

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SECCIÓN DE LABORATORIO CLÍNICO**



**INFORME FINAL DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN:
EN GENETICA FORENSE**

TÍTULO DEL INFORME FINAL:

**ADN Y ODONTOLOGÍA FORENSE UNA EFICAZ INTERACCIÓN PARA LA
IDENTIFICACIÓN HUMANA**

**PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE:
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**

PRESENTADO POR:

**CORTEZ MARTINEZ, OSCAR JAVIER N° CARNET CM16012 PORTILLO
MONTECINOS, KENIA ELIZABETH N° CARNET PM18035 SAGASTIZADO
QUINTANILLA, EVER ALEXIS N° CARNET SQ16003**

DOCENTE ASESOR:

LICDA. XIOMARA PASTORE DE RODAS

OCTUBRE DE 2024

SAN MIGUEL, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
AUTORIDADES



MSC. JUAN ROSA QUINTANILLA
RECTOR

DRA. EVELYN BEATRIZ FARFÁN
VICERRECTORA ACADÉMICA

MSC. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

LIC. PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA
SECRETARIO GENERAL

LIC. CARLOS AMILCAR SERRANO RIVERA
FISCAL GENERAL

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
AUTORIDADES**



**MSC. CARLOS IVÁN HERNANDEZ FRANCO
DECANO**

**DRA. NORMA AZUCENA FLOREZ RETANA
VICEDECANA**

**LIC. CARLOS DE JESÚS SANCHEZ
SECRETARIO**

**Dr. AMADEO ARTURO CABRERA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**MSC. MARTA LILIAN RIVERA
COORDINADORA DEL PROCESO DE GRADO DE LA CARRERA DE
LABORATORIO CLÍNICO**

INDICE

I. RESUMEN.....	1
1.1 ABSTRACT	2
II. INTRODUCCION	3
III. OBJETIVOS	5
3.1 OBJETIVO GENERAL:	5
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:	5
3.3 JUSTIFICACIÓN	6
IV. GLOSARIO.....	7
V. MARCO HISTORICO	9
VI. MARCO TEORICO.....	12
6.1. APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS FORENSES EN ODONTOLOGÍA FORENSE.	12
6.1.2 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN EN LA ODONTOLOGÍA FORENSE	12
6.1.3 DETERMINACION DE SEXO	13
6.1.4 DETERMINACIÓN DE LA EDAD	15
6.1.5 FOTOGRAFIA BUCODENTAL	15
6.1.6 RADIOGRAFÍA	16
6.1.7 QUEILOSCOPIA	17
6.1.8 RUGOSCOPIA	18
6.1.9 HUELLAS, REGISTROS DENTALES	20
6.2 TIPOS DE ADN	22
6.2.1 ADN GENÓMICO	22
6.2.2 ADN MITOCONDRIAL	23
6.2.3 PATOLOGIA DENTAL	27
6.2.4 TOMA DE MUESTRA	28
6.2.5 PREPARACIÓN DEL DIENTE	28
6.2.6 PROTOCOLO PARA LIMPIEZA DE PÍEZA DENTAL	30

6.2.7 AISLAMIENTO DEL ADN	31
6.2.8 PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN EN DIENTES POR AUTOMATE EXPRESS	32
6.2.9 POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO	34
6.2.10 MÉTODO DE EXTRACCIÓN AUTOMATIZADO DE ADN 1 GRAMO	34
6.2.11 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DIGESTIÓN.....	35
6.2.12 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN EN HUESOS EN AUTOMATE EXPRESS	36
6.2.13 BASES GENÉTICAS	37
6.2.14 MARCADORES MOLECULARES	39
6.2.15 TÉCNICAS PARA IDENTIFICAR MARCADORES DE ADN	39
6.3 POLIMORFISMOS	40
6.3.1 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ADN MÁS USADAS EN ODONTOLOGÍA FORENSE.....	42
6.3.2 HIBRIDACIÓN TIPO SOUTHERN	43
6.3.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) POLIMORFISMOS DELONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN.	44
6.3.4 POLIMORFISMO EN EL NÚMERO DE REPETICIONES EN TÁNDEM (VNTR)	44
5.3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction) REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	45
6.3.6 ANÁLISIS DEL CROMOSOMA Y	48
6.3.7 AMPFLP: POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	49
6.3.8 ANÁLISIS DEL ADNmt (ADN MITOCONDRIAL)	49
VII. CONCLUSIÓN.....	51
6.1 BIBLIOGRAFÍA	52
6.2 Anexos.....	53

I. RESUMEN

Por mucho tiempo los dientes han sido resistentes a los cambios ambientales por lo que quiere decir que son un método confiable para la identificación de individuos desaparecidos, el objetivo principal de este artículo se basa en poder obtener información de muestras dentales para recopilar datos importantes tales como el sexo, la edad, tipo de sangre de una persona. cuando hablamos de una pieza dental podemos determinar las partes que confirman está, siendo el cemento, dentina y pulpa quienes nos proveerán las fuentes principales de obtención de material genético en comparación a la corona dental. sin embargo, la pulpa se ha destacado como la fuente principal para este estudio, al estar protegida dentro de la cámara, permaneciendo así lo menos contaminada. una mala manipulación de las muestras, así como una técnica poco confiable, podría llevar a una contaminación del material genético. es importante considerar que no siempre se cuenta con piezas viables para la extracción de ADN, por las circunstancias en las que se halla el cuerpo, por tanto, el buen manejo de las muestras puede ser de vital importancia para poder determinar la identidad del cuerpo. el uso de los perfiles de ADN en odontología forense representa una alternativa válida en la identificación humana, al contener el material genético, propiedades distintivas para cada individuo. Los exámenes de ADN actualmente disponibles resultan de alta fiabilidad y se aceptan como pruebas legales en los tribunales. este artículo también nos hablara un poco sobre la evolución de las técnicas de biología molecular y su interacción con los tejidos dentales, destacando su interés en los casos de investigación forense.

Palabras claves: muestras dentales, individuos desaparecidos, extracción de ADN.

1.1 ABSTRACT

For a long time, teeth have been resistant to environmental changes, which means that they are a reliable method for identifying missing individuals. The main objective of this article is based on being able to obtain information from dental samples to collect important data such as the sex, age, blood type of a person. When we talk about a tooth we can determine the parts that confirm it, the cement, dentin and pulp being the ones that will provide us with the main sources of obtaining genetic material in comparison to the dental crown. However, the pulp has been highlighted as the main source for this study, as it is protected within the chamber, thus remaining the least contaminated. Poor handling of the samples, as well as an unreliable technique, could lead to contamination of the genetic material. It is important to consider that there are not always viable pieces for DNA extraction, due to the circumstances in which the body is found. Therefore, good handling of the samples can be of vital importance to determine the identity of the body. The use of DNA profiles in forensic odontology represents a valid alternative in human identification, as it contains genetic material, distinctive properties for each individual. The DNA tests currently available are highly reliable and are accepted as legal evidence in court. This article will also tell us a little about the evolution of molecular biology techniques and their interaction with dental tissues, highlighting their interest in forensic investigation cases.

Keywords: dental samples, missing individuals, DNA extraction.

II. INTRODUCCION

Los métodos odontológicos forenses han sido de gran utilidad para identificar víctimas, agresores y cadáveres aún no identificados, ya que los tejidos dentales se conservan, aunque los individuos estén en descomposición. La odontología forense además de ser encargada de la investigación, también es la rama que trata del manejo y examen adecuado de las evidencias dentales y su valoración al momento de un caso delictivo determinado es la que se encarga de la recolección y presentación de hallazgos dentales que ayudan a esclarecer el hecho o que tengan intereses judiciales. Su importancia es extraordinaria, cuando los cadáveres quedan carbonizados y cuando por acción del fuego han desaparecido elementos que permitan la certera identificación de los restos humanos disponibles, o por las propias limitaciones que presentan otros métodos. Además, está admitido por todos los especialistas que “no existen dos arcadas iguales” y que “aún los dientes de gemelos idénticos presentan variaciones”; La identificación se basa en la comparación entre las características conocidas de una persona desaparecida (denominado antemortem) con características recuperadas de un cuerpo desconocido (denominado postmortem). El propósito del perfil postmortem es proporcionar información a los investigadores que restringirá la búsqueda a una población de individuos más pequeña. Los odontólogos forenses generalmente pueden determinar el sexo, la raza y la edad (en el momento de la muerte) a partir del estudio cuidadoso de los dientes, su disposición anatómica y las características osteológicas del cráneo. Inicialmente la comunidad forense realizaba la determinación del perfil genético valiéndose del análisis de VNTRs aunque este método requería una gran cantidad de material y de excelente calidad, de ahí que sus resultados no hayan sido lo suficientemente óptimos, especialmente cuando se disponía de un escaso número de muestras de material biológico o el mismo se hallaba degradado. Actualmente en la mayoría de los institutos forenses el estudio del ADN se realiza a través del análisis de STR, que han permitido obtener excelentes resultados para la identificación humana en razón de que presentan mayor polimorfismo (es decir más cantidad de alelos), menor tamaño, mayor frecuencia de los heterocigotos (superior al 90%) y baja frecuencia de mutaciones.

Se ha expresado que, en razón de la naturaleza resistente de los tejidos dentarios al ataque de factores ambientales como incineración, inmersión, trauma, mutilación, descomposición y acción microbiana, representan una excelente fuente de ADN. En la estructura del diente, la dentina y la pulpa pueden proveer importante cantidad de material genético la producción total de ADN genómico obtenida de una muestra dental puede variar de 6 μg a 50 μg se ha enfatizado que a través del procedimiento realizado mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa o PCR se puede contribuir a la diferenciación de un individuo respecto de otro con un alto nivel de confiabilidad y con alrededor de 1 ng (una millonésima de un gramo) del ADN así, abundante cantidad de ADN de calidad puede extraerse de un diente, lo que representa una sostenible ventaja en el proceso de identificación.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

- ✓ Analizar el ADN y la odontología forense, para una eficaz identificación humana.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ✓ Demostrar cual es la importancia que genera en la identificación humana, el conocer los tipos de ADN y dientes.
- ✓ Analizar cuál es la importancia en la relación ADN/diente.
- ✓ Mencionar los diferentes métodos de toma de muestra que se pueden realizar, para la determinación del perfil genético mediante los dientes.

3.3 JUSTIFICACIÓN

La interacción entre el ADN y la odontología forense es crucial para la identificación humana, especialmente en contextos de criminalista y desastres masivos. El ADN proporciona una de las formas más precisas de identificación humana debido a su singularidad en cada individuo (excepto en gemelos idénticos). Sin embargo, el ADN de otras fuentes puede ser difícil de obtener en ciertos casos, como en restos muy descompuestos o quemados. En tales casos, la odontología forense juega un papel crucial. La odontología forense se basa en la comparación de registros dentales y características dentales únicas, que son extremadamente duraderas y pueden sobrevivir a condiciones adversas. Cuando se combina con el análisis de ADN, se aumenta significativamente la exactitud de la identificación, especialmente en escenarios en los que el ADN no está disponible o es de mala calidad. La odontología forense es especialmente útil cuando se trata de restos humanos con poca información biológica restante. Los dientes son más resistentes a la descomposición y pueden proporcionar datos valiosos. El ADN, por otro lado, es fundamental en casos donde se requiere una confirmación definitiva. En situaciones donde se requiere una identificación de alta precisión, como en desastres naturales o investigaciones criminales, la combinación de ADN y odontología forense permite una identificación más eficaz y rápida. El ADN puede confirmar la identidad de los restos dentales encontrados y viceversa. La colaboración entre genetistas y odontólogos forenses mejora los protocolos de investigación y las técnicas de análisis, permitiendo una identificación más fiable y una mejor gestión de la evidencia. Esta interacción también permite la mejora continua de los métodos y procedimientos en ambas disciplinas. La combinación del análisis de ADN con la odontología forense no solo optimiza la precisión en la identificación humana, sino que también aborda las limitaciones de cada técnica cuando se usa por separado, ofreciendo un enfoque más robusto y confiable en la identificación de restos humanos.

IV. GLOSARIO

- ✓ **Odontología forense:** es la aplicación de los conocimientos odontológicos confines de identificación y tiene utilidad en el derecho laboral, civil y penal.
- ✓ **Estomatología forense:** es la disciplina que aplica los conocimientos estomatológicos para el correcto examen, manejo, valoración y presentación de las pruebas bucodentales en interés de la justicia.
- ✓ **Queiloscopia:** (de las palabras griegas cheilos - labios, skopein - ver) es un estudio de los labios que muestra una serie de líneas que corren en diferentes sentidos, formando en algunos casos figuras geométricas, que deben ser estudiadas y descritas en la inspección integral del cuerpo, al igual que las comisuras y grosor de los labios.
- ✓ **La rugoscopia:** constituye una técnica auxiliar de la odontología forense, en caminata a determinar la identidad humana.
- ✓ **Los RFLP:** son variaciones de las longitudes de los fragmentos de ADN producidos por el corte de moléculas de ADN con endonucleasas de restricción específicas.
- ✓ **Hibridación tipo southern:** Es una técnica simple y fácil de realizar que detecta fragmentos de ADN procedentes de la digestión del ADN genómico con endonucleasas de restricción se separan según su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa.
- ✓ **PCR (Polymerase Chain Reaction) reacción en cadena de la polimerasa:** La reacción en cadena de la polimerasa es un procedimiento eficaz que permite amplificar una secuencia seleccionada de ADN de un genoma un millón de veces o más.
- ✓ **Enfermedad periodontal:** es una inflamación inducida por la placa bacteriana, afectando las estructuras de soporte del diente (Hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento).
- ✓ **RFLP:** son variaciones de las longitudes de los fragmentos de ADN producidos por el corte de moléculas de ADN con endonucleasas de restricción específicas.
- ✓ **AMPFL polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados:** Esta

técnica es más rápida que el análisis de RFLP y utiliza PCR para amplificar las muestras de ADN.

- ✓ **La hibridación tipo Southern:** explora las variaciones en la longitud o tamaño de los fragmentos de ADN ocasionadas por la restricción del genoma mediada por una enzima particular (endonucleasa).

V. MARCO HISTORICO

La disciplina forense se ocupa de la aplicación de la ciencia y la tecnología para la detección e investigación del crimen y la administración de justicia, requiriendo de los esfuerzos coordinados de un equipo preparado multidisciplinariamente. La identificación dental sigue siendo uno de los más confiables y frecuentes métodos utilizados para la identificación humana, principalmente por las comparaciones de los archivos ante-mortem y post-mortem. Es importante saber que la odontología forense se relaciona históricamente con la medicina forense, en particular con aquellos casos en los que la identificación de sujetos ha revestido un problema singular. El hecho que los tratamientos odontológicos antiguos hayan sido efectuados con materiales más o menos perdurables, permite reconocer y establecer las técnicas y los propios materiales utilizados. Un ejemplo del primer caso de identificación por elementos dentales se remonta a la Roma Imperial, en la época de Claudio I, Tiberio Druso quien reinó del 41 al 54 antes o después de Cristo, envenenado por su cuarta esposa Agripina (Ver anexo) para permitir el ascenso de su hijo (del matrimonio anterior de Agripina) Nerón. Agripina identificó un cadáver gracias a la mal posición dentaria. Claudio tenía una amante de nombre Loilla Paulina, rival poderosa de Agripina, quien mando a ejecutarla indicando que se le llevara su cabeza cercenada, y así lo hicieron pero debido al tiempo que transcurrió entre la ejecución y la presentación de la cabeza ésta ya presentaba signos de putrefacción, por lo cual Agripina separó los labios del cadáver observando la tonalidad de los dientes, así como una mala posición, que coincidía con las características dentales que presentaba en vida Loilla Paulina. Ya a finales de la Edad Media, un duque de Borgoña, Carlos el Temerario, muere y su cuerpo queda mezclado con los restos de otros combatientes, sus ayudantes tratan de localizarlo al recordar que él había sufrido la caída de un caballo, en la que perdió cuatro incisivos superiores, dato que les permitió hallar el cuerpo del Duque. Continuando con la evolución de la odontología forense, Paul Revere, considerado precursor de la odontología forense al ser el primero en hacer una identificación dental asentada en documentos, ya que él construyó un puente fijo con alambre de plata a un amigo suyo, Joseph Warren, héroe de la independencia muerto por una

bala que le perforo el cráneo en la batalla de Bunker Hill (actualmente Breed's Hill), sepultado por los británicos, Warren fue exhumado al día siguiente para ser exhibido como ejemplo de lo que les ocurriría a los demás revolucionarios, y luego devuelto a su sepultura.

Tiempo después los hermanos de Warren, junto con Revere, desenterraron e identificaron el cuerpo gracias al puente que se le había colocado.

En los años posteriores (1849-1879) se solicitaron por primera vez los servicios de un cirujano dentista en Estados Unidos, el doctor Keep, quien identificó un cadáver incinerado por una prótesis de porcelana que él había colocado. Otra identificación, pero por incrustaciones de oro fue la que realizó el doctor Roustein al dar con los restos del príncipe Luis Napoleón.

En 1894, el doctor Plastching presenta en Roma un método de identificación y le da el nombre de "odontometría", con el cual fija las bases para la completa reestructuración dentaria, con fichas legales que permiten tener un registro completo y de fácil interpretación.

El Dr. Oscar Amoeda (padre de la Odontología Forense) identificó a víctimas de un incendio en Francia en 1898 donde murieron 126 personas, publicó su libro *L'artdentaire en médecine légale*; además presentó en el congreso Médico Internacional de Rouen de 1897 un artículo titulado "Función de los dentistas en la identificación de las víctimas de la catástrofe del bazar de la Caridad". En este artículo concluye que era necesario establecer un sistema internacional de trazo uniforme de diagramas de la dentición y una sola nomenclatura.

En 1898, el cirujano dentista Schwars, presentó un trabajo basado en la medición de la maxila y mandíbula, al que llamo prosometría, en el que propone la integración de un cuerpo odontológico auxiliar al servicio de la identificación forense. En 1924 el doctor Amadeo López de León publica su trabajo "Odontología criminal"

con el que implanta las bases de la rugoscopia.

Para 1971, el procurador de Justicia del Distrito Federal, comienza a desarrollar en México técnicas de identificación con metodología de punta, con la creación de departamentos especializados. En la actualidad se continúan aplicando los conocimientos odontológicos con la finalidad de resolver numerosos problemas judiciales.

Esta rama de la Medicina Forense tiene un dominio establecido con amplias aplicaciones en:

- ✓ Examinación y evaluación de lesiones en boca, dientes y tejidos blandos bucales.
- ✓ Identificación de individuos en investigaciones criminales y/o desastres masivos.
- ✓ Identificación, examinación y evaluación de marcas de mordidas las cuales ocurren con frecuencia en las agresiones sexuales, en el abuso infantil y situaciones de defensa personal.
- ✓ Estimación de la edad.

Conforme el aumento del tiempo puede presentarse una serie de cambios que afectan el contenido de ADN de los dientes. En ese sentido, la progresiva reducción del tamaño de la cámara pulpar, producido por la fisiológica deposición de la dentina, representa un aspecto endeble. La pulpa no sólo disminuye en volumen con el tiempo, sino también en cuanto a su celularidad, tornándose más fibrosa Como parte del proceso de envejecimiento, la dentina aumenta en volumen y se vuelve progresivamente esclerótica. Por lo tanto, el avance de la edad puede conducir a una disminución en el contenido de ADN y un cambio en su distribución a través del diente. Pese a los factores apuntados, en individuos de mayor edad los molares todavía serían los dientes de elección.

VI. MARCO TEORICO

6.1. APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS FORENSES EN ODONTOLOGÍA FORENSE.

La estomatología forense es la disciplina que aplica los conocimientos estomatológicos para el correcto examen, manejo, valoración y presentación de las pruebas bucodentales en interés de la justicia.

Además, esta ciencia colabora con la criminalista en la investigación y comprobación de ciertos delitos mediante la identificación del culpable y la aportación de datos valiosos para el juicio.

También constituye un lazo de unión con la medicina forense, con la antropología forense y con el derecho, al aportar conocimientos muy valiosos para:

- ✓ Establecer la identidad de los sujetos que han perdido su individualidad por las circunstancias de la muerte.
- ✓ Aclarar problemas legales relacionados con la profesión odontológica.

APLICACIONES

La odontología forense interviene en múltiples actividades, principalmente:

- ✓ **Individualización por medio de las características odontológicas:**
Determinación de sexo, edad y grupo racial o Establecimiento de ocupación, situación socioeconómica y lugar de origen.
- ✓ Identificación de un agresor (huellas de mordeduras)
- ✓ Responsabilidad profesional y demandas por lesiones del aparato estomatognático.

6.1.2 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN EN LA ODONTOLOGÍA FORENSE

En Odontología Forense son clásicos dos tipos de estudios según la cantidad y calidad de la información de la que se disponga; así, en ocasiones se utiliza un método deductivo o, si se quiere, reconstructivo, esto es, a partir de las evidencias

encontradas se intenta averiguar determinadas características del sujeto como puedan ser la especie, raza, sexo, etc. y en otras ocasiones se utiliza el método comparativo, esto es, se analiza la información post-mortem y se compara con registros previos.

6.1.3 DETERMINACION DE SEXO

Los factores que se pueden considerar para determinar el sexo son:

- ✓ **Cuerpo de Barr:** En el hombre normal, el cariotipo o ideograma corresponde al patrón 46 (XY) y en la mujer normal, al patrón 46 XX por tanto, la determinación sexual se puede efectuar mediante el estudio del cuerpo de Barr, que es una parte de la cromatina sexual, correspondiente a uno de los cromosomas X femeninos; mide aproximadamente una micra y es posible observarlo a través del microscopio ordinario hasta en el 60% de las células del cuerpo femenino, se presenta solo cuando existen dos cromosomas X por lo que no existe en células del cuerpo masculino. Los cuerpos de Barr se pueden buscar en frotis teñidos de mucosa bucal o de pulpa dental.

- ✓ **Tamaño y alineación de los órganos dentarios:** Existen diversas investigaciones encaminadas a determinar el sexo por medio de la morfología y tamaño de los órganos dentarios; Astachoff establece lo siguiente: Los dos incisivos centrales superiores son más voluminosos en el sexo masculino; la diferencia en el diámetro mesiodistal es, en ocasiones de fracción de milímetro.

La relación mesiodistal del incisivo central y el incisivo lateral es menor en el sexo femenino lo cual significa que las mujeres tienen los órganos dentarios más uniformes y alineados.

En el sexo femenino, la erupción de la segunda dentición es más precoz (cuatro meses y medio)

- ✓ **Paladar:** Por lo general, el paladar del sexo masculino es ancho y poco profundo, y el del sexo femenino, estrecho y profundo, el arco dentario es más grueso y el femenino más fino; los bordes alveolares son más verticales en el sexo masculino que en el femenino.
- ✓ **Morfología mandibular:** En el hombre la mandíbula es más grande y gruesa y la altura del cuerpo es mayor (considerando tres partes en línea sagital una para el proceso alveolar, y las otras dos para el resto del cuerpo); los cóndilos son más grandes y las apófisis coronoides son anchas y altas. En la mujer la mandíbula es más pequeña y menos robusta en todas sus estructuras la altura del cuerpo es menor (considerando dos partes en la línea media, una para el proceso alveolar, y la otra para el resto del cuerpo); los cóndilos y la apófisis coronoides son gráciles.
- ✓ **Medición mandibular:** Para medir la mandíbula es necesario considerar lo siguiente:

Altura de la rama: esta medida se obtiene mediante el trazo de una tangente desde la cúspide del cóndilo hasta el plano donde reposa la mandíbula.

Anchura mínima de la rama se obtiene al medir perpendicularmente la altura.

Anchura bigoniaca: Distancia entre los goniones derecho e izquierdo. **Longitud total:** distancia del borde anterior del mentón y el punto de intersección de la línea sagital con la línea que une los bordes posteriores del ángulo mandibular.

Una vez obtenidas las medidas anteriores se aplica la siguiente fórmula:

Sexo = altura de la rama + anchura mínima de la rama + anchura biogoniaca + longitud total.

Si los valores obtenidos exceden la cifra 1 200.88 corresponden al sexo masculino; y si quedan por debajo corresponden al sexo femenino. El error probable con esta técnica es de 18.41%.

6.1.4 DETERMINACIÓN DE LA EDAD

La edad es uno de los elementos fundamentales en la identificación de un individuo, la odontología forense se auxilia de los siguientes métodos:

- ✓ **Cronología dental:** La naturaleza provee al ser humano de dos denticiones: **primaria** (temporal) y **secundaria** (permanente). Estas difieren en tamaño y anatomía; el estudio de la dentición se puede efectuar de manera clínica, o mediante el uso de radiografías. **Angulación mandibular:** no obstante que la angulación mandibular se debe tomar con cierta reserva, se considera que en el recién nacido es de aproximadamente 170°; cuando surge la dentición secundaria es de alrededor de 150°; en el adulto disminuye a 100 o 110° y en el anciano llega a 130 o 135°.

- ✓ **Desgaste dental:** El desgaste dental puede emplear para la determinación de la edad solo cuando se conocen diferentes aspectos culturales, ocupacionales y alimentarios, así como alteraciones de la oclusión, etc.

6.1.5 FOTOGRAFIA BUCODENTAL

En la identificación odontológica es fundamental la técnica fotográfica para un mejor registro, ya que al aplicar sus técnicas es posible captar detalles que a simple vista resultarían inadvertidos en el momento del estudio.

Las fotografías fundamentales para la identificación odontológica son cinco, principalmente:

- ✓ **Norma anterior:** Los órganos dentarios superiores de deben encontrar en oclusión con los órganos dentarios inferiores; se tienen que registrar las

superficies vestibulares desde el primer premolar izquierdo de ambas arcadas.

- ✓ **Norma lateral derecha:** Los órganos dentarios superiores de deben encontrar en oclusión con los órganos dentarios inferiores, es conveniente registrar desde el segundo premolar hasta el segundo molar.
- ✓ **Norma lateral izquierda:** misma técnica que el lado derecho.
- ✓ **Norma palatina:** El propósito es registrar las superficies palatinas y las oclusales, así como las rugas palatinas.
- ✓ **Norma lingual:** Esta encaminada a registrar, principalmente las superficies linguales y oclusales de los órganos dentarios inferiores.

6.1.6 RADIOGRAFÍA

La radiografía juega un papel vital en odontología forense para descubrir los hechos ocultos que no pueden ser vistos por medio de la exploración física. El examen dental y la comparación entre los registros radiográficos dentales ante-mortem y post-mortem puede producir resultados con un alto grado de fiabilidad y una simplicidad relativa. Las radiografías panorámicas son también útiles para determinar la edad del individuo mediante la evaluación de la etapa de erupción.

El uso de las radiografías es característico de las técnicas que implican la observación de las distintas etapas de mineralización. La estimación de edad se basa en el grado de formación de estructuras de las raíces y las coronas, la etapa de erupción y la mezcla de dentición primaria y secundaria.

También se puede observar el tamaño de la cavidad pulpar que se reduce como resultado del depósito de la dentina secundaria. Las medidas de esta reducción pueden utilizarse como un indicador de la edad (Kvaal et al, 1995); la longitud de la pulpa y la anchura se miden, estas proporciones están

significativamente correlacionadas con la edad. Los resultados muestran la correlación más fuerte con la edad para estar en relación entre la anchura de la pulpa y la raíz.

Esto indica que la velocidad de deposición de la dentina en las paredes mesial y distal está más estrechamente relacionada con la edad que en el techo de la cavidad pulpar. Sin embargo, la limitación de la técnica es que la correlación entre la edad y las proporciones entre la pulpa y la longitud de la raíz son solo importante para caninos y premolares superiores.

6.1.7 QUEILOSCOPIA

Queiloscopia (de las palabras griegas cheilos - labios, skopein - ver) es un estudio de los labios que muestra una serie de líneas que corren en diferentes sentidos, formando en algunos casos figuras geométricas, que deben ser estudiadas y descritas en la inspección integral del cuerpo, al igual que las comisuras y grosor de los labios. Se aplica principalmente en la identificación de los vivos, ya que huellas labiales se suelen dejar en la escena del crimen y pueden proporcionar un enlace directo con el sospechoso ya que los estudios de labios de impresión son exclusivos de una sola persona (excepto en los gemelos monocigóticos). Al igual que las huellas dactilares, los surcos labiales son permanentes e inmutables. Es posible identificar huellas labiales desde la sexta semana de vida intrauterina.

La unión de los labios, la piel y la mucosa está formado por una línea blanca ondulada llamada cordón labial. La zona de la mucosa, zona de Klein, está cubierta por arrugas y estrías formando un patrón característico: impresión de labio. El estudio de los labios nos muestra una serie de líneas que corren en diferentes sentidos, formando en algunos casos figuras geométricas, que deben ser estudiadas y descritas en la inspección integral del cuerpo, al igual que las comisuras y grosor de los labios.

Las líneas labiales se clasifican según Suzuki en:

- ✓ Verticales completas.
- ✓ Verticales incompletas.
- ✓ Bifurcadas En forma de X En forma de red.
- ✓ Punteadas.

Los labios en base a su espesor, se pueden clasificar en:

- ✓ **Delgados:** cuando la mucosa del labio superior es ligeramente visible
- ✓ **Medianos:** con la mucosa más redondeada y visible en un espacio de 8 a 10mm.
- ✓ **Gruesos:** cuando la mucosa es muy visible.
- ✓ **Voluminosos o muy gruesos:** fuertemente vueltos hacia el exterior.

6.1.8 RUGOSCOPIA

El fundamento de la técnica de identificación rugoscópica se basa en el estudio de las arrugas o crestas de la bóveda palatina de los humanos, que son unas eminencias papilares de la parte anterior del paladar duro, formadas desde el periodo de gestación y que permanecen toda la vida. La rugoscopia constituye una

técnica auxiliar de la odontología forense, encaminada a determinar la identidad humana. En la nomenclatura de la dactiloscopia se encuentra una clasificación para las distintas rugas palatinas:

- ✓ **Diferentes (diversas, distintas)**: no existen dos personas con la misma disposición de rugosidades palatinas.
- ✓ **Inmutables (no mudables)**: siempre permanecen iguales, a pesar de sufrir traumatismos superficiales.
- ✓ **Perennes (continuas, perpetuas)**: desde su formación hasta la muerte permanecen iguales.

De tal manera que no existen dos conjuntos de crestas palatinas iguales, estas no cambian de posición y duran toda la vida. Sin embargo, las rugas del paladar sí son susceptibles a perderse debido a la acción compresiva de algunas prótesis, ya que la presión de tales aditamentos altera su forma llegando a borrar las que estén en contacto con la superficie de la prótesis. Accidentes catastróficos relacionados con los accidentes de avión, los incendios y las explosiones pueden destruir las huellas dactilares, pero, curiosamente los patrones de las rugas palatinas se conservan. Según autores como Cortez, el proceso de descomposición de las rugas palatinas comienza aproximadamente cinco días después de la muerte; sin embargo, otros autores indican que por encontrarse protegidas por estructuras dentales y óseas presentan cierto nivel de resistencia a la acción destructiva de la putrefacción y las altas temperaturas, en comparación con el resto de los tejidos blandos.

El brasileño Luis Silva¹ implantó un sistema de clasificación para diferenciarlas, según la forma que dibujan sobre el paladar y las dividió en simples, y compuestas (que resultan de las uniones de las líneas simples). Para el estudio del paladar este se divide en dos partes, con una línea media que marca el lado derecho y el izquierdo, comenzando siempre de la parte más anterior.

En lo que respecta al rafe o papila palatina, que se encuentra sobre la línea media, se encuentra en cuatro diferentes formas:

- ✓ **Papila simple (casi un punto):** S.
- ✓ **Papila con prolongación no mayor a los caninos:** C.
- ✓ **Papila con prolongación no mayor a los segundos premolares:** M, Papila con prolongación mayor a los segundos premolares.

La estereoscopia es una técnica en la que se obtiene la imagen 3D de la anatomía de las rugas palatinas, basado en el análisis de las imágenes tomadas con una cámara, a partir de dos puntos diferentes, utilizando un equipo especial.

6.1.9 HUELLAS, REGISTROS DENTALES.

El análisis por marcas de mordida está basado en la individualidad de la dentición humana. Características como el tamaño de los dientes, la forma, el desgaste, el alineamiento, rehabilitaciones, pueden ser identificadas con fiabilidad.

La mordedura es una lesión traumática contusa, desgarrante o contuso perforante que, según la presión ejercida en los tejidos afectados puede causar:

- ✓ **Excoriación Equimosis Heridas:** superficiales o profundas, con colgajo o mutilantes.

En la descripción individual, una mordedura puede ser estática o dinámica. Las estáticas son aquellas que encontramos bien definidas las marcas de los bordes incisales de los dientes en el cuerpo, mientras en las dinámicas esta marca presenta un desplazamiento irregular semejando un “barrido” de la lesión, que no ofrece una buena definición de la de la huella dental.

Los casos más frecuentes en los que se estudian huellas de mordida son

violaciones, pederastia, secuestros y robos; y la localización varía según las causas y las circunstancias de la agresión. La clásica marca de mordida se produce por la acción de los incisivos superiores e inferiores, que dejan una marca oval o circular; estas pueden registrarse tanto en la piel (víctima y/o agresor) como en restos de comida y objetos que producen una marca evidente tan válida como la dejada en piel.

Circunstancias como la elasticidad del tejido, la localización, la profundidad o la fuerza, la duración, la presión de la lengua, la succión, la posición o los movimientos de la víctima, o si la mordedura se produjo ante-mortem o post-mortem son circunstancias que pueden distorsionar la marca de la mordida.

6.1.10 TIPOS DE DIENTES

Los dientes que conforman la dentadura humana se clasifican en cuatro tipos, incisivos, caninos, premolares y molares, que difieren en cuanto a forma y tamaño, aunque histológicamente poseen una estructura similar.

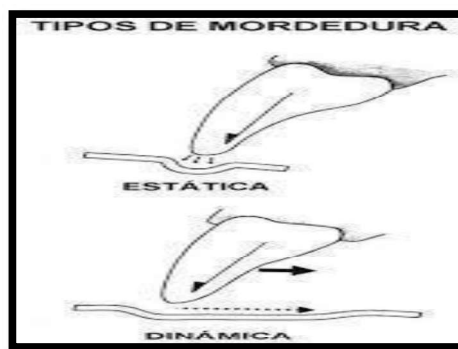
Estudios que han comparado el contenido de ADN entre los diferentes tipos de dientes han demostrado que aquellos con mayor volumen de pulpa aportan la mejor fuente de ADN (De Leo et al., 2000; Yu y Abbott, 2007; Speller et al., 2012) en razón de tener más células.

También se ha verificado que se recupera más ADN de los dientes multirradiculares respecto de aquellos con una sola raíz (Rubio et al., 2009; Speller et al., 2012), probablemente porque existe una superficie más extensa de la raíz y por ende mayor cantidad de cemento.

Entonces es lógico pensar que la selección del diente para obtener la muestra debería ser sobre aquellos con mayor superficie de la raíz y volumen de tejido pulpar, siendo los molares los principales candidatos, hecho aconsejado en diferentes guías de procedimientos, como los publicados por Interpol en su Manual

para Identificación de Víctimas en Catástrofes (IVC, 2014) o por la Comisión de ADN de la Organización Internacional del Recomendaciones de la Sociedad de Genética Forense (ISFG, 2007).

En ausencia de molares, se esperaría que los premolares fueran los de elección, pero debe tenerse en cuenta que los caninos ostentan mayor tamaño en su cámara pulpar, aportando entonces potencialmente mayor cantidad de ADN. Otro aspecto a considerar reside en que aquellas piezas dentarias retenidas, es decir que no han erupcionado en la cavidad oral, además de ser plausibles de menor contaminación, se encuentran más protegidas por el hueso alveolar, por lo que representan un excelente reservorio de material genético.



6.2 TIPOS DE ADN

El ADN genómico en el cuerpo humano se halla en el núcleo de cada célula y representa una fuente de ADN para la mayoría de los análisis forenses. Los dientes son excelentes proveedores de ADN genómico. El ADN mitocondrial se utiliza para determinación de linaje materno y puede resultar un óptimo proveedor de información aun cuando las muestras de ADN extraídas se encuentran degradadas (Manjunath et al., 2011).

6.2.1 ADN GENÓMICO

El genoma humano, que contiene 3.200 millones de pares de bases, se encuentra físicamente situados en los cromosomas que consisten en 22 autosomas y 2 cromosomas sexuales (X e Y). La inmensa mayoría de las células nucleadas del

organismo humano son diploides y poseen dos copias de cada autosoma más dos cromosomas sexuales (XY en hombres y XX en mujeres), lo que lleva a un total de 46 cromosomas en cada célula. Estas células son las llamadas somáticas, en contraste con las células de la línea germinal (gametos) que son haploides y sólo tienen 23 cromosomas.

En las células somáticas, los cromosomas se organizan en pares llamados “pares homólogos” (uno heredado desde la madre y otro desde el padre) que contienen la misma sucesión de genes y marcadores genéticos.

6.2.2 ADN MITOCONDRIAL

El ADN mitocondrial es una pequeña cadena circular de ADN que contiene solamente 6,569 pares de base. Reside dentro de las organelas generadoras de energía de la célula, denominadas mitocondrias. La ventaja de esta técnica de análisis radica en que el ADN mitocondrial se encuentra presente en múltiples copias dentro de la célula, por lo cual es más fácil recuperarlo en el caso de restos que no están adecuadamente conservados. El ADN mitocondrial se hereda únicamente de la madre. El ADNmt se caracteriza por presentar poliplasmia, lo que significa que existe un alto número de copias de ADNmt tanto por mitocondria (entre 2 y 10 copias) como por número de copias por célula (entre 1.000 y 100.000 copias de ADNmt por célula en la mayoría de los tejidos)

ADN y DIENTE

Se ha expresado que, en razón de la naturaleza resistente de los tejidos dentarios al ataque de factores ambientales como incineración, inmersión, trauma, mutilación, descomposición y acción microbiana, representan una excelente fuente de ADN. En la estructura del diente, la dentina y la pulpa pueden proveer importante cantidad de material genético (Alonso et al., 2005).

El ADN puede tener una buena conservación en los tejidos dentarios y óseos durante un extenso período, habiéndose reportado casos de obtención de ADN en

muestras con decenas de miles de años de antigüedad (Budowle et al., 2003).

Se ha hecho hincapié en la falta de estandarización a nivel internacional respecto al uso de protocolos forenses para la obtención del ADN de los dientes, aunque se sabe que existen diferentes guías de procedimiento donde se aconsejan buenas prácticas para la extracción, protección, manipulación y procesamiento de muestras genéticas. Se han publicado trabajos que remarcan el uso de protocolos inherentes al tratamiento de ADN del tejido óseo y que son transportados a los dientes, a pesar de que ambos tejidos son bioquímicamente y morfológicamente diferentes (Dobberstein et al., 2008).

En ese sentido, los protocolos para la obtención de ADN a nivel dentario preconizados por la Comisión Internacional de Personas Desaparecidas (ICMP) (Parsons et al., 2007), son idénticos a los utilizados para el hueso, con la diferencia de que la superficie externa es eliminada en los preparados de tejido óseo, no así en aquellos de índole dental.

Establecer protocolos de muestreo de ADN óptimos para los dientes requiere un correcto análisis y comprensión de su morfología y de la distribución de ADN dentro de ellos, como así también de una cabal comprensión de las modificaciones de tales tejidos durante el estadio post-mortem.

Esta eficaz interpretación propenderá a una adecuada selección de la pieza dentaria. Es recomendable destacar que, desde el punto de vista anatómico, los dientes humanos se dividen en dos partes: la corona, porción expuesta en la cavidad oral y el tejido radicular o raíz dentaria, alojada en el hueso alveolar. Se ha demostrado que las raíces dentales, compuestas por cemento, dentina y pulpa, producen más ADN que a nivel de la corona (Pötsch et al., 2002; Stavrianos et al., 2010; Rohland, 2012), también constituida por dentina y pulpa, pero predominantemente por esmalte.

El esmalte, tejido acelular que reviste la corona del diente, presenta la particularidad de ser altamente resistente a los agentes externos (Gaytmenn y Sweet, 2003) al estar conformado por un 96% de tejido mineral, aunque carece en su estructura de ADN. Empero, este tejido representa una eficaz barrera de protección para las células alojadas en el interior del diente de aquellas condiciones externas tales como calor, luz ultravioleta, humedad y agentes microbianos (Nanci, 2003).

En contraste con el esmalte, la pulpa dental es altamente celular, ricamente vascularizada e inervada.

El tejido conectivo contiene numerosos tipos de células, entre éstas los odontoblastos (que forman la dentina), fibroblastos, células de defensa como los histiocitos y macrófagos, células plasmáticas, nerviosas, mesenquimales e indiferenciadas (Pinchi et al., 2011).

Las células que se producen en mayor cantidad a nivel del tejido pulpar son los odontoblastos, aproximadamente 11.000 por mm² (Chiego, 2002) y los fibroblastos, la pulpa es una valiosa fuente de material genético. (Vertucci, y Anthony, 1986; Murray et al., 2002), aunque puede estar en cantidad limitada o incluso ausente en dientes afectados por alguna patología.

La dentina se compone de 65% de mineral en forma de hidroxiapatita carbonatada, macromoléculas orgánicas (principalmente colágeno), y agua (Malaver y Yunis, 2003).

A nivel de la cámara pulpar, la dentina es un tejido estructuralmente único, anillado, densamente perforado, altamente mineralizado y conformado por túbulos paralelos (Nanci, 2003). Estos túbulos contienen procesos celulares y fibras nerviosas. Las mitocondrias también están presentes a lo largo de las fibras nerviosas que hacen a los túbulos ricos en ADN (Mornstad, 1999; Zaslansky et al., 2009).

Se ha analizado en una investigación (Corte Real et al., 2008) que, sobre 10 dientes con tratamiento de conducto, es decir con la pulpa completamente eliminada, se han reportado rendimientos de ADN suficientes para generar perfiles STR nucleares completos en ocho de ellos. La terapia endodóntica se realiza en dientes con tejidos pulpares infectados e involucra la extirpación completa de la pulpa. Durante este tratamiento, la superficie pulpar de la dentina también es eliminada, irrigando reiteradamente todo el sistema del conducto radicular con hipoclorito de sodio (Corte Real et al., 2008). Estos regímenes de tratamiento hacen improbable que el material orgánico pueda sobrevivir a nivel de la dentina. El cemento cubre las raíces de los dientes y es un tejido mineral, avascular, con una estructura laminada.

Se compone de 45 a 50% de minerales inorgánicos (hidroxiapatita), proteínas como el colágeno y una matriz no colágena. El cemento se clasifica en dos tipos, basado en la presencia o ausencia de células (cementocitos) [Haapasalo et al., 2012]. El cemento celular es fuente de ADN, ya que contiene cementocitos dentro de la matriz extracelular. El cemento celular es similar en composición física y química al hueso, aunque estructuralmente y funcionalmente diferente (Avery y Chiego, 2009).

Es avascular, no contiene inervación y con menor cantidad de sales inorgánicas (Bosshardt, 2009).

A diferencia del cemento óseo, no se somete a remodelación continua, sino que aumenta de espesor paulatinamente a lo largo de la vida (Kvaal et al., 1996). El cemento celular es predominante en la porción apical de las raíces (Avery y Chiego, 2009).

Los cementocitos están conectados por canalículos que se dirigen hacia el ligamento periodontal, su fuente de nutrientes.

Fuentes adicionales de ADN asociadas con cemento están representadas por inclusiones de tejidos blandos, residuos de sangre, vasos que atraviesan canales accesorios, tejidos periodontales y fragmentos de hueso atrapados entre las raíces de los molares. En virtud de lo expuesto, la pulpa y el cemento representan los tejidos más valiosos como fuentes de ADN genómico en el diente y asimismo ambos tejidos junto con la dentina pueden proveer de ADN mitocondrial.

El esmalte es importante en la preservación de la dentina y la pulpa, pero carece de ADN. El contenido total de ADN de los dientes varía considerablemente de un individuo a otro y también entre los dientes de un mismo individuo.

Algunos de los factores que podrían incidir en el contenido de ADN incluyen el tipo de diente, la edad cronológica del donante y el estado de salud del diente. Cada uno de estos factores influirá en las proporciones relativas del ADN presente en la corona, raíz, pulpa, dentina y en cemento.

6.2.3 PATOLOGIA DENTAL

Las enfermedades dentales tienen un impacto negativo en el contenido de ADN. La CARIES dental enfermedad microbiana, produce disolución y destrucción de los tejidos calcificados de los dientes.

Esto facilita la entrada de bacterias en la pulpa tanto directamente como vía túbulos dentinarios, resultando en la muerte celular.

Otra patología prevalente en la cavidad oral es la enfermedad PERIDONTAL, la periodontitis o enfermedad periodontal es una inflamación inducida por la placa bacteriana, afectando las estructuras de soporte del diente (Hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento).

6.2.4 TOMA DE MUESTRA

Respecto de la toma de muestra para la determinación del perfil genético a partir del diente, se han detallado diferentes métodos como por ejemplo la sección horizontal de la pieza dentaria a nivel de la unión cemento esmalte o verticalmente hasta el ápice, es decir en el extremo final de la raíz.

También se puede realizar el aplastamiento del diente y obtención de polvillo dentario mediante el uso de instrumental rotatorio o sierra, que resulta bastante sencilla y relativamente de bajo costo otra metodología requiere de un molino criogénico denominándose al procedimiento molienda criogénica, que consisten la molienda del material al impactar contra una barra magnética. la muestra se deposita en un vial, es decir un tubo de policarbonato al que se le coloca una barra magnética, y al disponerlo dentro del equipo queda posicionado entre dos terminales de acero inoxidable. Se comienza con una etapa de preenfriamiento, donde el tubo con la muestra es sumergido en nitrógeno líquido con la finalidad de darle dureza a la misma posteriormente, se aplica un campo magnético con el objetivo de movilizar la barra entre los terminales de acero a alta frecuencia, logrando pulverizarla totalmente para, en una ulterior etapa, poder extraerse el material genético.

6.2.5 PREPARACIÓN DEL DIENTE

Los dientes se limpian y se almacenan generalmente en solución salina normal y pueden o no ser refrigerados, dependiendo del tiempo y las instalaciones. En los dientes, como se explicó anteriormente las fuentes de ADN son la pulpa, dentina, cemento, fibras periodontales, y fragmentos de huesos conectados; el tejido pulpar es más comúnmente utilizado, ya que suele ser abundante y tiene menor posibilidad de contaminación por ADN no humano.

Existen tres métodos para realizar el muestreo del tejido pulpar:

- ✓ **Trituración:** Éste método se utiliza como último recurso debido a que no da

margen para una mayor evaluación de la histología y morfología de los dientes; además la muestra triturada debe someterse a múltiples ciclos de descalcificación y purificación, existe una técnica realizada por Sweet y Hildebrand, pioneros en la molienda criogénica de dientes, se realiza la pulverización del diente limpio en un molino criogénico con nitrógeno líquido minimizando el riesgo de contaminación de la muestra, el polvo se disuelve en una solución de proteinasa K y se incuba durante una noche. La cantidad de ADN que se obtiene puede ser escasa.

- ✓ **División vertical y horizontal:** **A. Vertical o longitudinal:** Este método proporciona la excavación fácil de todo el tejido pulpar con una mínima probabilidad de contaminación. La división se realiza con discos de carburo dividiendo el diente desde el borde incisal (con el lavado frecuente con agua destilada) hasta llegar a la cavidad pulpar, después se divide el diente con un cincel para evitar daños por calor al tejido pulpar; se extrae la pulpa y se transfiere a un vial (contenedor) de laboratorio. Una ventaja de este método es que el resto del diente puede ser utilizado para una evaluación morfológica. **B. Horizontal:** Este método es realizado cuando es necesario preservar la corona dental, esencialmente es el mismo procediendo que el vertical solo que en este método se secciona la raíz separándola de la corona.

El proceso de extracción de ADN se compone de 3 etapas diferentes:

- ✓ **Rotura celular o lisis:** que permite el uso de varias técnicas para la eficaz ruptura de las membranas celulares.
- ✓ Desnaturalización de proteína e inactivación (por agentes quelantes y proteinasas con el fin de inactivar elementos, tales como proteínas.
- ✓ Extracción de ADN

Las técnicas de extracción de ADN más empleada a menudo en Odontología Forense es el método orgánica (compuesta de fenol- cloroformo y se utiliza para ADN de alto peso molecular, esta técnica es laboriosa, y tiene una mayor probabilidad de errores, dado el uso de múltiples tubos y sólo se puede realizar si la abundancia de muestra está disponible); Chelex 100 (el más rápido con el menor riesgo de contaminación, sin embargo, muy caro; Papel FTA (compuesto absorbente celulosa de papel con sustancias químicas, que acelera su uso), y alcohol isopropílico (que contiene amonio y el isopropanol, el cual es menos costoso y también una alternativa a la método orgánico).

6.2.6 PROTOCOLO PARA LIMPIEZA DE PÍEZA DENTAL

1. Fotografiar la pieza dental junto al contenedor en el que fue recibida (sobre, tubo, frasco, etc.) procurando mostrar claramente la identificación correspondiente al caso.
2. Pesar la pieza dental y anotar en el libro de trabajo las descripciones físicas.
3. Limpiar con un cepillo de dientes descontaminado en hipoclorito de sodio al 10% y dentífrico, enjuagar con agua destilada.
4. Transportar la pieza dental en una placa de Petri para continuar la limpieza en flujo laminar, utilizar una hoja de bisturí estéril para retirar putrúlagos, raspando con el filo paralelo a la superficie del diente, auxiliarse con un explorador dental para limpiar caries y otras impurezas.
5. Al verificar mediante visualización completa, que la pieza está limpia, proceder a dar un golpe suave en el yunque, (usar herramientas estériles y limpiar en el yunque con ADN SAT 1 y 2) procurando que no se pulverice o se pierda la muestra, aplicando la fuerza necesaria solamente para fragmentar.
6. Colocar los fragmentos de muestra en un frasco estéril para lavarla.

7. Lavar utilizando una dilución de 1:2 con hipoclorito de sodio al 10% y agua destilada, durante de 5 min agitando regularmente cubriendo completamente. NOTA: si la pieza es de larga data hacer un lavado rápido sin tiempo de reposo con una dilución 1:4 con hipoclorito de sodio 10% y agua destilada. Decantar con cuidado de no perder la muestra.

8. Lavar 5 veces con agua destilada estéril para quitar los restos de hipoclorito.

9. Adicionar etanol hasta cubrir por completo la muestra y dejar reposar 5 minutos decantar con cuidado de no perder la muestra.

10. Colocar la muestra en la caja Petri limpia y entreabierta, dejar secar en mesa de trabajo y cubrirla con un trozo de papel limpio, durante un tiempo mínimo de 1 hora y máximo toda la noche.

11. Una vez seca la pieza se procede a pulverizar.

6.2.7 AISLAMIENTO DEL ADN

Después de obtener la pulpa dental, se coloca en viales de Eppendorf, se agrega un mililitro de agua desionizada estéril y se centrifuga 3 veces en intervalos de 5 min. Se agrega un tampón que contiene Tris HCl y EDTA, y se incuba con proteinasa K durante 18 horas. Los contenidos están sujetos a múltiples etapas de centrifugación y purificación para obtener el sedimento final. Esto se añade a un 1% en gel de agarosa en TBE (Tris HCL, ácido bórico, y EDTA) y se preparan para electroforesis en gel.

El tejido pulpar es el más fácil analizar. Sin embargo, en muchos casos, el diente puede carecer de pulpa, o puede estar tratado odontológicamente. También puede estar contaminada por microorganismos, que introducen ADN no humano en la muestra. En tales casos, la dentina o el cemento se utilizan para extraer el ADN. La posibilidad de encontrar ADN no humano es menor en los tejidos calcificados

(excepto en los casos de lesiones de caries) y hay más probabilidad de recuperación de ADN intacto. Las muestras de dentina y cemento se obtienen por molienda de la raíz, ya sea como un polvo puro de la dentina, o como un polvo de dentina- cemento. Después el polvo se solubiliza y se almacena en viales de laboratorio; se sigue un procedimiento similar para la extracción de ADN como para el tejido de pulpa. El polvo de dentina es una buena fuente de ADNmt, siendo este más útil que el ADN genómico o nuclear ya que el ADNmt tiene sólo 13 genes, en comparación con el ADN nuclear. Las células contienen un alto número de copias de ADNmt que pueden sobrevivir por períodos prolongados en comparación con el ADN nuclear.

Las técnicas para el uso de hueso son esencialmente las mismas que la de los dientes, siendo más utilizada la trituración

6.2.8 PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN EN DIENTES POR AUTOMATE EXPRESS

PRIMERA FASE (PRIMER DIA)

1. Limpiar correctamente la muestra (ver protocolo de limpieza para dientes)
2. Rotular un metacrilato según identificación de muestra; colocar fragmentos de diente dentro del mismo y proceder a pulverizar en freezer mil.
3. Calibrarla báscula analítica antes de utilizarla y tarar con el tubo de trabajo sin muestra sobre la superficie de peso.
4. De la muestra molida; pesar 0.15g. dentro de un micro tubo con tapa de rosca ya sea cónico o de superficie plana (previamente identificado).
5. **En cámara de flujo laminar:** colocar al tubo con muestra 250 µl de buffer delysis, 10 µl de proteinasa K y 5 µl de ditiotrietol (DTT)

6. Homogenizar el tubo en vortex durante 15 segundos y colocar papel Parafilm entre tapa y tubo.
7. Dejar incubando en termo mixer a 56 C y 1100 RPM toda la noche.

SEGUNDA FASE (SIGUIENTE DIA)

8. Mezclar el tubo en vortex y centrifugar 5 min a 14,000 RPM.
9. Preparar el automate express verificando que tenga insertada la tarjeta parar estos óseos.
10. Limpiar la gradilla donde va insertado el cartucho con los diferentes reactivos y la gradilla donde se coloca la muestra, plumber y tubo colector de eluido.
11. Rotular un micro tubo cónico sin tapa y transferirle 150- 200 µl del sobrenadante del tubo con muestra antes centrifugado.
12. Mezclar el cartucho de reactivos y colocarlo en su gradilla correspondiente.
13. Colocar el tubo con muestra, plumber y tubo de eluido en su gradilla y posición correspondiente.
 - ✓ S: Tubo con muestra T1: Plumber.
 - ✓ E: Tubo colector de eluido.
14. Cerrar puerta y encender el equipo, el equipo se iniciará y pedirá presionar botón enter para continuar, posteriormente presionar botón 2 para seleccionar la opción PF express BTA, luego dar enter, ya que hemos verificado que todo está en su posición correcta y por último presionar START para que el equipo inicie su procedimiento.
15. Por último: descartar cartucho, tubo de muestra, plumber y guardar el tubo con eluido con refrigeración para posteriormente cuantificación.

6.2.9 POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO

(Los SNPs son variaciones de la secuencia de ADN que ocurren cuando un único nucleótido (A, T, C o G) en la secuencia del genoma se altera. SNPS).

Por ejemplo, un SNP podría cambiar la secuencia de ADN: AAGGCTAA a los SNP son nuevos marcadores emergentes, de interés para su aplicación en medicina forense.

Debido a su pequeño tamaño de amplificación, hecho de suma practicidad para analizar muestras degradadas, con menor tasa de mutación en comparación con los STR.

6.2.10 MÉTODO DE EXTRACCIÓN AUTOMATIZADO DE ADN 1 GRAMO

- ✓ Reactivos y materiales para muestra de 1 gramo.

Nota: las columnas Amicon Ultra K, los tubos y microtubos deben ser estériles y se deben irradiar en UV Crosslinker por 15 min previo a su utilización.

REACTIVOS	VOLUMEN
Proteinasa K 20mg/ml	113 UL
Ditiotreitol 1.0M	60UL
Buffer ATL	5ML
cartuchos de prepfiler BTA	2

MATERIAL	CANTIDAD
Tubo cónico 50ML	1
Microtubo sin tapadera de 1.5ML paramuestra	1
Microtubo de elución 1.5ML	1
Columna amicon ultra-4K	1

Frasco de descarte de fluidos	1
-------------------------------	---

6.2.11 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DIGESTIÓN.

1. Limpiar y pulverizar correctamente el resto óseo según protocolo establecido en su laboratorio.
2. Depositar 1.0g de material pulverizado en un tubo de 50ml.
3. Agregar 5ml de Buffer de digestión ATL, 113ul de Proteinasa K 20mg/ml, 60ul Ditiotritol 1.0M, Colocar papel parafilm.
4. Homogenizar en agitador tipo vórtex durante al menos 15 segundos e incubar ON a 56°C a 750 rpm.
5. Al día siguiente Centrifugar los tubos durante 20 min a 4,000 o 5,000rpm.
6. Durante el tiempo de centrifugación hidratar la columna Amikon Ultra 4K agregando 1ml de agua libre de nucleasas.
7. Descartar el líquido eluido en el tubo colector, sosteniendo la canasta con la mano. Agregar el volumen restante de digesto y centrifugar durante 15min a 3200xg.
8. Descartar nuevamente el líquido del tubo colector. Centrifugar el Amicon hasta obtener 500ul de digesto concentrado.
9. Pasar los 500ul de digesto concentrado al tubo de 1.7ul rotulado. La muestra está lista para ser purificada en el Automate Express.

6.2.12 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN EN HUESOS EN AUTOMATE EXPRESS

Materiales necesarios por muestra:

- ✓ Tubo cónico de 50ml tapa azul.
- ✓ Tubo 1.7ml rotulado.
- ✓ Tubo 1.5ml tapa a rosca rotulado.
- ✓ Amicon Ultra-15 100k rotulado.
- ✓ Buffer de Digestión (EDTA 0,5M PH8/0.8-1% lauryl-sarcosina). Este reactivo debe estar.
- ✓ Autoclavado.
- ✓ Proteinasa K 20mg/ml • DTT 1.0M.
- ✓ Cartuchos de Prefiler BTA.

NOTA: Los tubos de 50ml deberán ser estériles y se irradiarán en UV Crosslinker por 10 minutos.

- ✓ Los tubos de 1.7 y 1.5ml deben estar autoclavados.
- ✓ Los filtros Amicon deben irradiarse destapadas durante 15min, y luego invertidas por 5min.
- ✓ El Buffer de Digestión, la Proteinasa K y el DTT deben ser preparados según las indicaciones detalladas en el archivo "Preparación de reactivos varios".

Procedimiento.

Preparación y Digestión de las muestras:

1. Limpiar correctamente y moler el material (Ver protocolo Limpieza de Restos Óseos).
2. Colocar 1.0gr de material molido en tubo de 50ml tapa azul rotulado. Agregan 18ml de Buffer de Digestión, 400ul de Proteinasa K 20mg/ml, 60ul DTT 1.0M (descartar el remanente de DTT una vez descongelado). Vortear al menos 15 segundos e incubar ON a 56°C en horno de hibridación. No sellar el tubo

con parafilm, ya que se derrite en el horno.

3. Pasado este tiempo, verificar que se haya digerido toda la muestra, en caso contrario agregar un refuerzo de Proteinasa K 20mg/ml e incubar durante 2hs a 56°C.
4. Centrifugar los tubos por 20 min a 2,000xg para decantar el material no digerido.
5. Durante este tiempo de centrifugación, rotular el dispositivo Amicon e hidratarlo con 1ml de TE, inclinar el dispositivo para permitir que toda la membrana se hidrate.

Dejar reposar durante 10min y luego descartar el excedente de TE en un beaker, invirtiendo el tubo (sosteniendo la canasta para evitar que se separe del tubo).

6. Pasar 15ml del digesto al Amicon y centrifugar durante 20min a 3200xg.

6.2.13 BASES GENÉTICAS

El gen es un segmento de ADN que codifica para una proteína en particular. Esto representa sólo el 2-5% de todo el ADN celular. La función del restante 95% o más del ADN no es conocido y es de tipo ADN no codificante o ADN mal llamado en un principio "basura".

El ADN genómico es una entidad extremadamente variable, esta diversidad o variabilidad genética se debe a variaciones en la secuencia del genoma; por tanto, en un sentido amplio el concepto de diversidad se hace sinónimo de polimorfismo (en su significado literal, muchas formas). El polimorfismo afecta tanto a regiones codificantes del genoma (polimorfismo génico) como no codificantes (polimorfismo genético en general). En ambos casos puede consistir en la variación de un solo par de bases del ADN o, menos frecuente, de millones de pb.

El ADN codificante, aunque es el más interesante desde el punto de vista médico, posee en general poca variabilidad, con la excepción de la región HLA. Desde el punto de vista del análisis del polimorfismo es mucho más interesante el ADN no codificante, que no transcribe a ARN, y que representa, además, cuantitativamente, la mayor parte del genoma humano.

También se conocen en la actualidad los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

Inicialmente, la definición de polimorfismo se refería a las proteínas, y luego a sus genes. Actualmente se debe definir como la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado sea éste génico o no. Los alelos son variaciones de la secuencia de ADN presente en un locus o posición definida en un cromosoma.

Aproximadamente la mitad del ADN no codificante es ADN repetitivo y aunque gran parte del mismo es extremadamente polimórfico, por diversos motivos, el ADN más utilizado con fines forenses es el ADN repetido en tándem y, dentro de él, los minisatélites y microsatélites de ADN.

Estos consisten en repeticiones de fragmentos de ADN de número variable, por lo que genéricamente se denominan VNTR ("variable number of tandem repeats"). Las repeticiones en el ADN microsatélite son de tamaño pequeño (de 2 a 5 pares de bases) por lo que se suelen denominar STRs ("short tandem repeats"). Las repeticiones en un locus minisatélite tienen un tamaño medio de alrededor de 30 pares de bases. Poniendo un ejemplo, un locus STR puede tener una estructura en su zona repetitiva y variable, como ACTT ACTT ACTT ACTT ACTT ACTT ACTT ACTT...hasta un número n de repeticiones. Los individuos nos diferenciamos por el número de repeticiones de esa secuencia. Un individuo 8-12 para ese STR significa que tiene 8 veces la unidad de repetición (ACTT) en un lugar específico de un

cromosoma (locus génico) y 12 veces en el mismo lugar de su otro cromosoma.

Los STRs complejos son sistemas de elevado polimorfismo y gran complejidad con numerosas unidades de repetición distintas y muchas inserciones y deleciones de tamaño diverso. Ejemplos son los STR denominados HUMACTBP2, HUMFIBRA o el STR situado en el locus D21S11.

6.2.14 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores de ADN constituyen la nueva generación de marcadores moleculares pues son capaces de generar una cantidad virtualmente infinita de marcadores. La determinación de la huella genética de ADN se basa en el polimorfismo de secuencias que se da en el genoma humano (y en el genoma de todos los organismos).

6.2.15 TÉCNICAS PARA IDENTIFICAR MARCADORES DE ADN

Existen varias técnicas para identificar marcadores de ADN, las que se pueden agrupar en tres categorías:

- ✓ Hibridación tipo Southern.
- ✓ Reacción de polimerización en cadena (PCR).
- ✓ Combinación PCR o sus productos de ADN con la hibridación tipo Southern.

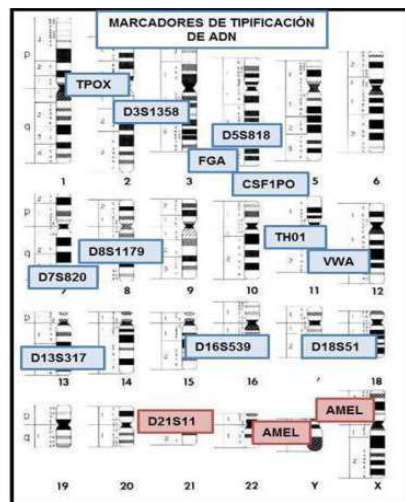
La hibridación tipo Southern explora las variaciones en la longitud o tamaño de los fragmentos de ADN ocasionadas por la restricción del genoma mediada por una enzima particular (endonucleasa).

Dentro de esta técnica se encuentran los marcadores RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) y los VNTR (secuencias adyacentes que se repiten en número variable).

La técnica de PCR, o reacción en cadena de la polimerasa, es una tecnología utilizada para multiplicar (sintetizar) in vitro fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma del individuo en

estudio.

Dentro de esta metodología se encuentran los marcadores llamados RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), PCR iniciada con microsatélites (MP- PCR), AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) y DAF (amplificación de huellas del ADN), entre otros.



Finalmente, dentro de las metodologías que combinan la PCR o sus productos de ADN más la hibridación tipo Southern, están los RAHM y RAMPO (amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites).

6.3 POLIMORFISMOS

La determinación de la huella genética de ADN se basa en el polimorfismo de secuencias que se da en el genoma humano (y en el genoma de todos los organismos).

Los polimorfismos de secuencia consisten en pequeñas diferencias secuenciales (generalmente cambios de pares de bases únicos) que se dan entre individuos una vez cada poco ciento de pares de bases promedio.

Cada diferencia con respecto al genoma humano consenso se presenta normalmente en sólo una pequeña parte de la población, pero todos los individuos

muestran alguna diferencia. Algunos de los cambios de secuencia afectan a dianas de restricción, originando diferencias en los tamaños de ciertos fragmentos de ADN producidos por digestión con una enzima de restricción, en individuos distintos.

Los primeros polimorfismos de ADN utilizados con fines forenses fueron polimorfismos en ADN minisatélite, que se identificaban como RFLPs (polimorfismos basados en la longitud de los fragmentos de restricción). En 1985, Jeffreys y col. basándose en que la región hipervariable de la mioglobina estaba flanqueada por una repetición directa de 9bp característica de la duplicación de secuencias blanco generada por elementos transponibles, sugirieron que algunas regiones hipervariables podían estar relacionadas por transposición. Posteriores experimentos no confirmaron esta hipótesis, pero se pudo observar que la homología parcial existente entre las secuencias de varias regiones hipervariables daba lugar, hibridando en condiciones poco rigurosas la secuencia de 33bp con ADN genómico, a la aparición de un complejo patrón de bandas para cada individuo. Jeffreys y col. consideraron que estos patrones serían prácticamente específicos para cada individuo, y los denominaron "DNA finger prints" (huellas genéticas).

Las bandas que aparecen en un patrón de "DNA fingerprint" (huella genética) corresponden a distintos loci hipervariables o no, con secuencias relacionadas. En la práctica esta metodología tuvo una escasa utilización pues era difícil la estandarización y creación de bases de datos y el uso de estas sondas originaba serios problemas de interpretación bioestadística de los resultados. Trabajando sobre el fenómeno de la homología parcial, Nakamura, realizó un estudio sistemático utilizando oligonucleótidos con las secuencias conocidas de varios loci hipervariables como sondas para analizar una librería genómica humana. Una vez hubieron seleccionado los clones positivos (que hibridaban con alguno de los oligonucleótidos), usaron estos clones como sondas en un análisis por RFLP en individuos elegidos al azar. De esta manera, el grupo de Nakamura fue capaz de caracterizar unos 200 loci hipervariables, que denominaron VNTRs. El uso de sondas multilocus fue pues pronto sustituido mediante la determinación de loci

VNTR individuales mediante sondas de locus único (SLPs, "single locus probes") que, con condiciones de hibridación rigurosas, permiten la detección de locus minisatélites únicos. Este tipo de sondas aún se utiliza con frecuencia, fundamentalmente en investigaciones de la paternidad pues detectan loci minisatélites enormemente informativos.

El uso de las SLPs para detectar polimorfismos minisatélites presentó, algunos problemas iniciales, que llevaron a la necesidad lógica de una estandarización obligada de la prueba.

Para empezar, son cientos los polimorfismos de ADN minisatélite descritos que pueden ser detectados con decenas de enzimas de restricción diferentes. Si cada laboratorio utilizase sus propias sondas y enzimas sería enormemente difícil poder comprobar un resultado en otro laboratorio y se imposibilitaría una necesidad legal básica: la realización de contra pericias o segundas opiniones. En Europa, se estandarizó el uso de HinfI como enzima de restricción y se validaron varias sondas SLPs de las que las más utilizadas son las denominadas YNH24, MS43a y MS31. Reconocen estas sondas loci minisatélite de extraordinaria variabilidad que se puede medir por el número de heterocigotos que es superior al 90% en todos los minisatélites que se usan. Un problema del uso de SLPs es que los individuos no pueden ser caracterizados exactamente por el número de repeticiones en el locus minisatélite y solamente lo pueden ser por el tamaño de los fragmentos de restricción, tamaño que puede variar según la metodología utilizada. Ello obligó a una estandarización muy rigurosa de la misma. Por otra parte, los alelos de los polimorfismos detectados por SLPs no pueden ser separados en clases discretas y la estima de frecuencias se hace más compleja.

6.3.1 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ADN MÁS USADAS EN ODONTOLOGÍA FORENSE

Las aplicaciones de la huella del ADN en odontología forense comprenden

los casos donde el ADN no estaba disponible en ninguna otra parte del cuerpo como en el caso de grandes catástrofes como un accidente de avión, cuerpos carbonizados, cuerpos en descomposición y derrumbe de un edificio. Algunos casos interesantes reportados en la literatura se mencionan a continuación.

Un caso muy interesante fue presentado por Sweet y Sweet 4 (1995) en el que una víctima fue incinerada, su cuerpo estaba carbonizado por completo y la extracción de ADN por el método usual no era posible. Sin embargo, su cuerpo fue identificado después de una extracción de ADN en un tercer molar no erupcionado.

El tsunami del Océano Índico del 26 de diciembre de 2004 creó grandes desafíos para la identificación forense de los cadáveres. Perfiles de ADN son útiles en la identificación de los cuerpos donde otros métodos dentales han sido infructuosos.

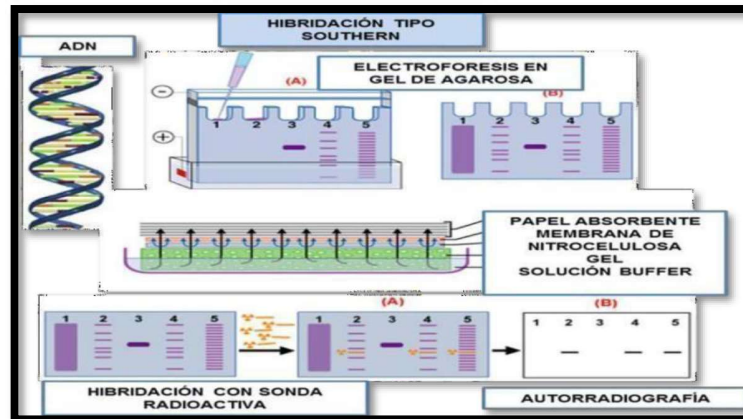
6.3.2 HIBRIDACIÓN TIPO SOUTHERN

Es una técnica simple y fácil de realizar que detecta fragmentos de ADN procedentes de la digestión del ADN genómico con endonucleasas de restricción se separan según su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa.

Los fragmentos de ADN se desnaturalizan por inmersión en gel álcali y, a continuación, se transfieren a una membrana de nilón para reproducir la distribución de fragmentos en gel, después la membrana se sumerge en una disolución que contenga una sonda de ADN marcada con radioactividad.

La sonda de una secuencia que se repita varias veces en el genoma humano generalmente identifica unos pocos de los millares de fragmentos de ADN generados cuando el genoma humano es digerido con una endonucleasa de restricción. Los fragmentos que se hibridan con la sonda se revelan por

autorradiografía.



6.3.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) POLIMORFISMOS DELONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN.

Los RFLP son variaciones de las longitudes de los fragmentos de ADN producidos por el corte de moléculas de ADN con endonucleasas de restricción específicas. Como las enzimas de restricción cortan el ADN de una manera de secuencia específica cada molécula homóloga de ADN proviene de cada célula de un organismo totalmente (todos los genes y todas las secuencias de ADN) homocigótico será cortada en exactamente los mismos sitios. Esto es lo que permite aislar grandes cantidades de fragmentos específicos de ADN para subclonación y secuenciación.

6.3.4 POLIMORFISMO EN EL NÚMERO DE REPETICIONES EN TÁNDEM (VNTR)

Este polimorfismo surge de la presencia de ADN repetitivo no codificante en eucariotas, concretamente de repeticiones en tándem (ADN satélite, minisatélite y microsatélite). El polimorfismo, entre individuos y entre los dos alelos de un mismo individuo, surge porque el número de unidades de repetición que forman cada bloque no es siempre el mismo la razón por la que varíe con tanta facilidad el número de repeticiones está en la posibilidad de recombinación entre ellas con sobre cruzamientos desiguales.

La digestión se lleva a cabo mediante el aislamiento y la cuantificación de ADN, que se corta en fragmentos con la ayuda de enzimas especiales conocidas como endonucleasas de restricción. Estas enzimas funcionan como tijeras moleculares, se esconde el ADN en sitios específicos, cada uno reconoce una secuencia particular. Estas tijeras de ADN se eligieron específicamente para cortar el ADN en sitios que no se encontraron dentro de la secuencia de repeticiones en tándem en lugar de las regiones conservadas menos variables.

Los fragmentos cortados contendrán un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) de diferentes longitudes, mediante la producción de fragmentos de ADN de varios tamaños.

La prueba de VNTR, que puede presentar pequeñas secuencias repetidas de tamaño intermedio (15-65 pares de base), se utiliza raramente en los análisis forenses debido al ADN de mala calidad que proporciona este método.

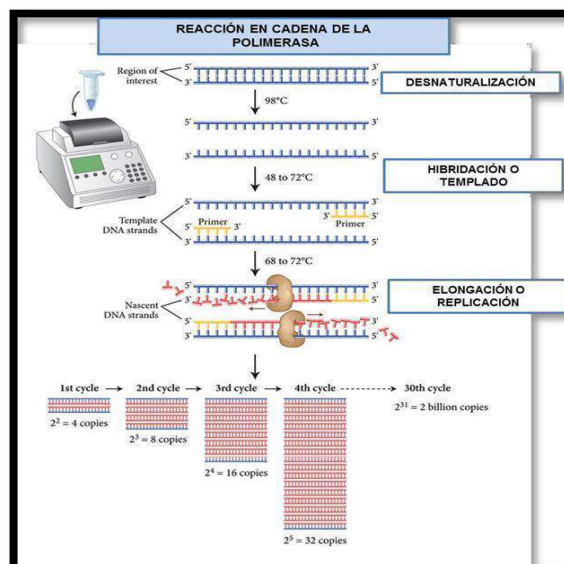
5.3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction) REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa es un procedimiento eficaz que permite amplificar una secuencia seleccionada de ADN de un genoma un millón de veces o más, puede usarse para clonar una secuencia determinada de ADN in vitro sin tener que usar células vivas durante el proceso de clonación; sin embargo, el procedimiento solo puede aplicarse cuando se conoce la secuencia de nucleótidos de al menos un segmento corto de ADN a cada lado de la región de interés.

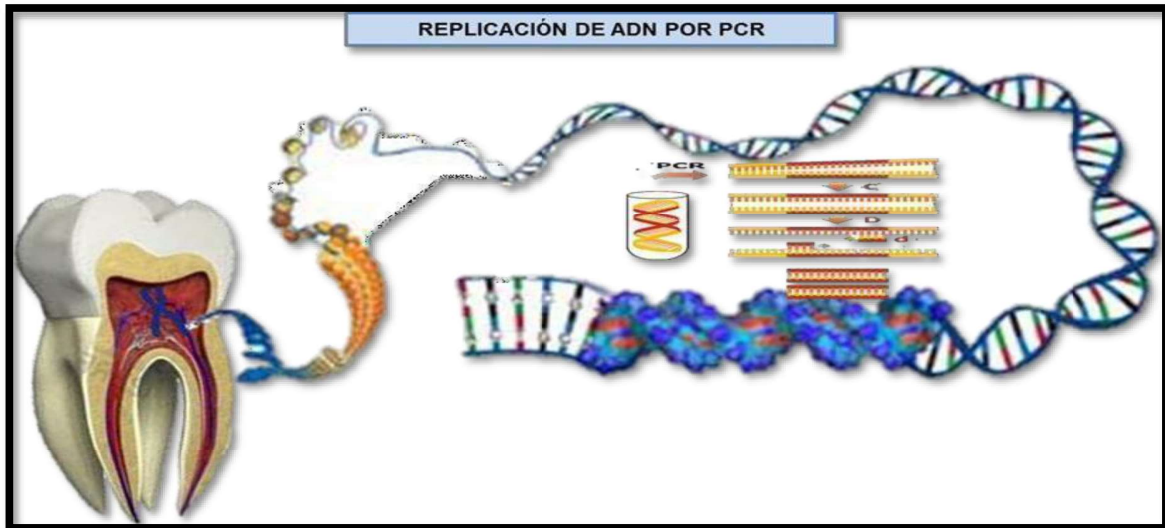
El procedimiento de la PCR implica utilizar oligonucleótidos sintéticos complementarios de las secuencias conocidas que se extienden por la región de interés para cebar la amplificación enzimática de este segmento de ADN en el tubo de ensayo. Este procedimiento incluye tres pasos, cada uno de los cuales se repite muchas veces para producir ciclos de amplificación.

1. Desnaturalización: calentamiento para la separación de las dos hebras de ADN, mediante una incubación breve (30-120s) a una temperatura entre 68 y 97°C, que debe ser superior a la fusión (T_m) de la región de ADN que se quiere amplificar.
2. Hibridación o templado: enfriamiento rápido por debajo de T_m de forma que se permite la hibridación de las hebras sencillas del ADN de interés con los oligonucleotidos o cebadores, también llamados primers. Generalmente se usan temperaturas de 37 a 65°C que se mantienen entre 10 y 120s.
3. Elongación o replicación: etapa de amplificación propiamente dicha (72-75°C, 1 a 3 min) en la que la ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre en dirección 5' a 3' a partir del extremo 3' OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience una nueva etapa de desnaturalización.

Este ciclo se repite muchas veces hasta que se logra el nivel deseado de amplificación.



Proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa: uso de oligonucleótidos sintéticos complementarios de secuencias conocidas que se extienden por la región de interés para cebar la amplificación enzimática de este segmento de ADN.



En un principio la PCR se realizaba con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* como la duplicasa. Como esta enzima es inactivada por el calor durante el paso de desnaturalización, se tenía que agregar nueva enzima en el paso 3 de cada ciclo. La amplificación de ADN mediante la PCR mejoró notablemente con el descubrimiento de una ADN polimerasa estable al calor en la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Esta polimerasa denominada Taq polimerasa (por el nombre del género y la especie de la bacteria de la cual se aisló), permanece activa durante el paso de la desnaturalización en cada ciclo de amplificación.

Una doble hélice de ADN genera dos dobles hélices después de un ciclo de duplicación, 4 después de 2 ciclos, 8 después de 3 ciclos, 16 después de 4 ciclos, 1024 después de 10 ciclos y así sucesivamente.

Los dientes son una excelente fuente de origen genómico y mitocondrial porque los análisis de PCR permiten comparar las muestras post mortem a las muestras recogidas ante-mortem o ADN parental. La principal ventaja de ADNmt es el alto número de copias por célula (de cientos a miles de organelos).

Replicación de ADN por PCR: ADN extraído de la pulpa dental para la amplificación con PCR, el esquema muestra los diferentes ciclos de este proceso (desnaturalización, hibridación y elongación) Imagen tomada de “Dental DNA finger printing in identification of human remains”.

Análisis STR (short tandem repeat) Pequeñas repeticiones en tándem.

En las muestras forenses, el estudio del ADN (genómico y mitocondrial) se realiza generalmente por el análisis de STR, que se puede definir como regiones hiper variables de ADN que presentan repeticiones consecutivas de fragmentos que tienen 2 -7 par de bases. La Oficina Federal de Investigaciones ha elegido a 13 locus STR específicos para servir como el estándar para el sistema de Índice Combinado de ADN(CODIS). STR se utilizó en 45 muestras de ADN de dientes obtenidas de cadáveres no identificados enterrados en 1995 y exhumados en 2000, la pulpa mostró fuertes señales de amplificación de PCR. La prueba STR se utiliza para casos forenses, haciendo una revolución en la identificación humana, y las pruebas de paternidad.

6.3.6 ANÁLISIS DEL CROMOSOMA Y

El cromosoma Y se transmite directamente de padre a hijo, por lo que el análisis de marcadores genéticos en el cromosoma Y es especialmente útil para el seguimiento de las relaciones entre los hombres, o para el análisis de muestras biológicas que implica múltiples colaboradores masculinos. Desde principios de los años 90 el campo forense de análisis del cromosoma Y se ha desarrollado con éxito para convertirse en un lugar común en los laboratorios que trabajan en el estudio de crimen en todo el mundo.

En el análisis de Y-STR, las regiones específicas de ADN en el cromosoma Y masculino se dirigen y se copia muchas veces. El sistema de análisis del ADN Y STR se dirige selectivamente al ADN masculino, incluso en presencia de grandes cantidades de ADN femenino. El Servicio de Ciencias Forenses,

encabezado por el Dr. Gill, ha desarrollado e implementado un número escaso de copias de ADN a finales de 1990. ESR Científico Principal, el Dr. John Buckleton, trabajó con el Dr. Gill y otros en el Reino Unido Servicio de Ciencias Forenses para establecer la técnica y el desarrollo de directrices de interpretación. Determinación de sexos de todas las muestras recogidas recientemente en 24 horas y después de 1 mes de la extracción, respectivamente, dio resultado 100%. Sin embargo, se ha observado que la técnica de PCR no es un método eficaz para la determinación del sexo después de 6 meses post-extracción.

6.3.7 AMPFLP: POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Esta técnica es más rápida que el análisis de RFLP y utiliza PCR para amplificar las muestras de ADN. Análisis AmpFLP puede ser altamente automatizado, y permite fácilmente la creación de árboles filogenéticos basados en la comparación de muestras individuales de ADN. Debido a su costo relativamente bajo y la facilidad de instalación y operación, AmpFLP sigue siendo popular en los países de bajos ingresos.

6.3.8 ANÁLISIS DEL ADNmt (ADN MITOCONDRIAL)

El ADNmt difiere del ADN nuclear en su ubicación, su cantidad en la célula, su modo de herencia y su secuencia. El análisis del ADNmt puede ser usado para examinar el ADN de las muestras que no pueden ser analizadas por RFLP o STR.

El análisis del ADNmt utiliza ADN extraído de otro organelo celular llamado mitocondria. Mientras que las mayores muestras biológicas que carecen de material nucleado celular, tal como el cabello, los huesos y los dientes, no se pueden analizar con STR y RFLP, pueden ser analizados con ADNmt. En la investigación de los casos que han quedado sin resolver desde hace muchos años, el ADNmt es extremadamente valioso. Es mejor que el genoma nuclear a medida que pasa a través del linaje materno y tiene 100-1000 copias de ADNmt.

Este análisis se puede utilizar en el diente especialmente con la dentina y el cemento que contienen suficiente ADN para permitir la amplificación del ADNmt, que puede ser usado en la identificación humana. Silva (2007) indicó que el análisis del ADNmt para fines forenses se limita a tejidos antiguos, tales como los huesos, el pelo y los dientes, en la que el ADN nuclear no puede ser analizado.

VII. CONCLUSIÓN

El genoma humano permite obtener información sobre ascendencia, linaje, evolución, identidad o fenotipo, como así también determinar el sexo.

La aplicación de la tecnología del ADN revolucionó los procedimientos de identificación forense, representando los dientes una excelente fuente de material genético en razón de su resistencia a la acción de aquellos agentes deletéreos que fustigan la integridad del cuerpo humano.

En dicho contexto, los odontólogos forenses deberían concientizarse respecto de la importancia de la correcta selección de los dientes que se tomarán como muestra, así como de su posterior acondicionamiento, preservación y medidas tendientes a conservar la cadena de custodia. Los STRs se han constituido en una eficaz herramienta, especialmente en pruebas de paternidad, pero la aplicación de los SNPs permite visualizar nuevas tendencias en biología molecular.

Se debería insistir en lograr la estandarización a nivel internacional de protocolos forenses para la obtención del ADN de los dientes, propiciando la interacción entre odontólogos y genetistas forenses respetando un lenguaje científico universal, acorde al actual mundo globalizado.

6.1 BIBLIOGRAFÍA

Briem Stamm AD, C. M. (5 de mayo de 2017). ADN y Odontología Forense: una eficaz interacción para la identificación humana. *ADN y Odontología Forense: una eficaz interacción para la identificación humana*, pág. 11. obtenido de <https://es.scribd.com/document/605432327/Odontologia-Forense-y-El-Uso-Con-El-ADN>

Pilares, E. R. (6 de noviembre de 2022). Odontología Forense y el uso con el ADN. *Odontología Forense y el uso con el ADN*, pág. 26. obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/forense/mmf-2019/mmf193d.pdf>

Sanchez Gaytan, S. V. (25 de marzo de 2019). Identificación de cuerpos humanos calcinados mediante el análisis odontológico. *Identificación de cuerpos humanos calcinados mediante el análisis odontológico*, pág. 11. obtenido de <https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000692123/3/0692123.pdf>

Tenorio, C. V. (2013). Aplicación de técnica forense en Odontología. *Aplicación de técnica forense en Odontología*, pág. 61. obtenido de http://odontologia.uba.ar/wp-content/uploads/2018/06/vol32_n73_2017_art4.pdf

6.2 Anexos.



Agripina, emperatriz romana consorte, también conocida como Agripina la Menor —para distinguirla de su madre— o Agripina, fue la hija mayor de Germánico y de su esposa Agripina la Mayor, bisnieta por tanto de Marco Antonio y Octavia la Menor.

ADN Y ODONTOLOGIA FORENSE. UNA EFICAZ INTERACCION PARA LA IDENTIFICACION HUMANA



INTRODUCCIÓN

Los métodos odontológicos forenses han sido de gran utilidad para identificar víctimas, agresores y cadáveres aún no identificados, ya que los tejidos dentales se conservan, aunque los individuos estén en descomposición.



METODOLOGÍA

- EXTRACCION DE ADN EN DIENTES POR AUTOMATE EXPRESS
- AISLAMIENTO DEL ADN
- TECNICAS DE ANALISIS MAS USADAS EN ODONTOLOGIA FORENSE






RESULTADOS

En algunas técnicas de análisis de ADN de las cuales son mas utilizadas en odontología forense se encuentran las aplicaciones de la huella del ADN en odontología forense donde no estaba disponible en ningún otra parte del cuerpo



CONCLUSIÓN

La aplicación de la tecnología del ADN revolucionó los procedimientos de identificación forense, representando los dientes una excelente fuente de material genético en razón de su resistencia a la acción de aquellos agentes deletéreos que fustigan la integridad del cuerpo humano



BIBLIOGRAFIA:

[HTTP://ODONTOLOGIA.UBA.AR/
WP-
CONTENT/UPLOADS/2018/06/
VOL32-N73-2017-ART4.PDF](http://odontologia.uba.ar/wp-content/uploads/2018/06/VOL32-N73-2017-ART4.PDF)