidos a maceración con detergentes (Bonicelli et al., 2022; Maidment & Williams, 2023).

Un método que acelera la limpieza de huesos, pero que no implica la utilización de químicos ni enzimas, es el uso de invertebrados necrófagos (Barquez et al., 2021; Díaz et al., 1998; Fenton et al., 2003; Leeper,

2015; Muñoz-Saba et al., 2020; Pahl, 2020; Schwartz, 1977; Steadman et al., 2006). Entre las especies utilizadas, se encuentran estadios larvales y adultos de derméstidos, tenebrios, moscas, polillas, isópodos, crustáceos marinos y hormigas (Fenton et al., 2003; Leeper, 2015; Majeed, 2009; Pahl, 2020; Steadman et al., 2006). Los derméstidos constituyen una de las alternativas más utilizadas en las colecciones (Husch et al., 2021; Pahl, 2020). El primer registro de su uso se remonta a 1895, en el Museo de Historia Natural de Kansas (Pahl, 2020); sin embargo, se necesitaron casi 40 años para que el procedimiento fuera comunicado en la revista *Journal of Mammalogy* (E. R. Hall & Russell, 1933). Entre las ventajas que se destacan con el uso de esta especie, está la posibilidad de obtener esqueletos completamente articulados, si el material se remueve a tiempo (Leeper, 2015). La desarticulación que puede ocurrir por la sobreexposición se debe a que se alimentan primero del tejido blando y luego del cartílago, pudiendo eventualmente carcomer también el hueso (Schwartz, 1977). Otras desventajas reportadas en la literatura para esta técnica son la retención de olores en el material, el tiempo necesario para conseguir un esqueleto limpio, el mantenimiento que requieren las colonias (Fenton et al., 2003; Leeper, 2015), las marcas que pueden quedar en la superficie ósea por acción de las poderosas mandíbulas de estos coleópteros (Husch et al., 2021; Leeper, 2015) y la necesidad de desinfección posterior de las piezas obtenidas, puesto que estos animales pueden vivir dentro del hueso por semanas (Pahl, 2020; Steadman et al., 2006). La desinfección implica la utilización de baños de alcohol, el guardado en freezer o la cuarentena del material (Pahl, 2020; Steadman et al., 2006). Una alternativa al uso de derméstidos son los tenebrios, reportados como una opción más económica

y, sobre todo, sin el riesgo de infestación ósea (Jara & Urrea, 2022; Steadman et al., 2006).

Cuando se evalúan los efectos que pueden ocasionar las distintas técnicas de limpieza sobre los materiales óseos, un aspecto que habitualmente no se considera es la posibilidad de alteración en las propiedades biomecánicas de los mismos. En efecto, cualquier procedimiento que altere su composición u ocasione daño en la superficie puede también provocar un aumento de la porosidad en la capa cortical, parámetro que está inversamente relacionado con la rigidez (Schaffler & Burr, 1988), con la resistencia a la fractura (Ural & Vashishth, 2007; Yeni et al., 1997). Por lo tanto, si el tratamiento es agresivo, puede traducirse en una modificación en la forma en que los elementos esqueléticos responden a la aplicación de fuerzas externas o internas.

Las fuerzas (o cargas) a las que pueden verse sometidos los elementos esqueléticos de un organismo son variadas (Fig. 2.1), y el comportamiento mecánico de los mismos depende no solo de la heterogeneidad y anisotropía de la estructura ósea (Rincón et al., 2004), sino también del estado de hidratación del tejido o de las distintas condiciones a las que se hayan visto expuestos (Marín-Monfort et al., 2014; Nyman et al., 2006; Sasaki & Enyo, 1995; Timmins & Wall, 1977). Con base en ello, existen distintos tipos de estudios a los que pueden someterse los huesos enteros para conocer su comportamiento biomecánico, basados en la aplicación de fuerzas uniaxiales de magnitud conocida y la evaluación de la respuesta obtenida. Estas pruebas asumen que el hueso es un tubo hueco perfecto, es decir, ignoran su heterogeneidad y la complejidad de su geometría, la cual resulta de la combinación de los dos tipos estructurales de tejido

óseo, el esponjoso o trabecular, y el compacto o cortical. Mientras que el primero de ellos es adecuado para resistir fuerzas de compresión y tensión, el cortical es más adecuado para resistir la flexión, torsión y cizallamiento (Comin et al., 1999; Flores-Rentería et al., 2018). Por ende, la predicción del comportamiento mecánico de un hueso como estructura completa es compleja, puesto que es el resultado de las propiedades materiales de cada uno de sus componentes, sumado a su distribución geométrica en el espacio (Guede et al., 2013). Esto implica que la información obtenida es solo aproximada; sin embargo, es la metodología más utilizada para estimar las propiedades mecánicas del hueso entero, resultando de utilidad en el análisis de los efectos que pueden provocar factores como la dieta, edad, drogas, enfermedades osteodegenerativas, etc. (Bektas et al., 2023; Brun et al., 2015; Caeiro et al., 2013; Caeiro Rey et al., 2005; Granke et al., 2015; Khan et al., 2021; Prisby et al., 2008; Sheu et al., 2011).

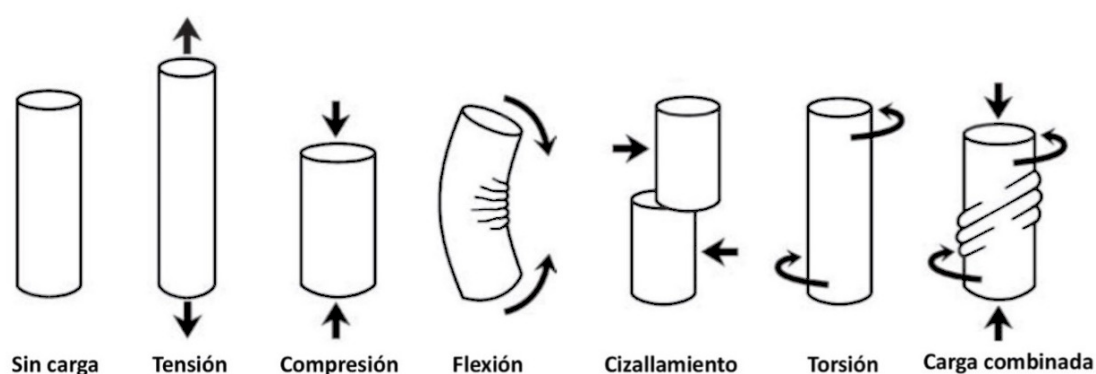


Figura 2.1: tipos de fuerza (flechas negras) que pueden operar sobre un hueso. Adaptado de Skedros (2012).

A partir de todo lo expuesto, queda claro que los métodos de preparación de materiales osteológicos juegan un rol preponderante en la durabilidad de los mismos, y en la calidad y cantidad de información que puede obtenerse a partir de ellos. Diversos autores han hecho esfuerzos para recopilar la información disponible acerca de las distintas técnicas

utilizadas habitualmente a tal fin (Botero-González & Agudelo, 2019; Couse & Connor, 2015; Díaz et al., 1998; Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008; L. M. Hall et al., 1997; Husch et al., 2021; Leeper, 2015; Pahl, 2020; Schwartz, 1977; N. B. Simmons & Voss, 2009; Steadman et al., 2006; Thompson, 2015, entre otros). En dichas compilaciones hay un intento por comparar los métodos aplicados y los resultados obtenidos, como así también las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. Sin embargo, las comparaciones carecen generalmente de validez porque los protocolos de limpieza pueden presentar variantes de una misma técnica, o han sido aplicados en materiales osteológicos diversos, no solo en cuanto al componente esquelético utilizado, sino también en cuanto al grupo taxonómico de procedencia. Por tal motivo, y en ausencia de estudios profundos al respecto, el objetivo del presente capítulo fue aplicar diferentes técnicas de limpieza (agrupadas en cuatro categorías: enterramiento, digestión química, digestión enzimática y digestión biológica) sobre huesos largos de mamífero, y analizar los efectos de las mismas a nivel morfohistológico, genético y biomecánico.

2.2. Estudio preliminar

Dada la gran cantidad de combinaciones que pueden ser utilizadas para cada categoría de técnica de limpieza, se realizó un estudio preliminar, de carácter exploratorio, que permitiera evaluar las alternativas más adecuadas en cuanto a la duración de los períodos de enterramiento, y a las combinaciones de tiempo-concentración-temperatura para los tratamientos de digestión química y enzimática.

2.2.1. Obtención del material y tratamientos ensayados

Se utilizaron 62 ratas Wistar (peso corporal total $306,53 \pm 55,10$ g). Las mismas procedieron del descarte de animales control (no sometidos a tratamientos químicos ni infección con patógenos), de proyectos de investigación en curso en los laboratorios del Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR-CONICET) y del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (BByF, UNS), en el marco del protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE-BByF-UNS, Protocolo N° 181/2021, Res CDBByF 671/21). Los animales fueron eutanasiados por inhalación de CO₂, y posteriormente sometidos a disección para aislar las extremidades traseras (N=124). Luego se procedió a la remoción del tegumento y de la mayor parte de la grasa y del tejido muscular con elementos de disección, procurando no tocar los huesos para evitar dañar su superficie (Fig. 2.2).

Del total de extremidades obtenidas, se reservaron dos como Control, que fueron simplemente lavadas con agua corriente y dejadas secar al aire, cubiertas con una muselina para resguardarlas de los insectos. Las restantes muestras fueron destinadas a los tratamientos, los cuales se establecieron teniendo en cuenta la combinación de condiciones para cada una de las técnicas implementadas, la propia experiencia de nuestro grupo de trabajo y los reportes bibliográficos (Austin & Fulginiti, 2008; Botero-González & Agudelo, 2019; Fenton et al., 2003; Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008; Leeper, 2015; Mairs et al., 2004; Miller & Tarpley, 1996; Mooney et al., 1982; Ossian, 1970; Thompson, 2015). El enterramiento se realizó en una parcela natural, colocando las muestras dentro de bolsas individuales

de red de poliamida (tamaño de malla: 1 mm) por períodos variables (Tabla 2.1). Para los tratamientos basados en digestión química se utilizó hidróxido de potasio (KOH), mientras que para la digestión enzimática se usó un detergente comercial para ropa a base de enzimas (*Skip®Bio-Enzymes Liquid Soap*). Las soluciones se prepararon con agua destilada, y se trabajó en estufa con control de temperatura, utilizando recipientes de vidrio cubiertos con papel de aluminio para evitar la evaporación (Tabla 2.1).

Al finalizar los tratamientos, los huesos recuperados se lavaron cuidadosamente con agua corriente, eliminando solo el tejido flojo adherido a la superficie con la ayuda de un cepillo de cerda suave, y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secos, se guardaron en bolsas de plástico con cierre de tipo zipper, debidamente identificadas.

2.2.2. Parámetros registrados

La efectividad de los distintos tratamientos en la remoción de tejidos blandos fue evaluada macroscópicamente en la totalidad de las muestras, estableciéndose una escala de tres niveles (Bueno: 0-20 % de restos de tejidos blandos; Regular: 21-50 %; Malo: 51-100 %).

El efecto de las distintas técnicas implementadas sobre el hueso fue analizado a nivel de la estructura interna y de la superficie ósea, mediante análisis histológicos de rutina y microscopía electrónica de barrido (MEB), respectivamente. Para ello se seleccionaron al azar dos fémures (derecho e izquierdo) por tratamiento, y se aisló la sección proximal de cada uno de ellos, consistente en la epífisis y parte de la diáfisis. Se utilizó a este fin un torno de dentista (16000 RPM, $\frac{1}{4}$ HP), equipado con fresa de corte de hoja

delgada.

Para el estudio de la estructura histológica se utilizaron las secciones de los fémures izquierdos. Las mismas fueron procesadas mediante técnicas de rutina, que incluyeron deshidratación en serie de alcoholes de concentración creciente, inclusión en Paraplast®), cortes realizados con micrótopo rotatorio (Leica RM 2145; 5-7 μm) y coloraciones con tricrómico de Masson, hematoxilina-eosina y tricrómico de Gomori. Las piezas se orientaron en el taco para obtener cortes longitudinales al eje mayor del hueso. Las observaciones y fotografías se llevaron a cabo con un microscopio óptico Leica DM500 equipado con una cámara Leica ICC50W.

El análisis de la superficie ósea mediante MEB se realizó en las secciones de los fémures derechos, que fueron procesadas y fotografiadas en su cara anterior mediante un microscopio SEM LEO EVO 40 XVP-EDS OXFORD X-MAX 50, en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro Científico Tecnológico (CCT-CONICET, Bahía Blanca). Las muestras se analizaron en términos de preservación (ausencia de signos de daño como delaminación superficial, agrietamiento y porosidad) y limpieza. Esto último se evaluó utilizando fotografías de idéntico aumento (25X), a las cuales se les superpuso una grilla de 1x1 cm, lo que permitió registrar la superficie ósea cubierta por residuos (Fig. 2.3). Para comparar adecuadamente los resultados, se consideró en todos los casos la misma región de la epífisis proximal, que incluía la cabeza femoral, el cuello y todo el trocánter mayor. No se tuvieron en cuenta los restos orgánicos que sobresalían de la superficie del hueso. Según el porcentaje de superficie ósea ocupada por restos de tejido blando, la efectividad de los tratamientos se clasificó según la misma escala utilizada en el análisis macroscópico

Tabla 2.1: tratamientos ensayados durante el estudio preliminar. Se indica en cada caso el número de miembros utilizados (N), la duración del tratamiento (h: horas; d: días), como así también la concentración (%) y la temperatura (°C) en los ensayos de digestión química (KOH) y enzimática (EZ).

Método de limpieza	Descripción		Código de tratamiento	N
Enterramiento	A 15 cm de profundidad en suelo franco, y no sometido a riego	30 d	E/30	6
		45 d	E/45	6
		50 d	E/50	8
		60 d	E/60	10
Digestión química	Solución acuosa de KOH	5 %/1 h/25°C	KOH5 %/1h/25C	4
		5 %/1 h/40°C	KOH5 %/1h/40C	4
		5 %/2 h/25°C	KOH5 %/2h/25C	4
		5 %/2 h/40°C	KOH5 %/2h/40C	4
		5 %/4 h/40°C	KOH5 %/4h/40C	6
		10 %/2 h/40°C	KOH10 %/2h/40C	6
Digestión enzimática	Solución acuosa de detergente comercial <i>Skip®Bio-Enzymes Liquid Soap</i>	10 %/2 h/70°C	EZ10 %/2h/70C	10
		10 %/4 h/50°C	EZ10 %/4h/50C	8
		10 %/24 h/25°C	EZ10 %/24h/25C	4
		10 %/70 h/5°C	EZ10 %/70h/5C	4
		10 %/70 h/25°C	EZ10 %/70h/25C	6
		15 %/2 h/70°C	EZ15 %/2h/70C	10
		15 %/4 h/50°C	EZ15 %/4h/50C	8
		15 %/24 h/25°C	EZ15 %/24h/25C	4
		15 %/70 h/5°C	EZ15 %/70h/5C	4
		15 %/70 h/25°C	EZ15 %/70h/25C	6

(Bueno: 0-20 %; Regular: 21-50 %; Malo: 51-100 %).

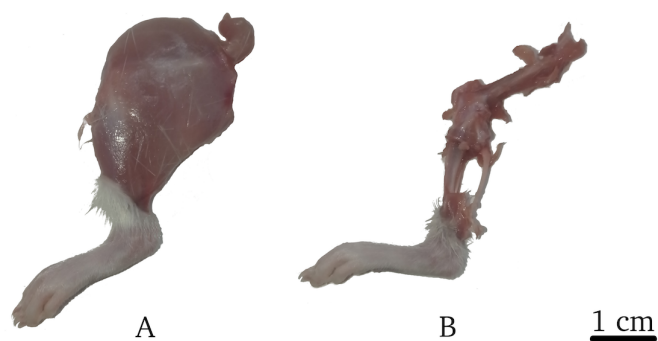


Figura 2.2: estudio preliminar: miembro posterior de rata Wistar luego de la remoción del tegumento (A) y de parte de la grasa y tejido muscular (B).

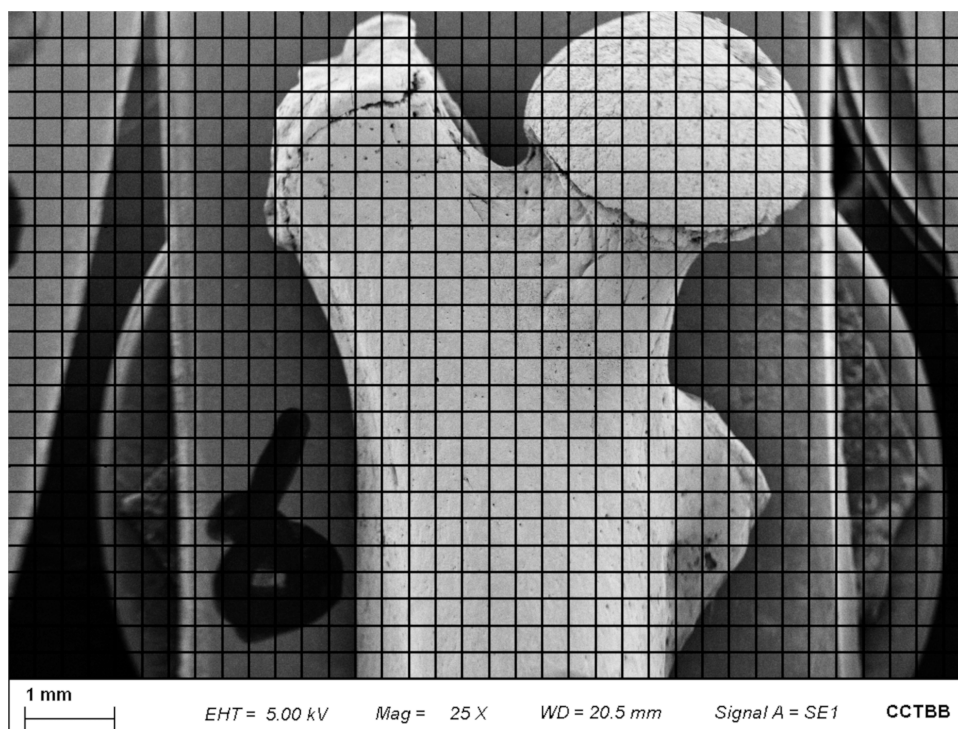


Figura 2.3: estudio preliminar: detalle de la grilla de 1x1 cm utilizada para el cálculo de la superficie ósea ocupada por restos de tejido blando, a partir de una imagen de la epífisis proximal de fémur derecho de rata (cara anterior), obtenida por MEB (25X).

2.2.3. Resultados

El análisis macroscópico reveló diferencias en el grado de limpieza obtenido con los distintos tratamientos (Tabla 2.2; Fig. 2.4).

La efectividad de los tratamientos en cuanto a limpieza del material, analizada a partir de las imágenes de MEB, coincidió en general con lo observado en la evaluación macroscópica, aunque permitió establecer un

ranking para cada uno de los niveles de la escala (Tabla 2.3). Sin embargo, el grado de detalle que se consiguió con este estudio puso en evidencia el efecto deletéreo de algunos de los tratamientos sobre la superficie ósea, aspectos que no se detectaron en las observaciones a simple vista.

En las muestras asignadas al Control, persistieron restos blandos fundamentalmente en las zonas de inserción muscular, y no se evidenciaron síntomas de daño en la superficie ósea. Tampoco se detectaron alteraciones de la estructura histológica, conservándose intactos no solo el tejido óseo sino también el cartílago articular y los discos epifisarios (Fig. 2.5).

Los tratamientos de enterramiento, si bien fueron los más efectivos para lograr la remoción de tejidos blandos (Tabla 2.3), provocaron daños importantes en superficie y en la estructura histológica. El deterioro fue más marcado en E/60, dado que todo el fragmento analizado presentó fuertes síntomas de debilitamiento general (Fig. 2.6 A), con alto grado de porosidad y agrietamiento, así como surcos de tipo dendrítico y fisuras en la base de la cabeza femoral y en el trocánter mayor (Fig. 2.6 B, C). Cabe mencionar, además, que se observaron raíces muy pequeñas en contacto con los huesos desenterrados, y varios ejemplares de milpiés pertenecientes al Orden Julida (Myriapoda, Diplopoda)¹ movilizándose sobre la superficie de algunos de ellos. Respecto del análisis histológico (Fig. 2.6 D, E, F), se observó deterioro a nivel del cartílago articular y del disco epifisario, coincidiendo con el daño registrado en MEB. Los restos de médula ósea fueron, asimismo, escasos.

Para la digestión química con KOH, los tratamientos más agresivos (KOH10 %/2h/40C y KOH5 %/4h/40C) dieron muy buenos resultados en

¹Identificación realizada por la Dra. Natalia Stefanazzi, docente de la cátedra Zoología de Invertebrados II (Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur).

cuanto a limpieza (Tabla 2.3). En ambos casos, solo se observaron escasos restos de tejido blando adheridos principalmente al trocánter mayor, que es el sitio de inserción de algunos de los músculos rotadores de la cadera (*M. obturator externus*, *M. obturator internus* y *M. gemellus*; Charles et al., 2016). Sin embargo, el efecto perjudicial sobre la superficie fue importante. De ambos tratamientos, KOH5 %/4h/40C fue el que ocasionó mayor daño, a pesar de que la temperatura fue la misma y la concentración la mitad que en la otra combinación, observándose una porosidad anormal en la base del trocánter mayor, así como algunas zonas de delaminación ósea (Fig. 2.7 A, B, C). Sin embargo, el daño no fue generalizado, como quedó evidenciado no solo en las imágenes de MEB, sino también a partir del análisis histológico, dado que la estructura ósea permaneció relativamente intacta en la cabeza, cuello y diáfisis, con pequeñas alteraciones a nivel del cartílago articular (Fig. 2.7 D, E, F).

Con las otras combinaciones de KOH, el grado de limpieza logrado fue sustancialmente menor (Tabla 2.3), con restos de tejido blando obstruyendo completamente la fosa trocantérica y cubriendo los trocánteres en algunos casos (Figs. 2.8 y 2.9). Aunque en las imágenes de MEB se observaron grietas dispersas y cierto grado de porosidad y delaminación en las áreas limpias de las muestras, no se pudo dilucidar el efecto real de los tratamientos sobre la integridad ósea porque la mayor proporción de grasa y músculo impidió la visualización de parte de la superficie. Sin embargo, a partir del estudio histológico se observó que la estructura ósea y cartilaginosa se mantuvieron relativamente intactas, posiblemente debido a un efecto protector de los restos blandos sobre la superficie ósea (Figs. 2.8 B, E y 2.9 B, E).

Los tratamientos de digestión enzimática (Figs. 2.10 y 2.11) generalmente produjeron menos daño a la superficie ósea que el enterramiento y la exposición a KOH, considerando que no se observaron grietas ni delaminaciones en ninguna de las áreas limpias del hueso, y que solo se confirmó porosidad en zonas acotadas de algunas de las combinaciones más agresivas (Fig. 2.11 D). Sin embargo, los resultados en cuanto a limpieza fueron peores, ya que para lograr una eliminación de tejidos blandos superior al 50 % ($\geq 49\%$ de restos) fue necesario someter el material, como mínimo, a 50°C (Tabla 2.3). En los tratamientos menos eficientes, los restos blandos no solo ocuparon la mayor parte de las epífisis, sino que también se extendieron sobre la porción proximal de la diáfisis y se adhirieron firmemente a la superficie ósea (Fig. 2.10 A, B y 2.11 A). En cuanto a la estructura histológica del tejido óseo, el daño fue mayor en los tratamientos de mayor duración y menor temperatura (70 horas a 25°C; Fig. 2.10) que en los de menor duración y mayor temperatura (2 horas a 70°C; Fig. 2.11). Sin embargo, en el primer caso la médula ósea fue eliminada por completo (Fig. 2.11), mientras que en el segundo persistieron algunos restos (Fig. 2.10 C, F).

La información obtenida en este estudio fue valiosa como punto de partida para definir los tratamientos y análisis a realizar en el estudio definitivo. En este marco, se delinearon tratamientos de limpieza de material óseo basados en nuevas combinaciones de factores, y se agregó la digestión biológica por medio de tenebrios. Se estableció asimismo qué análisis debían ser repetidos (MEB de la superficie ósea), y qué variables no consideradas en el estudio preliminar debían ser analizadas; dentro de estas últimas, se incluyó una evaluación de las ventajas y desventajas

de las técnicas de limpieza implementadas, el estudio de las propiedades biomecánicas de los huesos sometidos a los distintos tratamientos, y el análisis de la cantidad y calidad de ADN presente en ellos. Cabe aclarar que, si bien no se realizó el análisis de la estructura histológica del material óseo, los parámetros biomecánicos obtenidos fueron indicativos de la alteración producida por los tratamientos en dicha estructura, teniendo en cuenta la estrecha relación que existe entre ellos (Evans, 1976; Ma et al., 2022; Morgan & Buxsein, 2008; Velnar et al., 2015). Los aspectos relativos a esta etapa del trabajo se abordan en la siguiente sección (2.3).

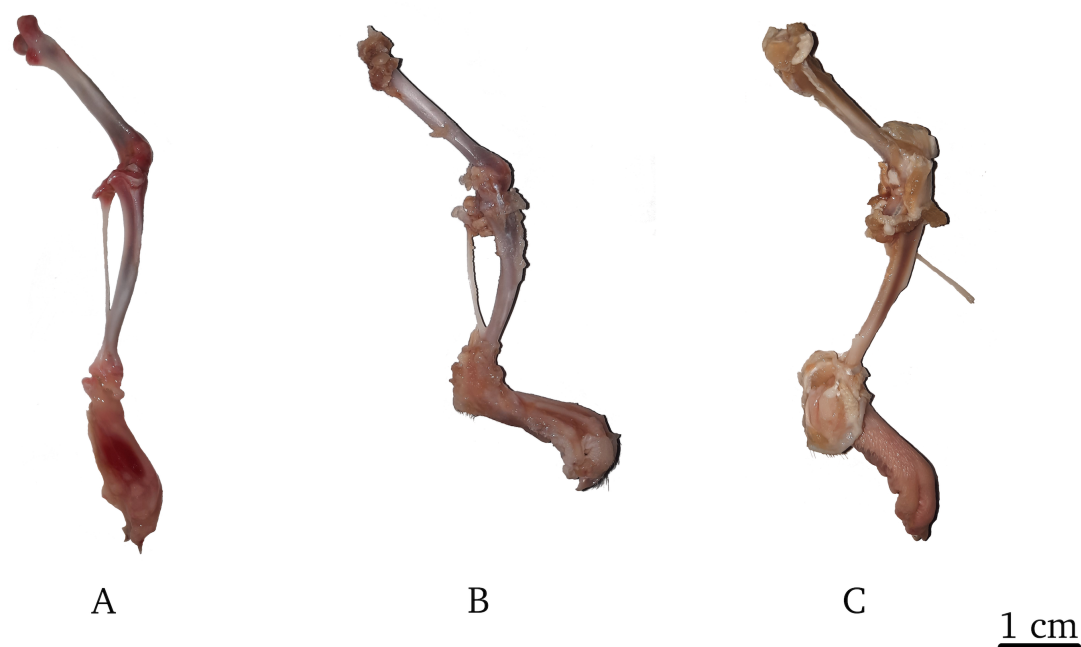


Figura 2.4: miembros posteriores de rata luego de la finalización de los tratamientos de limpieza del estudio preliminar, donde se observan diferentes niveles de remoción de tejido blando (A: Bueno, B: Regular, C: Malo).

Tabla 2.2: estudio preliminar: efectividad de los diferentes tratamientos de limpieza sobre fémures de ratas Wistar, clasificados en tres niveles según el porcentaje de restos blandos observados en el análisis macroscópico

Efectividad	Cantidad de tejidos blandos remanentes	Tratamiento
Bueno	0-20 %	E/60 - E/50 - E/45 - E/30 KOH10 %/2h/40C - KOH5 %/4h/40C - KOH5 %/2h/40C - EZ10 %/2h/70C
Regular	21-50 %	KOH5 %/2h/25C - KOH5 %/1h/40C - EZ15 %/4h/50C - EZ15 %/2h/70C - EZ10 %/4h/50C -
Malo	51-100 %	KOH5 %/1h/25C - EZ15 %/70h/25C - EZ15 %/70h/5C - EZ15 %/24h/25C - EZ10 %/70h/25C - EZ10 %/70h/5C - EZ10 %/24h/25C

Tabla 2.3: estudio preliminar: efectividad de los diferentes tratamientos de limpieza sobre fémures de ratas Wistar, clasificados en tres niveles y ordenados en forma creciente según el porcentaje de restos blandos observados con MEB (Bueno: 0-20 %; Regular: 21-50 %; Malo: 51-100 %).

Efectividad	Tratamiento	Tejidos blandos remanentes (%)
Bueno	E/60	0
	E/50	0
	E/45	1
	E/30	2
	KOH10 %/2h/40C	4
	KOH5 %/4h/40C	5
	KOH5 %/2h/40C	19
	EZ10 %/2h/70C	20
Regular	KOH5 %/2h/25C	23
	EZ15 %/2h/70C	31
	EZ15 %/4h/50C	40
	EZ10 %/4h/50C	45
	KOH5 %/1h/40C	45
	EZ10 %/70h/25C	70
Malo	KOH5 %/1h/25C	80
	EZ15 %/70h/25C	84
	EZ15 %/24h/25C	87
	EZ10 %/24h/25C	87
	EZ15 %/70h/5C	89
	EZ10 %/70h/5C	90

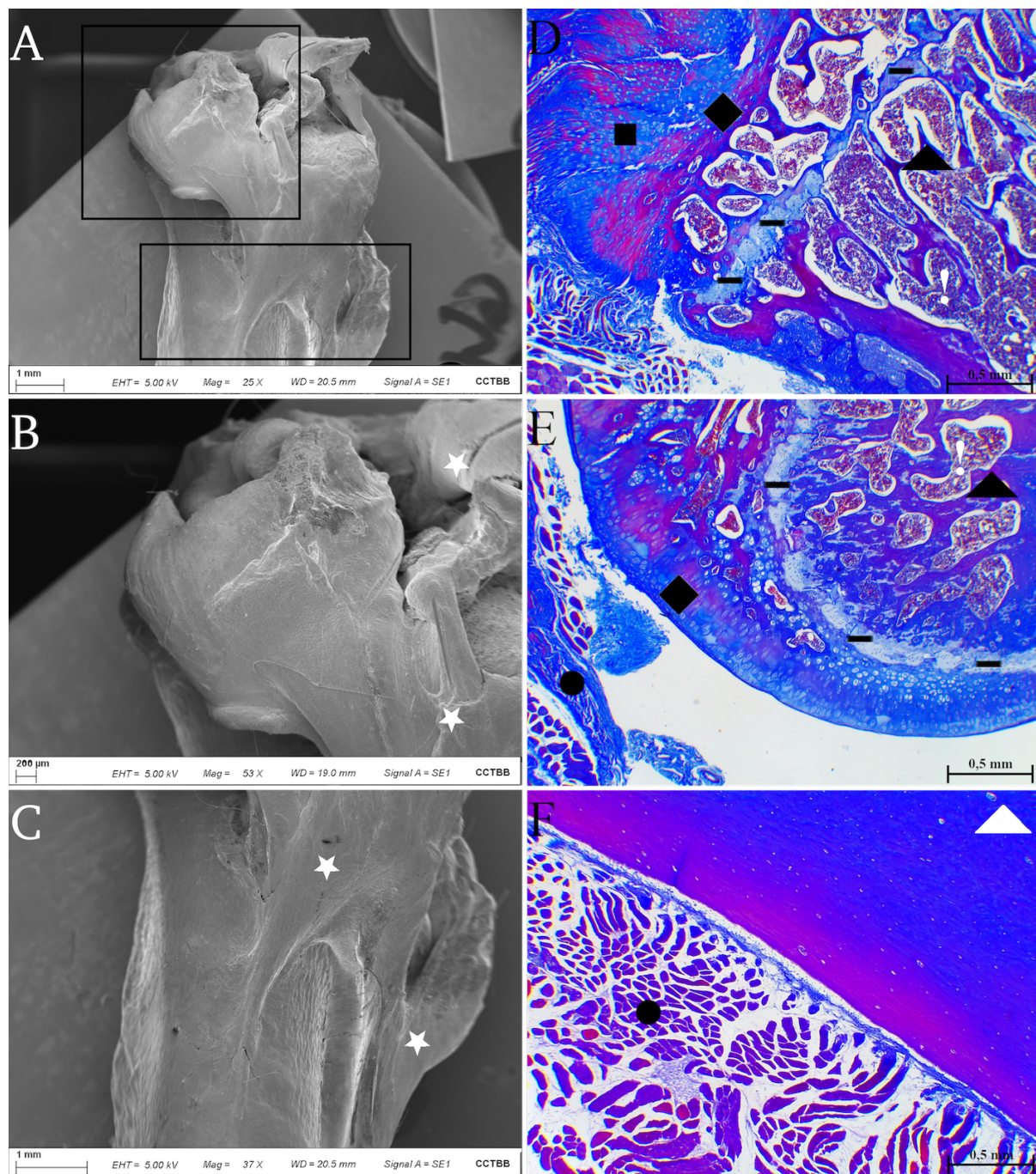


Figura 2.5: muestras correspondientes al Control del estudio preliminar. A-C: fotografías obtenidas con MEB, en las que puede observarse el aspecto general del hueso. Los sectores identificados en A con los recuadros superior e inferior, se muestran a mayor aumento en B y C, respectivamente. Estrellas blancas: restos de tejidos blandos. D-F: cortes histológicos representativos a nivel del trocánter mayor (D), cabeza femoral (E) y diáfisis (F). Tinción: tricrómico de Gomori; aumentos: 4X. Círculo negro: músculo; cuadrado negro: tendón; rectángulo negro: disco epifisario; rombo negro: cartílago articular; signo de exclamación: médula ósea; triángulo blanco: hueso compacto; triángulo negro: hueso trabecular.

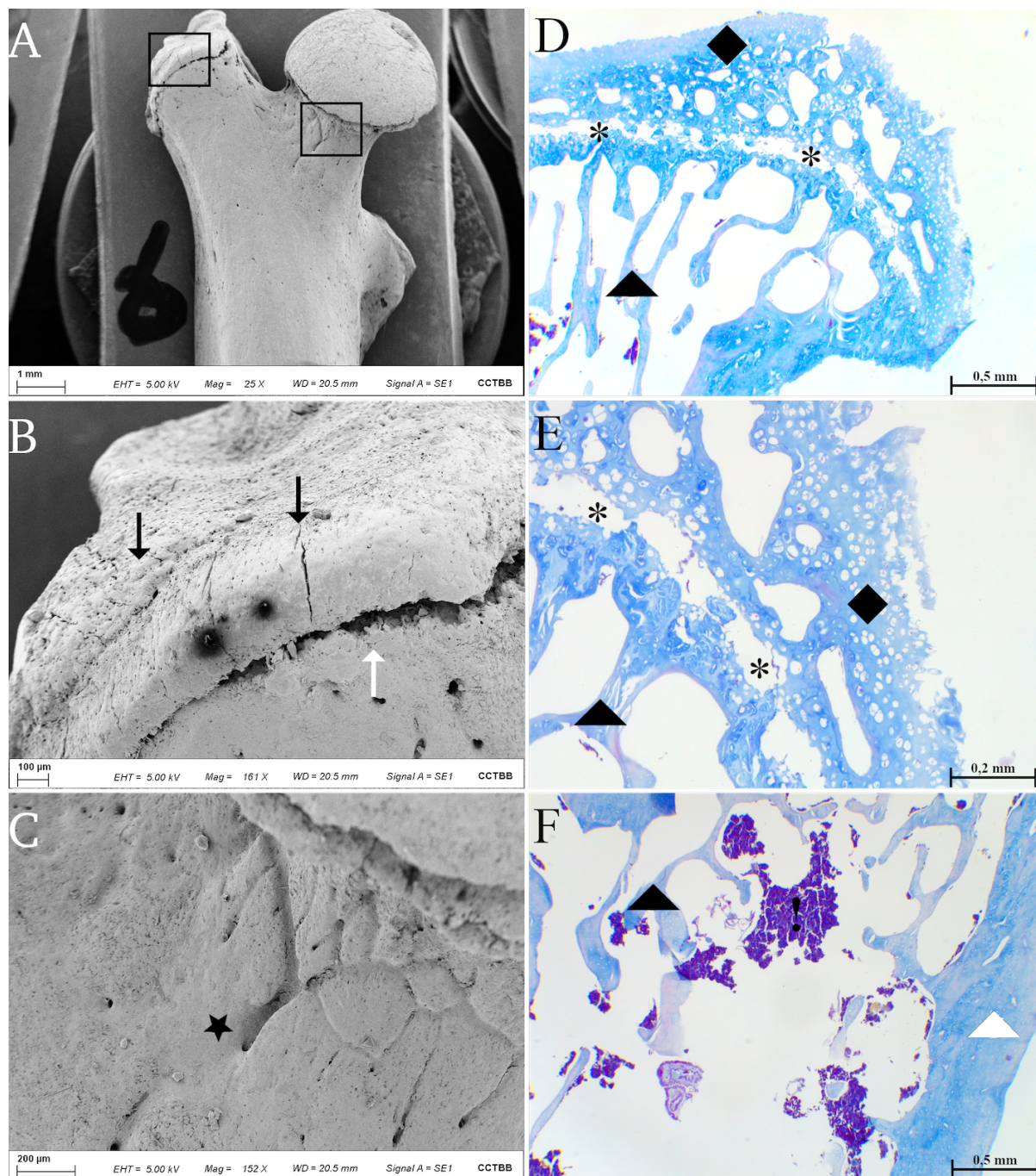


Figura 2.6: muestras correspondientes al tratamiento E/60 del estudio preliminar. A-C: fotografías realizadas con MEB. Los sectores identificados en A con los recuadros izquierdo y derecho, se muestran a mayor aumento en B y C, respectivamente, para poner en evidencia el alto grado de porosidad, agrietamiento (flechas negras) y surcos (estrella negra). La fisura en la base del trocánter mayor (flecha blanca) podría indicar condrólisis por ataque microbiano al cartílago de crecimiento (ver Discusión: 2.4). D y E: secciones histológicas representativas de la cabeza femoral a 4X y 10X, respectivamente. F: corte histológico a nivel de la diáfisis (4X). Tinción: tricrómico de Masson. Asterisco: región del disco epifisario; rombo negro: cartílago articular; signo de exclamación: médula ósea; triángulo blanco: hueso compacto; triángulo negro: hueso trabecular.

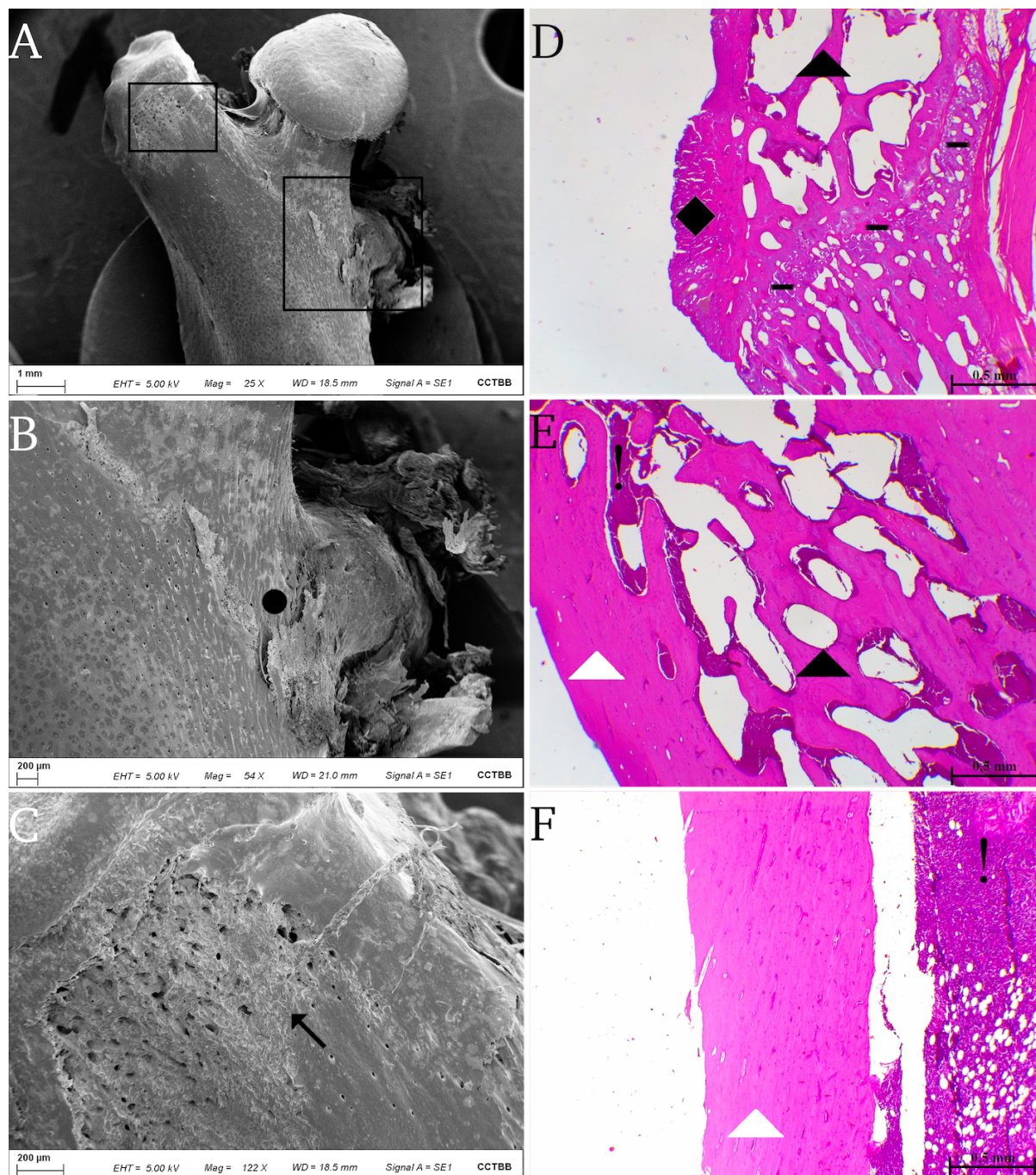


Figura 2.7: muestras correspondientes al tratamiento KOH5%/4h/40C del estudio preliminar. A-C: fotografías de MEB; los sectores identificados en A con los recuadros derecho e izquierdo, se muestran a mayor aumento en B y C, respectivamente. Obsérvese la delaminación ósea a nivel del trocánter menor (círculo negro en B) y el alto grado de deterioro en la base del trocánter mayor (flecha negra en C). D-F: secciones histológicas de la cabeza femoral (D), cuello (E) y diáfisis (F). Tinción: hematoxilina-eosina; aumentos: 4X. Rectángulo negro: disco epifisario; rombo negro: cartílago articular; signo de exclamación: médula ósea; triángulo blanco: hueso compacto; triángulo negro: hueso trabecular.

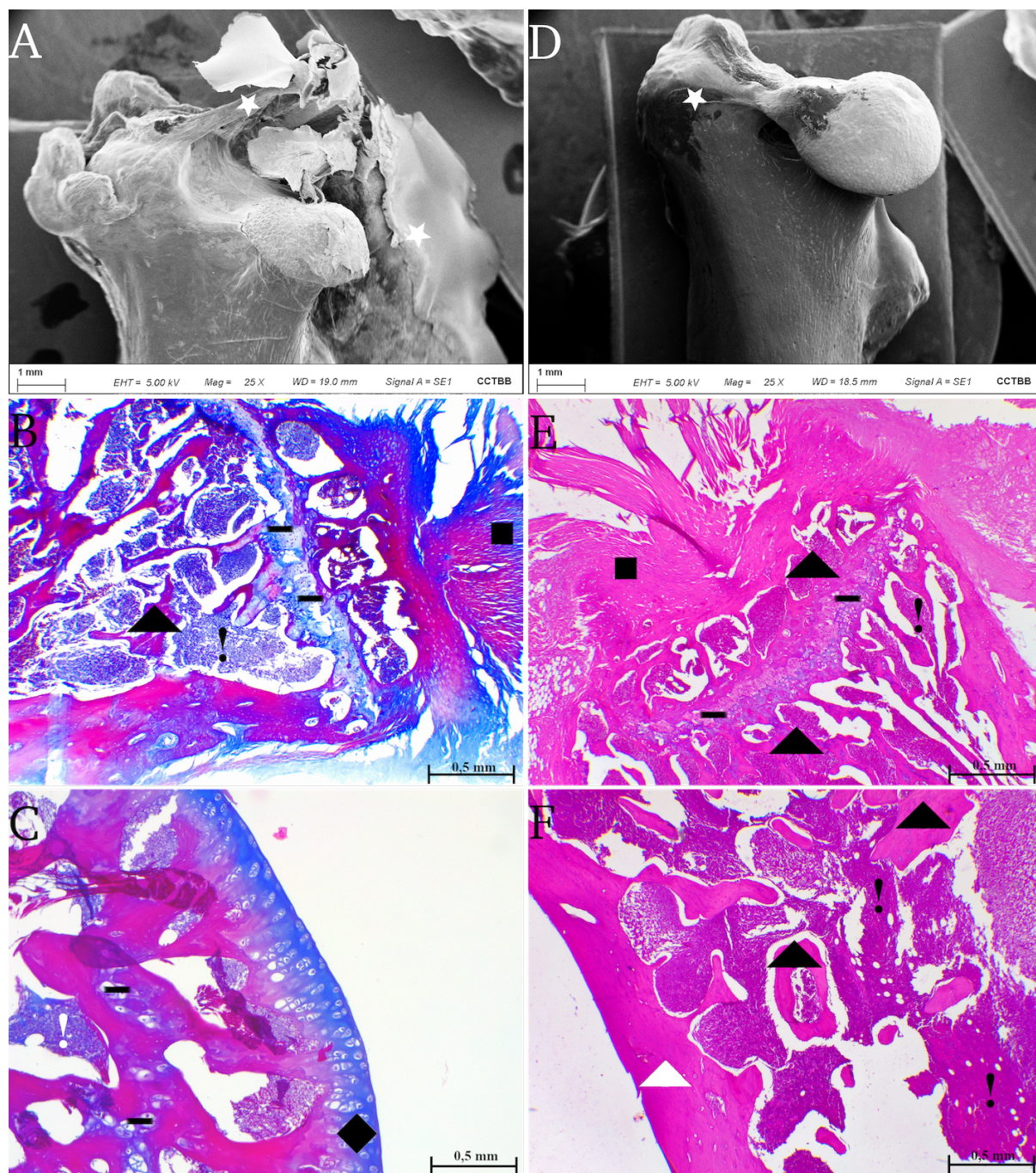


Figura 2.8: muestras obtenidas en el estudio preliminar, por exposición a KOH5% y 25°C, durante 1 hora (A-C) y 2 horas (D-F). Las estrellas blancas indican restos blandos en las imágenes de MEB (A y D). Las secciones histológicas corresponden a trocánter mayor (B y E), cabeza femoral (C) y cuello (F). Tinciones: tricrómico de Gomori (B y C) y hematoxilina-eosina (E y F); aumentos: 4X. Rectángulo negro: disco epifisario; rombo negro: cartilago articular; signo de exclamación: médula ósea; triángulo blanco: hueso compacto; triángulo negro: hueso trabecular.

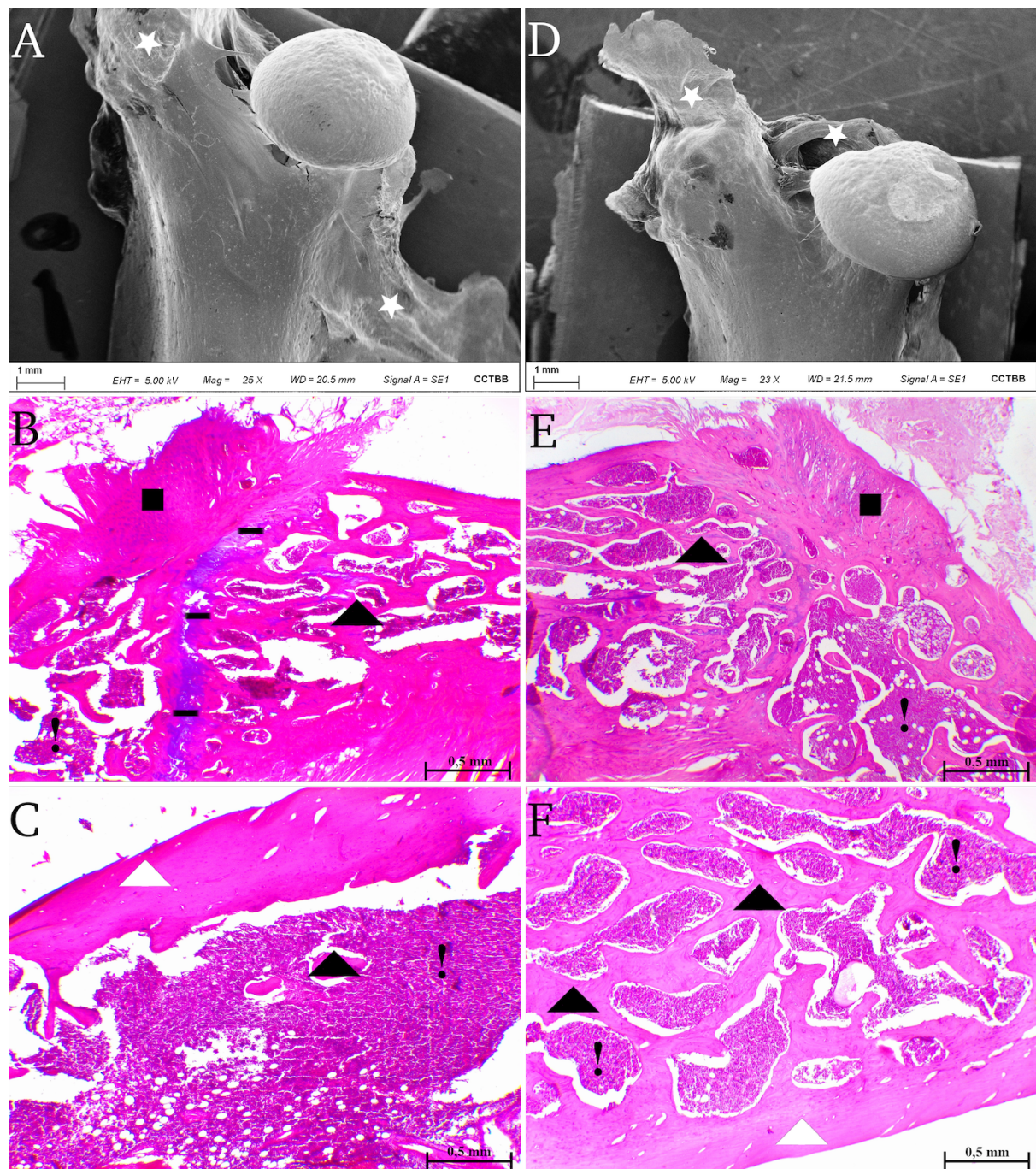


Figura 2.9: muestras obtenidas en el estudio preliminar, por exposición a KOH 5 % y 40°C, durante 1 hora (A-C) y 2 horas (D-F). Las estrellas blancas indican las áreas con mayores cantidades de restos blandos en las imágenes de MEB (A y D). Las secciones histológicas corresponden a trocánter mayor (B y E) y a diáfisis (C y F). Tinción: hematoxilina-eosina; aumentos: 4X. Cuadrado negro: tendón; rectángulo negro: disco epifisario; triángulo blanco: hueso compacto; triángulo negro: hueso trabecular.

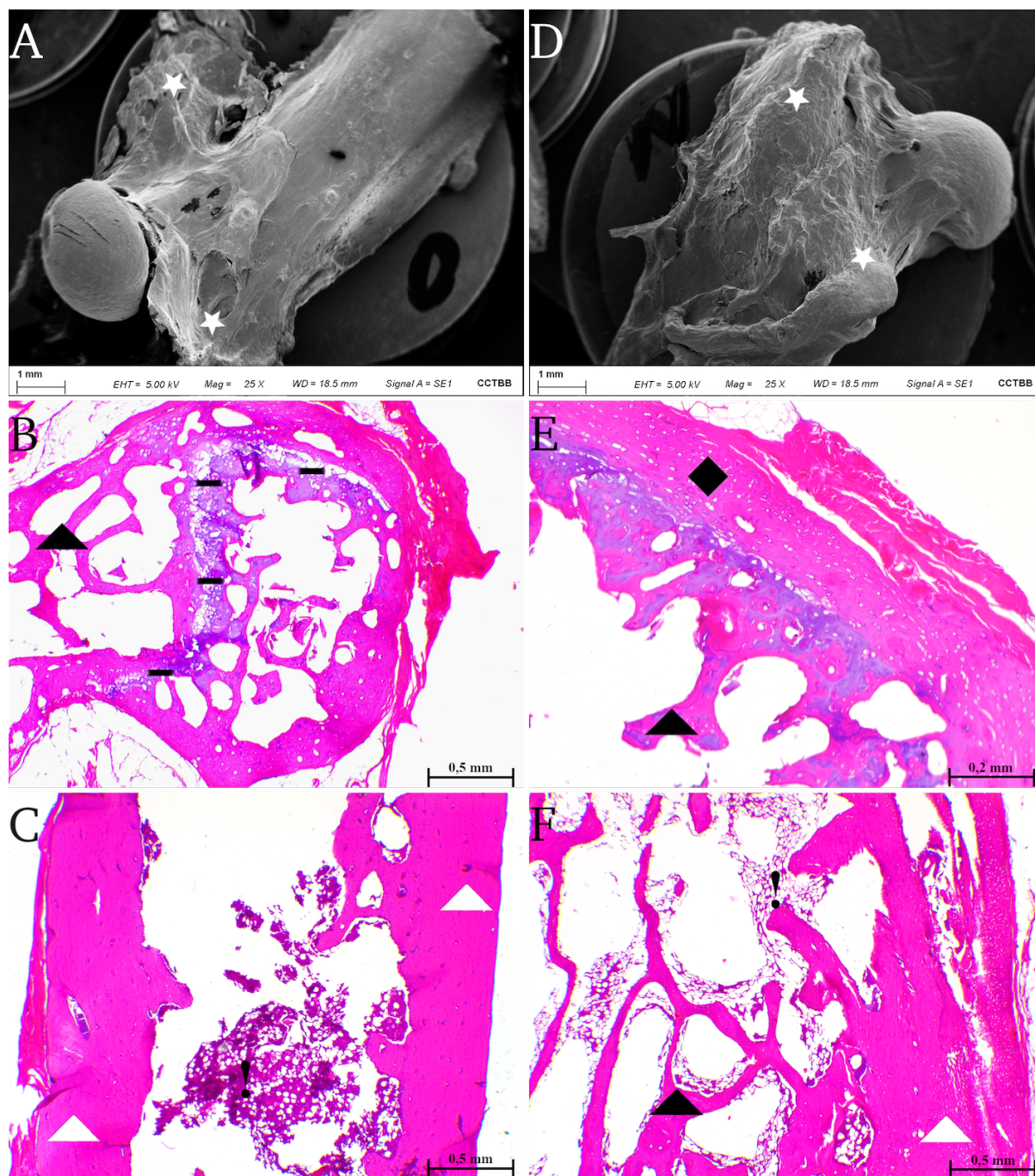


Figura 2.10: muestras obtenidas en el estudio preliminar, por exposición a distintas concentraciones de jabón enzimático (A-C: 10 %; D-F: 15 %) a 25°C, y durante 70 horas. Nótese la elevada cantidad de restos de tejido blando en las imágenes de MEB (estrellas blancas en A y D). Las secciones histológicas corresponden a cabeza femoral (B y E) y a diáfisis (C y F). Tinción: hematoxilina-eosina; aumentos: 4X (B, C y F) y 10X (E). Rectángulo negro: disco epifisario; rombo negro: cartílago articular; signo de exclamación: médula ósea; triángulo blanco: hueso compacto; triángulo negro: hueso trabecular.

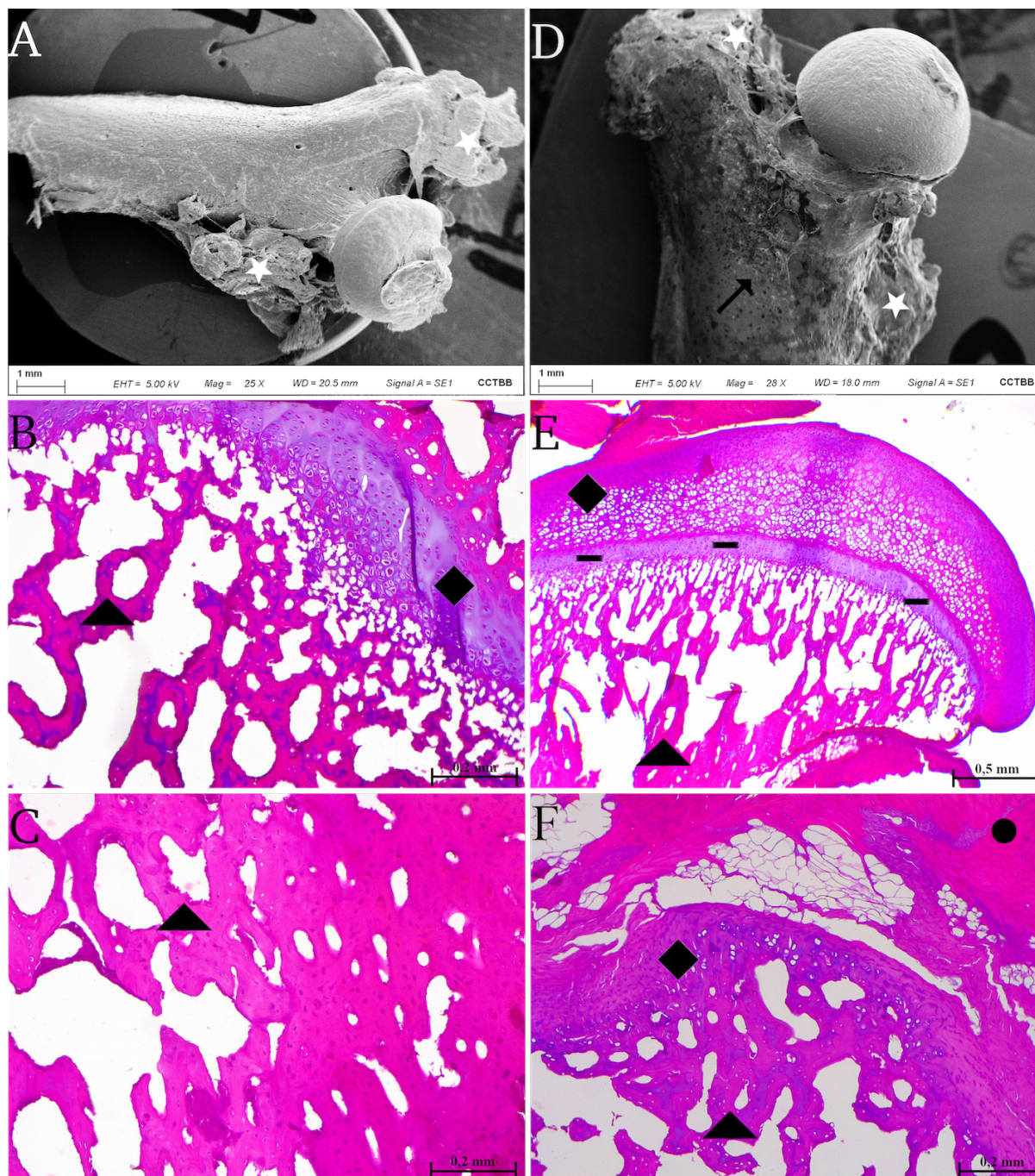


Figura 2.11: muestras obtenidas en el estudio preliminar, por exposición a distintas concentraciones de jabón enzimático (A-C: 10%; D-F: 15 %) a 70°C, y durante 2 horas. Nótese en las imágenes de MEB de ambos tratamientos la elevada cantidad de restos blandos (estrellas blancas en A y D), como así también la marcada porosidad en las áreas limpias de la muestra sometida a mayor concentración (flecha negra en D). Las secciones histológicas corresponden a cabeza femoral (B y E), diáfisis (C) y trocánter mayor (F). Tinción: hematoxilina-eosina; aumentos: 10X, excepto E (4X). Cuadrado negro: tendón; rectángulo negro: disco epifisario; rombo negro: cartílago articular; triángulo negro: hueso trabecular.

2.3. Estudio definitivo

2.3.1. Materiales y métodos

Se planificaron 20 tratamientos y un Control. Se dispuso para ello de 105 ratas macho de $47,7 \pm 3,6$ días de edad, con un peso corporal promedio de $209,10 \pm 12,50$ g, que se asignaron aleatoriamente a las distintas alternativas. Se utilizaron ambos miembros posteriores (derechos e izquierdos), resultando un diseño balanceado de 10 réplicas por tratamiento ($N_{\text{total}}=210$).

La metodología utilizada para la obtención del material fue la descrita en la sección anterior (2.2.1), pero se registró el peso de los miembros con posterioridad a la remoción manual de tejidos blandos, de modo de obtener muestras con un peso promedio de 4,27 g ($\pm 0,29$ g; Aculab V-121).

El detalle de los tratamientos aplicados se presenta en la Tabla 2.4. Como puede verse en dicha tabla, se definieron tres tiempos de enterramiento, ocho tratamientos con KOH y ocho tratamientos con detergente enzimático, utilizándose para estos dos últimos agentes las mismas combinaciones de tiempo de exposición y temperatura. Para la limpieza por métodos biológicos se utilizó una colonia establecida de larvas y adultos de *Tenebrio molitor*. Se decidió no utilizar derméstidos debido al riesgo de contaminación de las numerosas piezas de colección que están depositadas en los laboratorios en los cuales se desarrolló esta tesis, principalmente material esqueletario de armadillos (que conforman una de las mayores colecciones de dasipódidos a nivel nacional), y también material óseo y cueros de otros grupos de mamíferos (especialmente carnívoros). La colonia fue mantenida en pecera sobre colchón de material

inerte, y sin iluminación artificial. Las muestras óseas, debidamente identificadas, fueron introducidas en la pecera, pesadas diariamente, y retiradas al registrarse un peso constante durante dos días, lo que indicaba que los insectos habían cesado el consumo de partes blandas. Cada día, luego de ser pesadas, se remojaron en agua para favorecer el ablandamiento del tejido y estimular así la continuidad del consumo por parte de los animales, siguiendo el procedimiento utilizado por Leeper (2015) para derméstidos. Para el grupo Control, únicamente se removió en cada miembro la mayor parte de los tejidos blandos mediante elementos de disección. Una vez finalizados los tratamientos, las muestras fueron lavadas con agua corriente, secadas durante cinco días en ambiente a temperatura controlada (20°C) y al resguardo de insectos, pesadas y almacenadas en bolsas plásticas con cierre de tipo zipper, debidamente identificadas.

El material obtenido mediante los métodos descriptos fue utilizado para distintos estudios. Para algunos análisis se utilizaron los miembros enteros, mientras que para otros se aislaron fragmentos específicos; si bien las muestras utilizadas en cada caso, los parámetros registrados y los análisis estadísticos realizados se detallan a continuación, para mayor claridad se presenta en la Tabla 2.5 un resumen del material destinado a cada uno de los análisis realizados.

Tabla 2.4: tratamientos correspondientes al estudio definitivo ($N_{\text{tratamiento}}=10$; $N_{\text{total}}=210$). Se indica en cada caso el tiempo de exposición (h: horas; d: días), como así también la concentración (%) y la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) en los ensayos de digestión química (KOH) y enzimática (EZ).

Técnica	Descripción		Código de tratamiento
Enterramiento	A 15 cm de profundidad en suelo franco, y no sometido a riego	15 d	E-15
		30 d	E-30
		45 d	E-45
Digestión química	Solución acuosa de KOH	5 %/2 h/40 $^{\circ}\text{C}$	KOH5 %-2h-40C
		5 %/2 h/70 $^{\circ}\text{C}$	KOH5 %-2h-70C
		5 %/4 h/40 $^{\circ}\text{C}$	KOH5 %-4h-40C
		5 %/4 h/70 $^{\circ}\text{C}$	KOH5 %-4h-70C
		10 %/2 h/40 $^{\circ}\text{C}$	KOH10 %-2h-40C
		10 %/2 h/70 $^{\circ}\text{C}$	KOH10 %-2h-70C
		10 %/4 h/40 $^{\circ}\text{C}$	KOH10 %-4h-40C
		10 %/4 h/70 $^{\circ}\text{C}$	KOH10 %-4h-70C
		10 %/2 h/40 $^{\circ}\text{C}$	EZ10 %-2h-40C
		10 %/2 h/70 $^{\circ}\text{C}$	EZ10 %-2h-70C
Digestión enzimática	Solución acuosa de detergente comercial <i>Skip®Bio-Enzymes Liquid Soap</i>	10 %/4 h/40 $^{\circ}\text{C}$	EZ10 %-4h-40C
		10 %/4 h/70 $^{\circ}\text{C}$	EZ10 %-4h-70C
		15 %/2 h/40 $^{\circ}\text{C}$	EZ15 %-2h-40C
		15 %/2 h/70 $^{\circ}\text{C}$	EZ15 %-2h-70C
		15 %/4 h/40 $^{\circ}\text{C}$	EZ15 %-4h-40C
		15 %/4 h/70 $^{\circ}\text{C}$	EZ15 %-4h-70C
Digestión biológica	Larvas y adultos de <i>Tenebrio molitor</i>	12 d	Tenebrios
Control	Remoción de partes blandas y secado a temperatura ambiente		Control

Tabla 2.5: aspectos evaluados en el estudio definitivo, muestras destinadas a cada uno de los análisis realizados y segmentos utilizados en cada caso.

Animales utilizados	Miembros posteriores	Análisis macroscópico: <i>performance</i> de tratamientos y valoración de técnicas	Análisis microscópico: eficacia de la remoción de tejido blando y efectos en superficie ósea	Efectos de tratamientos sobre propiedades biomecánicas del hueso	Efectos de tratamientos sobre cantidad y calidad de ADN
105	210	210 miembros	105 fémures (izquierdos)	105 fémures (derechos)	105 complejos tibio-fibulares (derechos)
Muestras analizadas/ tratamiento		10	5	5	5
Segmento utilizado		Miembro completo (estilopodio, zeugopodio, autopodio)	Epífisis proximal y parte de diáfisis	Hueso entero	Complejo tibio-fibular completo

2.3.1.1. Análisis macroscópico de la *performance* de los tratamientos y valoración de las técnicas implementadas

Como se detalló en la Tabla 2.5, se utilizó en este estudio la totalidad de los miembros posteriores (derechos e izquierdos; $N_{\text{tratamiento}}=10$, $N_{\text{total}}=210$).

Las distintas técnicas de limpieza ensayadas fueron evaluadas a diferentes niveles. Por un lado, se analizó la variación en peso de los miembros enteros (estilopodio, zeugopodio y autopodio) a lo largo del proceso de limpieza. Se realizó también una evaluación macroscópica del grado de remoción de tejidos blandos y de la calidad general del hueso, estableciéndose para este último parámetro una escala cualitativa de cinco valores (Tabla 2.6).

Por otra parte, se consideraron aspectos inherentes a la implementación de cada una de las técnicas; si bien no se realizó un análisis exhaustivo en este sentido, se tuvieron en cuenta factores tales como facilidad

Tabla 2.6: escala cualitativa de valores establecida para los tratamientos del estudio definitivo. La calidad del hueso fue evaluada para la totalidad de los tratamientos, mientras que las otras tres variables fueron analizadas solo en los tratamientos de digestión química y enzimática. La facilidad de remoción de los tejidos blandos y la textura de los mismos refieren a condiciones registradas al retirar las muestras de las soluciones respectivas. Nótese que 1 y 5 representan los peores y mejores valores, respectivamente, para la totalidad de los parámetros considerados.

Valor	Calidad del hueso (evaluación macroscópica)	Textura de los tejidos blandos	Facilidad de remoción de tejidos blandos	Olor durante el proceso
1	Frágil y quebradizo; se desgrana fácilmente al tocarlo	Más firmes y/o resistentes que antes del tratamiento	Remoción manual imposible sin dañar el hueso	Olor fuerte que impregna el ambiente; desaparece lentamente
2	Se fractura al ejercer ligera presión, pero no se desgrana al tocarlo	Misma textura que antes del tratamiento	Remoción manual difícil sin dañar el hueso	Olor fuerte que impregna el ambiente; desaparece rápidamente
3	Se fractura al ejercer presión moderada	Considerablemente más blandos que antes del tratamiento	Es necesario ejercer algo de fuerza, pero puede lograrse sin dañar el hueso	Olor moderado cerca del lugar de procesamiento; desaparece lentamente
4	No se fractura fácilmente	Con licuefacción aparente y desprendidos del hueso	Fácil eliminación, pero quedan restos adheridos al hueso	Olor moderado cerca del lugar de procesamiento; desaparece rápidamente
5	Fuerte; textura normal	Casi totalmente licuados, con poca o ninguna conexión con el hueso	Mínima o nula adherencia al hueso; fácil remoción manual o desprendimiento al extraer las muestras de la solución	Poco o ningún olor; posible olor leve alrededor del material

de ejecución, esfuerzo que demanda al operador, costo involucrado y tiempo que debe dedicarse hasta obtener el material. Para el caso de digestión química y enzimática, en particular, se consideraron además tres parámetros, estableciéndose una escala cualitativa de cinco valores para cada uno de ellos (Tabla 2.6), con base en aspectos contemplados por Steadman et al. (2006) y Thompson (2015) en estudios previos.

2.3.1.2. Análisis microscópico: eficacia en la remoción de tejidos blandos y efecto de los tratamientos sobre la superficie ósea

Se seleccionaron para este análisis los fémures izquierdos (N=105) y, al igual que en el estudio preliminar, el segmento considerado fue la epífisis proximal (incluyendo cabeza femoral, cuello, trocánter mayor y trocánter menor) y parte de la diáfisis (Tabla 2.5). Los fragmentos óseos fueron obtenidos mediante torno de dentista equipado con fresa de corte. El estudio fue realizado mediante MEB, utilizando el equipo detallado anteriormente (SEM LEO EVO 40 XVP-EDS OXFORD X-MAX 50; CCT-CONICET, Bahía Blanca). La toma de fotografías se estandarizó de modo que la cabeza femoral quedara ubicada en el cuadrante superior izquierdo.

A partir de las fotografías obtenidas, se realizaron análisis a dos niveles. Para el primero, cuantitativo, se registró la cantidad de carne y grasa que persistió luego de cada tratamiento. Se seleccionaron para ello, en fotografías de idéntica magnificación (25X), campos de 600 x 400 píxeles, tomando como criterio que el margen superior izquierdo de cada campo contactara con el contorno de la cabeza (Fig. 2.12). Luego se colorearon digitalmente, y en forma diferencial, las porciones de hueso limpio y cubierto por tejidos blandos, utilizando el programa GIMP (The GIMP Development Team, 2019). Posteriormente, se desarrolló un aplicativo para computar el número de píxeles correspondientes a hueso y a restos de tejidos blandos utilizando las librerías ImageIO y Numpy (Python). El segundo análisis, cualitativo, consistió en la evaluación del aspecto superficial del hueso, focalizando en la detección de daños como delaminación, agrietamiento o porosidad.

Con los datos obtenidos para ambos parámetros evaluados, se construyó una escala de cinco niveles, donde 1 y 5 representan los peores y mejores valores, respectivamente (Tabla 2.7).

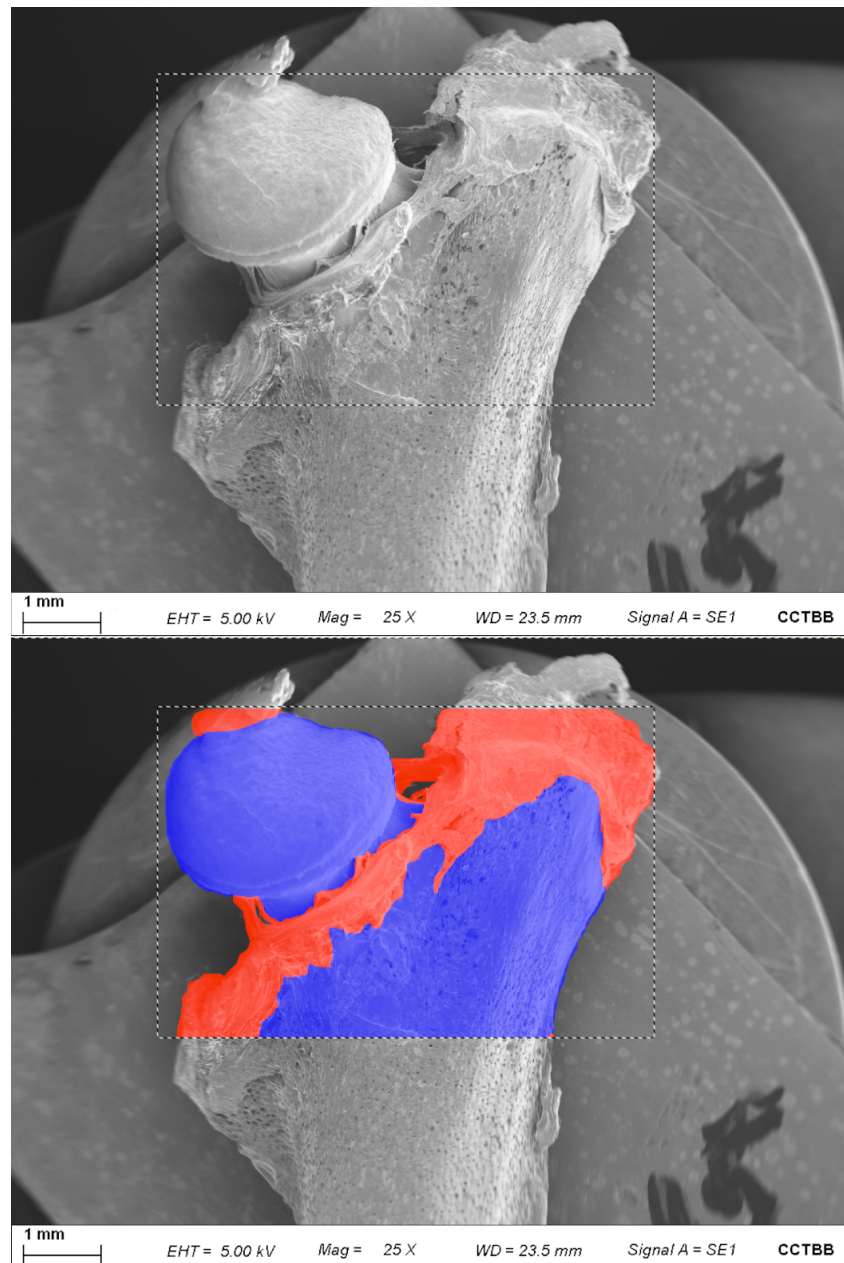


Figura 2.12: ejemplo del campo de 600x400 píxeles, ubicado sobre una imagen de MEB de la epífisis femoral proximal de rata (25X). Naranja: restos de tejidos blandos, azul: hueso limpio.

Tabla 2.7: valores establecidos para los tratamientos de limpieza de fémures de rata Wistar, con base en los resultados obtenidos a partir del análisis microscópico del estudio definitivo.

Valor	Tejidos blandos remanentes (%)	Aspecto de la superficie ósea
1	81-100 %	Gran deterioro: porosidad extrema y pérdida de material óseo
2	61-80 %	Deterioro importante: porosidad marcada y que abarca áreas extensas del hueso, pero sin pérdida de material
3	41-60 %	Deterioro intermedio: porosidad moderada y/o delaminación
4	21-40 %	Deterioro leve: escasa porosidad, o acotada a áreas pequeñas
5	0-20 %	Sin deterioro: no se evidencia daño en superficie

2.3.1.3. Efectos de los tratamientos sobre las propiedades biomecánicas del hueso

Las propiedades biomecánicas de los huesos sometidos a los distintos tratamientos fueron evaluadas mediante ensayos de flexión en tres puntos, que se basan en la aplicación de una fuerza progresiva en el centro de una muestra colocada sobre dos soportes, con posterior registro de su comportamiento (Guede et al., 2013). Se obtiene así una curva de **fuerza vs desplazamiento** (Fig. 2.13 A), en la cual se registran dos comportamientos: el elástico y el plástico. El primero refiere a la capacidad del hueso para devolver la energía absorbida una vez que termina la aplicación de la fuerza, mientras que el segundo hace referencia a una deformación irreversible. De ese modo, cuando se aplica sobre el hueso una fuerza progresiva, se observa en primera instancia que la fuerza y el desplazamiento son proporcionales (región elástica), donde se cumple la Ley de elasticidad de Hooke; luego aparece la zona plástica o de deformación irreversible, donde el hueso no recupera la forma original, aunque deje de aplicarse la fuerza.

A partir de esta curva pueden obtenerse varios parámetros para los huesos enteros. La **fuerza de fractura** (medida en Newtons, N) refiere a la resistencia del hueso, y se define como la fuerza aplicada para generar la rotura, mientras que la **fuerza máxima** (N) es la máxima fuerza soportada durante el ensayo, y se registra justo antes de la primera disminución de la fuerza. Otra propiedad es la **rigidez** (N/mm), que se obtiene a partir de la pendiente de la región elástica de la gráfica, y representa la fuerza que debe aplicarse para producir una unidad de desplazamiento (Guede et al., 2013). Una última propiedad es la **energía absorbida** (mJ), que es el área bajo la curva de la gráfica desde el inicio hasta el momento en que se produce la fractura, y hace referencia a la resistencia del órgano a dicho trauma.

Si bien la curva vista se usa para medir la resistencia y rigidez de una estructura como tal, para comparar materiales diferentes entre sí es necesario realizar una estandarización que permita estimar las propiedades intrínsecas de los mismos (Guede et al., 2013). Para el caso de los huesos, estas normalizaciones permiten obtener las propiedades del tejido óseo. Para ello, la fuerza y el desplazamiento deben normalizarse como estrés (o esfuerzo; MPa) y deformación, respectivamente, lo que permite obtener una nueva curva (Fig. 2.13 B). El estrés hace referencia a la resistencia interna del tejido a una fuerza que actúa sobre él, mientras que la deformación representa los cambios en las dimensiones del objeto sometido a la acción de la fuerza. Las fórmulas que se utilizan para esta transformación, basadas en la teoría clásica de vigas (Kourtis et al., 2014), son:

$$\text{Estrés} = \frac{F * d * r}{(4 * CSMI)}$$

$$\text{Deformación} = \frac{12 * r * de * 10^6}{d^2}$$

donde **F** es la fuerza aplicada (N), **d** la distancia de separación entre los puntos de apoyo (mm), **r** el radio externo del hueso (mm), **de** el desplazamiento (mm) y **CSMI** el momento de inercia transversal (*cross-sectional moment of inertia; mm⁴*). Este último parámetro, que depende de la geometría del objeto, se calcula como:

$$CSMI = \frac{\pi}{64} \left(\frac{dex}{2} \right)^4 - \left(\frac{din}{2} \right)^4$$

donde **dex** representa el diámetro externo y **din** el diámetro interno. De ese modo, las transformaciones tienen en cuenta no solo las dimensiones del objeto, sino además la geometría del mismo. A partir de la curva estrés-deformación puede obtenerse el **módulo de elasticidad o de Young** (GPa), que corresponde a la pendiente de la región elástica de dicha curva (Guede et al., 2013). Un material con un valor bajo para esta propiedad, sufrirá grandes deformaciones frente a esfuerzos pequeños, mientras que lo opuesto ocurrirá si el módulo de Young es elevado. Cabe aclarar que esta propiedad hace referencia a la rigidez del material y no debe confundirse con la rigidez de la estructura o hueso, mencionada previamente.

Para realizar el estudio se utilizaron los fémures derechos enteros (N=105; Tabla 2.5), los cuales fueron procesados y analizados por el Laboratorio de Biología Ósea de la FCM-UNR (Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario).

Las pruebas mecánicas del ensayo de flexión se realizaron en una

máquina diseñada en el Departamento de Ingeniería del mencionado laboratorio, que posee una celda de carga de 300 N, con 0,01 N de discriminación y una precisión de 10 μm en desplazamientos. La velocidad, controlada por computadora, fue de 0,01 mm/s. La resistencia del hueso cortical fue medida a la altura media de la diáfisis, utilizándose una separación de 11,5 mm entre los puntos de apoyo, que fue establecida basándose en la longitud ósea promedio (25,69 mm).

Las gráficas de fuerza-desplazamiento fueron realizadas utilizando el *software Biomedical Data Acquisition Suite 1.0* (Argentina, 2011). La velocidad de adquisición de datos del software fue de 10 Hz. Con base en ellas se calcularon la **fuerza máxima** (N), **fuerza de fractura** (N), **rigidez** (N/mm) y **energía absorbida** (mJ). Se realizaron a continuación cortes transversos delgados (500 μm) con una sierra de baja velocidad (IsoMet. Buehler Ltd. Illinois, EEUU), a 7 mm de la epífisis proximal. Se tomaron fotografías de cada pieza con un aumento de 40X, y se midieron los diámetros interno y externo con ImageJ 1.40 (NIH, Maryland, USA), para calcular el **ancho cortical**. Mediante las transformaciones correspondientes se obtuvieron los datos de estrés y deformación, y se graficaron las nuevas curvas para obtener el **módulo de Young** (GPa).

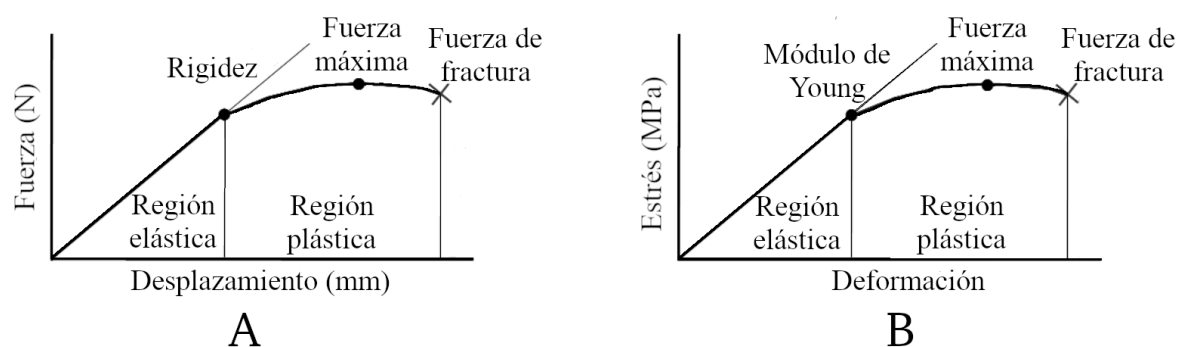


Figura 2.13: principios empleados en la determinación de las propiedades mecánicas del hueso. Curvas fuerza-desplazamiento (A) y estrés-deformación (B). Extraído y modificado de Guede et al. (2013).

2.3.1.4. Efectos de los tratamientos sobre la calidad y cantidad de ADN

Para analizar los efectos de los tratamientos sobre la concentración y pureza del ADN, se molieron en morteros cerámicos los complejos tibio-fibulares derechos (N=105; Tabla 2.5), hasta obtener un polvo fino. El ADN se extrajo a partir de 5 mg de este polvo, utilizando un protocolo estándar de extracción con fenol-cloroformo (Samsuwan et al., 2018, Apéndice A). Finalmente, el ADN extraído se almacenó resuspendido en 50 μ l de buffer Tris-EDTA a -20°C .

Con el objeto de minimizar la contaminación del ADN extraído, entre cada muestra procesada se procedió a la limpieza de las superficies del laboratorio con lavandina y alcohol, mientras que el mortero se expuso durante 5 minutos a luz UV. Además, se utilizaron máscaras con filtro como medida de seguridad. Todo el procedimiento se realizó en el Laboratorio de Genética para la Conservación (GENCON-INBIOSUR).

La concentración del ADN obtenido se cuantificó utilizando un espectofotómetro NanoDrop®(ThermoFisher), en el Laboratorio de Servicios Genómicos (GENeTyC, CERZOS-CONICET). A fin de evaluar la presencia de contaminantes tras el aislamiento del ácido nucleico, se determinó la relación de absorbancia 260/280 ($1,6 < \text{ADN puro} < 2,1$) y 260/230 ($\text{ADN puro} > 2$).

2.3.1.5. Análisis estadísticos

Los datos de peso de los miembros fueron sometidos a estudios de normalidad y homocedasticidad, por medio de las pruebas estadísticas de Shapiro-Wilks y Levene. Debido a que no se verificaron los supuestos de

las pruebas paramétricas tradicionales, se ajustó un modelo generalizado de mínimos cuadrados. En el caso de hallarse diferencias significativas, los tratamientos se compararon de a pares mediante el test de Tukey. Para todos los casos, el nivel de significación se estableció en $p \geq 0,05$.

Los demás parámetros fueron analizados mediante R Studio (RStudio Team, 2015), realizándose en todos los casos análisis exploratorios de los datos a fin de definir la metodología estadística adecuada. Para las fotografías obtenidas a partir de MEB, el número total de píxeles con restos de tejidos blandos respecto del número total de píxeles coloreados se definió como variable respuesta del modelo, permitiendo calcular posteriormente el porcentaje de restos. Este tipo de variable sigue una distribución binomial, y los modelos lineales generalizados constituyen un método adecuado para analizar este tipo de datos (Jørgensen, 2013). Debido a que los datos presentaron sobredispersión, es decir que la variabilidad observada en ellos fue mayor a la esperada según la distribución binomial, se asignó un factor aleatorio a cada observación (Harrison, 2014). Además, aquellos tratamientos donde no quedaron restos de tejidos (número de píxeles correspondientes a remanentes blandos = 0) fueron excluidos del análisis. Se aplicó un modelo mixto para incorporar el factor aleatorio, utilizando la función *glmer* del paquete *lme4* (Bates et al., 2015).

En el análisis exploratorio de los datos de biomecánica se observó heterocedasticidad entre los tratamientos. Debido a ello, se utilizaron modelos mixtos para incorporar una estimación de varianza para cada tratamiento, con la función *varIdent* del paquete *nlme* (Pinheiro et al., 2024), y el ajuste del modelo se realizó con la función *gls* del mismo paquete.

La evaluación exploratoria para las variables relativas al ADN (concentración, relación A260/280 y A260/230), se realizó mediante la construcción de histogramas de frecuencia. En el caso de la concentración de ADN se observó una distribución asimétrica, por lo que se utilizaron modelos lineales generalizados, con función de enlace logaritmo y distribución *gamma*. El ajuste del modelo se realizó con la función *glm* del paquete *stats* (R Core Team, 2013). En cuanto a las otras dos variables, el análisis previo detectó heterocedasticidad entre los tratamientos, por lo que se utilizaron modelos mixtos a fin de incorporar una estimación de varianza para cada uno de ellos. Al igual que con los datos de biomecánica, se utilizó a tal fin la función *varIdent* del paquete *nlme* (Pinheiro et al., 2024), y el modelo final se ajustó con la función *gls*.

La posible existencia de diferencias significativas entre tratamientos para cada una de las variables analizadas, se evaluó mediante la función ANOVA del paquete *car* (Fox & Weisberg, 2019). Posteriormente, se realizaron las comparaciones mediante el test de Tukey, utilizando la función *emmeans* del paquete *emmeans* (Lenth, 2024).

2.3.2. Resultados

2.3.2.1. Análisis macroscópico de la *performance* de los tratamientos y valoración de las técnicas implementadas

Los pesos de los miembros asignados al Control y a los distintos tratamientos, como así también la disminución porcentual en dicha variable, se detallan en la Tabla 2.8. Para el Control, la variación registrada en el peso promedio, correspondiente simplemente a la deshidratación natural durante el proceso de secado, representó una reducción de 2,8 veces.

Los miembros sometidos a digestión química sufrieron una disminución en el peso significativamente mayor que la del Control. En el caso de la digestión enzimática, las diferencias se registraron únicamente en las combinaciones de mayor duración y temperatura (4h-70°C), para ambas concentraciones ensayadas. Las diferencias significativas representaron disminuciones de entre 67 y 89 % respecto del peso con el que ingresaron al tratamiento. La mayor disminución se observó en KOH10 %-4h-70C, donde la variable se redujo en promedio 9,6 veces con respecto al peso original.

En la observación macroscópica de las muestras asignadas al Control, se registró la persistencia de cantidades considerables de tejidos blandos que ayudaron al mantenimiento de una unión firme entre los huesos, y tornaron dificultosa su separación por presión manual. A nivel de fémur, se observaron restos fundamentalmente en las epífisis y, en menor medida, en las diáfisis. En los complejos tibio-fibulares la cantidad de los mismos fue mayor, llegando a obliterar incluso los espacios interóseos (Fig. 2.14).

El enterramiento de las muestras produjo, en general, importante remoción de tejidos blandos, aunque los tres segmentos de cada miembro (estilopodio, zeugopodio y autopodio) estaban desarticulados en la totalidad de las muestras (Fig. 2.15). En los dos tratamientos de mayor duración, la desarticulación afectó incluso a elementos tarsianos, metatarsianos y falanges; en E-45, además, no pudo recuperarse una de las muestras, correspondiente a un fémur derecho, y la bolsa de red se encontraba rota. En cuanto al aspecto general de los huesos, aunque tenían una apariencia seca, no se observó daño aparente, correspondiendo a la **categoría 5** para la calidad del hueso dentro de la escala cualitativa establecida. Si bien en todos los casos se observaron restos de sedimento

depositados sobre la superficie ósea, los mismos fueron escasos y pudieron ser eliminados fácilmente con el lavado posterior. No se observaron miriápodos ni ningún otro tipo de organismos al recuperar las muestras.

Los huesos sometidos a digestión química conservaron pocos restos de tejidos blandos (Fig. 2.16). Excepto para el tratamiento de menor agresividad (Fig. 2.16 A), los fémures se separaron de los complejos tibia-fíbula sin ningún tipo de fuerza manual. Por otra parte, estos últimos se separaron también del autopodio correspondiente en el tratamiento KOH10 %-4h-40C (Fig. 2.16 G) y en todos los de 70°C (Fig. 2.16 B, D, F, H). El autopodio fue la estructura que mayor variabilidad presentó respecto del nivel de limpieza puesto que, al aumentar el tiempo de exposición o la temperatura, disminuyó la cantidad de remanentes blandos, llegándose incluso a la separación total de huesos en el tratamiento KOH10 %-4h-70C (Fig. 2.16 H). Respecto de la calidad del hueso, en general, todos se clasificaron como **categoría 5**, correspondiente a huesos de textura normal. La excepción fue KOH10 %-4h-70C, donde se observó una marcada tendencia a la desintegración al sacar las muestras de la solución y someterlas a lavado, sin hacer prácticamente presión sobre ellas (**categoría 1**). Luego del secado, a su vez, mostraban un aspecto semejante a una tiza, tanto al tacto como en la coloración (Fig. 2.16 H).

La digestión enzimática fue menos efectiva que el KOH, en términos de limpieza, para todas las combinaciones ensayadas (Fig. 2.17). No se registró desarticulación en ningún caso, pero los huesos pudieron separarse con relativa facilidad mediante fuerza manual. Tampoco se observaron daños aparentes en los elementos esqueléticos, correspondiendo a **categoría 5** en la variable calidad del hueso. En general, los tratamientos a 40°C

(Fig. 2.17 A, C, E, G) dejaron una cantidad visiblemente mayor de restos blandos que los tratamientos a 70°C (Fig. 2.17 B, D, F, H), en los cuales las diáfisis femorales y los espacios interóseos se limpiaron por completo. Solo en el tratamiento más agresivo, EZ15 %-4h-70C, se registró en todas las muestras la remoción completa del tegumento del autopodio, pero los elementos tarsales, metatarsales y falanges se mantuvieron unidos (Fig. 2.17 H).

En las muestras expuestas a tenebrios se observó consumo de tejidos blandos a nivel de estilopodio y zeugopodio, desde el inicio del tratamiento hasta el día 10 (Fig. 2.18), motivo por el cual el ensayo fue finalizado a los 12 días. Durante el registro diario pudo observarse sobre el material tanto a los estadios larvales como a los adultos. Al finalizar el tratamiento, los fémures poseían pocos restos de tejidos blandos, localizados mayormente en las fosas trocántéricas. En la mayoría de las muestras, las epífisis femorales distales estaban separadas de las diáfisis, y permanecían firmemente unidas a las rótulas y a los complejos tibio-fibulares mediante restos de tejidos blandos. Los espacios interóseos quedaron completamente limpios. En algunos casos, se observó separación de epífisis tibio-fibulares distales, que quedaron ligadas al autopodio correspondiente. No se observó desarticulación de elementos esqueléticos del pie (tarsianos, metatarsianos, falanges), como tampoco consumo de tegumento a ese nivel. A pesar de la desarticulación epifisaria, la calidad del hueso fue normal en todos los casos, correspondiéndole **categoría 5** en la escala cualitativa.

En cuanto a los aspectos que atañen a las técnicas aplicadas, el enterramiento resultó la opción de menor costo, de mayor facilidad de implementación y de menor esfuerzo, pero el tiempo necesario para

recuperar los restos y la imposibilidad de monitorear el avance en la descomposición de los tejidos blandos fueron aspectos negativos.

Los tenebrios dieron buenos resultados de limpieza con un costo bajo, puesto que el único gasto involucrado fue el inicial, para la adquisición de la colonia. A diferencia del enterramiento, esta técnica permitió hacer el seguimiento del avance en el grado de limpieza. Sin embargo, el mantenimiento de la colonia requirió un espacio con temperatura controlada y la supervisión periódica.

Respecto del uso de detergente comercial, las ventajas fueron la facilidad para adquirir el producto, el bajo costo involucrado y la sencillez para la manipulación y preparación de las soluciones correspondientes. Por el contrario, la adquisición de KOH fue más compleja, dado que requirió hacer la inscripción en el Registro Nacional de Precursores Químicos (RENPRE), y el costo económico fue sustancialmente mayor. Además, si bien el grado de limpieza obtenido fue mayor que con el jabón enzimático, la manipulación del producto implicó el uso de elementos de protección personal, como guantes y mascarillas, en un espacio constantemente ventilado, debido a la emanación de vapores.

Los valores asignados a los tratamientos de digestión química y enzimática para las variables olor desprendido, textura de los tejidos blandos y facilidad de remoción se presentan en la Tabla 2.9, siendo 1 y 5 los que corresponden a los peores y mejores valores de la escala, respectivamente. Para los tratamientos de digestión química, se encontraron diferencias en cuanto al olor desprendido durante el proceso. Los tratamientos de 2 horas de duración presentaban un olor moderado en cercanías a la estufa que se disipaba rápidamente, independientemente de

la concentración de la solución y de la temperatura. En cambio, en aquellos tratamientos cuya duración fue de 4 horas, el olor seguía siendo moderado pero se disipaba lentamente. En cuanto a la textura de los tejidos blandos, se observó en general una licuefacción casi total y ausencia de contacto de dichos tejidos con los huesos. Las únicas diferencias se encontraron en KOH5 %-2h-40C, donde tres muestras tenían restos de tejidos blandos algo más firmes, adheridos a las regiones de las epífisis. Este tratamiento, a su vez, obtuvo el valor más bajo para la Facilidad de remoción, puesto que los remanentes cercanos al hueso estaban firmemente unidos a él en la totalidad de las muestras. La combinación KOH10 %-2h-40C presentó tres muestras calificadas con la **categoría 4** para esta variable, pero en las muestras restantes, al igual que en las correspondientes a los demás tratamientos, los restos de tejidos eran fácilmente removibles.

Todos los tratamientos de digestión enzimática se clasificaron con el máximo valor para la variable olor, puesto que no se detectó ningún olor durante el proceso. Los tratamientos a 40°C fueron consistentes para las variables textura de los tejidos blandos y facilidad de remoción, dado que el tejido blando tenía las mismas características que antes de ingresar al tratamiento, a la vez que era imposible remover dichos restos sin dañar el hueso. En los tratamientos a 70°C, en cambio, se observó mayor variabilidad asociada al tiempo de exposición, pero no a la concentración. En los tratamientos de 2 horas de duración, el tejido estaba más blando que al inicio del proceso, o se empezaba a desprender del hueso a nivel de la diáfisis, y se podían remover porciones grandes con mayor o menor fuerza manual, sin provocar daño en la superficie ósea; sin embargo, los restos asociados a las epífisis no se pudieron remover en ningún caso. Al

duplicar el tiempo de exposición, las muestras se podían clasificar en las **categorías 3 o 4**, ya que el tejido empezaba a denotar licuefacción y a separarse del hueso, a la vez que se podía remover manualmente en algunos casos; sin embargo, y al igual que en los tratamientos a 2 horas, permanecía firmemente adherido a las epífisis, manteniendo unidos los huesos.

Los promedios de los valores asignados a cada parámetro, según las escalas establecidas, fueron en general superiores en los tratamientos de digestión química que en los de digestión enzimática, con la totalidad de los tratamientos que superaron el valor 4 en el primer caso, y solo dos de los ocho que alcanzaron o superaron dicho valor en el segundo (Tabla 2.9). Por lo tanto, la digestión química tuvo en general una *performance* algo superior que la enzimática.

Tabla 2.8: pesos promedio (\pm desvío estándar) de los miembros posteriores asignados al Control y a los distintos tratamientos, y disminución porcentual del peso, calculada como la variación entre el Peso post remoción manual de tejidos blandos y el Peso final ($N_{\text{tratamiento}}=10$ excepto para E-45, donde el Peso final se sacó a partir de 9 muestras, debido a la pérdida de uno de los miembros derechos). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de disminución porcentual, según el test de Tukey.

Tratamiento	Peso post remoción manual de tejidos blandos (g)	Peso final (g)	Disminución (%)	
Control	4,43 \pm 0,19	1,59 \pm 0,08	64,12 \pm 2,18	abc
E-15	4,40 \pm 0,29	0,91 \pm 0,06	79,33 \pm 1,28	d
E-30	4,37 \pm 0,30	0,66 \pm 0,10	84,88 \pm 2,20	e
E-45	4,46 \pm 0,29	0,73 \pm 0,04	83,46 \pm 1,66	e
KOH5 %-2h-40C	4,39 \pm 0,18	1,45 \pm 0,07	66,92 \pm 1,55	cf
KOH5 %-2h-70C	4,36 \pm 0,14	0,90 \pm 0,10	79,25 \pm 2,45	dgh
KOH5 %-4h-40C	4,31 \pm 0,12	1,17 \pm 0,09	72,83 \pm 1,94	i
KOH5 %-4h-70C	3,85 \pm 0,15	0,68 \pm 0,08	82,33 \pm 1,63	eh
KOH10 %-2h-40C	4,34 \pm 0,13	1,26 \pm 0,08	70,92 \pm 1,59	ij
KOH10 %-2h-70C	3,93 \pm 0,29	0,85 \pm 0,09	78,47 \pm 1,26	dg
KOH10 %-4h-40C	4,40 \pm 0,09	1,03 \pm 0,07	76,63 \pm 1,83	d
KOH10 %-4h-70C	4,03 \pm 0,17	0,42 \pm 0,04	89,50 \pm 1,14	k
EZ10 %-2h-40C	4,49 \pm 0,14	1,62 \pm 0,06	63,93 \pm 1,24	a
EZ10 %-2h-70C	3,88 \pm 0,17	1,33 \pm 0,08	65,71 \pm 1,74	abcf
EZ10 %-4h-40C	4,42 \pm 0,28	1,58 \pm 0,08	64,27 \pm 1,42	ab
EZ10 %-4h-70C	4,15 \pm 0,27	1,16 \pm 0,07	72,07 \pm 2,76	ij
EZ15 %-2h-40C	4,53 \pm 0,09	1,64 \pm 0,07	63,80 \pm 1,24	a
EZ15 %-2h-70C	4,13 \pm 0,14	1,39 \pm 0,06	66,50 \pm 1,59	bcf
EZ15 %-4h-40C	4,29 \pm 0,31	1,52 \pm 0,09	64,51 \pm 1,31	ab
EZ15 %-4h-70C	4,01 \pm 0,26	1,26 \pm 0,09	68,43 \pm 2,08	fj
Tenebrios	4,46 \pm 0,26	1,18 \pm 0,07	73,55 \pm 1,70	i

Tabla 2.9: valores numéricos asignados a cada uno de los tratamientos de digestión química y enzimática del estudio definitivo, para las variables olor durante el proceso (OL), textura de los tejidos blandos (TTB) y facilidad de remoción de tejidos blandos (FR).

	Digestión Química								Digestión Enzimática							
	KOH5 %-2h-40C	KOH5 %-2h-70C	KOH5 %-4h-40C	KOH5 %-4h-70C	KOH10 %-2h-40C	KOH10 %-2h-70C	KOH10 %-4h-40C	KOH10 %-4h-70C	EZ10 %-2h-40C	EZ10 %-2h-70C	EZ10 %-4h-40C	EZ10 %-4h-70C	EZ15 %-2h-40C	EZ15 %-2h-70C	EZ15 %-4h-40C	EZ15 %-4h-70C
OL	4	4	3	3	4	4	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5
TTB	4-5	5	5	5	5	5	5	5	2	3	2	3-4	2	3	2	3-4
FR	4	5	5	5	4-5	5	5	5	1	3	1	3-4	1	3	1	3-4
Promedio	4-4,3	4,7	4,3	4,3	4,3-4,7	4,7	4,3	4,3	2,7	3,7	2,7	3,7-4,3	2,7	3,7	2,7	3,7-4,3



Figura 2.14: aspecto general de un miembro posterior de rata correspondiente al Control del estudio definitivo.

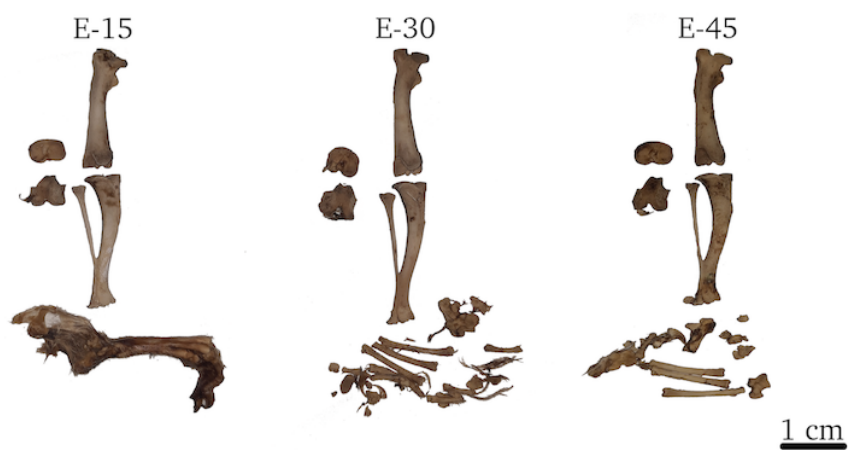


Figura 2.15: miembros posteriores de rata al finalizar los tratamientos de enterramiento del estudio definitivo.

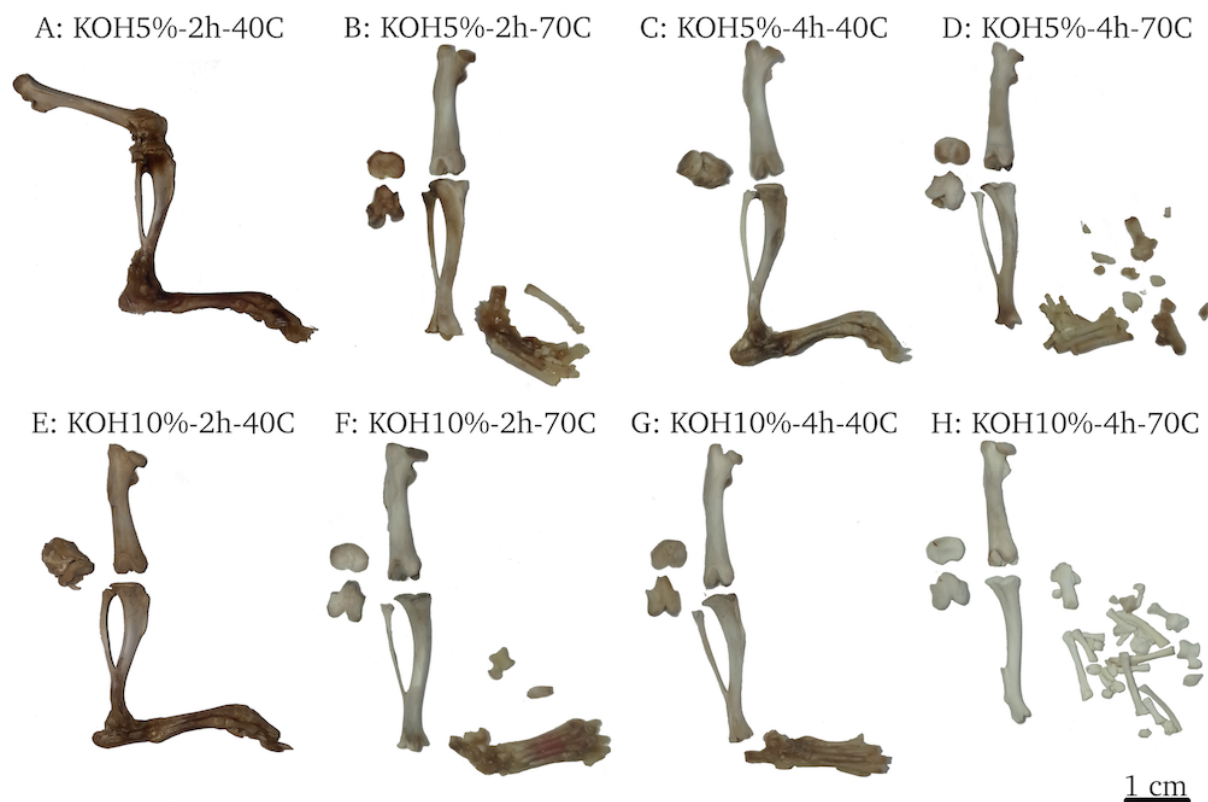


Figura 2.16: miembros posteriores de rata al finalizar los tratamientos de digestión química del estudio definitivo.

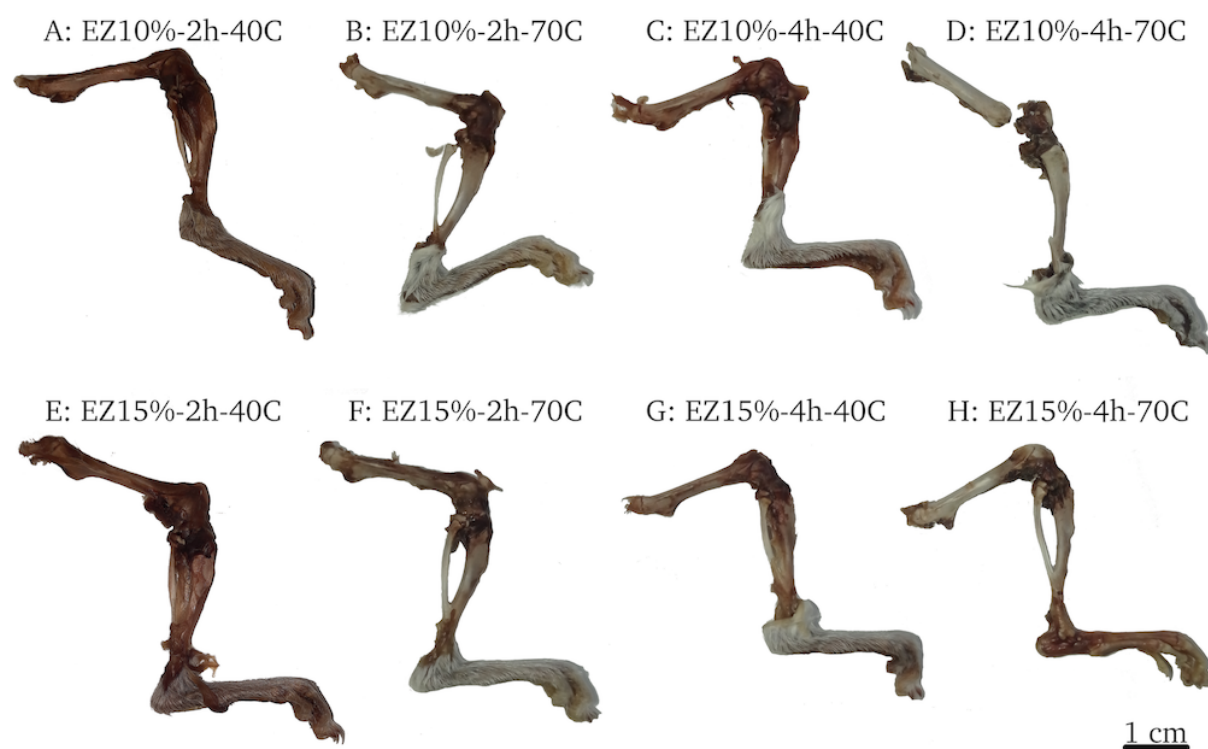


Figura 2.17: miembros posteriores de rata al finalizar los tratamientos de digestión enzimática del estudio definitivo.

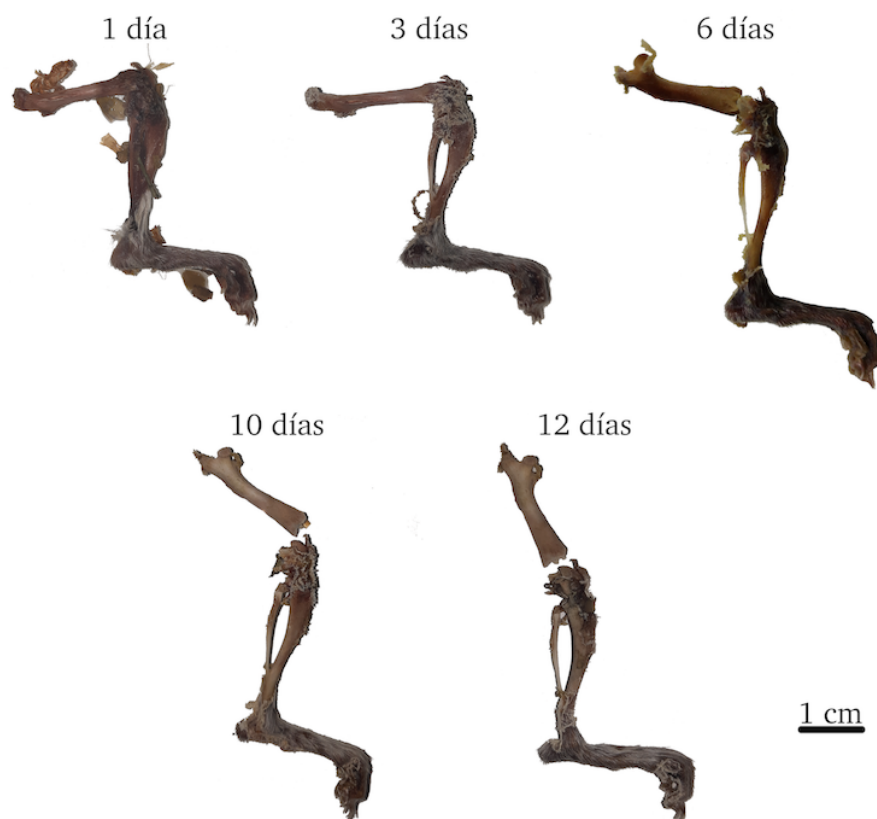


Figura 2.18: evolución de un miembro posterior de rata expuesto a la acción de tenebrios, a lo largo del periodo experimental del estudio definitivo.

2.3.2.2. Análisis microscópico: eficacia en la remoción de tejidos blandos y efecto de los tratamientos sobre la superficie ósea

En las imágenes de MEB correspondientes al Control, se pudo observar gran cantidad de restos blandos que ocuparon, en promedio, casi un 70 % de la superficie analizada (Fig. 2.19), y las áreas de hueso limpio no presentaron síntomas de daño (Fig. 2.20).

Los especímenes sometidos a enterramiento variaron respecto a la cantidad de tejidos blandos remanentes y al deterioro óseo. En E-15 se observó la persistencia de escasos restos (Fig. 2.19), principalmente en la región del cuello del fémur, como así también porosidad en las áreas limpias

del hueso (Fig. 2.21 A, B, C). En los otros dos tratamientos (E-30 y E-45), los huesos carecieron por completo de remanentes blandos, y el nivel de daño fue notable (Fig. 2.21 D a I). En ambos casos, tanto la cabeza femoral como el trocánter mayor presentaron áreas con un grado importante de deterioro en la totalidad de las muestras. A pesar de los síntomas de daño observados, no se detectaron surcos de aspecto similar a los registrados en los tratamientos de enterramiento del estudio preliminar. Tampoco se observaron fisuras en la base de la cabeza del fémur ni del trocánter mayor.

De los tratamientos de digestión química, el único que dejó restos blandos fue KOH5%-2h-40C, pero en una cantidad significativamente menor a la del Control (Fig. 2.19). Dichos remanentes se localizaron principalmente sobre el trocánter mayor y la fosa trocantérica, observándose además algo de porosidad en algunas de las áreas limpias de los huesos (Fig. 2.22 A, B, C). Para los restantes tratamientos al 5 % (Fig. 2.22 D a L), el nivel de daño se incrementó con el aumento de la temperatura y del tiempo de exposición, llegándose a ver incluso delaminación ósea en algunas de las muestras sometidas a 4 horas (Fig. 2.22 G, H, I). El efecto perjudicial fue marcadamente superior en los tratamientos al 10 % (Fig. 2.23), hasta el punto de registrarse pérdida de material óseo en algunas réplicas de la combinación más agresiva (KOH10%-4h-70C; Fig. 2.23 J, K).

Los tratamientos de digestión enzimática fueron los que arrojaron peores resultados en términos de limpieza. En todas las muestras persistieron restos de tejidos blandos en cantidad variable según el tratamiento, y solo EZ10%-2h-70C se diferenció significativamente del Control (Fig. 2.19). Dichos remanentes se localizaron principalmente en la fosa trocantérica,

con algunos restos ocupando también los trocánteres mayor y menor y parte de la diáfisis (Figs. 2.24 y 2.25). Las áreas expuestas de los huesos tratados con solución al 10 % evidenciaron poco o ningún deterioro, excepto para algunas de las muestras sometidas a EZ10 %-4h-70C, que exhibieron porosidad leve a nivel de la cabeza femoral (Fig. 2.24). En los tratamientos de mayor concentración, el deterioro en las áreas de hueso limpio también fue escaso o estuvo acotado a pequeños sectores para los tratamientos a 40°C (Fig. 2.25 A, B, C, G, H, I). Sin embargo, en las dos combinaciones de mayor temperatura (EZ15 %-2h-70C y EZ15 %-4h-70C), se observó un daño más marcado, especialmente a nivel de la cabeza femoral y del trocánter mayor (Fig. 2.25 D, E, J, K, L).

La exposición a larvas y adultos de tenebrios permitió obtener huesos con un grado de limpieza significativamente mejor que el del Control (Fig. 2.19). Sin embargo, persistieron algunos restos blandos firmemente adheridos a los trocánteres mayor y menor, con parte de los mismos sobresaliendo en superficie (Fig. 2.26). El nivel de daño fue sumamente marcado, observándose un deterioro muy profundo especialmente a nivel de la cabeza femoral, trocánter mayor y fosa trocantérica, llegándose a registrar incluso pérdida de material óseo.

Los resultados del porcentaje de tejidos blandos remanentes y del aspecto de la superficie ósea, obtenidos a partir del estudio microscópico, permitieron asignar valores a los distintos tratamientos, según la escala detallada en la Tabla 2.7. La combinación de estos datos con los resultados en calidad del hueso, según la valoración realizada en el estudio macroscópico, se detalla en los gráficos de la Fig. 2.27.

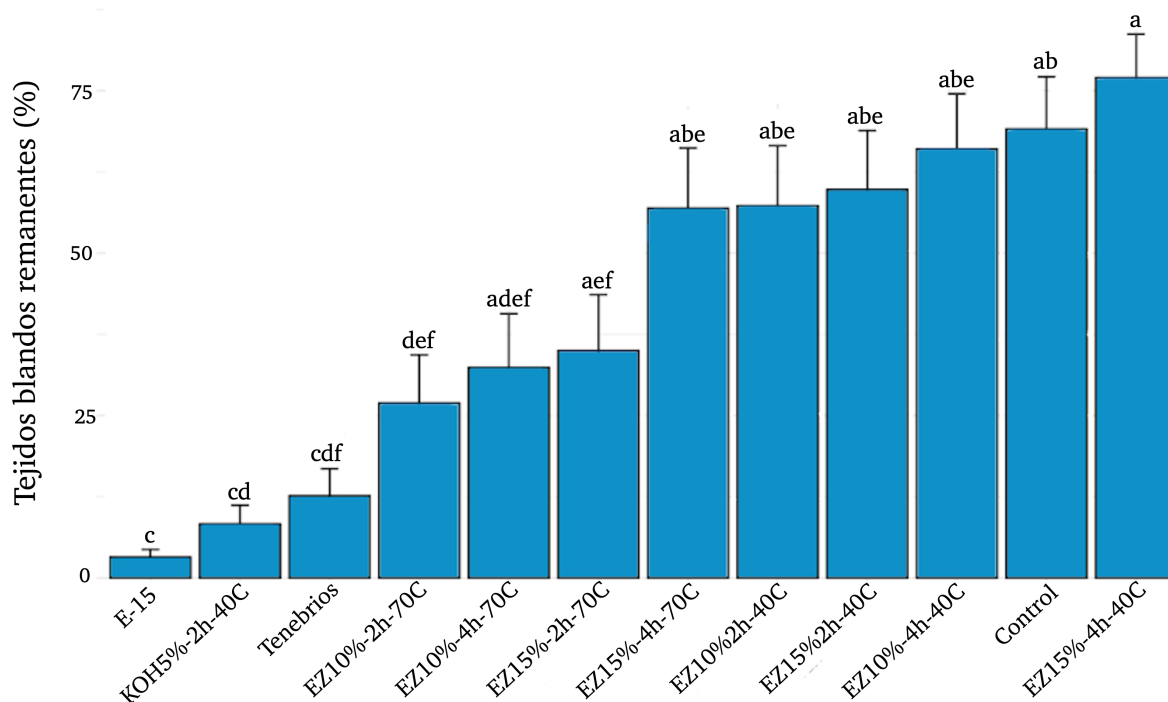


Figura 2.19: porcentaje promedio (\pm error estándar) de tejidos blandos remanentes al finalizar los tratamientos del estudio definitivo, calculados a partir del análisis cuantitativo realizado sobre las imágenes de MEB. Los resultados se ubican en orden creciente para dicho parámetro, y no se representan los casos donde la remoción de tejidos blandos fue total. Las diferencias significativas entre tratamientos se indican con letras diferentes ($X^2=156,98$; g.l.=11; $p<0,01$).

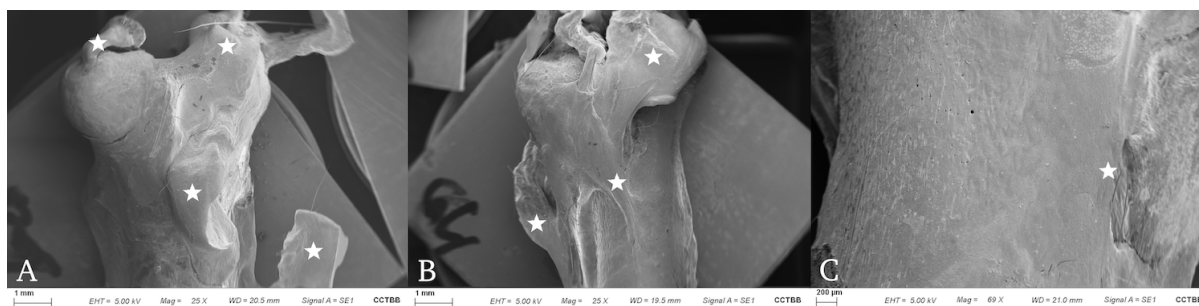
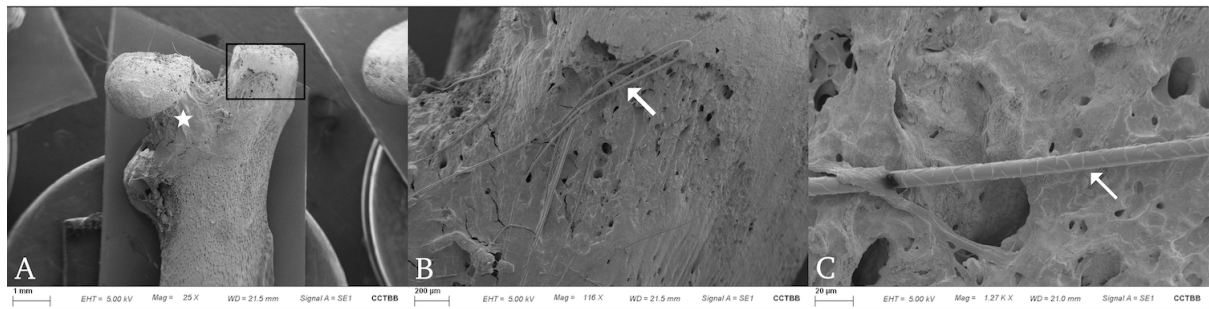
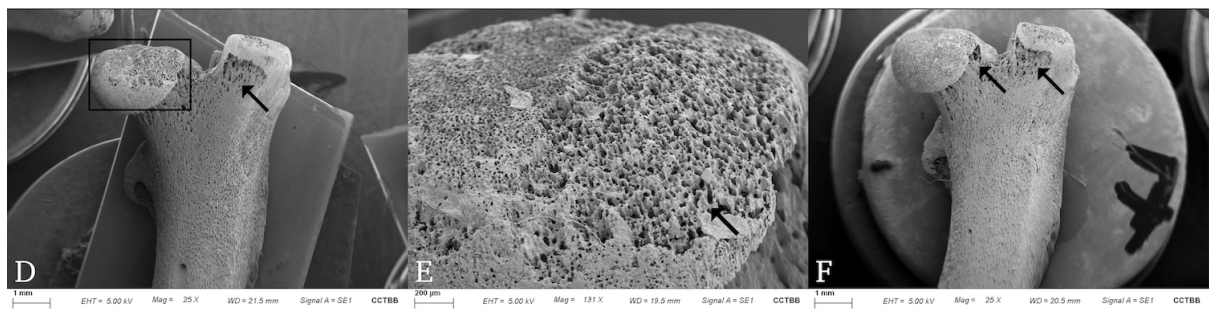


Figura 2.20: microfotografías de MEB que muestran la superficie ósea de tres muestras correspondientes al Control del estudio definitivo. A y B: Obsérvese la gran cantidad de restos de tejidos blandos (estrellas blancas). C: detalle de una zona de hueso limpio a mayor aumento, para mostrar la ausencia de daño en la superficie.

E-15



E-30



E-45

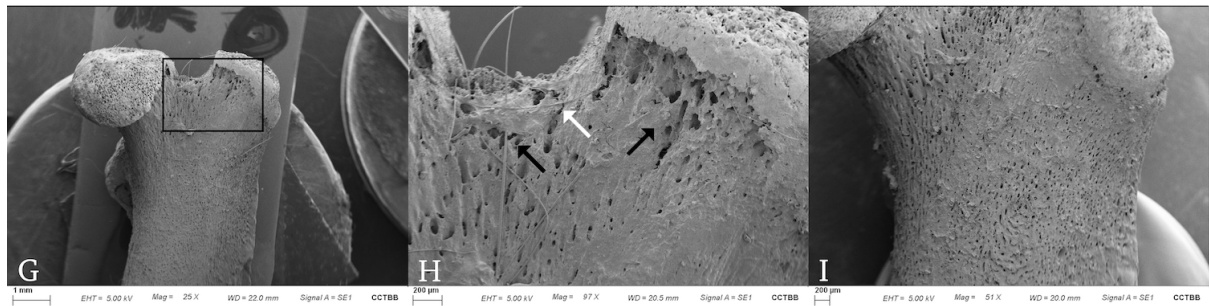


Figura 2.21: microfotografías de huesos sometidos a los tratamientos de enterramiento del estudio definitivo, obtenidas mediante MEB. Para cada tratamiento: las imágenes a izquierda y derecha corresponden a ejemplares diferentes, y las centrales son detalles ampliados de los sectores identificados con recuadros. Estrellas blancas: restos de tejidos blandos; flecha blanca: pelos; flechas negras: zonas de deterioro.

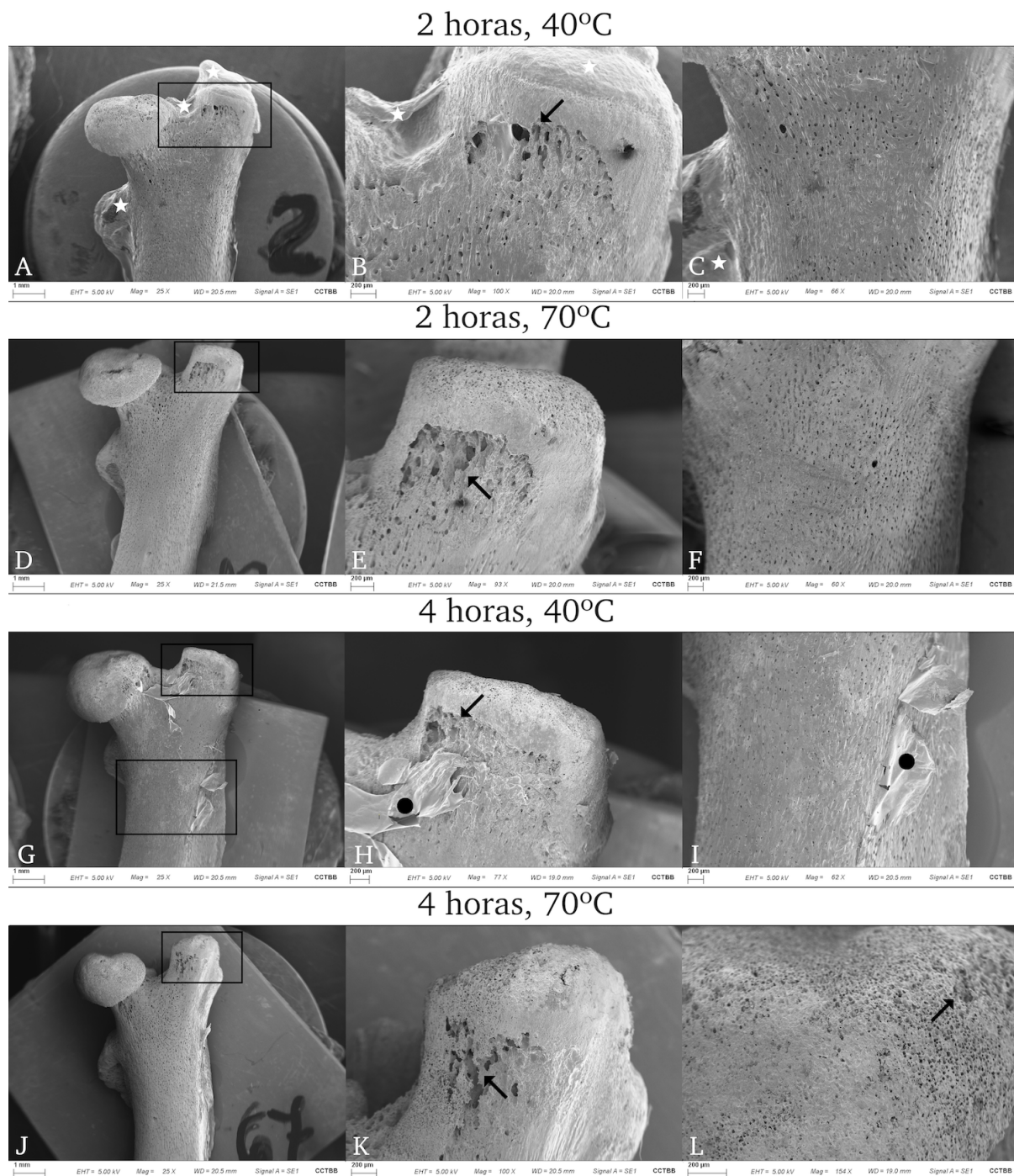


Figura 2.22: microfotografías de huesos sometidos a tratamientos de digestión química con KOH al 5 % del estudio definitivo, obtenidas mediante MEB. Para la combinación 4h-40C, las tres imágenes corresponden al mismo ejemplar (H e I: vistas a mayor aumento de los sectores indicados con recuadros en J). Para los demás tratamientos, las imágenes a izquierda y derecha corresponden a ejemplares diferentes y las centrales son vistas a mayor aumento de los sectores señalados. Estrellas blancas: restos de tejidos blandos; flechas negras: zonas de deterioro; círculos negros: delaminación.

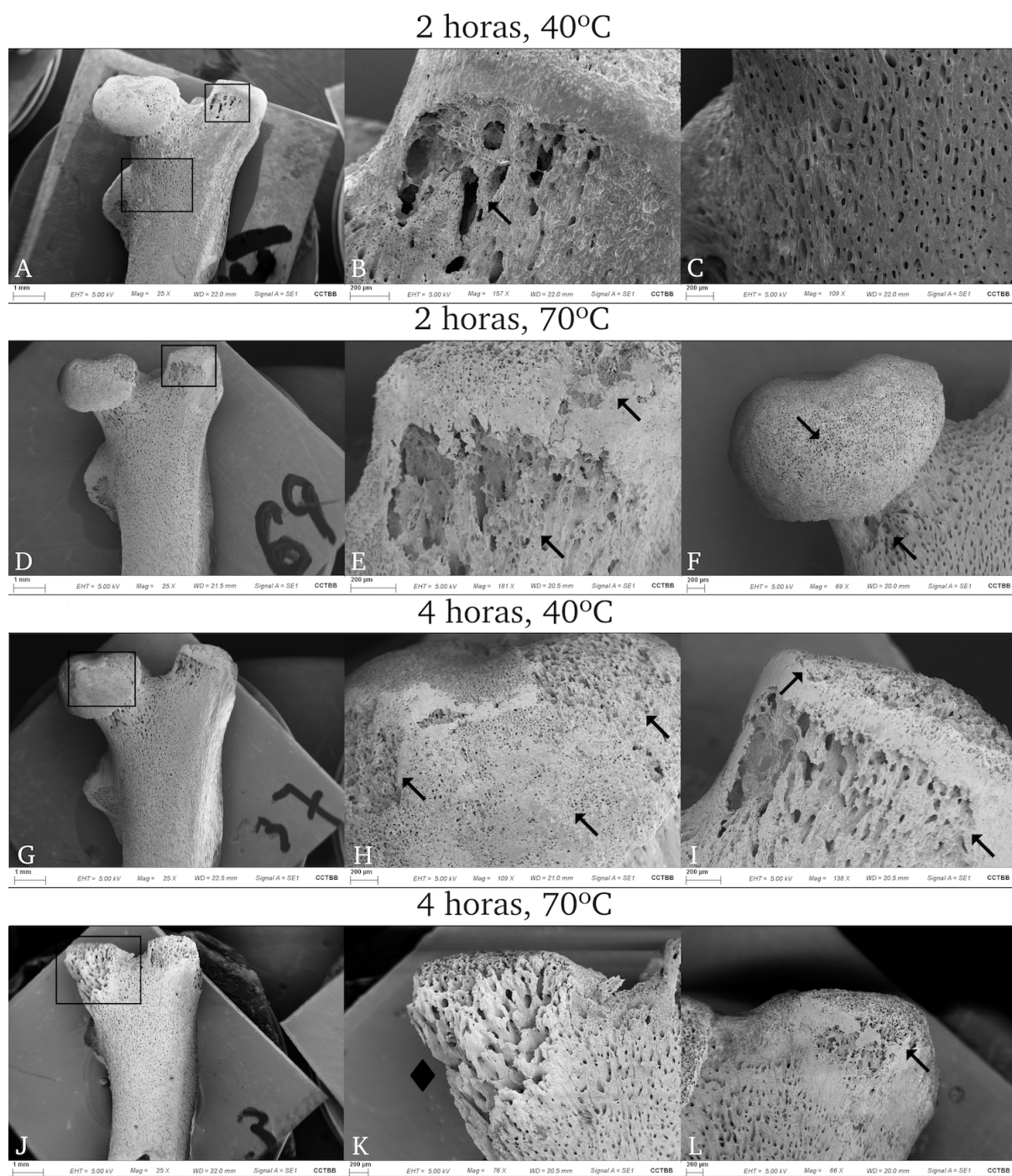


Figura 2.23: microfotografías de huesos sometidos a tratamientos de digestión química con KOH al 10 % del estudio definitivo, obtenidas mediante MEB. Para la combinación menos agresiva (2h-40C), las tres imágenes corresponden al mismo ejemplar (B y C: vistas a mayor aumento de los sectores indicados con recuadros en A). Para los demás tratamientos, las imágenes a izquierda y derecha corresponden a ejemplares diferentes y las centrales son vistas a mayor aumento de los sectores recuadrados. Nótese en J (y a mayor detalle en K) la desintegración ocurrida a nivel de la cabeza femoral. Flechas negras: zonas de deterioro; diamante negro: pérdida de material.

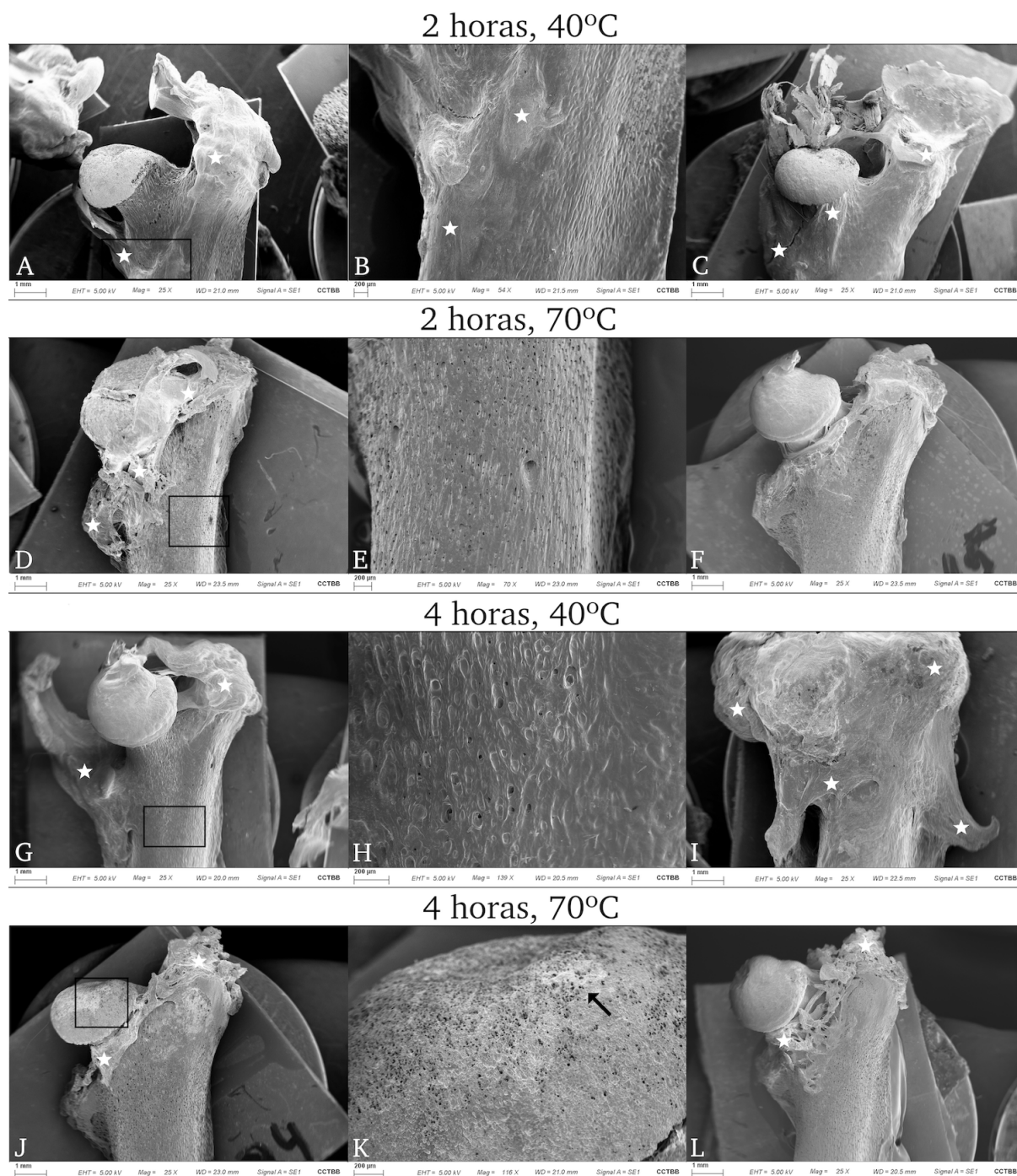


Figura 2.24: microfotografías de huesos sometidos a tratamientos de digestión con jabón enzimático al 10% del estudio definitivo, obtenidas mediante MEB. Para cada combinación de tiempo de exposición y temperatura, las imágenes a izquierda y derecha corresponden a ejemplares diferentes y las centrales son detalles ampliados de los sectores identificados con recuadros. Estrellas blancas: restos de tejidos blandos; flechas negras: zonas de deterioro.

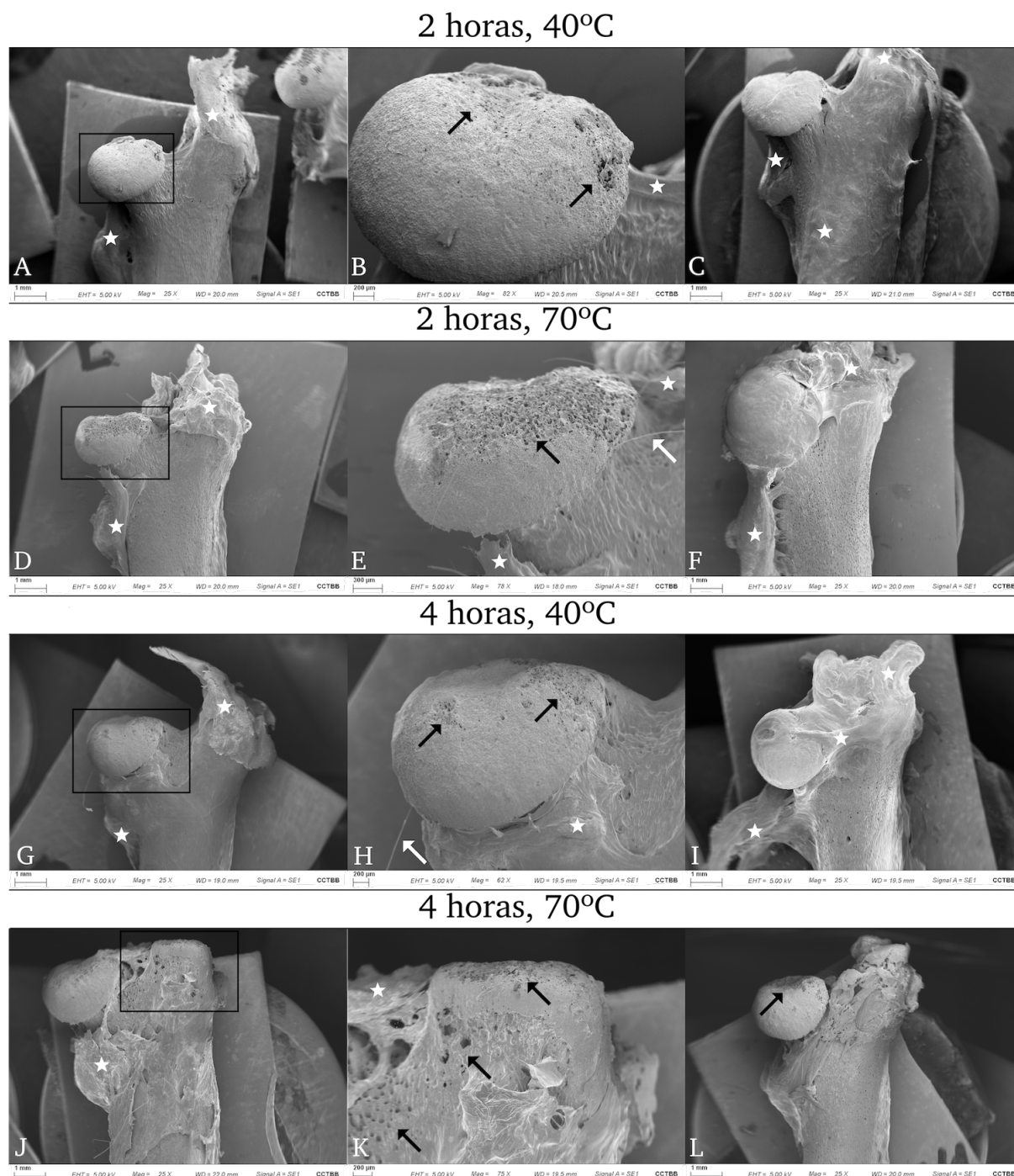


Figura 2.25: microfotografías de huesos sometidos a tratamientos de digestión con jabón enzimático al 15% del estudio definitivo, obtenidas mediante MEB. Para cada combinación de tiempo de exposición y temperatura, las imágenes a izquierda y derecha corresponden a ejemplares diferentes y las centrales son detalles ampliados de los sectores identificados con recuadros. Estrellas blancas: restos de tejidos blandos; flechas negras: zonas de deterioro; flechas blancas: pelos.

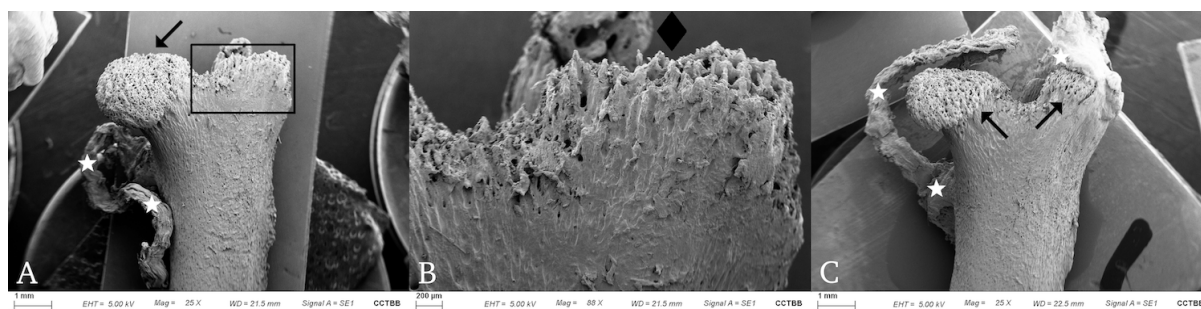


Figura 2.26: microfotografías de huesos sometidos a la limpieza con tenebrios, durante el estudio definitivo. A y C corresponden a ejemplares diferentes; B es una vista a mayor aumento del sector identificado con recuadro en A. Estrellas blancas: restos de tejidos blandos; diamante negro: pérdida de material óseo; flechas negras: zonas de deterioro marcado.

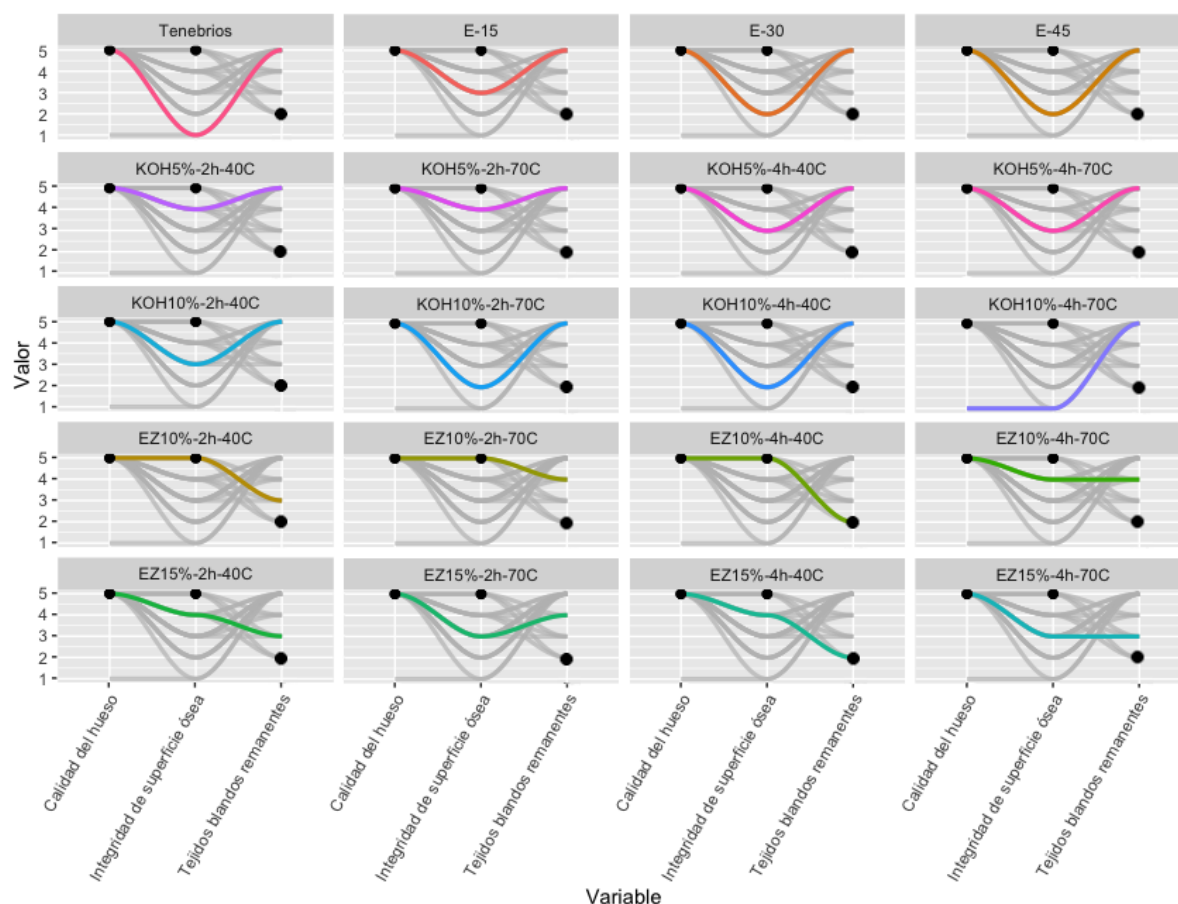


Figura 2.27: valores promedio de parámetros obtenidos a partir de los análisis macroscópicos (calidad del hueso) y microscópicos (integridad de la superficie ósea, tejidos blandos remanentes) de los fémures de ratas Wistar sometidas a los diferentes tratamientos del estudio definitivo. Para cada figura: el control se representa mediante puntos negros, mientras que los diferentes tratamientos se representan mediante líneas, destacando en color el correspondiente al tratamiento indicado en cada caso. Nótese que, para cada parámetro, 1 y 5 son los peores y mejores valores, respectivamente.

2.3.2.3. Efectos de los tratamientos sobre las propiedades biomecánicas del hueso

El ensayo de flexión se realizó en la mayoría de las muestras, a excepción de las resultantes del tratamiento KOH10 %-4h-70C (que se rompieron durante la fase de detección del aparato debido a su fragilidad extrema), y de una que no pudo recuperarse al final del tratamiento E-45 (mencionado previamente). Los valores promedio de los parámetros analizados (\pm desvío estándar) y los resultados de los análisis estadísticos se detallan en la Tabla 2.10. Como puede observarse en la misma, solo dos tratamientos (KOH5 %-4h-70C y KOH10 %-2h-70C) exhibieron valores significativamente más bajos que los del Control para la **fuerza de fractura**, **fuerza máxima** y **estrés máximo**, pero no se detectaron diferencias significativas entre ellos. El **módulo de Young** fue significativamente más alto que el del Control únicamente en E-15 y E-45, mientras que para las restantes variables (**energía absorbida**, **ancho cortical** y **rigidez**) no se detectaron diferencias significativas con respecto al Control, para ninguno de los tratamientos ensayados.

Tabla 2.10: valores promedio (\bar{X}) y desvío estándar (d.e.) para las variables relativas al ensayo de flexión en tres puntos. Las diferencias significativas entre los valores medios de los distintos tratamientos se indican con letras diferentes, y se resaltan en sombreado aquellas que resultaron significativas con respecto al Control. El ensayo no pudo realizarse en las muestras resultantes del tratamiento KOH10 %-4h-70C, debido a su fragilidad extrema.

		Control	E-15	E-30	E-45	KOH5 %-2h-40C	KOH5 %-2h-70C	KOH5 %-4h-40C	KOH5 %-4h-70C	KOH10 %-2h-40C	KOH10 %-2h-70C	KOH10 %-4h-40C	EZ10 %-2h-40C	EZ10 %-2h-70C	EZ10 %-4h-40C	EZ10 %-4h-70C	EZ15 %-2h-40C	EZ15 %-2h-70C	EZ15 %-4h-40C	EZ15 %-4h-70C	Tenebrios
Fuerza de fractura	\bar{X}	55,6	58,1	54,6	56,3	56,2	44,8	48,0	31,7	55,8	28,3	46,3	63,1	49,9	65,0	53,9	64,8	52,0	50,4	43,4	56,6
	d.e.	7,8	3,7	6,1	4,3	5,8	6,1	7,7	2,1	8,3	4,4	5,6	18,4	11,7	8,5	4,0	9,6	19,3	4,0	8,7	6,2
		abc	bc	abc	abc	abc	a	abc	de	abc	d	a	abc	bce	c	abc	c	abcde	abc	abde	abc
Fuerza máxima	\bar{X}	56,1	58,3	55,4	57,8	57,1	46,3	51,6	33,5	56,1	29,9	47,7	64,1	50,2	65,1	54,1	66,2	52,4	54,5	47,8	57,0
	d.e.	7,7	3,7	6,1	4,3	6,6	6,9	7,6	3,6	8,2	3,6	5,6	17,2	11,5	8,5	4,1	10,0	19,5	4,3	10,0	6,6
		ab	ab	ab	ab	ab	ac	ab	cd	ab	d	a	ab	abc	b	ab	b	abcd	ab	abc	ab
Estrés máximo	\bar{X}	72,4	88,9	95,7	82,2	72,3	60,6	64,0	44,6	73,8	43,8	56,5	79,7	73,7	76,9	84,4	80,7	78,0	73,4	74,5	72,3
	d.e.	13,0	6,8	26,5	8,8	13,0	12,9	8,4	2,7	11,8	8,1	9,5	21,1	19,0	11,1	7,7	14,7	39,1	24,1	16,6	7,2
		abcd	a	abcd	abc	abcd	bcdef	cd	f	abcd	ef	def	abcdef	abcdef	abcd	ab	abcd	abcdef	abcdef	abcde	bcd
Rigidez	\bar{X}	149,3	191,4	167,8	196,3	176,5	132,0	149,3	119,9	168,8	85,7	137,1	211,4	197,4	198,2	166,5	213,1	177,9	140,9	174,9	218,7
	d.e.	27,1	14,8	30,8	36,2	42,3	8,1	33,3	27,8	33,3	27,0	33,9	64,7	23,7	30,6	11,9	31,3	76,4	54,7	48,4	43,2
		abcde	e	bcde	e	bcde	ab	abcde	abc	bcde	a	abcde	bcde	de	de	cde	de	abcde	abcd	abcde	de
Módulo de Young	\bar{X}	1262	2021	2005	1912	1482	1139	1273	1080	1455	881	1089	1758	1957	1500	1735	1744	1890	1312	1776	1832
	d.e.	245,3	278,7	767,0	414,1	442,8	189,9	468,7	245,3	312,9	358,5	439,6	594,9	369,6	418,0	185,0	420,3	1190,2	657,2	261,3	398,0
		abc	e	abcde	de	abcde	ab	abcde	ab	abcde	a	abcd	abcde	cde	abcde	cde	abcde	abcde	abcde	cde	bcde
Energía absorbida	\bar{X}	23,0	19,4	28,4	19,6	28,1	27,2	22,7	12,3	31,1	11,6	25,9	36,6	13,2	24,3	18,7	22,4	21,4	32,7	22,4	18,5
	d.e.	10,5	6,0	14,1	6,5	15,5	5,8	11,9	5,6	12,3	4,8	15,7	18,0	8,5	14,8	2,8	5,8	14,7	6,9	11,3	4,7
		abc	abc	abc	abc	abc	c	abc	ab	abc	a	abc	abc	abc	abc	abc	abc	abc	abc	bc	abc
Ancho cortical	\bar{X}	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,6	0,7	0,6	0,8	0,7	0,7	0,6	0,7
	d.e.	0,04	0,05	0,04	0,01	0,02	0,03	0,03	0,03	0,05	0,04	0,03	0,02	0,04	0,06	0,03	0,04	0,03	0,08	0,04	0,04
		ab	ab	ab	ab	b	ab	b	ab	ab	ab	b	b	ab	ab	a	ab	ab	ab	ab	ab

2.3.2.4. Efectos de los tratamientos sobre la calidad y cantidad de ADN

La extracción de ADN fue posible a partir de todos los complejos tibio-fibulares sometidos a las distintas técnicas de limpieza ensayadas, aunque la concentración del mismo varió significativamente entre los diferentes tratamientos ($X^2=262,06$; g.l.=20; $p<0,001$). En general, los huesos sometidos a digestión enzimática presentaron las concentraciones más elevadas, y que no difirieron significativamente del Control, mientras que en los tratamientos con tenebrios, digestión química y enterramiento, las concentraciones fueron significativamente más bajas que la del Control (Fig. 2.28 A). No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de digestión enzimática, ni entre los de digestión química y el de digestión biológica (tenebrios).

La relación A260/280 también varió significativamente entre los tratamientos ($X^2=477,79$; g.l.=20; $p<0,001$). E-30 y E-45, así como aquellos con KOH a 40°C (para todas las concentraciones y tiempos de exposición, excepto KOH10 %-4h-40C), y KOH5 %-2h-70C fueron los únicos que difirieron estadísticamente del Control. Los valores medios fueron en todos ellos inferiores a 1,6, indicando la presencia de contaminantes como proteínas o fenol (Fig. 2.28 B).

En cuanto a la relación A260/230, la cual también varió significativamente entre los tratamientos ($X^2=242,37$; g.l.=20; $p<0,001$), solo E-30, KOH5 %-2h-40C y KOH5 %-4h-40C difirieron significativamente del Control. Los valores medios, inferiores a 2, indicaron una posible contaminación con compuestos orgánicos tales como EDTA, TRIzol, derivados de guanidina, fenoles, sales caotrópicas o hidratos de carbono (Fig. 2.28 C).

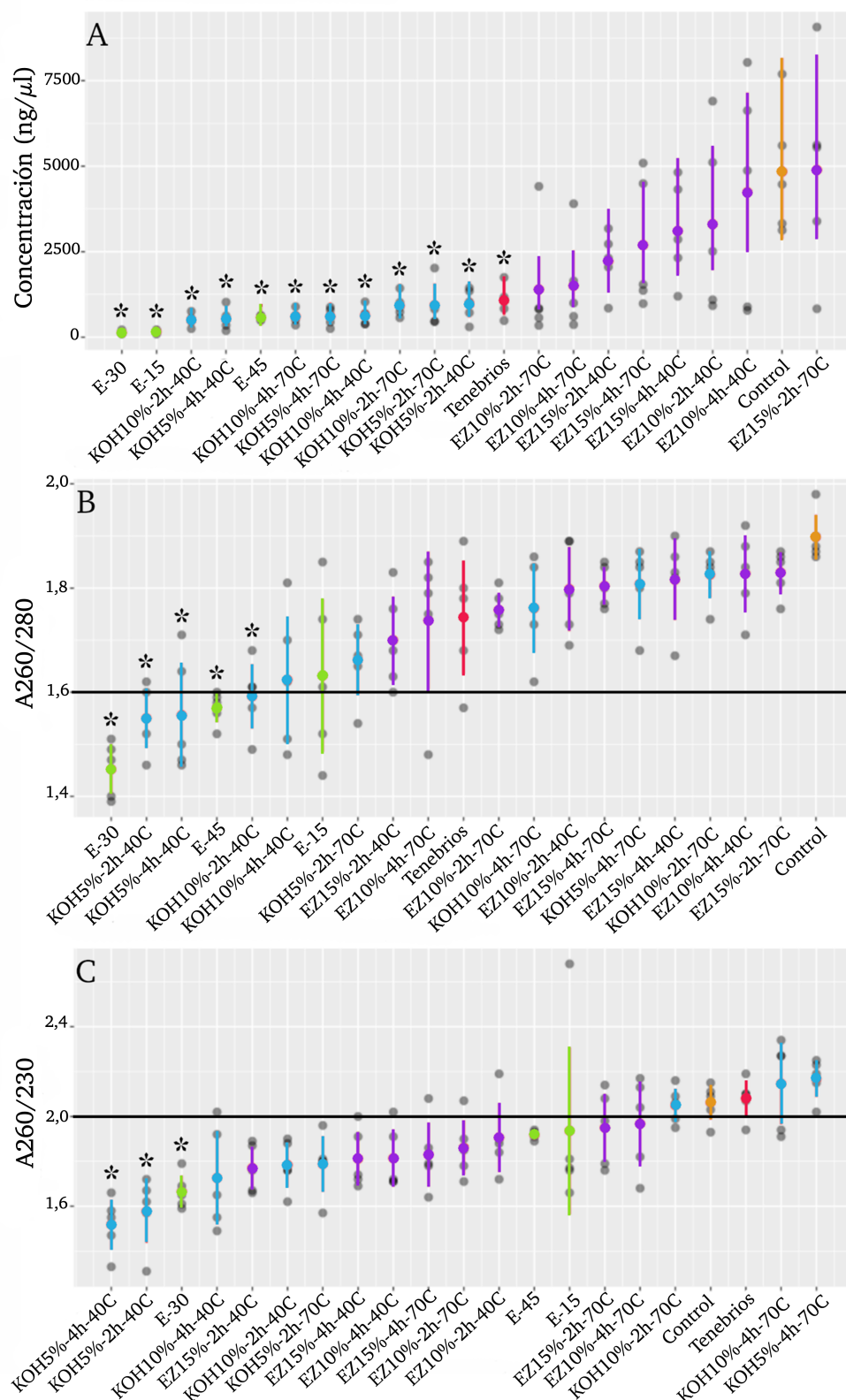


Figura 2.28: concentración de ADN (A), relación A260/280 (B) y relación A260/230 (C) de los complejos tibio-fibulares de rata sometidos a los distintos tratamientos del estudio definitivo. Puntos grises: valores individuales; círculos de color: promedios; líneas verticales: intervalos de confianza del 95%. Asteriscos: diferencias significativas con el Control. Las líneas negras horizontales en B y C indican el valor umbral de presencia de contaminantes.

2.4. Discusión

Los distintos tratamientos ensayados en este trabajo son de uso frecuente en las colecciones de historia natural. Los resultados obtenidos, tanto en el estudio preliminar como en el definitivo, evidenciaron que los huesos sometidos a las distintas técnicas de limpieza presentaron diferencias en todos los parámetros evaluados.

2.4.1. Eficacia de limpieza e integridad ósea

Algunas de las técnicas implementadas provocaron daños graves a nivel superficial, y los resultados del análisis histológico realizado en el estudio preliminar pusieron en evidencia también daños a nivel de estructura interna. Sin embargo, para poder establecer una correlación entre el deterioro observado en superficie (a través de MEB) y la profundidad del daño, habría sido necesario realizar un análisis histológico mediante cortes seriados, considerando el mismo segmento óseo en ambos tipos de estudios. Ello habría implicado la necesidad de aumentar el número de réplicas destinadas a cada tratamiento y, por ende, un mayor sacrificio de animales.

El enterramiento fue altamente efectivo en cuanto a la remoción de tejidos blandos. Sin embargo, aunque el tratamiento de 15 días resultó en una limpieza aceptable sin daños significativos en la superficie, los más prolongados causaron un alto nivel de deterioro óseo. Este daño no fue evidente a simple vista, pero pudo observarse claramente en el análisis microscópico.

Cuando los huesos son enterrados quedan sometidos a un proceso de diagénesis, conformado por el conjunto de cambios físicos y/o químicos que

ocurren a diferentes niveles estructurales y profundidades de los mismos (Barrientos et al., 2016). Estas modificaciones resultan de la interacción entre factores intrínsecos, que dependen del material, y extrínsecos, relacionados con las características abióticas y bióticas del medio donde se encuentran enterradas las piezas (Barrientos et al., 2016; Hedges, 2002; Nielsen-Marsch & Hedges, 2000). Entre estos últimos, cobra gran importancia la acción de los invertebrados del suelo. Aunque se ha prestado poca atención a los grupos que actúan bajo tierra como agentes de modificación ósea, existen varios reportes que documentan la acción de diversos taxa en la descomposición de restos expuestos (Backwell et al., 2021; Fernandez et al., 2022; Fernández-Jalvo & Andrews, 2016a; Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008; Zanetti et al., 2019, entre otros).

Entre los agentes bióticos también son importantes los microorganismos del suelo, cuya acción ha sido señalada como una de las causas más comunes de degradación en huesos enterrados (Eriksen et al., 2020). Los microorganismos pueden degradar el colágeno, aumentando la porosidad ósea (Barrientos et al., 2016; C. I. Smith et al., 2002), o provocando la aparición de túneles característicos si el período por el que se mantienen enterradas las piezas es considerable, como reportaron Turner-Walker et al. (2023) en huesos de vaca enterrados por períodos de entre 1 y 10 años. También, como se describirá más adelante, se ha documentado una posible pérdida de ADN por ataque bacteriano (C. I. Smith et al., 2002). Si bien en los tratamientos probados en este trabajo los períodos de enterramiento fueron relativamente cortos, los efectos del tiempo fueron evidentes al comparar el aspecto de la superficie de los huesos resultantes. En este sentido, los mayores daños fueron observados en fémures sometidos al

tratamiento de mayor duración del estudio preliminar (60 días), donde el deterioro fue considerable y especialmente marcado a nivel de la epífisis, con la aparición de fisuras severas en la base de la cabeza femoral y del trocánter mayor. Dado que se trabajó con ratas jóvenes, y que esas fisuras se localizaron en el lugar que ocupan los discos epifisarios (Canillas del Rey, 2009), se postula que este daño podría deberse a una condrólisis provocada por el ataque microbiano al cartílago de crecimiento. Aunque no se conocen reportes de la ocurrencia de este fenómeno en restos óseos de animales jóvenes que hayan sido sometidos a enterramiento, existen datos de necrosis y condrólisis causadas por bacterias y hongos, tanto *in vivo* como *in vitro*, para varios tipos de enfermedades osteoarticulares en aves y mamíferos (Alder et al., 2020; Daniel et al., 1973, 1976; Scher et al., 2016; R. Smith et al., 1987; Wideman & Prisby, 2013; Zimmerli, 2015).

Los restos óseos enterrados son muy susceptibles también de ser invadidos por raíces vegetales, ya que constituyen una fuente potencial de nutrientes altamente concentrados para las plantas, especialmente compuestos nitrogenados y fosfatos (Pokines & Baker, 2014). La invasión radicular en la superficie ósea produce un efecto conocido como vermiculación (Pineda & Saladié, 2022), es decir, deja un grabado característico de surcos finos y ramificados, causados por la disolución del tejido debido a la transferencia de fósforo desde los huesos al sistema radicular (Pokines & Baker, 2014). Aunque dicho fenómeno se asocia habitualmente a restos antiguos (Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008; Pineda & Saladié, 2022; Zhang et al., 2016), Pokines y Baker (2018) sugieren que podría darse también en restos modernos. Estas trazas, a su vez, tienen en ciertos casos semejanzas con las que dejan algunos

invertebrados (Blatt et al., 2024). En este sentido, los grupos que han sido señalados como los principales agentes tafonómicos con capacidad para provocar modificaciones óseas son algunos coleópteros y las termitas (Fernandez et al., 2022). En el presente trabajo se encontraron grabados dendríticos en los huesos sometidos al mayor período de enterramiento (60 días, estudio preliminar), y las muestras poseían en superficie fragmentos de raíces delgadas, así como diplópodos movilizándose sobre ellas. El papel crucial que desempeñan los milpiés en la descomposición de materia orgánica muerta ha sido puesto de manifiesto por algunos autores (Crawford, 1990; Kime & Golovatch, 2000; Laurito & Valerio, 2018; Mbenoun Masse et al., 2018), con algunos reportes de taxa necrófagos (Striganova, 1980, en Kime y Golovatch, 2000)). Sin embargo, el grupo observado en este estudio (Julida) se caracteriza por una dieta detritívora, con piezas bucales de poca movilidad (Spelda, 2015; Vicente, 1988) y que no parecen ser adecuadas para provocar marcas visibles sobre el tejido óseo. Teniendo en cuenta todo lo expuesto, y considerando la gran similitud de las marcas observadas en el presente trabajo con registros fotográficos de huesos afectados por la acción de raíces (Blatt et al., 2024; Kendell et al., 2023; Knüsel & Robb, 2016; Pokines, 2018; Zhang et al., 2016), se sugiere que este podría haber sido el fenómeno responsable de la aparición de surcos en el tratamiento prolongado, aunque no se descarta la acción de otros organismos del suelo.

A la posibilidad de deterioro óseo causado por uno o varios de los factores mencionados, se le suman otros aspectos adversos de la técnica, como el largo tiempo requerido para la obtención del material, la imposibilidad de monitorear el proceso para controlar el avance del mismo y la probabilidad

de pérdida de piezas pequeñas. Este último fenómeno ocurrió durante el presente trabajo, con uno de los fémures del tratamiento E-45 del estudio definitivo. Con respecto a esto, debe tenerse en cuenta que las especies que viven dentro del suelo pueden dispersar huesos a través de procesos de bioturbación. Armour-Chelu y Andrews (1994) examinaron el potencial de las lombrices de tierra comunes (*Lumbricus terrestris*) para desplazar huesos enterrados de ratón (*Mus domesticus*) y de topillo rojo (*Clethrionomys glareolus*). Encontraron que un solo ejemplar puede provocar el desplazamiento incidental de huesos a distancias considerables, tanto vertical (20 cm) como horizontalmente (15 cm), probablemente como consecuencia de movimientos del suelo durante el cavado. Todos estos aspectos inherentes al enterramiento deben ser sopesados al momento de la preparación de material esquelético, en relación a las ventajas que otorga el método en cuanto a la facilidad de implementación, con mínimo esfuerzo para el operador, y al bajo costo involucrado.

Los tratamientos de digestión química mediante KOH resultaron también efectivos para remover los tejidos blandos, con una tasa de éxito que aumentó a medida que se incrementó la concentración del agente, la temperatura y los tiempos de exposición. La eficacia de este compuesto como limpiador óseo se debe a su naturaleza alcalina, que le permite degradar fácilmente las proteínas presentes en la muestra (Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008; Thompson, 2015), constituyendo una opción rápida en las preparaciones esqueléticas. Sin embargo, se debe controlar la agresividad de las combinaciones. Un incremento en la temperatura, por ejemplo, acelera los procesos de digestión de los tejidos. Muchas de las proteínas presentes en los músculos comienzan a desnaturalizarse a los

40°C, mientras que el colágeno, componente clave en tendones, ligamentos y huesos, comienza a desnaturalizarse a los 60°C y gelatiniza a los 70° (Leeper, 2015). Este efecto, que se incrementa en el tiempo (Sun et al., 2006), provoca aumento de porosidad, deformación y alteración de la microestructura ósea, debido a que el colágeno amalgama los cristales de hidroxiapatita (Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008). La técnica también conlleva la necesidad de aplicar el protocolo en un ambiente que cuente con las medidas de seguridad necesarias, tanto para el manejo como para la eliminación de estas sustancias químicas.

De los tratamientos probados en el estudio definitivo, KOH5 %-2h-40C fue el único que dejó restos de tejidos blandos, aunque cubrieron en promedio menos del 10 % de la superficie ósea. Resultados similares se obtuvieron con KOH5 %-2h-70C (Fig. 2.27); las demás combinaciones, que implicaron mayor agresividad, eliminaron todo el tejido blando pero causaron más daño óseo, incluyendo un aumento de la porosidad. Estos daños solo se observaron microscópicamente, a excepción del tratamiento con KOH10 %-4h-70C, que mostró un evidente deterioro del material una vez finalizado el período experimental. Botero-González y Agudelo (2019), limpiando cráneos de ratas con soluciones de KOH de concentración creciente (1 %, 5 % y 10 %), a distintas temperaturas (21,5 a 45,5°C) y tiempos variables, también reportaron persistencia de restos de tejido a las mayores diluciones, pero observaron desarticulación y pérdida de material óseo en varios de los tratamientos, principalmente de huesos cigomáticos. En nuestro caso, si bien las distintas combinaciones presentaron diferentes grados de deterioro, no se verificó pérdida de fragmentos óseos de gran tamaño. Estas diferencias podrían atribuirse a la naturaleza diferencial del

fémur y de la arcada cigomática, siendo esta última una estructura delgada cuya osificación depende de la edad del animal, y que suele perderse en preparaciones osteológicas (Ruberte et al., 2017).

Con respecto a la digestión enzimática mediante detergente comercial, ninguna de las combinaciones ensayadas en el estudio definitivo eliminó por completo el tejido blando, dejando entre un 27 % y un 77 % de restos. De manera similar a lo sucedido con los tratamientos químicos, el aumento de la temperatura y la concentración de las soluciones enzimáticas mejoró la eficacia de la limpieza, pero en ningún caso se logró una remoción comparable a la lograda mediante digestión química. El nivel de deterioro observado en las áreas de hueso limpio (análisis microscópico) fue más leve que el registrado con las mismas combinaciones tiempo-temperatura de KOH (Fig. 2.27). Sin embargo, no pudo saberse el estado de la superficie en las áreas cubiertas, debido a que la grasa presente en los tejidos blandos es ópticamente transparente pero electrónicamente opaca y sólida, e impide la distinción de cualquier estructura por debajo de ella en los análisis de MEB (Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008).

Si bien en la bibliografía existen reportes de limpieza ósea completa con soluciones jabonosas enzimáticas, normalmente se requieren tiempos de exposición más prolongados o temperaturas más altas que las probadas en este estudio. Por ejemplo, Couse y Connor (2015) lograron huesos limpios (cráneos de puma, patas de oso y conjuntos de restos humanos) después de tratarlos con un detergente comercial durante 24 horas a 100°C. De manera similar, Faruk y Das (2023) limpiaron dos esqueletos de perro calentándolos a 50-60°C durante tres horas, y dejando posteriormente que la solución se enfriara durante 12 horas, con el material en inmersión. Sin embargo, al

efecto desnaturalizador del colágeno de las altas temperaturas, se le podría sumar una pérdida de la microestructura ósea por proliferación y ataque bacteriano debido al tiempo prolongado de exposición a las soluciones (Fenton et al., 2003; Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008; Mori, 1970). En el presente trabajo, un indicio del efecto negativo de las exposiciones prolongadas a soluciones enzimáticas fue evidente en el estudio preliminar, donde los mayores daños a nivel de la estructura histológica del tejido óseo fueron registrados en los tratamientos de mayor duración (70 horas). Al igual que en el caso de la digestión química, varios de estos efectos pueden no ser evidentes en lo inmediato, pero sí hacerse visibles a largo plazo.

Otro problema que se presenta con los detergentes de acción enzimática, es que no puede conocerse exactamente la composición química de los mismos, debido a la confidencialidad que involucran las marcas comerciales. Por lo tanto, la replicabilidad de los resultados está atada, en cierta medida, a utilizar siempre el mismo producto. A pesar de estas desventajas, los beneficios del uso de estos agentes son el bajo costo involucrado, la facilidad para su adquisición sin necesidad de tramitar permisos especiales, y los escasos (o nulos) riesgos para la salud, brindando mayor seguridad a los operadores (Mairs et al., 2004).

Las muestras expuestas a los tenebrios mantuvieron el tejido blando firmemente adherido a los trocánteres mayor y menor, a pesar del tiempo que se mantuvieron las muestras a disposición de los animales (12 días), sometiéndolas a remojo diario para favorecer el consumo. Las áreas expuestas de los huesos no evidenciaron daños a nivel macroscópico, pero las imágenes de MEB revelaron niveles de deterioro comparables al tratamiento más extremo de KOH (Fig. 2.27).

En la literatura existen distintos reportes de los daños que pueden producir los tenebrios y derméstidos sobre los huesos (Adams & Higley, 2024; Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008; Holden et al., 2013; Jara & Urrea, 2022; MacFarlane, 1971; Zacher, 1927). En el caso de derméstidos, se ha señalado que tanto los adultos como los estadios inmaduros pueden provocar alteraciones (Adams & Higley, 2024), pero los mayores daños parecen estar dados por las larvas porque, justo antes de la ninfosis, excavan túneles (cámaras pupales) para ocultarse y reducir el riesgo de depredación y canibalismo por parte de otras larvas (Archer & Elgar, 1998). Charabidzé et al. (2022) analizaron el daño causado por larvas de *Dermestes maculatus* en huesos humanos medievales y en huesos vacunos frescos, y reportaron múltiples lesiones (especialmente en los huesos antiguos), incluyendo marcas generadas por las mandíbulas en el hueso cortical, perforaciones corticales atribuidas a cámaras de pupación, destrucción de la red trabecular y perforación del cartílago.

Holden et al. (2013) diferenciaron las marcas dejadas por derméstidos y tenebrios, atribuyéndole al primer grupo trazas de “minería con aspecto picado”, y a los tenebriónidos rastros en forma de surcos superficiales y lineales, resultado de una remoción ósea gradual, extensa y consistente. En dicho trabajo reportaron también que la velocidad de consumo de los tenebrios es mayor que la de derméstidos, debido a que sus mandíbulas son, al menos, cuatro veces más grandes. En el presente estudio no se detectaron marcas en la superficie ósea como las que describen Holden et al. (2013) para *T. molitor*. Los mismos autores expresaron que es poco probable que cualquier insecto pueda crear tal daño en cuestión de unos pocos días, siendo necesario posiblemente un intervalo de varias semanas.

Sin embargo, a pesar de que en las muestras no se observaron marcas superficiales atribuibles a la acción del aparato bucal de estos animales, el grado de destrucción registrado con solo 12 días de exposición fue sumamente notable, llegándose incluso a la pérdida de material óseo a nivel de la cabeza y del trocánter mayor.

Allen y Neil (1950) señalaron las ventajas del uso de tenebrios, por sobre los derméstidos, para la limpieza de material esquelético: pueden ser mantenidos fácilmente en cualquier tipo de contenedor, casi sin necesidad de atención o cuidado, y no se dispersan ni infestan pieles secas. Como ventajas adicionales pueden mencionarse la facilidad de implementación, con mínimo esfuerzo por parte del operador, y el bajo costo involucrado dado que solo es necesario hacer una inversión inicial para adquirir los animales. Las principales desventajas de esta técnica son el riesgo potencial de que las piezas resulten dañadas si no hay una constante supervisión, y el tiempo que demora el procesamiento de los restos. Arana Escalante (2018) sugirió que este tiempo podría reducirse con temperaturas mayores, considerando que el rango óptimo para el desarrollo de la especie está entre los 25 y 27°C. La misma autora señaló que otro factor a considerar es la humedad ambiental, pues altos valores de humedad relativa pueden favorecer la infestación por ácaros o la proliferación de hongos en el sustrato, lo que afectaría la salud de los insectos y disminuiría su actividad.

2.4.2. Efectos de los tratamientos sobre las propiedades biomecánicas del hueso

Los ensayos de flexión en tres puntos no arrojaron resultados claros, debido probablemente a la gran dispersión de los datos y al bajo número

de muestras involucradas en cada tratamiento. No obstante ello, fue posible observar algunas tendencias.

En primer lugar, debe resaltarse la extrema fragilidad observada en los huesos tratados con KOH10%-4h-70C, y que imposibilitó incluso la realización de las pruebas biomecánicas. Este tipo de método de limpieza, que combina tiempos de exposición considerables a concentraciones relativamente altas de un producto alcalino fuerte, y a temperaturas elevadas, debe descartarse completamente como opción para la preparación de material esquelético. Los tratamientos KOH5 %-4h-70C y KOH10 %-2h-70C, donde la agresividad estuvo dada por combinaciones elevadas de tiempo-temperatura o de concentración-temperatura, arrojaron valores significativamente más bajos que el Control para fuerza de fractura, fuerza máxima y estrés máximo. Estos parámetros, que están asociados a la integridad estructural de los tejidos, son indicadores críticos de la capacidad del hueso para soportar una carga. Por ende, dichas combinaciones también deberían ser descartadas como alternativas de preparación de materiales destinados a colecciones, ya que dejan los huesos debilitados y vulnerables a cualquier tipo de fricción que pudiera existir entre ellos durante el almacenamiento.

Como fuera explicado previamente, al realizar una prueba de flexión se registran dos comportamientos: elástico y plástico (Guede et al., 2013). El primero hace referencia a su capacidad de devolver la energía absorbida una vez finalizada la aplicación de fuerza, mientras que el segundo hace referencia a la deformación irreversible. Así, cuando se aplica una fuerza progresiva sobre el hueso, inicialmente se observa que la fuerza y el desplazamiento son proporcionales (comportamiento elástico), donde se

cumple la Ley de elasticidad de Hooke. Entonces aparece la respuesta plástica o deformación irreversible, donde el hueso no recupera su forma original, aunque ya no se aplique la fuerza. El módulo de Young se aplica al comportamiento elástico del hueso (Guede et al., 2013), y un valor alto para este parámetro es indicativo de la necesidad de aplicar grandes fuerzas para inducir cambios en el material. En el presente estudio, se observó una tendencia hacia valores más altos del módulo en las muestras sometidas a enterramiento, lo que podría deberse a un aumento en resistencia ósea debido a la hipermineralización (Caeiro et al., 2013; Granke et al., 2015), producto del contacto con el sustrato. Por el contrario, la tendencia de los tratamientos con digestión química a valores más bajos de la variable podría deberse a la pérdida de minerales, la desnaturalización del colágeno o la ruptura de los enlaces presentes entre el colágeno y los minerales (Bektas et al., 2023; Caeiro et al., 2013; Ferretti, 1998).

La evaluación de las propiedades biomecánicas de los huesos es una herramienta fundamental para comprender el comportamiento de los mismos bajo diversas condiciones, aplicándose principalmente al estudio de los efectos de las enfermedades en los huesos humanos (Brun et al., 2015; Prisby et al., 2008; Sheu et al., 2011; Turner & Burr, 1993). En muchos casos, estas pruebas pueden detectar problemas estructurales que no son evidentes a simple vista; sin embargo, hasta donde se sabe, nunca han sido aplicadas a materiales óseos de colecciones científicas. La implementación de las mismas en las piezas de museo podría enriquecer el valor científico de dichas colecciones.

2.4.3. Efectos de los tratamientos sobre la calidad y cantidad de ADN

Las concentraciones de ADN en los huesos sometidos a enterramiento, digestión química y tenebrios fueron significativamente más bajas en comparación con las correspondientes al Control y a los métodos enzimáticos.

La conservación del ADN en huesos expuestos al enterramiento o a la acción de los tenebrios depende en gran medida de factores ambientales, como el pH y la presencia de agua (MacHugh et al., 2000). Los valores bajos de pH degradan tanto el ADN como el tejido óseo, exacerbando la pérdida de material genético (Barrientos et al., 2016; Burger et al., 1999). Además, la naturaleza porosa de los huesos facilita la degradación del ADN mediante la filtración de agua, aumentando la actividad de las enzimas autolíticas (MacHugh et al., 2000). Finalmente, los microorganismos y sus metabolitos también representan una amenaza significativa para la integridad del ADN (Burger et al., 1999; C. I. Smith et al., 2002).

Respecto al uso de KOH para la limpieza de materiales biológicos duros, Fernández-Jalvo y Marín-Monfort (2008) sugirieron que este agente podría preservar el ADN, al probar una solución de KOH 0,1M en dientes durante tiempos variables. Sin embargo, en el presente estudio, las concentraciones ensayadas (0,09 M y 0,18 M), los tiempos de exposición y las temperaturas probadas, dieron como resultado bajas concentraciones de ADN. Esto coincidiría con la recomendación de Franchi et al. (2011), quienes afirmaron que el uso de químicos no resulta una buena práctica si luego se pretende extraer el ácido nucleico.

Las altas concentraciones de ADN observadas en los huesos tratados

enzimáticamente son consistentes con estudios previos, que indican que los detergentes son eficaces para la recuperación de ADN nuclear (Franchi et al., 2011; Steadman et al., 2006). Los detergentes pueden actuar como tampones a medida que aumenta la temperatura de la solución, protegiendo así el ADN (Rennick et al., 2005). Además, es importante considerar que una mayor proporción de tejidos blandos en los huesos resultantes de estos tratamientos, podría contribuir a recuperar una mayor cantidad de ADN.

Los parámetros de pureza y contaminación para los diferentes tratamientos realizados fueron variables. En general, los tratamientos químicos y de enterramiento exhibieron valores, para ambos parámetros, que se desviaron significativamente de los niveles óptimos. El protocolo de fenol-cloroformo es un procedimiento básico de extracción (McKiernan & Danielson, 2017; Sambrook & Russell, 2006; Samsuwan et al., 2018), que produce buenos resultados para muestras óseas, aunque también puede introducir contaminantes orgánicos. El uso de otros métodos alternativos de extracción, como la purificación en columna y el aislamiento con perlas magnéticas, pueden mejorar la concentración y pureza del ADN con una contaminación mínima. Sin embargo, estas técnicas suelen ser económicamente costosas, lo que hace que el protocolo de fenol-cloroformo sea una alternativa valiosa (Samsuwan et al., 2018).

Se necesita más investigación para profundizar en los efectos de los tratamientos de limpieza sobre el ADN óseo. Este estudio se centró únicamente en evaluar la concentración, contaminación y pureza, pero no su calidad. Aunque la concentración de ADN se correlaciona positivamente con el éxito de la amplificación y secuenciación de fragmentos de ADN

específicos (Pacheco et al., 2022), grandes cantidades de ADN no siempre garantizan resultados exitosos en estos procesos.

Capítulo 3

Evaluación de la cantidad y calidad de ADN en cueros y huesos de mamíferos depositados en colecciones de historia natural

3.1. Introducción

Las colecciones de historia natural constituyen depósitos únicos de biodiversidad, tanto de tiempo pasado como presente (Cook et al., 2020; Funk, 2018; Kemp, 2015). Si bien en la antigüedad surgieron con el objetivo de exhibir curiosidades asociadas a la biodiversidad, el desarrollo de la genética molecular y el avance de las herramientas moleculares permiten que los especímenes allí depositados respondan a una diversidad de preguntas que van desde los impactos del cambio climático (Moritz et al., 2008; Rowe et al., 2015; Rubidge et al., 2012), hasta el desarrollo de enfermedades emergentes (Cook et al., 2020; Di Euliis et al., 2016; Dunnum et al., 2017). Sin embargo, en la mayoría de los especímenes históricos depositados en las CHN, no se dispone de muestras de tejido especialmente

preservadas para estudios genéticos, ya que esta práctica solo se adoptó en el último medio siglo (Dessauer et al., 1996). Además, y aunque es altamente deseable, muchas de las CHN no cuentan con el personal ni la infraestructura necesaria para submuestrear y almacenar muestras de ADN de alta calidad en mejores condiciones, como por ejemplo en colecciones criogénicas.

Se ha reportado que el modo en que el material haya sido tratado durante y después de la colecta probablemente juegue un rol fundamental en la preservación del ADN (Bachir et al., 2024; Gallo, 2020; L. M. Hall et al., 1997; McCormack et al., 2016; Pizzano et al., 2021; Prendini et al., 2002; N. B. Simmons & Voss, 2009; Töpfer et al., 2011; Wandeler et al., 2007; Willerslev & Cooper, 2005). En el capítulo anterior se analizó y discutió el efecto de las distintas técnicas de limpieza aplicadas al material óseo. En cuanto a las pieles, debe mencionarse que se han descrito varias formas de limpieza y conservación. Las mismas incluyen el uso de sustancias químicas como arsénico, aluminio, bórax e incluso sal (L. M. Hall et al., 1997; Payne & Sorenson, 2002; Töpfer et al., 2011). Estos compuestos pueden provocar la inhibición de enzimas como la proteinasa K, dificultando los procesos de extracción de ADN (L. M. Hall et al., 1997). Como dificultad adicional, es bastante habitual que en las CHN los detalles de las técnicas de conservación del material no se incluyan con la información de los especímenes, lo que genera incertidumbre acerca de la calidad del ADN en la muestra (Bachir et al., 2024; Raxworthy & Tilston Smith, 2021; Ruiz-Gartzia et al., 2022).

Varios estudios reportan que el ADN histórico (derivado de especímenes de CHN) se encuentra altamente degradado, como consecuencia del paso

del tiempo y/o de los tratamientos aplicados a los materiales para su conservación (Bachir et al., 2024; L. M. Hall et al., 1997; Nakahama, 2021; Patzold et al., 2020; Sheldon, 2001; Töpfer et al., 2011). Tradicionalmente, los especímenes de CHN se almacenan a temperatura ambiente como muestras secas o conservadas en líquido. En lo que respecta a los especímenes almacenados en alcohol, se suelen utilizar concentraciones de etanol entre 70–75 %. Sin embargo, dado que el alcohol se evapora a temperatura ambiente, aumenta la dilución de las soluciones, pudiendo dañarse el ADN por hidrólisis.

Por lo mencionado previamente, la obtención de ADN a partir de especímenes de colecciones plantea un conjunto único de desafíos (Wandeler et al., 2007), ya que usualmente la conservación está destinada a garantizar la integridad a largo plazo de la muestra en sí, pero no de los ácidos nucleicos que contiene (McDonough et al., 2018). Adicionalmente, muchos de los especímenes depositados en las CHN son frecuentemente únicos e irremplazables, lo que limita la posibilidad de emplear técnicas destructivas para su análisis. Es por esto que el personal a cargo de las colecciones se encuentra en una disyuntiva frente al pedido de destrucción de una muestra para poder obtener ADN. De acceder, se destruye un material irremplazable sin tener certeza de que se va a poder obtener material genético, pero en el caso contrario, se obstaculizan líneas de investigación (Bachir et al., 2024; Card et al., 2021; Nakahama, 2021; Payne & Sorenson, 2002; Raxworthy & Tilston Smith, 2021).

Cabe mencionar que en los últimos años se han producido avances metodológicos en la extracción exitosa de ADN histórico de muchos tipos de especímenes (Lalonde & Marcus, 2020; Raxworthy & Tilston

Smith, 2021; Rizzi et al., 2012; Rowe et al., 2011; Straube et al., 2021). La implementación de técnicas no destructivas o de bajo impacto ha demostrado ser una alternativa eficaz para conservar las colecciones, permitiendo al mismo tiempo obtener la información necesaria para responder preguntas científicas clave (Patzold et al., 2020; Rayo et al., 2022; Scarsbrook et al., 2023; Straube et al., 2021). Entre las metodologías menos invasivas para la extracción de ADN histórico pueden mencionarse la utilización de pieles, huesos maxiloturbinales o polvo de hueso obtenido a partir de la perforación de cavidades dentales (Bachir et al., 2024; Lonsinger et al., 2018; Patzold et al., 2020; Rohland et al., 2004). Se ha progresado además en el desarrollo de protocolos para reducir la contaminación de ADN exógeno en las muestras, incluyendo la adopción de estándares de sala limpia para ADN histórico, el movimiento unidireccional, procedimientos rigurosos de limpieza de laboratorio y otros protocolos de buenas prácticas para el muestreo de tejido de especímenes (Ferrari et al., 2023; Fulton & Shapiro, 2019; Schoeder et al., 2019).

Finalmente, en la actualidad existen varios reportes en relación con el rendimiento de diferentes tipos de tejidos provenientes de especímenes de mamíferos depositados en CHN, a partir de estudios tanto de índole genética como genómica (Casas-Marce et al., 2010; Rohland et al., 2004; Tsai et al., 2019). Cabe destacar que, si bien los distintos autores informan sobre el éxito en la extracción y amplificación de ADN histórico, la mayoría se centra solo en una especie e informan sus resultados como observaciones secundarias en relación al objetivo primario del estudio. Por lo tanto, resulta vital contar con evaluaciones directas sobre el desempeño de las distintas tipologías de muestras en estudios genéticos, y en diferentes

especies de mamíferos. A su vez se impone la necesidad de una evaluación cuidadosa de la eficiencia de las metodologías empleadas, tanto en términos económicos como en el tiempo y recursos necesarios.

El objetivo general de este capítulo fue evaluar la calidad del ADN extraído de especímenes de dos especies de mamíferos, que se encuentran depositados en diferentes CHN de Argentina, en función de su viabilidad para realizar estudios de índole genética.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Muestreo

Para cumplir con los objetivos propuestos se visitaron 10 colecciones científicas de Argentina (Apéndice B). El muestreo se limitó a especímenes de puma (*Puma concolor*) y zorro pampeano (*Lycalopex gymnocercus*). En cuanto a los tejidos seleccionados, y en virtud de que comprenden la mayor cantidad de material depositado y solicitado por investigadores en las CHN, el muestreo se restringió a dos tipos de muestras: huesos provenientes del cráneo y cueros.

Para la toma de muestras de huesos, se utilizaron dos metodologías. La primera consistió en realizar una pequeña perforación (diámetro: 4 mm) en el cráneo o la mandíbula mediante torno de dentista, colectando el polvo resultante en un trozo de papel de aluminio para luego almacenarlo en un tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 ml (Figs. 3.1 y 3.2 A). La otra técnica empleada fue la extracción de fragmentos de cornetes nasales con la ayuda de una pinza de disección. El objetivo de ambas metodologías fue preservar la integridad del material, evitando afectar futuros estudios de índole

morfométrica y taxonómica. La elección de una u otra alternativa dependió del material disponible y de las disposiciones de los curadores de cada una de las colecciones.

En el caso de cueros, se colectó una muestra por individuo, de un tamaño equivalente al espacio de almacenamiento en un tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 ml (Fig. 3.2 B). Se priorizó la toma en bordes y porciones distales (extremidades), con el doble propósito de conservar el ejemplar y utilizar regiones donde generalmente la concentración de los químicos empleados para su tratamiento (curtido) es menor (Gallo, 2020).

Todas las muestras colectadas fueron acompañadas con la información del año de colecta y clasificadas en dos categorías: “antiguas” (colectas previas al año 1990) y “recientes” (colectadas a partir del año 1990, inclusive). Además, se las catalogó según el tipo de tejido (hueso o cuero) y, cuando la información estaba disponible, se registró también el tratamiento de limpieza y conservación utilizado. Finalmente, las muestras se guardaron a temperatura ambiente hasta el momento de su procesamiento.



Figura 3.1: perforación de una mandíbula de *Puma concolor* con torno, para la obtención de material óseo.

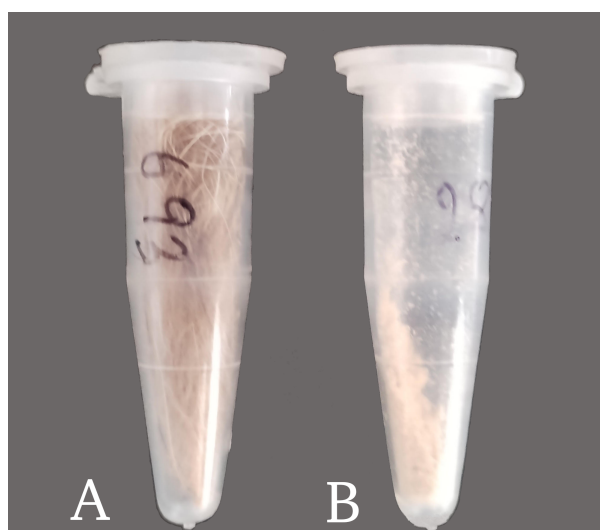


Figura 3.2: material recolectado en las colecciones de historia natural visitadas (a: polvo de hueso; b: muestra proveniente de cuero).

3.2.2. Extracción y amplificación, obtención de genotipos

A partir de las muestras colectadas (Apéndice B), y con el objetivo de evaluar la calidad del material genético presente en ellas, se realizaron extracciones de ADN en el Laboratorio de GENCON (Genética para la Conservación, INBIOSUR-CONICET, UNS) y en los del CIBIO-InBio (Centro de Investigaçãõ em Biodiversidade e Recursos Genéticos,

Universidade do Porto, Portugal). Estos procesos fueron realizados en ambientes libres de ADN o de productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), siguiendo diferentes protocolos conforme a la tipología de muestra.

Para la extracción del ADN de las muestras recientes se utilizaron el Kit EasySpin (Citomed®) y el protocolo de NaCl (Apéndice C). Para las muestras antiguas se siguió el método descrito por Dabney et al. (2013) con modificaciones (Apéndice D). Las muestras recientes en las cuales no fue exitosa la obtención de ADN mediante los protocolos mencionados, fueron procesadas nuevamente mediante el procedimiento utilizado para las antiguas. Finalmente, y solo para la totalidad las muestras de zorro, la concentración de ADN se cuantificó por medio de fluorimetría (Qbit 4). Para cada muestra se tomaron dos medidas independientes, utilizando como valor de concentración final el promedio de ambas (Apéndice E).

Con el objetivo de evaluar la calidad del ADN extraído, un total de 25 *loci* de microsatélites de puma (Kurushima et al., 2006; Rodzen et al., 2007) y 21 de zorro (Silva et al., 2018) se amplificaron en 3 y 4 mixes respectivamente (Apéndice F), y se marcaron con fluorescencia (Blacket et al., 2002) para su posterior identificación. Una muestra se consideró “exitosa” cuando el porcentaje de *loci* amplificados en la misma superaba el 75 % (18 *loci* amplificados para puma, 15 para zorro).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando el kit QIAGEN® Multiplex PCR, en un volumen total de 10 µL que incluyó 1 µL de mezcla de marcadores, 1 µL de ADN, 5 µL de MasterMix y 3 µL de agua Milli-Q®. Las amplificaciones se realizaron en termocicladores Bio-Rad T100. Debido a la limitada cantidad y baja calidad del ADN

extraído de muestras antiguas, es habitual la aparición de errores de genotipado, entre los cuales los más comunes son la no amplificación de uno de los alelos (*allelic drop-out*) y la generación de alelos falsos, provocados por errores en la replicación de la ADN polimerasa (Pompanon et al., 2005). Para minimizar y detectar estos errores, se adoptó el enfoque de amplificaciones múltiples por marcador (Tabla 3.1, *multiple-tube approach*; Navidi et al., 1992; Taberlet et al., 1996). En este contexto, los marcadores fueron amplificados en cuatro réplicas por muestra para el ADN antiguo, siguiendo un protocolo de "pre-amplificación" (Pacheco et al., 2017; M. J. Smith et al., 2011). Las muestras de tejido recientes se amplificaron una única vez, siguiendo un "protocolo estándar".

Tabla 3.1: enfoque de amplificaciones múltiples por marcador, ejemplificado para la muestra MLP 1892 de *Lycalopex gymnocercus*. Se listan los resultados de las cuatro amplificaciones de cinco *loci* (en color rojo el alelo erróneo) y el genotipo de consenso de cada uno de ellos (en color azul).

Muestra	<i>Locus</i>									
	AHT137		ATH1		INRA21		INU030		REN247M23	
MLP 1892	158	162	130	130	117	117	160	124	283	303
MLP 1892	158	162	130	130	117	123	160	124	283	303
MLP 1892	158	162	130	130	117	123	160	124	283	283
MLP 1892	158	162	130	130	117	123	160	124	283	303
Consenso	158	162	130	130	117	123	160	124	283	303

3.2.3. Análisis estadísticos

El éxito de genotipado se evaluó sin discriminar por especie, y se calculó como porcentaje de los genotipos obtenidos sobre el total de muestras analizadas, considerando dos niveles: general y por categoría de muestra (antigüedad y tipo).

Se utilizaron modelos de regresión logística para testear la posible influencia de los factores mencionados sobre el éxito de genotipado. Estos modelos, incluidos dentro de los denominados Modelos Lineales

Generalizados (GLMs; Agresti, 2013), son específicos para datos que siguen una distribución binomial. Dichos modelos se aplicaron sobre una tabla de dos dimensiones (variables independientes: “Tipo”, “Antigüedad”), cuya variable respuesta fue la proporción de éxito de genotipado con respecto al número total de muestras analizadas ($N_{\text{genotipadas}} / [N_{\text{genotipadas}} + N_{\text{no genotipadas}}]$). Se postularon varios modelos, desde el más complejo (que incluía las dos variables y las interacciones entre ellas) hasta aquellos más simples, que consideraban solo los efectos principales de cada variable independiente, seleccionando aquel que poseía un mejor ajuste a los datos según el Criterio de Información de Akaike, corregido para tamaños muestrales pequeños (AICc; Burnham & Anderson, 2003). Finalmente, como estimación de la bondad de ajuste (*goodness-of-fit*) se calculó el pseudo- R^2 (Nagelkerke, 1991) para el modelo seleccionado.

3.3. Resultados

3.3.1. Muestreo

Se recolectaron un total de 265 muestras ($N_{\text{zorro}}=57$; $N_{\text{puma}}=208$) que abarcaron el período 1905 a 2022, y de las cuales el 57 % fueron asignadas al grupo recientes (Fig. 3.3).

La información relativa a los métodos de preparación solo estuvo disponible en una mínima proporción de las muestras, por lo cual no pudo ser incorporado a los análisis realizados. En cuanto a la forma de almacenamiento, todos los especímenes muestreados se encontraban depositados en cajas o armarios protegidos de la luz.

3.3.2. Obtención de genotipos y análisis estadísticos

Considerando el total de las muestras, se pudo obtener un genotipo en el 43,77 % de ellas (Apéndice B). Como era de esperar, el éxito de genotipado fue estadísticamente mayor en las muestras recientes que en las antiguas ($\text{Éxito}_{\text{recientes}}=50,86\%$; $\text{Éxito}_{\text{antiguas}}=17,86\%$; $X^2=27,36$; g.l.=1; $p<0,01$, Figs. 3.4 y 3.5).

Si solo se analiza el tipo de muestra, el éxito de genotipado de los cueros (51,75 %) fue estadísticamente mayor que el de los huesos (37,75 %, $X^2=5,21$, g.l.=1, $p<0,05$, Fig. 3.4).

El modelo que incluyó la antigüedad, tipo de muestra y la interacción entre estas variables, resultó ser el que mejor explicó la variación en el éxito de genotipado (Tabla 3.2). Si bien este modelo capturó solo el 23,84 % de la varianza total (Tabla 3.3), difirió estadísticamente del posicionado en segundo lugar.

Combinando las dos variables, las muestras recientes de cuero fueron las que mayor éxito de genotipado tuvieron, diferenciándose estadísticamente del resto de las combinaciones ($p<0,01$, Fig. 3.5). Entre las muestras óseas, también se observó un mayor éxito de genotipado en las recientes ($p<0,05$, Fig. 3.5). Analizando las muestras antiguas, no se encontraron diferencias significativas entre cueros y huesos ($p=0,34$), aunque se puede apreciar una tendencia por parte de los huesos a un mayor éxito de genotipado (Fig. 3.5).

La cuantificación fluorométrica de la concentración del ADN extraído de las muestras de zorro varió entre 0,14 y 105 ng/ μ l ($\bar{X}=14,90 \pm 26,14$, Apéndice E). No se hallaron diferencias significativas en la concentración de ADN de muestras genotipadas y no genotipadas ($\bar{X}_{\text{genotipado}}=14,78 \pm 23,67$

[rango 0,19-97,55]; $\overline{X}_{\text{no genotipado}}=14,98 \pm 28,36$ [rango 0,14-105]; $t=0,03$, g.l.=54, $p=0,48$).

Analizando la concentración del ADN respecto del tipo de muestra, se pudo extraer mayor cantidad del mismo a partir de las muestras de hueso, que de las de cuero ($\overline{X}_{\text{hueso}}=21,80 \pm 30,45$; $\overline{X}_{\text{cuero}}=2,48 \pm 4,10$, $t=-3,74$; g.l.=37; $p<0,01$). Si se restringe el análisis a las muestras que fueron genotipadas, no se detectan diferencias significativas en la concentración del ADN extraído ($\overline{X}_{\text{hueso genotipado}}=16,54 \pm 641,54$; $\overline{X}_{\text{cuero genotipado}}=5,59 \pm 69,26$, $t=-1,58$, g.l.=16, $p>0,05$).

Respecto de la antigüedad de las muestras, se encontró una leve correlación entre la antigüedad y la concentración de ADN extraído ($F=4,15$, $p=0,046$, $r=-0,26$, Fig. 3.6). No se halló una correlación estadísticamente significativa al analizar la antigüedad de las muestras que fueron positivamente genotipadas, respecto de la concentración del ADN ($p=0,27$).

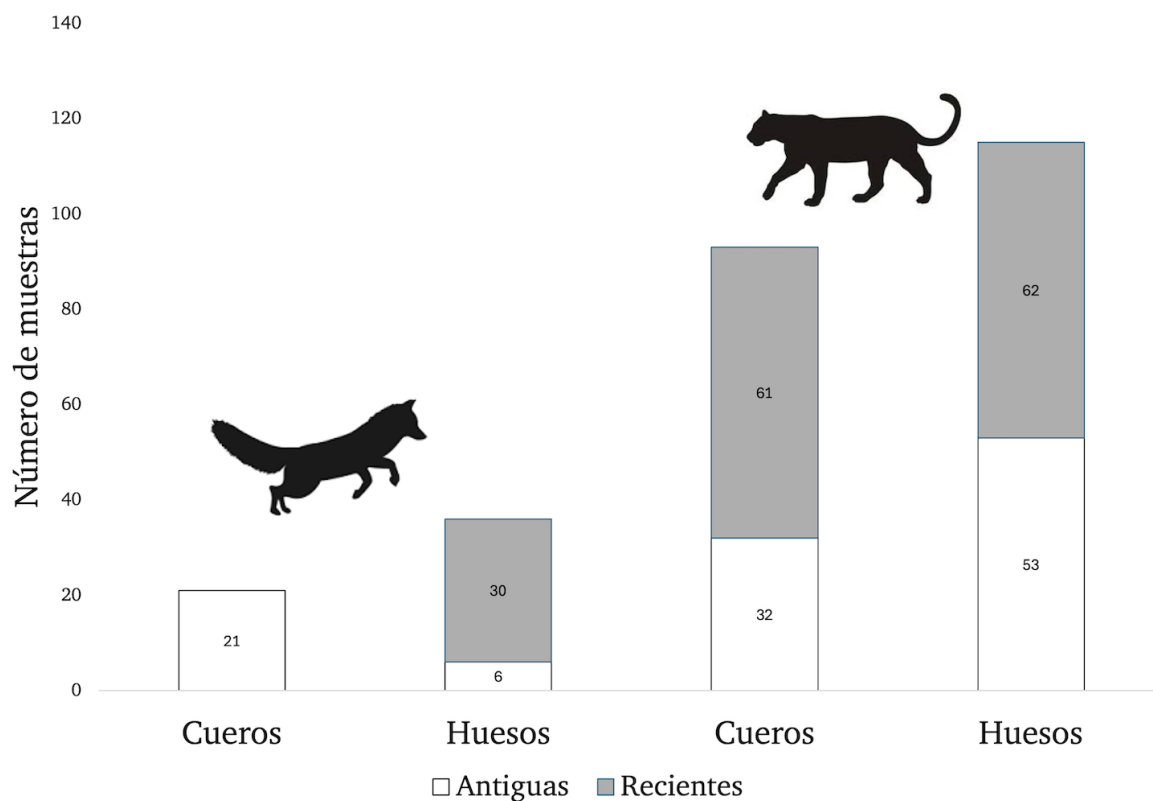


Figura 3.3: número de muestras colectadas en las colecciones de historia natural visitadas, según especie (*Lycalopex gymnocercus*, *Puma concolor*), tipo (cueros, huesos) y categoría del año de colecta (antiguas [<1990], recientes [≥ 1990]).

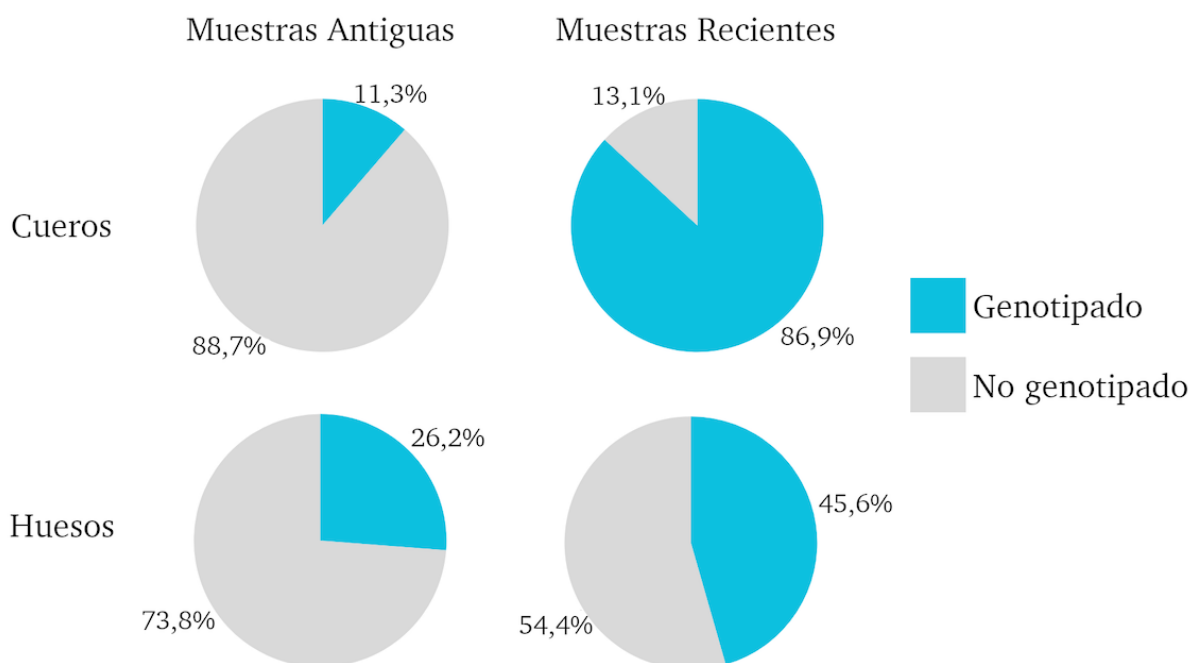


Figura 3.4: éxito de genotipado según categoría del año de recolección (antiguas [<1990], recientes [≥ 1990]) y tipo (cueros y huesos) de las muestras analizadas de *Lycalopex gymnocercus* y *Puma concolor*.

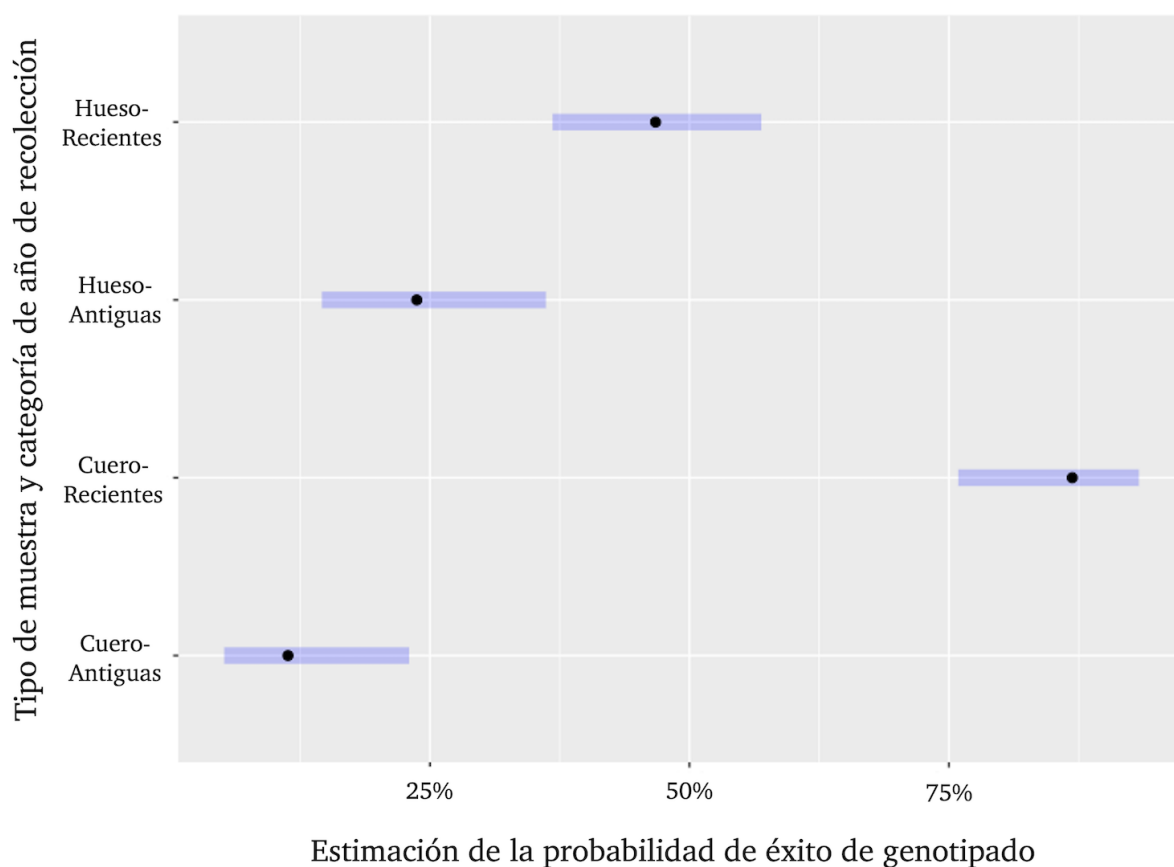


Figura 3.5: media y desvío estándar del éxito de genotipado según año de recolección (antiguas y recientes) y tipo (cuero y hueso) de las muestras analizadas de *Lycalopex gymnocercus* y *Puma concolor*.

Tabla 3.2: estadísticos de los diferentes modelos testeados sobre el éxito de genotipado de las muestras analizadas con la regresión logística de los Modelos Lineales Generalizados (GLMs), asumiendo una distribución binomial. (g.l.)= grados de libertad del modelo.

Modelo	g.l.	logLik	AICc	Delta	Peso del modelo
Antigüedad + Muestra + Antigüedad * Muestra	4	-138,332	284,8	0	1
Antigüedad + Muestra	3	-148,466	303	18,23	0
Antigüedad	2	-153,578	311,2	26,4	0
Muestra	2	-179,034	362,1	77,31	0
Antigüedad + Muestra + Año + Antigüedad * Muestra	71	-96,484	387,9	103,14	0
Muestra + Año	70	-98,569	388,4	103,58	0
Antigüedad + Muestra + Año	70	-98,569	388,4	103,58	0
Año	69	-106,343	400,2	115,43	0
Antigüedad + Año	69	-106,343	400,2	115,43	0

Tabla 3.3: parámetros correspondientes al modelo de regresión logística de mejor ajuste a los datos, para el éxito de genotipado. Se resaltan los valores del estadístico que resultaron estadísticamente significativos. Pseudo $R^2 = 0.23$.

Predictores	Estimación	Error estándar	z
Intercepto	-2,06	0,43	-4,748
Antigüedad [recientes]	3,95	0,58	6,856
Muestra [hueso]	0,89	0,53	1,68
Antigüedad [recientes] * Muestra [hueso]	-2,91	0,68	-4,25

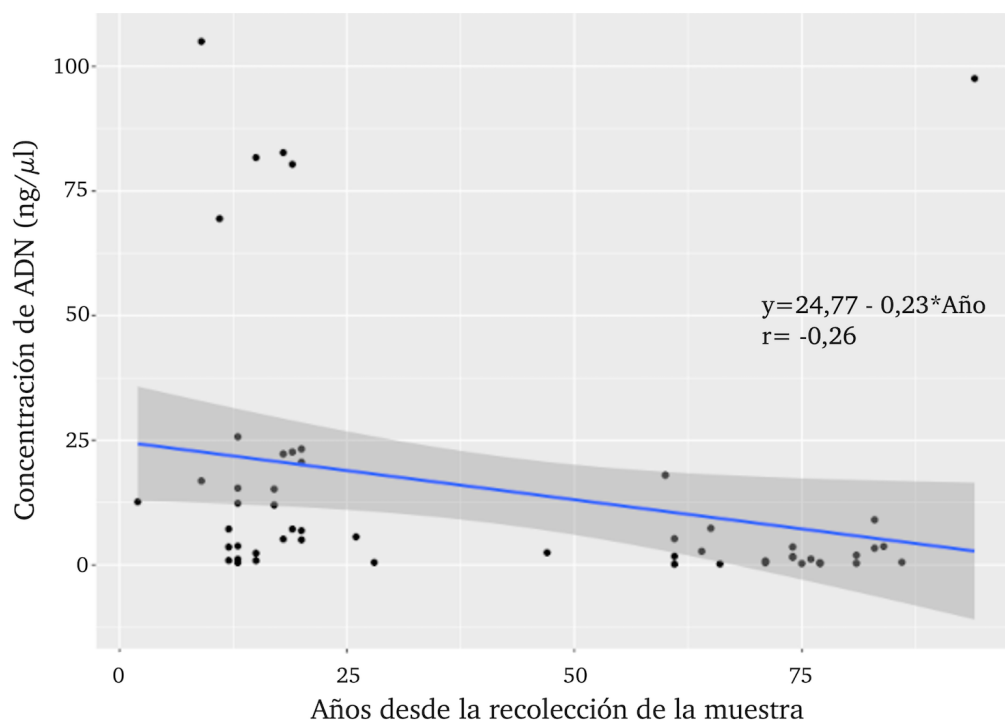


Figura 3.6: concentración del ADN extraído (ng/μl) de las muestras de *Lycalopex gymnocercus* en función de los años transcurridos entre la fecha de colecta y la de su análisis.

3.4. Discusión

Los recursos genéticos se han convertido en una parte fundamental y central de las CHN, expandiendo el valor y la utilidad de los especímenes allí depositados. La creciente demanda sobre estos recursos limitados, hace que los investigadores y los administradores de las CHN necesiten información acerca de la fiabilidad de las muestras comúnmente utilizadas, para fundamentar las solicitudes y decisiones asociadas al muestreo

destrutivo de especímenes de museo (Lonsinger et al., 2018).

A partir de muestras de museo, se logró en este estudio un éxito de genotipado cercano al 48 %. Martíňková y Searle (2006) obtuvieron un 47 % de éxito de amplificación de ADN, a partir de cueros de comadreja (*Mustela erminea*) provenientes de 18 museos en 11 países. Por otra parte, Losinger et al. (2018), trabajando con diferentes tipos de muestras (huesos, pieles y almohadillas) de *Vulpes macrotis* depositadas en el Natural History Museum of Utah obtuvieron rendimientos que fueron del 32,9 % al 91,7 %. Finalmente, Polanc et al. (2012) trabajando con lince (*Lynx lynx* L.) pudieron amplificar un 41 % de las muestras tomadas de CHN.

Los resultados obtenidos no muestran evidencias de que la concentración del ADN extraído constituya un buen predictor del éxito de genotipado. Con los protocolos empleados fue posible obtener genotipos exitosos a partir de concentraciones de ADN de 0,19 ng/μl. Sin embargo, concentraciones elevadas de ADN no produjeron resultados positivos. Como ya se mencionó con anterioridad, frecuentemente el ADN endógeno de las muestras históricas se encuentra en poca cantidad y muy degradado, por lo cual, pese a los cuidados mencionados para minimizar la contaminación de las muestras, muchas veces se termina cuantificando ADN exógeno a las mismas. Por otra parte, no se puede ignorar el efecto de las condiciones en las que se recolectan, preparan y almacenan los especímenes en las colecciones ya que, como se dijo, estas determinan la calidad y la cantidad de material genético de la muestra.

En este estudio, el éxito de genotipado de las muestras provenientes de CHN fue significativamente mayor en las recientes (hasta 34 años de antigüedad) que en las antiguas. Esto resulta esperable ya que el ADN

se degrada con el tiempo, y tanto los estudios genéticos (Casas-Marce et al., 2010; Wandeler et al., 2003) como los genómicos (McDonough et al., 2018) sobre ADN histórico han informado una disminución en la calidad del ADN a medida que aumenta la antigüedad de la muestra. Sin embargo, investigaciones recientes sobre la degradación del ADN en muestras de CHN utilizando *loci* de microsatélites, sugieren patrones no lineales de degradación, con tasas de éxito de la PCR que disminuyen de manera pronunciada al inicio, pero con una desaceleración en la tasa de degradación con el tiempo (Lonsinger et al., 2018; Nielsen et al., 1999; Wandeler et al., 2003). Estas contradicciones ponen de manifiesto la necesidad de estudios que aborden específicamente esta temática.

Diversos estudios sugieren que las muestras de tejido duro (huesos o dientes) de especímenes históricos o antiguos tienden a producir tasas de amplificación de ADN más altas y menos errores de genotipado que las muestras de tejido blando, como almohadillas y cueros (Casas-Marce et al., 2010; Jansson et al., 2014; McDonough et al., 2018; Nyström et al., 2006; Wisely et al., 2004). Como consecuencia, los investigadores interesados en obtener ADN histórico de calidad deberían inclinarse a muestrear tejidos duros, lo que se contrapone con la preferencia de los curadores de CHN, quienes prefieren el muestreo menos destructivo de tejido blando cuando ambas fuentes están disponibles (Wandeler et al., 2007). En este trabajo, si se consideran muestras con una antigüedad cercana a los 30 años, contrariamente a lo previamente expresado, los cueros resultaron ser una mejor fuente de ADN que los huesos. El buen desempeño de esta tipología de muestra concuerda con otros trabajos que han demostrado que los tejidos blandos de mamíferos proporcionan un mayor contenido de ADN

endógeno que los tejidos duros (Pacheco et al., 2022; Polanc et al., 2012; van der Valk et al., 2019). Por otra parte, Roycroft et al. (2022) reportaron que el éxito de secuenciación de los cueros disminuye con la antigüedad de la muestra en mayor proporción que otras tipologías, como por ejemplo las de naturaleza ósea. Dado que en este estudio los huesos tuvieron un mejor desempeño que los cueros en muestras de más de 34 años de antigüedad, los resultados obtenidos apoyarían esta hipótesis. Es oportuno aclarar que las variaciones entre los estudios mencionados en el rendimiento relativo de los diferentes tipos de muestra pueden estar influenciadas por las condiciones ambientales originales en las que se recolectó el espécimen, por las condiciones de almacenamiento previas a su preparación en el museo, o por aquellas en las que fue preservado. Aunque rara vez se documentan o se reportan, todos estos factores pueden influir en la heterogeneidad de la degradación del ADN, lo que dificulta las comparaciones entre estudios.

Los protocolos empleados en este estudio para extracción, amplificación y genotipado de microsatélites, fueron eficientes para obtener datos adecuados para estudios poblacionales, especialmente para aquellos que buscan la comparación entre datos históricos y contemporáneos. Considerando los resultados obtenidos, se recomienda el uso de cueros para muestrear especímenes de mamíferos carnívoros, en especial de aquellos que no superen los 30 años de antigüedad, ya que representan fuentes confiables y mínimamente destructivas de ADN endógeno. Si las muestras son más antiguas puede considerarse el uso de material óseo, con las técnicas aquí descritas, las cuales minimizan la destrucción de los especímenes depositados en las CHN.

Dirigir el muestreo de especímenes históricos hacia las muestras con

mayor probabilidad de obtención de resultados confiables reduce el muestreo destructivo innecesario y contribuye a los objetivos tradicionales de las CHN de cuidado y mantenimiento de los especímenes a largo plazo (Raxworthy & Tilston Smith, 2021; Roycroft et al., 2022; Töpfer et al., 2011; Wisely et al., 2004), al mismo tiempo que facilita la investigación genética y los análisis retrospectivos esenciales para comprender y mejorar la conservación de las poblaciones contemporáneas. La creciente demanda de las CHN como fuentes de ADN, junto con la necesidad de minimizar los daños a los especímenes, debería incentivar futuras investigaciones en la temática enfocadas a diferentes grupos de vertebrados e invertebrados.

Capítulo 4

Consideraciones finales y conclusiones

Las colecciones de historia natural constituyen depósitos únicos de biodiversidad a escala mundial, regional o local, tanto de tiempo pasado como presente (Cook et al., 2020; Funk, 2018; Kemp, 2015), motivo por el cual es fundamental asegurar la calidad de los materiales depositados en ellas. Si bien en las colecciones de fines académicos los materiales debieran ser principalmente durables y fidedignos de las estructuras que se quieren mostrar, en el caso de aquellos que van a ser utilizados en investigación deben procurarse no solo ambas características, sino garantizar también que los resultados a obtener a partir de ellos sean comparables. Para lograr estos objetivos, las instituciones deberían contar con protocolos estandarizados de preparación, almacenamiento y conservación, que se ajusten al grupo taxonómico y al tipo de material que se pretende obtener.

Generalmente, las técnicas que se usan en las colecciones dependen de lo habituado o cómodo que se sienta el personal con un método en particular, y en la elección suelen tener gran influencia la facilidad de implementación, el costo de las mismas y la rapidez con que se obtengan las piezas finales.

Sin embargo, y como quedó demostrado en el presente estudio, dichos factores no son necesariamente los que conducen al mejor resultado desde el punto de vista de la calidad de los materiales obtenidos.

Muñoz Saba et al. (2020) propusieron dos principios para evaluar un tratamiento de limpieza: el principio de mínimo esfuerzo, que apunta a procedimientos expeditos, y el principio de durabilidad del material, que garantiza la longevidad de los especímenes en las colecciones. Es claro que estos dos principios atañen a ejemplares destinados a la exhibición, pero de ningún modo cubren la totalidad de los aspectos que deben ser tenidos en cuenta al momento de evaluar las bondades de una técnica, y de seleccionar la que resulte más adecuada.

Finalmente, y dado el valor inherente asociado a muchos de los especímenes depositados en las CHN, es necesario alcanzar un equilibrio entre su conservación y el desarrollo de líneas de investigación. En lo que atañe a los estudios moleculares, conocer las características de las muestras y asegurar protocolos de procesamiento con mayor potencial de ofrecer resultados confiables, minimiza el muestreo destructivo innecesario y respalda los objetivos tradicionales de las CHN, relacionados con la conservación y el mantenimiento a largo plazo de los especímenes.

Los resultados de la presente tesis permiten establecer las siguientes conclusiones:

- Las distintas técnicas de preparación de material esquelético rinden grados variables de remoción de tejidos blandos, verificándose una efectividad decreciente según las categorías enterramiento - digestión química - exposición a tenebrios - digestión enzimática.
- La limpieza por enterramiento debería reservarse para animales de

tamaño mediano a grande, y los restos enterrados requieren inspección periódica para evitar daños severos. Esto último es importante especialmente si se trata de huesos de animales jóvenes, donde puede ocurrir no solo daño a nivel superficial sino también condrólisis de cartílagos de crecimiento y alteración de la estructura histológica.

- Si los restos que se entierran provienen de animales pequeños, las muestras deberían ser colocadas en contenedores rígidos, para minimizar la posibilidad de pérdidas de material debido a movimientos del sustrato por acción de organismos del suelo.
- La actividad radicular puede afectar y generar marcas en huesos que han estado sometidos a enterramiento durante lapsos de tiempo cortos.
- La digestión química mediante álcalis fuertes es una alternativa que permite obtener huesos limpios en poco tiempo, pero las combinaciones de concentración de la solución, tiempo de exposición, y temperatura deben ser rigurosamente controladas. En este sentido, las concentraciones elevadas del agente siempre producen daño considerable, independientemente de cuáles sean la temperatura y el tiempo de exposición. En soluciones de baja concentración, en cambio, el grado de degradación está directamente relacionado con el tiempo.
- La digestión enzimática mediante detergentes comerciales, no resulta adecuada para remover tejidos blandos, al menos en las combinaciones de concentración, tiempo y temperatura probadas en este estudio. Por otra parte, el uso de estos agentes puede provocar daño en profundidad, el cual es más marcado en combinaciones de mayor duración y menor temperatura, que en las de menor duración y mayor temperatura.

- En tratamientos de corta duración, los escarabajos de la especie *T. molitor* no dejan marcas detectables en la superficie ósea que puedan ser atribuidas al aparato bucal, pero provocan destrucción acentuada principalmente a nivel de las epífisis, llegándose a registrar incluso pérdida de material óseo.
- De todas las alternativas ensayadas en este estudio, la más apropiada para la limpieza de huesos de pequeños mamíferos fue la digestión química mediante productos alcalinos a baja concentración y tiempos de exposición cortos, representada por los tratamientos KOH5 %-2h-40C y KOH5 %-2h-70C. Esto quedó de manifiesto en la calidad macroscópica del hueso, la integridad de la superficie ósea y la efectividad de limpieza (Fig. 2.27), sumado a resultados aceptables en cuanto a las propiedades biomecánicas y a la cantidad y calidad del ADN recuperado.
- La evaluación de la bondad de una técnica para la preparación de material esquelético necesita un enfoque integral, en el que se incluya no solo la evaluación macroscópica del material obtenido, sino también un análisis de MEB que permita observar el aspecto de la superficie ósea, la realización de cortes histológicos seriados, un estudio de las propiedades biomecánicas y el análisis de la cantidad y calidad del ADN obtenido.
- La concentración de ADN extraído de especímenes de CHN no constituye un buen predictor del éxito en la obtención de un genotipo. La gran variabilidad observada en la concentración y calidad del ADN de las muestras podría estar relacionada con la metodología utilizada

para la preparación del material, lo que subraya la importancia no solo de incorporar el registro de la técnica utilizada en cada caso, sino también de establecer protocolos de obtención estándar para las distintas colecciones.

- Las pieles de mamíferos carnívoros de hasta 30 años constituyen fuentes confiables y mínimamente destructivas de ADN endógeno, adecuadas para estudios con marcadores de microsatélites. Pasado este periodo de tiempo se debería privilegiar el uso de material óseo, bajo las técnicas aquí propuestas.

Para finalizar, es importante recalcar que en la bibliografía existen diversos trabajos en los que se comparan los resultados de distintos métodos de preparación de materiales esqueléticos sobre la calidad de las piezas obtenidas. Sin embargo, los mismos se basan en la evaluación de muestras preexistentes en colecciones (Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008), o bien obtienen materiales *de novo* pero sin eliminar la variabilidad debida a la heterogeneidad de los ejemplares de los que parten (Bemis et al., 2004; Fenton et al., 2003; Fernández-Jalvo & Marín-Monfort, 2008; Leeper, 2015; Mairs et al., 2004; Mooney et al., 1982; Onwuama et al., 2012; Thompson, 2015, entre otros). En tal sentido, los análisis contenidos en el Capítulo 2 de esta tesis constituyen el primer estudio que pone de manifiesto los efectos reales de distintas técnicas, debido a que se eliminó la variabilidad debida a otros factores, tales como grupo taxonómico, edad, tamaño, condición y sexo de los ejemplares. Los resultados obtenidos conforman un punto de partida valioso para el establecimiento de protocolos de preparación. Sin embargo, dichos análisis fueron realizados luego de transcurrido un breve período desde

la limpieza, por lo que no debe descartarse el potencial daño a largo plazo que podría ocurrir debido a los tratamientos aplicados (Coy, 1980). En el caso particular de la digestión química y enzimática, por ejemplo, a pesar de haberse realizado un enjuague minucioso luego de cada tratamiento, la acción digestora de los agentes utilizados podría continuar a lo largo del tiempo, produciendo desintegración ósea y degradación del ADN. Por ello, el análisis debe ser complementado con estudios de los materiales a largo plazo, en los cuales se deberán analizar todas las variables consideradas (integridad de la superficie ósea, estructura histológica, propiedades biomecánicas y cantidad y calidad del ADN extraído), como así también ampliar las evaluaciones a otros taxones.

Con el advenimiento de los avances en genética molecular y genómica sumado al desarrollo de herramientas estadísticas asociadas, las CHN se han convertido en la fuente de muchos estudios que van desde la genética de la conservación (contrastando la diversidad genética histórica con la actual) hasta la posibilidad de estudiar directamente el cambio evolutivo. Esta creciente demanda de las CHN como fuentes de material genético, conlleva la imperiosa necesidad del desarrollo de estudios como el presentado en esta tesis, el cual ofrece información importante sobre las características que deben tenerse en cuenta al seleccionar muestras para la investigación. Predecir el éxito de la secuenciación durante la etapa de muestreo en las CHN constituye un aspecto fundamental dada la naturaleza destructiva del mismo (en mayor o menor grado) y el desafío (tanto económico como técnico) que requiere el análisis genético de este tipo de muestras.

Apéndice

Apéndice A

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 µl de buffer de lisis [0,75 mol/l NaCl, 0.024 mol/l EDTA (pH 8.0), 10 % dodecil sulfato sódico y 20 µl 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 minutos) 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 y 4°C por 2 minutos.
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 minutos a 4°C a máxima velocidad.
 11. Descartar sobrenadante y agregar 500 µl de etanol 70 % frío.
 12. Lavar y secar al aire, y resuspender en 50 µl de buffer TE.

Apéndice B

Procedencia e identificación de las muestras depositadas en colecciones de historia natural

Colecciones visitadas: **DFyFS**: Dirección de Flora y Fauna Silvestre (CENPAT-CONICET, Chubut); **CML**: Colección Mamíferos Lillo, Universidad Nacional de Tucumán (Tucumán); **IADIZA**: Instituto Argentino de Investigaciones de Zonas Áridas (CONICET y Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza); **INBIOSUR**: Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (CONICET-Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca); **MACN**: Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (Ciudad Autónoma de Buenos Aires); **MCNJL**: Museo de Ciencias Naturales “José Lorca” (Mendoza); **MLP**: Museo de Ciencias Naturales de La Plata; **MPCNAI**: Museo Provincial de Ciencias Naturales “Dr. Arturo U. Illía” (Córdoba); **MPCNFA**: Museo Provincial de Ciencias Naturales “Florentino Ameghino” (Santa Fe); **SAyCC**: Secretaría de Ambiente y Cambio Climático (Río Negro).

Tabla B.1: Tipo, categoría, número (n), procedencia e identificación de las muestras obtenidas a partir de especímenes de puma (*Puma concolor*). *Muestras colectadas y procesadas por Orlando Gallo en el marco de su tesis doctoral (Gallo, 2020). †: Muestras genotipadas exitosamente

Tipo	Categoría	n	Colección	Id de referencia en Colección
Cuero	Recientes	61	DFyFS (CENPAT)	1833 [†] , 1684 [†] , 1822 [†] , 355 [†] , 356 [†] , 360 [†] , 1040 [†] , 1073 [†] , 1077 [†] , 1078 [†] , 1641 [†] , 1661 [†] , 1674 [†] , 1682 [†] , 1840 [†] , 1873 [†] , 1877 [†] , 1894 [†] , 1895 [†] , 2967 [†] , 5762 [†] , 5797 [†]
			INBIOSUR	437, 489 [†] , 490 [†] , 593 [†] , 594 [†] , 595 [†] , 596 [†]
			MACN	22020 [†]
			CML	32 [†]
			SAyCC (Río Negro)	P_RN_2002.5, P_RN_2002.6, P_RN_2002.10, P_RN_2002.11, P_RN_2004.3, P_RN_2004.4, P_RN_2004.6, P_RN_1992.1 [†] , P_RN_2002.1 [†] , P_RN_2002.2 [†] , P_RN_2002.3 [†] , P_RN_2002.8 [†] , P_RN_2002.9 [†] , P_RN_2002.14 [†] , P_RN_2002.15 [†] , P_RN_2002.16 [†] , P_RN_2002.17 [†] , P_RN_2002.18 [†] , P_RN_2002.19 [†] , P_RN_2002.20 [†] , P_RN_2002.21 [†] , P_RN_2003.5 [†] , P_RN_2004.1 [†] , P_RN_2004.2 [†] , P_RN_2004.5 [†] , P_RN_2004.7 [†] , P_RN_2004.8 [†] , P_RN_2004.11 [†] , P_RN_2004.12 [†] , P_RN_2004.13 [†]
			MPCNFA	MFA-ZV-M:69, MFA-ZV-M:70
			MACN	24.19, 25.164, 34.558, 34.557, 36.617, 36.615, 36.614, 36.616, 41.162, 53.79, 53.64, 13478, 13479, 14024, 14025, 25.163 [†] , 16509 [†] , 53.63
			CML	444, 468, 418, 234, 26, 54
			INBIOSUR	475, 476, 477, 478, 479, 480
			MPCNAI	MAI1
Hueso	Recientes	62	DFyFS (CENPAT)	386, 1638, 11860, 325, 327, 404, 1539, 1788, 1825, 1843, 11852, 11864, 11865, 1674 [†] , 329 [†] , 1086 [†] , 1276 [†] , 1502 [†] , 382 [†] , 387 [†] , 408 [†] , 1245 [†] , 1298 [†] , 1536 [†] , 1678 [†] , 1683 [†] , 1759 [†] , 1795 [†] , 1838 [†] , 1877 [†] , 2977 [†] , 2992 [†] , 19737 [†]
			MPCNFA	MFA-ZV-M.O:294, MFA-ZV-M.O:752, MFA-ZV-M.O:873, MFA-ZV-M.O:874, MFA-ZV-M.O:1174, MFA-ZV-M.O:1347, MFA-ZV-M.O:751 [†]
			INBIOSUR	213, 214 [†] , 436, 452 [†] , 453 [†] , 454, 455, 460, 461, 467 [†] , 468, 469, 471
			CML	7354, 4623, 5483, 5484, 5485, 6211, 7369, 9833
			MLP	9.X.92.2
			MPCNFA	MFA-ZV-M.O:120, MFA-ZV-M.O:136 [†]
			IADIZA	4030 [†]
			MACN	24.19, 26.9, 30.214, 30.215, 32.80, 36.615, 36.614, 36.689, 37.27, 37.28, 38.44, 39.208, 47.405, 53.59, 53.97, 13160, 13342, 13344, 13328, 13330, 13340, 13343, 13345, 13458, 13462, 13459, 13463, 13074 [†] , 13339 [†] , 13341 [†] , 13346 [†] , 13457 [†] , 15307 [†] , 24260 [†]
			CML	6362, 443, 6354, 6359, 6357, 6356, 650, 234, 7252, 3726, 6197
			MLP	1770, 31.VIII.98.2 [†] , 4.VIII.98.6
			MCNJL	MLA1, 245 [†]

Tabla B.2: Tipo, categoría, número (n), procedencia e identificación de las muestras obtenidas a partir de especímenes de zorro (*Lycalopex gymnocercus*). †: Muestras genotipadas exitosamente

Tipo	Categoría	n	Colección	Id de referencia en Colección
Cuero	Antiguas	21	MACN	38.223, 47.135, 47.138, 47.133, 49.224, 48.368, 17828, 53.80, 53.2, 50.419, 50.420, 50.432, 14771 [†] , 14540, 14547, 16531 [†] , 14707, 13781, 14386 [†] , 13299 [†] , 53.81
			INBIOSUR	645 [†] , 646 [†] , 647 [†] , 648 [†] , 649 [†] , 650, 651, 652, 662 [†] , 663 [†] , 664 [†] , 668 [†]
Hueso	Recientes	30	MACN	26330, 25370, 24254, 24262, 24736, 24253, 30.209, 24738 [†]
			MLP	2512 [†] , 2513 [†] , 1896 [†] , 1889, 1890 [†] , 1903, 1890, 1892 [†] , 2518 [†] , 1898 [†]
	Antiguas	6	MACN	42.146 [†] , 43.68 [†] , 24208
			MLP	1762, 1737, 1641 [†]

Apéndice C

Protocolo de extracción de ADN con NaCl

Protocolo de extracción de ADN con NaCl modificado de Aljanabi y Martínez, (1997):

Reactivos

- Buffer de lisis: 50 mM de Tris-HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1 % de SDS, 50 mM de NaCl.
- Proteinasa K: 10 mg/ml.
- NaCl: 5 M.
- TE 1X pH 8: autoclavado.
- Etanol o isopropanol absoluto a -20°C.

Procedimiento

1. Colocar una pequeña muestra de tejido (aproximadamente 20 mg) en un tubo Eppendorf de 1,5-2 ml y enjuagar brevemente con agua destilada.
2. Agregar 500 µl de buffer de lisis y 100 µl de proteinasa K (la concentración de la proteinasa K en el laboratorio es de 1 mg/ml).

-
3. Incubar a 55°C, preferentemente con agitación, durante 2 horas o toda la noche, dependiendo del tipo de tejido.
 4. Centrifugar a máxima velocidad durante 20 minutos.
 5. Pipetear 500 µl del sobrenadante a un tubo limpio, evitando acarrear la fracción sólida del fondo y la capa oleosa superficial, si existiera.
 6. Agregar al sobrenadante 300 µl de NaCl 5 M, agitar brevemente y centrifugar a máxima velocidad durante 20 minutos.
 7. Pipetear 500 µl del sobrenadante a un tubo limpio.
 8. Agregar el doble de volumen (1 ml) de etanol absoluto a -20°C. Agitar levemente primero y luego mezclar completamente.
 9. Para maximizar la recuperación de ADN, colocar el tubo a -20°C durante 2 horas o toda la noche.
 10. Centrifugar a máxima velocidad durante 20 minutos y descartar cuidadosamente el sobrenadante, asegurándose de no perder el pellet.
 11. Lavar el pellet brevemente con 250 µl de etanol al 70 %, evitando perder o disgregar el pellet.
 12. Descartar el etanol y secar el pellet en una estufa a 37°C durante aproximadamente 2 horas.
 13. Resuspender en 100 µl de TE y almacenar en la heladera hasta que se disuelva completamente.

Apéndice D

Protocolo de extracción de ADN antiguo

Protocolo de extracción de ADN antiguo, modificado de Dabney et al. 2013.

Reactivos

- EDTA 0.5 M pH 8.0
- Tris-HCl 1 M pH 8.0
- Proteinasa K
- Cloruro de guanidina
- Acetato de sodio 3 M pH 5.2
- Buffer PE
- Tween 20

Consumibles

- Tubos *LoBind* de 2.0 ml (Eppendorf)
- Tubos *LoBind* de 1.5 ml (Eppendorf)

-
- Tubos *falcon* de 50 ml
 - Columnas de centrifugado *MinElute* (Qiagen)
 - Columnas *Zymo-Spin V-Spin*

Procedimiento

1. En un tubo *SafeLock LoBind* de 2.0 ml, añadir 1 ml de buffer de extracción, para un máximo de 50 mg de polvo de muestra.
2. Suspender la muestra agitándola en un vórtex de ser necesario e incubar durante la noche a 37°C en una incubadora con rotación.
3. Para cada muestra (y control), transferir 10 ml de *Binding Buffer* a un tubo *falcon* de 50 ml y añadir 400 µl de acetato de sodio 3 M. Alternativamente, preparar una mezcla previa añadiendo 2 ml de acetato a 50 ml de *Binding Buffer* y tomar aproximadamente 10,4 ml de esta mezcla. Usar la graduación de la pared del tubo *falcon* es suficientemente precisa.
4. Centrifugar los tubos que contienen la muestra y el buffer de extracción durante 2 minutos a velocidad máxima para sedimentar el polvo residual.
5. Transferir el sobrenadante al tubo *falcon* con *Binding Buffer* /mezcla de acetato de sodio. Mezclar suavemente agitando. Conservar el pellet óseo para futuros experimentos.
6. Etiquetar la tapa de una columna *MinElute* y distorsionar ligeramente el borde interior de la tapa con unas pinzas.
7. Insertar un reservorio de extensión de una columna *V-Spin* en la

apertura del tubo *MinElute*. Colocar este conjunto en un tubo *falcon* de 50 ml.

8. Verter la mezcla de muestra/*Binding Buffer* en el reservorio y cerrar el tubo *falcon*. Centrifugar durante 4 minutos a 1500 rpm. Colocar los tubos a 90° y centrifugar 2 minutos más.
9. Retirar la tapa de rosca y volver a colocar el conjunto del reservorio/columna en el tubo de recolección. Remover el reservorio y cerrar la tapa de la columna. Conservar el flujo residual para futuros experimentos.
10. Realizar un centrifugado en seco durante 1 minuto a 6000 rpm. Desechar el flujo residual.
11. Añadir 750 µl de *PE buffer*, centrifugar a 6000 rpm durante 30 segundos y desechar el flujo residual. Repetir este paso.
12. Colocar la columna a 180°C y realizar un centrifugado en seco durante 1 minuto a máxima velocidad (13200 rpm). Transferir la columna a un tubo de recolección nuevo (o a un tubo de 1,5 ml sin tapa).
13. Añadir 25 µl de TET sobre la membrana de sílice y dejar reposar durante 2-5 minutos. Centrifugar durante 30 segundos a máxima velocidad. Repetir este paso. Recomendación: girar los tubos 180° y repetir la centrifugación).
14. Transferir el líquido (extracto de ADN) a un tubo limpio y congelar a -20°C hasta su uso.

Apéndice E

Concentración de ADN obtenido para las muestras de zorro

Tabla E.1: Concentración de ADN por muestra. *: muestra que fue omitida del análisis.

Colección	Muestra	1ra lectura	2da lectura	Concentración (ng/μl)
INBIOSUR	650	21,80	19,40	20,60
INBIOSUR	651	7,26	6,51	6,89
INBIOSUR	652	84,20	79,20	81,70
INBIOSUR	645	5,71	5,56	5,64
INBIOSUR	646	0,51	0,48	0,49
INBIOSUR	647	5,05	4,99	5,02
INBIOSUR	648	15,30	15,10	15,20
INBIOSUR	649	23,30	23,20	23,25
INBIOSUR	662	3,76	3,82	3,79
INBIOSUR	663	7,13	7,25	7,19
INBIOSUR	664	12,50	12,20	12,35
INBIOSUR	668	12,70	12,60	12,65
MACN	38.223	0,56	0,51	0,53
MACN	47.135	0,44	0,39	0,42
MACN	47.138	0,47	0,43	0,45
MACN	47.133	0,30	0,23	0,27
MACN	49.224	0,30	0,26	0,28
MACN	48.368	1,23	1,11	1,17
MACN	17828	7,98	6,71	7,35
MACN	53.80	0,84	0,74	0,79
MACN	53.2	0,47	0,37	0,42
MACN	50.419	1,74	1,61	1,68
MACN	50.420	1,59	1,44	1,52
MACN	50.432	3,66	3,53	3,60
MACN	14540	0,14	muy baja	0,14
MACN	14547	6,03	4,48	5,26
MACN	14707	1010,00	1,00	505,50*
MACN	13781	2,75	2,71	2,73
MACN	53.81	0,68	0,61	0,65
MACN	30.209	0,50	0,41	0,45
MACN	24208	0,36	0,32	0,34
MACN	26330	110,00	100,00	105,00
MACN	25370	70,90	68,00	69,45
MACN	24254	1,20	1,07	1,14
MACN	24262	26,50	24,90	25,70
MACN	24736	3,80	3,39	3,60
MACN	24253	15,70	15,10	15,40
MACN	14771	17,90	18,10	18,00
MACN	16531	2,48	2,45	2,47
MACN	14386	1,76	1,73	1,75
MACN	13299	0,17	0,20	0,19
MACN	42.146	1,96	1,93	1,95
MACN	24738	0,89	0,88	0,88
MACN	43.68	98,80	96,30	97,55
MLP	1903	12,40	11,60	12,00
MLP	1890	89,10	76,30	82,70
MLP	1762	3,48	3,23	3,36
MLP	1737	9,21	8,87	9,04
MLP	2512	2,34	2,36	2,35
MLP	2513	0,87	0,82	0,84
MLP	1896	22,30	22,20	22,25
MLP	1889	5,18	5,15	5,17
MLP	1890	7,15	7,19	7,17
MLP	1892	22,50	22,80	22,65
MLP	2518	16,90	16,80	16,85
MLP	1898	80,40	80,30	80,35
MLP	1641	3,70	3,71	3,71

Apéndice F

Marcadores microsatélites utilizados

Tabla F.1: Set de 30 marcadores microsatélites específicos (Kurushima et al., 2006; Rodzen et al., 2007) para *Puma concolor* y su separación en mixes para la amplificación en multiplex de las regiones objeto de estudio.

<i>Locus</i>	Fluoróforo	Multiplex	Condiciones de termociclado		
			Etapas	Temperatura (tiempo)	Nº de ciclos
PcoB102	FAN	MS1	Desnaturalización inicial	95°C (15')	1x
PcoA106	NED		Desnaturalización	95°C (30'')	13x
PcoD310	FAM		Alineación	64°C (1'30'')	(-0,5°C)
PcoB207	FAM		Extensión	72°C (45'')	
PcoD012	VIC		Desnaturalización	95°C (30'')	
PcoD217	FAM		Alineación	58°C (1')	32x
PcoC010	NED		Extensión	72°C (45'')	
PcoB010	VIC		Extensión final	60°C (30')	1x
PcoA216	VIC		Enfriamiento	10°C (∞)	-
PcoD329	PET				
PcoC112	FAM	MS2	Desnaturalización inicial	95°C (15')	1x
PcoB323	NED		Desnaturalización	95°C (30'')	13x
PcoB003	VIC		Alineación	62°C (1')	(-0.5°C)
PcoB210	VIC		Extensión	72°C (45'')	
PcoB203	FAM		Desnaturalización	95°C (30'')	
PcoA2	PET		Alineación	56°C (1')	27x
PcoB115	NED		Extensión	72°C (45'')	
PcoB324	FAM		Extensión final	60°C (30')	1x
PcoC307	FAM		Enfriamiento	10°C (∞)	
PcoD301	NED				
PcoD103	PET	MS3	Desnaturalización inicial	95°C (15')	1
PcoD303	VIC		Desnaturalización	95°C (30'')	13x
PcoC209	FAN		Alineación	64°C (1'30'')	(-0.5°C)
PcoD323	FAN		Extensión	72°C (45'')	
PcoA208	NED		Desnaturalización	95°C (30'')	
PcoA339	NED		Alineación	58°C (1')	32x
PcoD313	FAN		Extensión	72°C (45'')	
PcoC217	VIC		Extensión final	60°C (30')	1x
PcoD8	VIC		Enfriamiento	10°C (∞)	

Tabla F.2: Set de 19 marcadores microsatélites no específicos (Silva et al., 2018) para *Lycalopex gymnocercus* y su separación en mixes para la amplificación en multiplex de las regiones objeto de estudio.

<i>Locus</i>	Fluoróforo	Multiplex	Condiciones de ciclado		
			Etapas	Temperatura (tiempo)	Nº de ciclos
FH2010	FAM	MS1	Desnaturalización inicial	95°C (15')	1 x
			Desnaturalización	95°C (30")	
			Alineación	56°C (45")	40x
			Extensión	72°C (45")	
PEZ3	NED		Extensión final	60°C (30')	1 x
			Enfriamiento	10°C (∞)	
AHT103	NED	MS2	Desnaturalización inicial	95°C (15')	1 x
AHT111	VIC		Desnaturalización	95°C (30")	
C04.140	PET		Alineación	56°C (45")	40x
C09.173	NED		Extensión	72°C (45")	
C13.758	FAM		Extensión final	60°C (30')	1x
C14.866	VIC		Enfriamiento	10°C (∞)	
C20.253	PET				
CPH14	FAM				
VWF	NED				
C08.618	VIC	MS3	Desnaturalización inicial	95°C (15')	1
			Desnaturalización	95°C (30")	
			Alineación	60°C (45")	7x (-0,5°C)
			Extensión	72°C (45")	
			Desnaturalización	95°C (30")	
			Alineación	57°C (45")	33x
CPH05	FAM		Extensión	72°C (45")	
			Extensión final	60°C (30')	1x
			Enfriamiento	10°C(∞)	
AHT137	VIC		Desnaturalización inicial	98°C (3')	1x
			Desnaturalización	98°C (15")	
			Alineación	60°C (75")	40x
			Extensión	72°C (45")	
INRA21	VIC	Thermo Fisher Scientific (Canine Genotypes Panel 2.1 Kit)	Extensión final	72°C (5')	1x
INU030	NED		Enfriamiento	10°C(∞)	
REN169O18	FAM				
REN169D01	VIC				
REN247M23	PET				

Bibliografía

- Adams, B. V., & Higley, L. G. (2024). Bone traces and modifications from feeding by *Dermestes maculatus*. *International Journal of Zoology and Animal Biology*, 7(2), 000575. <https://doi.org/10.23880/izab-16000575>
- Agresti, A. (2013). *Categorical data analysis* (3.^a ed.). John Wiley & Sons.
- Alder, K. D., Lee, I., Munger, A. M., Kwon, H. K., Morris, S. V., M T.and Cahill, Back, J. H., Yu, K. E., & Lee, F. Y. (2020). Intracellular *Staphylococcus aureus* in bone and joint infections: A mechanism of disease recurrence, inflammation, and bone and cartilage destruction. *Bone*, 141, 115568. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2020.115568>
- Allen, E. R., & Neill, W. T. (1950). Cleaning mammal skeletons with meal worms. *Journal of Mammalogy*, 31(4), 464.
- Arana Escalante, S. G. (2018). *Manejo en cautiverio de Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) usando cinco tipos de harina* [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Quintana Roo.
- Archer, M. S., & Elgar, M. A. (1998). Cannibalism and delayed pupation in hide beetles, *Dermestes maculatus* DeGeer (Coleoptera: Dermestidae). *Australian Journal of Entomology*, 37, 158-161.
- Armour-Chelu, M., & Andrews, M. (1994). Some effects of bioturbation by Earthworms (Oligochaeta) on archaeological sites. *Journal of Archaeological Science*, 21, 433-443.
- Austin, D., & Fulginiti, L. (2008). The forensic anthropology laboratory in a medical examiner setting. En M. W. Warren, H. A. Walsh-Haney & L. E. Freas (Eds.), *The forensic anthropology laboratory* (pp. 23-46). CRC Press, Taylor; Francis.
- Bachir, F., Darif, H., Himmi, O., & Fekhaoui, M. (2024). Potential and challenges of DNA analysis in natural history collections. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 32(2), 148-159.
- Backwell, L., Huchet, J. B., Harrison, J., & D'Errico, F. (2021). Invertebrate modification of bone. En J. T. Pokines, E. N. L'Abbe & S. A. Symes (Eds.), *Manual of forensic taphonomy* (pp. 631-666). CRC Press.
- Barquez, R. M., & Díaz, M. M. (2014). Historia de la mastozoología argentina. En J. Ortega, J. L. Martínez & D. G. Tirira (Eds.), *Historia de la mastozoología en Latinoamérica, las Guayanas y el Caribe* (pp. 15-50). Editorial Murciélago Blanco y Asociación Ecuatoriana de Mastozoología.

-
- Barquez, R. M., Díaz, M. M., Lopez Berrizbeitia, M. F., & Mollerach, M. I. (2021). *Colección Mamíferos Lillo: un manual de procedimientos para la preparación y conservación de mamíferos y anexos*. Programa de Conservación de los Murciélagos de Argentina.
- Barrientos, G., Sarmiento, P. L., & Galligani, P. E. (2016). Evaluación de la diagénesis ósea mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (MEB): aproximaciones analíticas aplicables a muestras arqueológicas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 18(2), 1-13.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48.
- Bektas, H., Dasdag, S., Nalbant, A., Akdag, M. B., Demir, C., & Kavak, S. (2023). 3.5 GHz radiofrequency radiation may affect biomechanics of bone and muscle of diabetics. *Biotechnology & Biotechnological equipment*, 37(1), 329-338.
- 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*, 3, 603-609.
- Blacket, M. J., Robin, C., Good, R. T., Lee, S. F., & Miller, A. D. (2002). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources*, 12, 361-366.
- Blatt, S., Michael, A., & Bright, L. (2024). Bioarchaeology: Interpreting human behavior from skeletal remains. En E. Welker (Ed.), *Guide to Archaeology* (p. 6). Pressbooks.
- Bonicelli, A., Cheung, W., Hughes, S., Wescott, D. J., & Procopio, N. (2022). Preliminary investigation of the effect of maceration procedures on bone metabolome and lipidome. *Metabolites*, 12, 1020. <https://doi.org/10.3390/metabo12111020>
- Botero-González, D., & Agudelo, M. (2019). Comparison of macerations with dermestid larvae, potassium hydroxide and sodium hypochlorite in Wistar rat crania. *Anatomy*, 13(3), 149-154. <https://doi.org/10.2399/ana.19.080>
- Brun, L. R., Brance, M. L., Lombarte, M., Maher, M. C., Di Loreto, V. E., & Rigalli, A. (2015). Effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on histomorphometry, biomechanics, and densitometry on bones in the rat. *Calcified Tissue International*, 97(5), 527-534.
- Burger, J., Hummel, S., Herrmann, B., & Henke, W. (1999). DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*, 20, 1722-1728.
- Burnham, K. P., & Anderson, D. R. (2003). *Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach* (2.^a ed.). Springer Science & Business Media.
- Caeiro, J., González, P., & Guede, D. (2013). Biomecánica y hueso (y II): ensayos en distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la resistencia ósea. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 5(2), 99-108.
- Caeiro Rey, J., Dapía Robleda, S., Vaquero Cervino, E., Roca Ruiz, L., & Blanco Ramos, M. A. (2005). Factores determinantes de la resistencia ósea. *Revista española de enfermedades metabólicas óseas*, 14(4), 67-74.

-
- Canillas del Rey, F. M. (2009). *Patodinamia de la lesión luxante de la cadera en desarrollo en periodo precoz: aportaciones sobre un modelo experimental* [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma de Madrid.
- Card, D. C., Shapiro, B., Giribet, G., Moritz, C., & Edwards, S. V. (2021). Museum genomics. *Annual Review of Genetics*, 55(27), 1-27. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-071719-020506>
- Carrion-Bonilla, C., & Cook, J. A. (2020). A new bat species of the genus *Myotis* with comments on the phylogenetic placement of *M. keaysi* and *M. pilosatibialis*. *Therya*, 11, 508-532.
- Casas-Marce, M., Revilla, E., & Godoy, J. (2010). Searching for DNA in museum specimens: a comparison of sources in a mammal species. *Molecular Ecology Research*, 10, 502-507.
- Charabidzé, D., Lavieille, V., & Colard, T. (2022). Experimental evidence of bone lesions due to larder beetle *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae). *Biology*, 11, 1321. <https://doi.org/10.3390/biology11091321>
- Charles, J. P., Cappellari, O., Spence, A. J., Hutchinson, J. R., & Wells, D. J. (2016). Musculoskeletal geometry, muscle architecture and functional specialisations of the mouse hindlimb. *PLoS ONE*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/Journal.PONE.0147669>
- Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., & Roberts, J. P. (2002). The survival of organic matter in bone: A review. *Archaeometry*, 44(3), 383-394.
- Comin, M., Peris, J. L., Prat, J. M., Dejoz, J. R., Vera, P. M., & Hoyos, J. V. (1999). *Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación*. Valencia: Instituto Biomecánica de Valencia.
- Cook, J. A., Arai, S., Armien, B., Bates, J., Carrion Bonilla, C. A., de Souza Cortez, M. B., Dunnum, J. L., Ferguson, A. W., Johnson, K. M., Anwarali Kha, F. 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, 531-534.
- Couse, T., & Connor, M. (2015). A comparison of maceration techniques for use in forensic skeletal preparations. *Journal of Forensic Investigation*, 3(1), 6.
- Coy, J. (1980). Osteological preparation techniques 1. *Guild of Taxidermists Newsletter*, 5, 44-50.
- Crawford, C. S. (1990). Millipedes as model detritivores. *Berichte des naturwissenschaftlichen-medizinischen Verein Innsbruck*, 10, 277-288.
- Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M. T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., García, N., Pääbo, S., Arsuaga, J. L., & Meyer, M. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 15758-15763. <https://doi.org/10.3390/genes12020146>
- Daniel, D., Akeson, W., Amiel, D., Ryder, M., & Boyer, J. (1976). Lavage of septic joints in rabbits: effects of chondrolysis. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 58, 393-395.
- Daniel, D., Boyer, J., Green, S., Amiel, D., & Akeson, W. (1973). Cartilage destruction in experimentally produced *Staphylococcus aureus* joint infections: In vivo study. *Surgical Forum*, 24, 479-481.

-
- Dessauer, H. C., Cole, C. J., & Hafner, M. S. (1996). Collection and storage of tissues. En D. M. Hillis, C. Moritz & B. K. Mable (Eds.), *Molecular systematics* (pp. 29-41). Sinauer Associates.
- Di Euliis, D., Johnson, K. R., Morse, S. S., & Schindel, D. E. (2016). Opinion: Specimen collections should have a much bigger role in infectious disease research and response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 4-7.
- Díaz, M. M., Flores, D. A., & Barquez, R. M. (1998). *Instrucciones para la preparación y conservación de mamíferos* (PUBLICACION). Programa de Investigaciones de Biodiversidad Argentina (PIDBA) y Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán.
- Dunnum, J. L., Yanagihara, R., Johnson, K. M., Armien, B., Batsaikhan, N., Morgan, L., & Cook, J. A. (2017). Biospecimen repositories and integrated databases as critical infrastructure for pathogen discovery and pathobiology research. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11, e0005133.
- Dures, S. G., Carbone, C., Loveridge, A. J., Maude, G., Midlane, N., Aschenborn, O., & Gottelli, D. (2019). A century of decline: Loss of genetic diversity in a southern African lion-conservation stronghold. *Diversity and Distribution*, 25, 870-879.
- Ellegren, H. (1994). Genomic DNA from museum bird feathers. En B. Herrmann & S. Hummel (Eds.), *Ancient DNA* (pp. 211-217). Springer.
- Eriksen, A. M. H., Nielsen, T. K., Matthiesen, H., Carøe, C., Hansen, L. H., Gregory, D. J., Turner-Walker, G., Collins, M. J., & Gilbert, M. T. P. (2020). Bone biodeterioration-The effect of marine and terrestrial depositional environments on early diagenesis and bone bacterial communit. *PLoS ONE*, 15(10), e0240512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240512>
- Evans, F. G. (1976). Mechanical properties and histology of cortical bone from younger and older men. *The Anatomical Record*, 185, 1-12.
- Faruk, A. Z., & Das, S. K. (2023). Detergent maceration: A convenient skeleton preparation technique for teaching and demonstration of veterinary anatomy. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 8(1), 11-17. <https://doi.org/10.21608/javs.2022.158955.1175>
- Fenton, T. W., Birkby, W. H., & Cornelison, J. (2003). A fast and safe non-bleaching method for forensic skeletal preparation. *Journal of Forensic Sciences*, 48(2), 274-276.
- Fernandez, A. E., Escosteguy, P. D., & Rugnone, F. M. (2022). La acción de *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) sobre restos óseos: un experimento de tafonomía actualística. *Revista del Museo de Antropología*, 15(3), 259-272.
- Fernández-Jalvo, Y., & Andrews, P. (2016a). *Atlas of taphonomic identifications: 1001+ images of fossil and recent mammal bone modification*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7432-1>
- Fernández-Jalvo, Y., & Marín-Monfort, M. D. (2008). Experimental taphonomy in museums: preparation protocols for skeletons and fossil vertebrates under the scanning electron microscopy. *Geobios*, 41(1), 157-181.
- Fernández-Jalvo, Y., & Andrews, P. (2016b). *Atlas of taphonomic identifications: 1001+ images of fossil and recent mammal bone modification*. Springer.
- Ferrari, G., Esselens, L., Hart, M. L., Janssens, S., Kidner, C., Mascarello, M., Peñalba, J. V., Pezzini, F., von Rintelen, T., Sonet, G., Vangestel, C., Virgilio, M., & Hollingsworth, P. M.

-
- (2023). Developing the protocol infrastructure for DNA sequencing natural history collections. *Biodiversity Data Journal*, 11, e102317. <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.e102317>
- Ferretti, J. L. (1998). Biomechanical properties of bone. En H. K. Genant, G. Guglielmi & M. Jergas (Eds.), *Bone densitometry and osteoporosis* (pp. 143-162). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-80440-3-8>
- Flores-Rentería, M., Ortiz-Domínguez, M., Cruz-Avilés, A., & López-Sánchez, F. (2018). La mecánica del hueso: una revisión de los modelos de remodelación óseo. *Ingenio y Conciencia Boletín Científico de la Escuela Superior de la Ciudad de Sahagún*, 5(9), 1-15.
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An R companion to applied regression* (Tercera). Sage.
- Franchi, C., Pilli, E., Barni, F., Potenza, S., & Berti, A. (2011). DNA typing strategy to overcome post-mortem bone maceration. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3, e367-e368. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.09.045>
- Fulton, T. L., & Shapiro, B. (2019). Setting up an ancient DNA laboratory. En B. Shapiro, A. J. Barlow, P. D. Heintzman, M. Hofreiter, J. L. A. Paijmans & A. E. R. Soares (Eds.), *Ancient DNA. Methods in molecular biology* (pp. 1-13). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9176-1_1
- Funk, V. A. (2018). Collections-based science in the 21st century. *Journal of Systematics and Evolution*, 56, 175-193.
- Gallo, O. (2020). *Ecology and landscape genetics of the puma (Puma concolor) in Argentina: Analysis of genetic structure and connectivity* [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional del Sur. Argentina.
- Granke, M., Does, M. D., & Nyman, J. S. (2015). The role of water compartments in the material properties of cortical bone. *Calcified Tissue International*, 97, 292-307.
- Guede, D., González, P., & Caeiro Rey, J. R. (2013). Biomecánica y hueso (I): conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 5(1), 43-50.
- Hall, E. R., & Russell, W. C. (1933). Dermestid beetles as an aid in cleaning bones. *Journal of Mammalogy*, 14(4), 372-374.
- Hall, L. M., Willcox, M. S., & Jones, D. S. (1997). Association of enzyme inhibition with methods of museum skin preparation. *BioTechniques*, 22(5), 928-934. <https://doi.org/10.2144/97225ST07>
- Harrison, X. A. (2014). Using observation-level random effects to model overdispersion in count data in ecology and evolution. *PeerJ*, 2, e616. <https://doi.org/10.7717/peerj.616>
- Hedges, R. E. M. (2002). Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 44(3), 319-328.
- Holden, A. R., Harris, J. M., & Timm, R. M. (2013). Paleoecological and taphonomic implications of insect-damaged pleistocene vertebrate remains from Rancho La Brea, Southern California. *PLoS ONE*, 8(7), e67119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067119>
- Husch, C., Berner, M., Goldammer, H., & Lichtscheidl-Schultz, I. (2021). Technical note: A novel method for gentle and non-destructive removal of flesh from bones. *Forensic Science International*, 323, 110778. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110778>
- Jans, M. M. E. (2008). Microbial bioerosion of bone - A review. En M. Wisshak & L. Tapanila (Eds.), *Current Developments in Bioerosion* (pp. 397-413). Springer.

-
- Jansson, E., Harmoinen, J., Ruokonen, M., & Aspi, J. (2014). Living on the edge: reconstructing the genetic history of the finnish wolf population. *BMC Evolutionary Biology*, 14, 1-21.
- Jara, D., & Urrea, F. (2022). Uso de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) como agente biológico para la limpieza de osamentas de pequeños vertebrados. *Revista Chilena de Entomología*, 48(3). <https://doi.org/10.35249/rche.48.3.22.03>
- Jørgensen, B. (2013). Generalized linear models. En A. H. El-Shaarawi & W. W. Piegorsch (Eds.), *Encyclopedia of Environmetrics* (2.^a ed., pp. 1152-1159). Wiley.
- Kemp, C. (2015). The endangered dead. *Nature*, 518(7539), 292-294.
- Kendell, A., Perrone, A., & Milligan, C. (2023). Forensic Anthropology. En B. Shook, L. Braff, K. Nelson & K. Aguilera (Eds.), *Explorations: An open invitation to biological Anthropology* (2.^a ed.). American Anthropological Association.
- Khan, K., Kilimci, F. S., & Kara, M. E. (2021). Biomechanical test: Applications and their reliability for the prediction of bone strength in broiler chicken. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 6(2), 85-92.
- Kime, R. D., & Golovatch, S. I. (2000). Trends in the ecological strategies and evolution of millipedes (Diplopoda). *Biological Journal of the Linnean Society*, 69, 333-349.
- Knüsel, C. J., & Robb, J. (2016). Funerary taphonomy: An overview of goals and methods. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 10, 655-673. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.05.031>
- Kourtis, L. C., Carter, D. R., & Beaupre, G. S. (2014). Improving the estimate of the effective elastic modulus derived from three-point bending tests of long bones. *Annals of Biomedical Engineering*, 42, 1773-1780.
- Kurushima, J. D., Collins, J. W., & Ernest, B. (2006). Development of 21 microsatellite *loci* for puma (*Puma concolor*) ecology and forensics. *Molecular Ecology Notes*, 6, 1260-1262.
- Lalonde, M. M. L., & Marcus, J. M. (2020). How old can we go? Evaluating the age limit foreffective DNA recovery from historical insect specimens. *Systematic Entomology*, 45, 505-515. <https://doi.org/10.1111/syen.12411>
- Latham, K. E., & Miller, J. J. (2019). DNA recovery and analysis from skeletal material in modern forensic contexts. *Forensic Sciences Research*, 4, 51-59.
- Laurito, C. A., & Valerio, A. L. (2018). Primer registro fósil de un Myriapoda (Polydesmida) para el Pleistoceno tardío de la localidad de La Palmera de San Carlos, Provincia de Alajuela, Costa Rica. *Revista Geológica de América Central*, 58, 179-187.
- Leeper, B. J. (2015). *Evaluation of current methods of soft tissue removal from bone* [Tesis de Doctorado]. University of Pittsburgh.
- Lenth, R. V. (2024). emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means. <https://cran.r-project.org/package=emmeans>
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709-715.
- Lonsinger, R. C., Adams, J. R., & Waits, L. P. (2018). Evaluating effective population size and genetic diversity of a declining kit fox population using contemporary and historical specimens. *Ecology and Evolution*, 8, 12011-12021. <https://doi.org/10.1002/ece3.4660>

-
- Lynnerup, N. (2007). Mummies. *Yearbook of Physical Anthropology*, 50, 162-190. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20728>
- Ma, C., Du, T., Niu, X., & Fan, Y. (2022). Biomechanics and mechanobiology of the bone matrix. *Bone Research*, 10(59), 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00223-y>
- MacFarlane, J. A. (1971). The carnivorous beetles of the Ithundu Cave, Kenya. *Studies in Speleology*, 2, 149-158.
- MacHugh, D. E., Edward, C. J., Bailey, J. F., Bancroft, D. R., & Bradley, D. G. (2000). The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: a survey of current methodologies. *Ancient Biomolecules*, 3, 81-102.
- Maidment, C., & Williams, A. (2023). Comparison of common maceration techniques to prepare porcine bone for fluorescence analysis using alternative light sources (ALS). *Forensic Imaging*, 34, 200556. <https://doi.org/10.1016/j.fri.2023.200556>
- 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, 276-284.
- Majeed, Z. Z. (2009). Maceration of delicate osteological material by fly larvae. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 8, 2147-2149.
- Marín-Monfort, M. D., Pesquero, M. D., & Fernández-Jalvo, Y. (2014). Compressive marks from gravel substrate on vertebrate remains: A preliminary experimental study. *Quaternary International*, 330, 118-125.
- Martínková, N., & Searle, J. B. (2006). Amplification success rate of DNA from museum skin collections: A case study of stoats from 18 museums. *Molecular Ecology Notes*, 6, 1014-1017. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01482.x>
- Mbenoun Masse, P. S., Nzoko Fiemapong, A. R., Van den Spiegel, D., & Golovatch, S. I. (2018). Diversity and distribution of millipedes (Diplopoda) in the Campo Ma'an National Park, southern Cameroon. *African Journal of Ecology*, 56(1), 73-80.
- McCormack, J. E., Tsai, W. L., & Faircloth, B. C. (2016). Sequence capture of ultraconserved elements from bird museum specimens. *Molecular Ecology Resources*, 16, 1189-1203.
- McDonough, M., Parker, L., Mcinerney, N., Campana, M., & Maldonado, J. (2018). Performance of commonly requested destructive museum samples for mammalian genomic studies. *Journal of Mammalogy*, 99, 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 Edit, pp. 371-394). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3>
- Miller, D. M., & Tarpley, J. (1996). An automated double staining procedure for bone and cartilage. *Biotechnic & Histochemistry*, 71, 79-83.
- Mooney, M. P., Kraus, E. M., & Bardach, J. (1982). Skull preparation using the enzyme-active detergent technique. *The Anatomical Record*, 202, 125-129.

-
- Morgan, E. F., & Bouxsein, M. L. (2008). Chapter 2 - Biomechanics of Bone and Age-Related Fractures. En J. P. Bilezikian, L. G. Raisz & T. J. Martin (Eds.), *Principles of bone biology* (Third Edition, pp. 29-51). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00024-0>
- Mori, J. L. (1970). Procedures for establishing a faunal collection to aid in archaeological analysis. *American Antiquity*, 35(3), 387-389.
- Moritz, C., Patton, J. L., Conroy, C. J., Parra, J. L., White, G. C., & Beissinger, S. R. (2008). Impact of a century of climate change on small-mammal communities in Yosemite National Park, USA. *Science*, 322(5899), 261-264.
- Muñoz-Saba, Y., Sánchez-Nivicela, J. C., Sierra-Durán, C. M., Vieda-Ortega, J. C., Amat-García, G., Munoz, 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.
- Nagelkerke, N. J. (1991). A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika*, 78(3), 691-692.
- Nakahama, N. (2021). Museum specimens: An overlooked and valuable material for conservation genetics. *Ecological Research*, 36, 13-23. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12181>
- Navidi, W., Arnheim, N., & Waterman, M. S. (1992). A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. *American Journal of Human Genetics*, 50, 347-359.
- Nielsen, E. E., Hanse, M. M., & Loeschcke, V. (1999). Analysis of DNA from old scale samples: Technical aspects, applications and perspectives for conservation. *Hereditas*, 130, 265-276.
- Nielsen-Marsch, C. M., & Hedges, R. E. M. (2000). Patterns of diagenesis in bone I: The effects of site environments. *Journal of Archaeological Science*, 27, 1139-1150. <https://doi.org/10.1006/jasc.1999.0537>
- Nyman, J. S., Roy, A., Shen, X., Acuna, R. L., Tyler, J. H., & Wang, X. (2006). The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone. *Journal of Biomechanics*, 39, 931-938.
- Nyström, V., Angerbjo, A., & Dalen, L. (2006). Genetic consequences of a demographic bottleneck in the Scandinavian arctic fox. *Oikos*, 114, 84-94.
- Onwuama, K. T., Salami, S. O., Ali, M., & Nzalak, J. O. (2012). Effect of different methods of bone preparation on the skeleton of the African giant pouched rat (*Cricetomys gambianus*). *International Journal of Morphology*, 30(2), 425-427.
- Ossian, C. R. (1970). Preparations of disarticulated skeletons using enzyme-based laundry “pre-soakers”. *Copeia*, 1, 199-200.
- Pääbo, S., Irwin, D. M., & Wilson, A. C. (1990). DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 4718-4721.
- Pacheco, C., López-Bao, J. V., García, E. L., Lema, F. J., Llaneza, L., Palacios, V., & Godinho, R. (2017). Spatial assessment of wolf-dog hybridization in a single breeding period. *Scientific Reports*, 7, 42475.

-
- 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. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2022.970249/FULL>
- Pahl, A. (2020). Skeleton preparation best practices in the modern museum: The dermestid approach. *Curator: The Museum Journal*, 63(1), 99-113.
- Patzold, F., Zilli, A., & Hundsfoerfer, A. K. (2020). Advantages of an easy-to-use DNA extraction method for minimal-destructive analysis of collection specimens. *PLoS ONE*, 15(7), e0235222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235222>
- Payne, R. B., & Sorenson, M. D. (2002). Museum collections as sources of genetic data. *Bonner Zoologische Beiträge*, 51, 97-104.
- Pineda, A., & Saladié, P. (2022). Beyond the problem of bone surface preservation in taphonomic studies of early and middle Pleistocene open-air sites. *Journal of Archaeological Method and Theory*, 29, 1090-1130. <https://doi.org/10.1007/s10816-022-09550-0>
- Pinheiro, J., Bates, D., & R Core Team. (2024). *nlme: linear and nonlinear mixed effects models* [R package version 3.1-166]. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Pizzano, B. R., Gallo, O., Godinho, R., Casanave, E. B., & Castillo, D. F. (2021). Genetic diversity and population structure of the pampas fox, *Lycalopex gymnocercus*, in a human-dominated landscape of Southern Espinal, Argentina. *Mastozoología Neotropical*, 28(2), e0571. <https://doi.org/10.31687/saremMN.21.28.2.0.03.e0571>
- Pokines, J. T. (2018). Differential diagnosis of the taphonomic histories of common types of forensic osseous remains. *Journal of Forensic Identification*, 68(1), 87-145.
- Pokines, J. T., & Baker, J. E. (2014). Effects of burial environment on osseous remains. En J. T. Pokines, E. N. L'Abbé & S. A. Symes (Eds.), *Manual of forensic taphonomy* (2.^a ed., p. 768). CRC Press, Taylor; Francis Group.
- Polanc, P., Sindičić, M., Jelenčić, M., Gomerčić, T., Kos, I., & Huber, D. (2012). Genotyping success of historical Eurasian lynx (*Lynx lynx* L.) samples. *Molecular Ecology Resources*, 12, 293-298.
- Prendini, L., Hanner, R., & Desalle, R. (2002). Obtaining, storing and archiving specimens and tissue samples for use in molecular studies. En R. DeSalle, G. Giribet & W. Wheeler (Eds.), *Techniques in molecular systematics and evolution* (pp. 176-248). Birkhäuser Basel.
- Prisby, R. D., Swift, J. M., Bloomfield, S. A., Hogan, H. A., & Delp, M. D. (2008). Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat. *Journal of Endocrinology*, 199(3), 379-388.
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org/>
- Raxworthy, C. J., & Tilston Smith, B. (2021). Mining museums for historical DNA: Advances and challenges in museomics. *Trends in Ecology & Evolution*, 36(11), 1049-1060. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.07.009>

-
- Rayo, E., Ferrari, G., Neukamm, J., Akgül, G., Breidenstein, A. M., Cooke, M., Phillips, C., Bouwman, A. S., Rühli, F. J., & Schuenemann, V. J. (2022). Non-destructive extraction of DNA from preserved tissues in medical collections. *BioTechniques*, 72, 61-64. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0014>
- 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, 1-4.
- Rincón, E., Ros, A., Claramunt, A., & Arranz, F. (2004). Caracterización mecánica del material óseo. *Tecnología y Desarrollo. Revista de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente*, 2, 3-27.
- Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G., & Caramelli, D. (2012). Ancient DNA studies: New perspectives on old samples. *Genetics Selection Evolution*, 44(21), 1-19. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-44-21>
- Rodzen, J. A., Banks, J. D., Meredith, E. P., & Jones, K. C. (2007). Characterization of 37 microsatellite (*loci*) in mountain lions (*Puma concolor*) for use in forensic and population applications. *Conservation Genetics*, 8, 1239-1241.
- Rohland, N., Siedel, H., & Hofreiter, M. (2004). Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. *BioTechniques*, 36(5), 814-821. <https://doi.org/10.2144/04365ST05>
- Rowe, K. C., Singhal, S., Macmanes, M. D., Ayroles, J. F., Morelli, T. L., Rubidge, E. M., Bi, K., & Moritz, C. C. (2011). Museum genomics: low-cost and high-accuracy genetic data from historical specimens. *Molecular Ecology Resources*, 11, 1082-1092. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03052.x>
- Rowe, K. C., Tingley, M. W., Koo, M. S., Patton, J. L., Conroy, C. J., Perrine, J. D., Beissinger, S. R., & Moritz, C. (2015). Spatially heterogeneous impact of climate change on small mammals of montane California. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1799), 20141857.
- Roycroft, E., Moritz, C., Rowe, K. C., Moussalli, A., Eldridge, M. D. B., Portela Miguez, R., Piggott, M. P., & Potter, S. (2022). Sequence capture from historical museum specimens: maximizing value for population and phylogenomic studies. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 931644. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.931644>
- RStudio Team. (2015). RStudio: Integrated Development Environment for R. <http://www.rstudio.com/>
- Ruberte, J., Carretero, A., & Navarro, M. (2017). *Morphological mouse phenotyping: Anatomy, histology and imaging*. Elsevier.
- Rubidge, E. M., Patton, J. L., Lim, M., Burton, A. C., Brashares, J. S., & Moritz, C. (2012). Climate-induced range contraction drives genetic erosion in an alpine mammal. *Nature Climate Change*, 2, 285-288.
- Ruiz-Gartzia, I., Lizano, E., Marques-Bonet, T., & Kelley, J. L. (2022). Recovering the genomes hidden in museum wet collections. *Molecular Ecology Resources*, 22, 2127-2129. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13631>

-
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol: Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 1, 356-359. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093450>
- Samsuwan, J., Somboonchokepisal, T., Akaraputtiorn, 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>
- Sanchiz, B. (1994). Manual de catalogación y gestión de las colecciones científicas de Historia Natural. En *Serie de Manuales Técnicas de Museología, Número 1* (p. 80). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Sasaki, N., & Enyo, A. (1995). Viscoelastic properties of bone as a function of water content. *Journal of Biomechanics*, 28, 809-815.
- Scarsbrook, L., Verry, A. J. F., Walton, K., Hitchmough, R. A., & Rawlence, N. J. (2023). Ancient mitochondrial genomes recovered from small vertebrate bones through minimally destructive DNA extraction: Phylogeography of the New Zealand gecko genus *Hoplodactylus*. *Molecular Ecology*, 32, 2964-2984. <https://doi.org/10.1111/mec.16434>
- Schaffler, M. B., & Burr, D. B. (1988). Stiffness of compact bone: effects of porosity and density. *Journal of Biomechanics*, 21(1), 13-16.
- Scher, J. U., Littman, D. R., & Abramson, S. B. (2016). Microbiome in inflammatory arthritis and human rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatology*, 68, 35-45.
- Schiaffini, M. I., Gabriell, M., Prevosti, F. J., Cardoso, Y. P., Castillo, D., Bo, R., Casanave, E. B., & Lizarralde, M. (2013). Taxonomic status of southern South American *Conepatus* (Carnivora: Mephitidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 167, 327-344.
- Schoeder, H., de Barros Damgaard, P., & Allentoft, M. E. (2019). Pretreatment: Improving endogenous ancient DNA yields using a simple enzymatic predigestion step. En B. Shapiro, A. Barlow, P. D. Heintzman, M. Hofreiter, J. L. A. Paijmans & A. E. R. Soares (Eds.), *Ancient DNA. Methods in Molecular Biology* (pp. 21-24). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9176-1_3
- Schwartz, L. M. (1977). Vertebral Skeletal Preparations: A Manual. *The American Biology Teacher*, 35-41.
- Sheldon, F. H. (2001). Molecular collections for basic research: museums, methods, and morality. En Z. Yaacob, S. Moo-Tan & S. Yorath (Eds.), *Proceedings of the International Conference of In-situ and Exsitu Biodiversity Conservation in the New Millennium* (pp. 331-346). Yayasan Sabah.
- Sheu, Y., Zmuda, J. M., Boudreau, R. M., Petit, M. A., Ensrud, K. E., Bauer, D. C., Gordon, C. L., Orwoll, E. S., & Cauley, J. A. (2011). Bone strenght measured by peripheral quantitative computed tomography and the risk of nonvertebral fractures: The osteoporotic fractures in men (MrOS) study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(1), 63-71. <https://doi.org/10.1002/jbmr.172>
- Silva, P., López-Bao, J. V., Llana, L., Álvares, F., Lopes, S., Blanco, J. C., Cortés, Y., García, E., Palacios, V., Rio-Maior, H., Ferrand, N., & Godinho, R. (2018). Cryptic population structure

-
- reveals low dispersal in Iberian wolves. *Scientific Reports*, 8, 14108. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32369-3>
- Simmons, J. E., & Muñoz-Saba, Y. (2005). *Cuidado, manejo y conservación de las colecciones biológicas* (J. E. Simmons & Y. Muñoz-Saba, Eds.). Bogotá DC, Colombia: Univesidad Nacional de Colombia.
- Simmons, N. B., & Voss, R. S. (2009). Collection, preparation, and fixation of specimens and tissues. En T. H. Kunz & S. Parsons (Eds.), *Ecological and behavioral methods for the study of bats* (pp. 849-867). Johns Hopkins University Press.
- Skedros, J. G. (2012). Interpreting load history in limb-bone diaphyses. Important considerations and their biomechanical foundations. En C. Crowder & S. Stout (Eds.), *Bone Histology: An Anthropological Perspective* (pp. 153-220). CRC Press, Taylor; Francis.
- 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, 405-415.
- Smith, M. J., Pascal, C. E., Grauvogel, Z., Habicht, C., Seeb, J. E., & Seeb, L. W. (2011). Multiplex preamplification PCR and microsatellite validation enables accurate single nucleotide polymorphism genotyping of historical fish scales. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 268-277. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02965.x>
- Smith, R., Schurman, D. J., Kajiyama, G., Mell, M., & Gilkerson, E. (1987). The effect of antibiotics on the destruction of cartilage in experimental infectious arthritis. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 69, 1063-1068.
- Smulders, M., Snoek, L., Booy, G., & Vosman, B. (2003). Complete loss of MHC genetic diversity in the common hamster (*Cricetus cricetus*) population in The Netherlands. Consequences for conservation strategies. *Conservation Genetics*, 4, 441-451.
- Spelda, J. (2015). Clase Diplopoda: Orden Julida. *Revista Ibero Diversidad Entomológica @ccesible*, 27(A), 1-18.
- Steadman, D. W., DiAntonio, L. L., Wilson, J. J., Sheridan, K. E., & Tammariello, S. P. (2006). The effects of chemical and heat maceration techniques on the recovery of nuclear and mitochondrial DNA from bone. *Journal of Forensic Sciences*, 51(1), 11-17. <https://doi.org/10.1111/J.1556-4029.2005.00001.X>
- Straube, N., Lyra, M. L., Paijmans, J. L. A., Preick, M., Basler, N., Penner, J., Rödel, M.-O., Westbury, M. V., Haddad, C. F. B., Barlow, A., & Hofreiter, M. (2021). Successful application of ancient DNA extraction and library construction protocols to museum wet collection specimens. *Molecular Ecology Resources*, 21, 2299-2315. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13433>
- Sun, Y., Chen, W., Lin, S., Jee, S., Chen, Y., Lin, L., So, P. T. C., & Dong, C. (2006). Investigating mechanisms of collagen thermal denaturation by high resolution second-harmonic generation imaging. *Biophysical Journal*, 91, 2620-2625.

-
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L. P., & Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 2, 3189-3194.
- The GIMP Development Team. (2019). GIMP. <https://www.gimp.org>
- Thompson, M. C. (2015). *Preparing skeletons for research and teaching from preserved human specimens* [Tesis de Maestría (MSc)]. California State University, East Bay.
- Timmins, P. A., & Wall, J. C. (1977). Bone water. *Calcified Tissue International*, 23, 1-5.
- Töpfer, T., Gamauf, A., & Haring, E. (2011). Utility of arsenic-treated bird skins for DNA extraction. *BMC Research Notes*, 4(197), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-197>
- Tsai, W. L. E., Schedl, M. E., Maley, J. M., & McComarck, J. E. (2019). More than skin and bones: Comparing extraction methods and alternative sources of DNA from avian museum specimens. *Molecular Ecology Resources*, 00, 1-8. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13077>
- Turner, C. H., & Burr, D. B. (1993). Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, 14(4), 595-608.
- Turner-Walker, G., Gutiérrez Galiacho, A., Armentano, N., & Hsu, C.-Q. (2023). Bacterial bioerosion of bones is a post-skeletonisation phenomenon and appears contingent on soil burial. *Quaternary International*, 660, 75-83.
- Ural, A., & Vashishth, D. (2007). Effects of intracortical porosity on fracture toughness in aging human bone: A μ CT-Based cohesive finite element study. *Journal of Biomechanical Engineering*, 129, 625-631.
- van der Valk, T., Vezzi, F., Ormestad, M., Dalén, L., & Guschanski, K. (2019). Index hopping on the Illumina HiSeqX platform and its consequences for ancient DNA studies. *Molecular Ecology Resources*, 20(5), 1171-1181. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13009>
- Vaught, J. B. (2016). Biobanking comes of age: The transition to biospecimen science. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56, 211-228.
- Vaught, J. B., & Henderson, M. K. (2011). Biological sample collection, processing, storage and information management. *IARC Scientific Publications*, 163, 23-42.
- Velnar, T., Bunc, G., & Gradisnik, L. (2015). Fractures and biomechanical characteristics of the bone. *Surgical Science*, 6, 255-263. <https://doi.org/10.4236/ss.2015.66039>
- Vicente, M. C. (1988). Diplopoda. En J. A. Barrientos (Ed.), *Bases para un curso práctico de Entomología* (p. 383). Asociación española de Entomología.
- Wandeler, P., Hoeck, P. E., & Keller, L. F. (2007). Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 634-642.
- Wandeler, P., Smith, S., Morin, P. A., Pettifor, R. A., & Funk, S. M. (2003). Patterns of nuclear DNA degeneration over time—a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology*, 12, 1087-1093.
- White, T. D., & Folkens, P. A. (2005). *The human bone manual*. Elsevier.
- Wideman, R. F., & Prisby, R. D. (2013). Bone circulatory disturbances in the development of spontaneous bacterial chondronecrosis with osteomyelitis: A translational model for the pathogenesis of femoral head necrosis. *Frontiers in Endocrinology*, 3, 183.

-
- Willerslev, E., & Cooper, A. (2005). Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1558), 3-16. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2813>
- 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, 105-107.
- Yeni, Y. N., Brown, C. U., Wang, Z., & Norman, T. L. (1997). The influence of bone morphology on fracture toughness of the human femur and tibia. *Bone*, 21(5), 453-459.
- Zacher, F. (1927). *Die Vorrats, speicher und materialschalinge unde ihre bekamfung*. Parey.
- Zanetti, N. I., Ferrero, A. A., & Centeno, N. D. (2019). Depressions of *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) on bones could be pupation chambers. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 49(2), 122-124.
- Zhang, A., D'Errico, F., Backwell, L. R., Zhang, Y., Chen, F., & Gao, X. (2016). Ma'anshan cave and the origin of bone tool technology in China. *Journal of Archaeological Science*, 65, 57-69. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2015.11.004>
- Zimmerli, W. (2015). Bone and joint infections. En W. Zimmerli (Ed.), *From microbiology to diagnostics and treatment* (p. 432). Wiley.