



Facultad de Odontología—Universidad de Sevilla

Trabajo Fin de Grado

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA
LEGAL**

Extracción de ADN de los dientes

Mayo 2017

Claudia-Andreea Sofian

Tutor: Dr. Luis Montes Palma



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

LUIS ANTONIO MONTES PALMA, Profesor Titular del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal (Área de Medicina Legal y Forense) de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que Dña. **CLAUDIA-ANDREEA SOFIAN** estudiante de quinto curso del Grado en Odontología, ha realizado bajo su tutela y dirección el trabajo titulado **“EXTRACCIÓN DE ADN DE LOS DIENTES”** como Trabajo Fin de Grado en la Facultad de Odontología (Universidad de Sevilla), cumpliendo todos los requisitos exigidos para el mismo.

Sevilla, 24 de Mayo de 2017

Fdo. Prof. Dr. Luis Antonio Montes Palma

ÍNDICE

1. RESUMEN/ ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVOS	7
4. METODOLOGÍA	8
1. DISEÑO.....	8
2. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA.....	8
3. HERRAMIENTAS	10
5. RESULTADOS	11
6. DISCUSIÓN.....	20
1. MÉTODOS DESTRUCTIVOS Y MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS....	20
2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EN PIEZAS ANTIGUAS	23
3. IDENTIFICACIÓN A TRAVÉS DE ADN MITOCONDRIAL	24
7. CONCLUSIONES.....	26
8. BIBLIOGRAFÍA	27

1. RESUMEN

La odontología forense ha evolucionado desde la estimación de la edad y el análisis de mordeduras a la investigación genética y pruebas más complejas a lo largo de los años gracias a los avances en la tecnología. Cualquier análisis de ADN requiere una muestra de un individuo (vivo o muerto) o de un lugar en el que se ha producido un incidente/crimen. La región orofacial es una fuente importante de material genético, dado que los dientes son tejidos muy resistentes a la degradación medioambiental, destrucción térmica, eléctrica o mecánica. En esta revisión bibliográfica analizaremos los métodos de extracción utilizados para obtener el ADN, centrándonos en sus ventajas y desventajas, tendencias actuales y las alternativas al ADN nuclear en caso de no obtener una identificación positiva.

Palabras clave: ADN, extracción, identificación, odontología forense, diente

1. ABSTRACT

Forensic dentistry has evolved from age estimation and bite mark analysis to genetic investigation and more complex analysis through the years because of the technological advances. Any DNA analysis requires a sample from a subject (dead or alive) or a place where happened an incident/crime. Orofacial region is an important source of genetic material because teeth tissues are very resistant to environmental, thermal, electrical or mechanical degradation. In this literature review we will analyze the extraction methods used to obtain DNA focusing on its advantages and disadvantages, current tendencies and alternatives to nuclear DNA in case no identification is obtained.

Key words: DNA, extraction, typing, forensic dentistry, tooth

2. INTRODUCCIÓN

El odontólogo forense tiene un trabajo variado en el que se incluye las siguientes actividades:

- Identificación de fallecidos, incluidos aquellos implicados en desastres de masas y también de personas vivas
- Estimación de la edad (tanto de sujetos vivos como muertos)
- Identificación, análisis y comparación de marcas de mordida
- Identificación, análisis y comparación de forma de labios y rugets palatinos y lesiones con patrón dental
- Evaluación de traumas orofaciales en casos de abusos de varia índole o accidentes
- Estudios arqueológicos
- Demandas de malapraxis y negligencia
- Presentación de evidencias ante un tribunal

La identificación de una persona desaparecida o desconocida es uno de los roles más importantes del odontólogo forense ya que el registro dental ha demostrado ser muy útil y fiable a lo largo de los años, sin embargo, depende mucho de la disponibilidad, fiabilidad y exactitud de registros antemortem. ^{1,2,3}

En los cadáveres humanos o restos con un intervalo postmortem corto el material genético se degrada de forma muy rápida, y ya si añadimos que dichos restos humanos están extremadamente dañados o deteriorados por diversas causas la única fuente posible de ADN proviene de los huesos o de los dientes por sus características anatómicas, morfológicas y fisiológicas, y es ahí cuando es necesario una identificación forense. Esto se aplica también a la identificación de especímenes antiguos como momias o esqueletos encontrados en diversos yacimientos arqueológicos y se sabe que no hay ninguna forma de posible identificación ya que no hay más tejidos que los dientes o los huesos y aun así estos pueden tener su ADN degradado por las condiciones en las que se han conservado o almacenado. Otros análisis del diente y su ADN permiten un análisis químico que podría indicar el año de nacimiento (después de 1955 debido a pruebas de detonaciones de bombas nucleares entre 1955 y 1963 que han hecho aumentar el carbono 14 en la atmósfera y con ello en los individuos nacidos después de esa época, es decir el carbono 14 aumentó de forma proporcional

tanto en el ambiente y los individuos y ello se puede medir) e incluso el año de muerte usando el radiocarbono en el esmalte. ^{4,5}

El ADN para la identificación de un sujeto se comenzó a utilizar por primera vez en 1984 (algunos artículos 84 y otros 85) gracias a Sir Alec Jeffreys y su equipo que crearon sondas moleculares radioactivas que eran capaces de reconocer regiones altamente variables del ADN que determinaba patrones específicos para cada individuo. Estas regiones altamente variables llamadas loci hipervariables se componen por una secuencia de oligonucleótidos que puede ser desde 2 a 80 pares de bases. Dependiendo de su tamaño se dividieron en número variable de repeticiones tándem (VNTR de 9 a 80 pares de bases) o minisatélites y repeticiones cortas tándem (STR de 2 a 7 pares de bases) o microsátélites. Ya a partir de ahí y una vez extraído el ADN este se amplificaba a través de la PCR y comprobado a través de electroforesis en gel o electroforesis capilar. Al principio se usó el test a través del VNTR, sin embargo, este método requiere una gran cantidad de material y tiene una calidad baja de resultados. ⁶

Las formas que hay de identificación a través del ADN son las siguientes:

- A través de RFLP (Restriction fragment length polymorphism) se usa para analizar las longitudes variables de los fragmentos de ADN obtenidos a través de una enzima de restricción llamada endonucleasa de restricción, que divide el ADN en un patrón de secuencia específico conocido como lugar de reconocimiento de endonucleasa de restricción. No es muy útil en caso de muestras deterioradas por factores ambientales, además de tardar un tiempo más largo para obtener los resultados.
- STR (short tandem repeat). Se trata de tramos cortos de ADN nuclear que se repite en varias localizaciones a través del genoma humano llamados loci. Cada persona tiene algunos STR heredados del padre y otros de la madre, sin embargo, ninguna persona tiene STR que sean idénticos a cualquiera de los padres, es decir, cada individuo tiene STR únicos y eso es lo que proporciona un marcador de identidad. Dependiendo del país se utilizan entre 10 y 13 loci para completar un perfil de ADN que dé lugar a una identificación de un individuo.
- ADN mitocondrial. Usado sobre todo cuando el material para análisis del que disponemos está altamente deteriorado o dañado, además de estar muy abundante en los huesos y los dientes. El ADN mitocondrial es una buena herramienta ya que presenta un número grande

de copias, es de herencia materna y tiene un alto grado de variabilidad de secuencias. Como desventaja es que su técnica de análisis requiere un intervalo de tiempo mayor y es exclusivamente maternolinesal por lo que es menos informativo.

- Análisis de cromosoma Y. Proporciona una herramienta para entender la evolución humana, la migración y las relaciones entre los hombres. Dado que el cromosoma Y se transmite en un único bloque de padre a hijo, su análisis a través del STR es útil en pruebas de paternidad, casos de agresión física o sexual y agresiones infantiles, además de asesinatos.
- Análisis de cromosoma X. El STR a través del cromosoma X se utiliza para la identificación y estudios de diversos grupos étnicos y razas en el mundo. Tiene la ventaja que es un cromosoma pequeño, lo cual facilita su amplificación, además de detectarse con una alta sensibilidad.
- SNP (Single nucleotide polymorphism). El SNP son secuencias variables del ADN que ocurren cuando un solo nucleótido en la secuencia del genoma es alterado. Es muy útil debido a que tiene un pequeño tamaño de amplicón, sobre todo cuando el material es muy deteriorado, además de tener una tasa mutación menor comparado con el STR. Tiene una susceptibilidad alta de análisis (automatización) y es muy abundante en el genoma humano. Proporciona información específica sobre ancestros, linaje, evolución, identidad, fenotipo e incluso determina el sexo, sin embargo, tiene limitaciones como que loci no ampliamente establecidos.
- Identificación de sexo a través del gen de la amelogenina que está localizado tanto en el cromosoma X como en el Y. La variación en la longitud en los homólogos X-Y del gen de la amelogenina (AMELX y AMELY) son usados para la identificación. El género también puede ser identificado a través del análisis de los picos de los loci de X e Y por electroforesis capilar.⁷

Actualmente mediante la amplificación con el PCR, el STR (Short Tandem Repeat) es uno de los métodos más usados y seguros disponibles para la identificación humana, aunque los avances en SNP (Single Nucleotide Polymorphism) y la identificación a través de Indel proporcionan métodos que pueden aumentar la identificación, ya que ofrecen información sobre la ascendencia y/o características fenotípicas cuando hay presunción de identificación o muestras comprometidas antemortem. Para la identificación del individuo a través del ADN se utilizan diferentes

polimorfismos que están localizados en loci específicos a través de las repeticiones de los nucleótidos, uno de los más comunes es el gen de la amelogenina.

Otro factor importante para la extracción del ADN del diente es la distribución del mismo a lo largo de la anatomía dental. Las raíces dentales, compuestas de cemento, dentina y pulpa contienen una mayor cantidad de ADN que la corona, aunque esta también contenga pulpa y dentina, pero está predominantemente compuesta por esmalte y se ha demostrado que la cantidad o rendimiento del ADN puede ser de hasta 10 veces menor que en las raíces. La pulpa, al ser un tejido blando es uno de los componentes del diente que más rápidamente se degrada. El cemento y la dentina secundaria y terciaria por estar remodelándose continuamente tienen en su interior células localizadas en lagunas y ello permite la obtención de material genético para su estudio, aunque haya transcurrido mucho tiempo postmortem o la conservación de los restos sea muy degradada.

Hay que tener en cuenta en caso de analizar ADN antiguo que hay varias fuentes de contaminación incluyendo los excavadores y antropólogos que han manejado los restos, contaminantes que se transportan por el aire y contaminantes presentes en reactivos y productos desechables del laboratorio.⁸

Todos los métodos de extracción de ADN siguen unos pasos comunes: lisis, purificación y recuperación del ADN propiamente dicha. Estos pasos tienen como objetivo la lisis de las células, la desnaturalización de los complejos proteicos y la remoción de contaminantes biológicos y químicos para finalmente extraer el ADN y posteriormente amplificarlo si hace falta para la identificación.⁹

Para la limpieza de los dientes o los huesos, en primer lugar, se realiza una limpieza mecánica con diversas herramientas para eliminar inhibidores que afecten posteriormente a la extracción propiamente dicha del ADN. A continuación, las piezas se suelen limpiar con hipoclorito sódico (diversas concentraciones y tiempos según distintos autores) y por último se suele hacer otra limpieza o lavado con etanol o alcohol isopropílico a altas concentraciones y distintos intervalos de tiempo. Una vez llevado a cabo la esterilización y lavados de las muestras, éstas se suelen secar mediante diversos métodos. También un método muy común para tratar este tipo de muestras además de la limpieza mecánica y química, es irradiarlas con rayos UV (varios intervalos de tiempo según distintos autores).

Una vez llevada a cabo la limpieza y esterilización de las muestras se procede a la preparación del diente para la extracción del ADN. El método tradicional consiste en aplastar y moler el diente hasta que se convierte en un polvo fino, lo cual destruye la muestra completamente. Recientemente se está optando por métodos más conservadores y para ello se realizaron varios estudios para ver su efectividad, aunque como se comentó anteriormente el método de preferencia sigue siendo la destrucción completa del diente.

3. OBJETIVOS

Esta revisión bibliográfica se plantea con la meta de analizar el papel que la odontología forense puede desempeñar en el campo de la extracción del ADN de los dientes y la relevancia que ello tiene a la hora de identificar a un individuo. Los principales motivos de este trabajo es revisar los distintos métodos que existen de tratar el diente para la extracción del ADN, es decir, si se utilizan métodos destructivos o no destructivos.

Este proyecto encuentra entre sus fines la comparación entre los métodos de extracción del ADN de piezas antiguas y modernas, es decir, con distintos intervalos post-mortem. Asimismo, otro interés de este trabajo es recopilar los métodos usados para tratar especímenes antiguos o muestras de museos.

Por último, otro de sus intereses es la comparación a la hora de una identificación positiva la utilización de ADN nuclear y ADN mitocondrial.

4. METODOLOGÍA

4.1. DISEÑO

El trabajo se planteó como una revisión bibliográfica, intentando abarcar los artículos más relevantes publicados en diversas revistas científicas de prestigio en el área de la odontología forense.

4.2. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Para la elaboración de la revisión bibliográfica se llevaron a cabo varias búsquedas de artículos y revisiones científicas relacionadas con el tema en distintas bases de datos. En primer lugar, se consultó PubMed utilizando diversas palabras claves y en algunos casos filtros:

- “DNA tooth forensic”. Se obtuvieron 199 resultados de los cuales se seleccionaron 24 artículos. 5 de dichos artículos son revisiones bibliográficas.
- “DNA tooth extraction methods”. Se obtuvieron 93 resultados, al aplicar el filtro “inglés”, los resultados se redujeron a 85 de los cuales se seleccionaron 4 artículos.
- “DNA” AND “(tooth OR teeth)” AND “(extraction OR isolation OR purification OR technique)” AND “(better OR best)” AND “forensic”. Se obtuvieron 19 resultados de los que cuales se seleccionó un solo artículo, el cual es una revisión bibliográfica.

También se empleó la base de datos de SCOPUS, en la que se realizaron las siguientes búsquedas:

- “DNA tooth forensic”. Se obtuvieron 429 resultados. Al aplicar el filtro “Dentistry (subject area)”, los resultados se redujeron a 26, de los cuales solo se seleccionó un artículo.
- “DNA tooth extraction methods”. Se obtuvieron 272 resultados. Al aplicar el filtro “Dentistry (subject area)”, los resultados se redujeron a 65 de los cuales se seleccionaron 4 artículos.
- “DNA” AND “(tooth OR teeth)” AND “(extraction OR isolation OR purification OR technique)” AND “(better OR best)” AND “forensic”. Se obtuvieron 28 resultados de los cuales se seleccionó un solo artículo.

Al mismo tiempo se revisó la base de datos IME, aunque con escaso éxito, por lo que no se seleccionó ningún artículo.

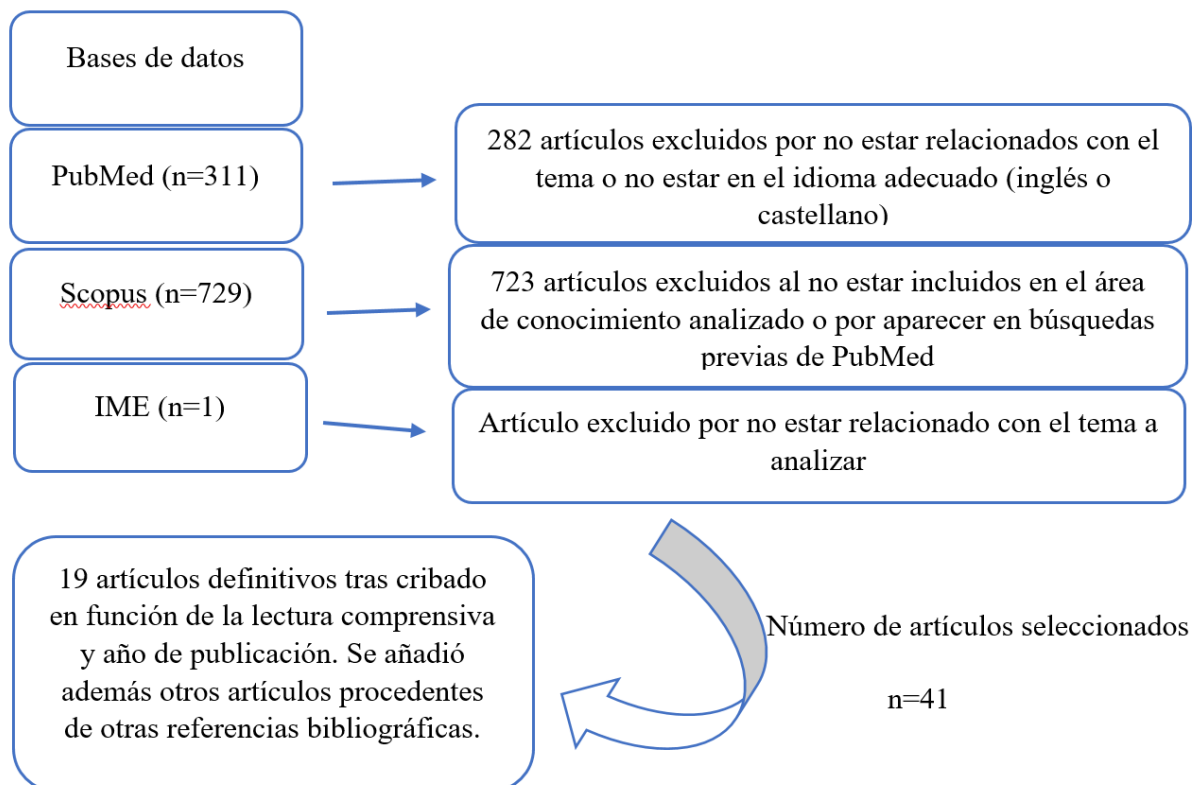
Prácticamente en ningún caso se aplicó un filtro de años debido a que la mayoría de los artículos seleccionados no exceden los 10 años desde su fecha de publicación.

Por último, se realizaron diversas búsquedas de conceptos generales en “Google” y “Google Academic” de los que se seleccionaron 3 artículos.

La base de datos más consultada ha sido PubMed por ser la recomendada principalmente por las bases de realización de los TFG.

Se han rechazado varios artículos de los encontrados mediante las estrategias de búsqueda. La exclusión de dichos artículos se ha realizado siguiendo los siguientes criterios:

- Idiomas: Sólo se han incluido artículos redactados en inglés o castellano.
- Contenido: Se han incluido artículos que aportaban información relevante al conjunto del trabajo, rechazándose aquellos que se alejaban del tema.
- Imposibilidad de acceso: Se han excluido aquellos artículos a los que no se han podido acceder por limitaciones ajenas.



4.3. HERRAMIENTAS

Durante todo el proceso de búsqueda y selección de artículos, se ha usado el gestor Mendeley, con el cual se ha podido organizar y almacenar cada una de las referencias trabajadas, así como clasificarlas en función de los patrones de búsqueda empleados.

5. RESULTADOS

REVISTA	TÍTULO	AÑO	AUTORES	OBJETIVOS	RESULTADOS
Forensic science international	Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains	2000	Meyer, E Wiese, M Bruchhaus, H Claussen, M Klein, A	Determinar el sexo en restos antiguos de huesos y dientes del mismo individuo a través de estudios moleculares del gen de la amelogenina.	La identificación morfológica y el estudio del gen de la amelogenina estuvieron en absoluta concordancia, con la excepción de tres muestras, lo cual da una tasa de éxito de más del 90%.
Forensic Science International	Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth	2005	Kemp, Brian M Smith, David Glenn	Determinar la mejor forma de eliminar la contaminación con hipoclorito de sodio de muestras antiguas de huesos y dientes sin afectar al ADN endógeno.	Una concentración de hipoclorito al 6.0% durante 15 minutos previo a la extracción de ADN es el método más efectivo para retirar la contaminación en muestras que tienen entre 500 y 10000 años.
Forensic Science International	Techniques of dental DNA extraction: Some operative experiences	2011	Pinchi, Vilma Torricelli, Francesca Nutini, A Lucia Conti, Marco Iozzi, Sara	Validar la técnica de extracción de ADN del diente sin destruirlo y ver la posibilidad de múltiples extracciones con distintos intervalos de tiempo	Suficiente cantidad de ADN de la pulpa dental incluso bajo condiciones críticas. El método elegido fue conservador con el diente, pudiendo obtener ADN varios meses más tarde.

REVISTA	TÍTULO	AÑO	AUTORES	OBJETIVOS	RESULTADOS
Journal of Forensic and Legal Medicine	DNA Profiling and forensic dentistry – A review of the recent concepts and trends	2011	Manjunath, B.C. Chandrashekar, B.R. Mahesh, Melkundi Vatchala Rani, R.M.	Revisar las nuevas tendencias aplicadas para la identificación en la odontología a través del ADN.	La utilización del ADN ha revolucionado la identificación forense en los últimos 25 años. Los dientes son una fuente excelente de ADN en comparación con otras regiones del cuerpo y debería tenerse en cuenta para cualquier investigación forense.
Journal of Archaeological Science	Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones	2011	Adler, C.J. Haak, W Donlon, D Cooper, A	Determinar que parte del diente da una mayor cantidad de ADN mitocondrial, examinar los problemas a los que se expone la calidad y sobrevivencia del ADN usando técnicas convencionales de extracción	Se observó que la velocidad estándar de la turbina puede disminuir el rendimiento del ADN mitocondrial hasta 30 veces en comparación con la pulverización en una trituradora de hueso. Por lo visto, este problema se relaciona con el calor producido a altas velocidades. Por último, se vio que se consigue una mayor cantidad de ADN mitocondrial en el cemento del ápice de la raíz con hasta 5 veces más rendimiento que en la dentina.

REVISTA	TÍTULO	AÑO	AUTORES	OBJETIVOS	RESULTADOS
Journal of Forensic Dental Sciences	Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry	2011	Muruganandhan, J Sivakumar, G	Descripción de varias fuentes de la región orofacial que han demostrado ser útiles para el uso en un laboratorio forense	La región oral supone una fuente sencilla y no invasiva de ADN, siendo el más común el frotis bucal en casos sospechosos de homicidios o asaltos físicos o sexuales. En desastres de masas, los restos esqueléticos y dentales son de gran ayuda para la identificación.
Croatian Medical Journal	Highly efficient nuclear DNA typing of the World War II skeletal remains using three new autosomal short tandem repeat amplification kits with the extended European Standard Set of loci	2012	Zupanič Pajnič, Irena Gornjak Pogorelc, Barbara Balažic, Jože Zupanc, Tomaž Štefanič, Borut	Estudiar la eficacia de tres nuevos kits de amplificación usando la normativa europea de los loci para identificación de los loci a través de STR en restos de fosas comunes de la Segunda Guerra Mundial en Eslovenia.	Los tres kits de amplificación han demostrado tener una eficacia similar dado que la identificación de ADN fue exitosa con todas las muestras analizadas (101 de 102), dando una tasa de éxito de 99%

REVISTA	TÍTULO	AÑO	AUTORES	OBJETIVOS	RESULTADOS
Journal of Forensic Dental Sciences	Role of deoxyribonucleic acid technology in forensic dentistry	2012	Datta, Pankaj Datta, SoniaSood	Recorrido a través de la evolución en la tecnología en la identificación a través del ADN y en particular a través de los dientes, destacando la importancia de la biología molecular en estos casos.	Los test actuales de ADN tienen una alta fiabilidad e incluso son aceptados como pruebas legales en los juzgados. En este artículo se destaca la evolución e importancia en los casos de investigación forense.
Science & Justice	Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review	2013	Higgins, Denice Austin, Jeremy J	Sintetizar los conocimientos sobre morfología dental en relación con el ADN y los cambios producidos post-mortem.	Entender la relación entre la estructura dental y su relación con el ADN en los tejidos mineralizados post-mortem es fundamental para la selección de la muestra. El seleccionar las muestras de forma adecuada permite la extracción de un tejido dental específico con el objetivo de aumentar la tasa de éxito al realizar un análisis genético, además de permitir una identificación más rápida y eficiente.

REVISTA	TÍTULO	AÑO	AUTORES	OBJETIVOS	RESULTADOS
PLoS ONE	Analysis of Radiocarbon, Stable Isotopes and DNA in Teeth to Facilitate Identification of Unknown Decedents	2013	Alkass, Kanar Saitoh, Hisako Buchholz, Bruce A Bernard, Samuel Holmlund, Gunilla Senn, David R Spalding, Kirsty L Druid, Henrik	Saber el año de nacimiento, localización geográfica y sexo a través de los niveles de ¹⁴ C en los dientes. Ver también la variación de este isótopo a lo largo de la estructura dental, además de observar las variaciones según el continente.	De un solo diente se puede estimar el año de nacimiento, una idea sobre la localización geográfica y sexo. Los niveles de ¹³ C son más elevados en Norte América que en dientes de Europa y Asia.
Annals of Dental Specialty	Dental DNA Finger-printing in Identification of Humans Remains	2013	Mayall, Sandeep Singh Agarwal, Priyanka Vashisth, Pallavi	Analizar el uso del ADN para la identificación de individuos a través de los dientes, además de un repaso a la tecnología usada en los últimos años.	El conocimiento e importancia de la odontología forense es necesaria para identificar y documentar cualquier caso de herida o abuso para ayudar a la investigación. Una buena historia y documentación clínica puede ayudar en caso de desastres de masas. Los dientes por sus características únicas tienen una gran importancia en la identificación, además de ayudar en procesos legales.

REVISTA	TÍTULO	AÑO	AUTORES	OBJETIVOS	RESULTADOS
Annals of Dental Specialty	Dental DNA Finger-printing in Identification of Humans Remains	2013	Mayall, Sandeep Singh Agarwal, Priyanka Vashisth, Pallavi	Analizar el uso del ADN para la identificación de individuos a través de los dientes, además de un repaso a la tecnología usada en los últimos años.	El conocimiento e importancia de la odontología forense es necesaria para identificar y documentar cualquier caso de herida o abuso para ayudar a la investigación. Una buena historia y documentación clínica puede ayudar en caso de desastres de masas. Los dientes por sus características únicas tienen una gran importancia en la identificación, además de ayudar en procesos legales.
Journal of Clinical and Experimental Dentistry	Forensic dentistry in human identification: A review of the literature	2014	Ata-Ali, J. Ata-Ali, Fadi	Actualización sobre el rol de la odontología en la identificación en humanos.	Se realizó un análisis de la literatura durante los últimos 5 años previos a la publicación del artículo proporcionando una descripción de las novedades en estudios identificativos bucodentales, identificación reconstructiva (edad, rugoscopia, sexo...), mordeduras humanas y el rol del ADN en la identificación.

REVISTA	TÍTULO	AÑO	AUTORES	OBJETIVOS	RESULTADOS
Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences	Role of DNA profiling in forensic odontology	2015	Sakari, S. Leena Jimson, Sudha Masthan, K M K Jacobina, Jenita	Destacar la evolución en el aislamiento del ADN y las formas más sencillas de llevar a cabo la identificación a través de este medio.	Cuando los métodos tradicionales de identificación no son posibles por desastres o calamidades, los dientes por sus características proporcionan una fuente de ADN muy fiable y útil.
Forensic Science International	Forensic identification in teeth with caries	2015	Alia-García, Esther Parra-Pecharromán, David Sánchez-Díaz, Ana Mendez, Susy Royuela, Ana Gil-alberdi, Laura López-Palafox, Juan del Campo, Rosa	Estudiar y validar la utilidad de dientes con caries en una identificación a través del ADN.	En el estudio se concluyó que los dientes con caries son igual de válidos que los dientes sanos a la hora de identificar a un individuo. Además, se observó que la severidad de la caries y las bacterias cariógenas no influyen en el establecimiento de un perfil humano.

REVISTA	TÍTULO	AÑO	AUTORES	OBJETIVOS	RESULTADOS
Journal of Forensic Sciences	Nondestructive Methods for Recovery of Biological Material from Human Teeth for DNA Extraction	2015	Hervella, Montserrat Iñiguez, Maitane G. Izagirre, Neskuts Anta, Alberto De-la-Rúa, Concepción	Evaluar la efectividad de tres métodos no destructivos (perforación oclusal, perforación cervical y corte cervical) para la extracción del ADN en lugar del método más común de pulverización	Una vez obtenida la cuantificación del ADN se vio que el método más efectivo fue el corte cervical del diente para acceder a la cavidad pulpar y los canales radiculares. Este método permite la recuperación tanto de ADN nuclear como mitocondrial con un deterioro mínimo de los dientes.
International Commission for Missing Persons (ICMP)	Standard operating procedure for sampling bone and tooth specimens from human remains for DNA testing at the ICMP	2015		Guía con información sobre la selección y tratamiento de muestras de tejidos mineralizados de restos humanos.	Una buena selección, documentación y muestreo de restos humanos (huesos y dientes) facilitan los análisis de ADN para la identificación.

REVISTA	TÍTULO	AÑO	AUTORES	OBJETIVOS	RESULTADOS
Molecular Microbial Diagnostic Methods	DNA extraction: finding the most suitable method	2016	Barbosa, Cristina Nogueira, Sofia Gadanho, Mário Chaves, Sandra	En este trabajo se analizan cuatro métodos de extracción de ADN destacando sus características, mecanismos, ventajas y desventajas.	Dependiendo de los intereses que haya para la extracción del ADN un método u otro será más útil pero ninguno de ellos destaca.
Forensic Science International	Trial application of oxygen and carbon isotope analysis in tooth enamel for identification of past-war victims for discriminating between Japanese and US soldiers	2016	Someda, Hidetoshi Gakuhari, Takashi Akai, Junko Araki, Yoshiyuki Kodera, Tsutomu Tsumatori, Gentaro Kobayashi, Yasushi Matsunaga, Satoru Abe, Shinichi Hashimoto, Masatsugu Saito, Megumi Yoneda, Minoru Ishida, Hajime	Analizar la aplicación de isótopos de oxígeno y carbono en el esmalte para diferenciar entre soldados japoneses y estadounidenses de la segunda guerra mundial.	El análisis de isótopos estables de oxígeno y carbono puede ser un método efectivo de discriminación para restos de distintas regiones (Japón y EEUU) con una alta especificidad.

6. DISCUSIÓN

La presente discusión se llevará a cabo en varios apartados debido a que a los artículos revisados se centran en múltiples técnicas e ideas a la vez, pero muy pocos discuten en profundidad los conceptos que se desarrollarán en los próximos subapartados, además de algunos datos que pueden ser interesantes a tener en cuenta para la extracción del ADN.

Según la “International Commission on Missing Persons(ICMP)”¹⁰ dientes completos y bien conservados y con ápices formados se usarán siempre que sea posible, sin embargo la presencia de ápices radiculares completamente formados no es un requerimiento absoluto.

Los mejores dientes para trabajar en una posible identificación son el primer molar, segundo molar, tercer molar, primer o segundo premolar, canino e incisivo, en ese orden. En molares superiores se prefiere la raíz palatina debido a su amplitud, mientras que en molares inferiores se suele elegir la raíz distal por la misma raíz ¹¹

Si es posible, se evitarán los dientes que tengan deterioros como caries extensas y/o fracturas peri o postmortem. Si la calidad del diente se ha visto comprometida y es posible, se usarán dos dientes como muestra para la posible identificación.

Sin embargo, ya hay muchos estudios analizan la efectividad en la identificación que se realizan en piezas que están comprometidas como puede ser una afectación por la caries ¹², conductos obturados ¹³ o que son piezas antiguas, ya que son métodos más sencillos, relativamente más económicos, además de preservar la integridad de la pieza para estudios futuros. ²

6.1. MÉTODOS DESTRUCTIVOS VS MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS

El diente está formado por el esmalte, la dentina, el cemento y la pulpa. El ADN solamente se encuentra en los tejidos que contengan células y estos son la dentina, cemento y sobre todo la pulpa por ser un tejido blando y vascularizado. ¹¹

Los métodos más comunes y tradicionales de extracción del ADN implican una destrucción parcial o completa y total del diente, sin embargo, en los últimos años se está optando por métodos más conservadores que permiten en algunos casos repetir la prueba si fuera necesario a diferencia de los métodos tradicionales. ^{14,15}

También hay que tener en cuenta que el método usado para la extracción influye en la cantidad y la calidad del ADN que se obtiene, lo cual tiene una gran influencia a la hora de ampliar satisfactoriamente dicho ADN para la identificación del sujeto. Los métodos de extracción necesitan evitar tratamientos agresivos como altas temperaturas o uso de detergentes demasiado fuertes que pueden dañar aún más el ADN lo cual dificultará una identificación positiva.¹⁶ En caso de usar sierras o discos para cortar el diente es necesario que sea a baja temperatura y refrigeración constante con agua y aire para evitar el aumento de temperatura y la progresión de la degradación de ADN.

El aplastamiento completo o pulverización del diente es una técnica destructiva tradicional en la que el diente completo o solo su porción apical se rompe manual o automáticamente a través de trituradoras o molinos para extraer el ADN de las células o tejidos dentales. Las principales desventajas de pulverizar el diente es que produce gran cantidad de desechos pudiendo ser una fuente de contaminación, tiene mayor cantidad de inhibidores a la hora de amplificar el ADN y lo más importante es que se pierde o altera la pieza, imposibilitando un estudio posterior de la misma. Se necesita una completa documentación previa de la pieza con radiografías y fotografías desde todos los ángulos posibles.^{14,17} Otra desventaja es que no se contabiliza en que parte del diente se ha recogido la muestra para el estudio del ADN. También hay que tener en cuenta que a través del aplastamiento o pulverización se genera gran cantidad de calor contribuyendo a la degradación del ADN endógeno y la calidad del material disponible.¹⁶ Para solventar este problema diversos estudios proponen el uso de nitrógeno líquido mientras se destruye el diente convirtiéndolo en polvo³ para posteriormente solubilizarse e incubarse en una solución de proteinasa K, EDTA o ambas durante diversos intervalos de tiempo con el objetivo de eliminar los inhibidores de la PCR y poder amplificar el ADN. Con esta técnica de extracción puede conseguirse un rendimiento de ADN por gramo de polvo de diente de hasta 18.4 µg.^{17,3}

Algunos estudios también sugieren que solo cortar la raíz y pulverizar esta da prácticamente la misma efectividad a la hora de identificación ya que la cantidad de ADN suele ser más que suficiente para llevarse a cabo³. Incluso hay estudios en lo que se mira la efectividad a la hora de identificación entre la parte apical de la raíz y el resto de la misma, dando mejores resultados en la identificación la porción apical, por lo que hay varios autores que siguen este método. Hay que

decir que en estos estudios los autores tan solo han convertido en polvo las raíces de los dientes, manteniendo las coronas intactas.

El corte longitudinal, horizontal o a nivel apical del diente usando un disco o sierra muy finos para acceder a la cavidad pulpar que da acceso a las células de las que se va a extraer el ADN es otra de las técnicas tradicionales más usadas en estos casos. El objetivo es raspar (scraping) o taladrar el interior del diente para extraer células que contengan ADN. Este método presenta la principal ventaja de que es más conservador y facilita el acceso directo a las células de la pulpa, sin embargo, la eficacia en la recuperación del ADN según algunos autores puede ser menor dependiendo de la pieza y la localización, aunque tiene un rendimiento suficiente dado que últimamente se prefiere estos tipos de técnicas. Generalmente para acceder a la cámara pulpar se utiliza una fresa de carburo de tungsteno con refrigeración con agua destilada desde la parte incisal hasta que se llega a la cámara, y ya a partir de ahí generalmente se usa un cincel terminando de romper el diente con la finalidad de no generar mayor cantidad de calor que pueda afectar a la calidad del ADN. Dentro de esta categoría entraría también el método de extracción a través de la cavidad endodóncica, que en algunos estudios y según distintos autores ha demostrado tener un mayor rendimiento de ADN si se sabe exactamente cuáles son los marcadores o loci a identificar.³ Las desventajas que puede presentar el acceso endodóncico es que constantemente hay que usar refrigeración con agua y aire y requiere un conocimiento profundo de la morfología del diente y de la cavidad pulpar, además en sujetos ancianos la cámara pulpar va disminuyendo de tamaño por aposición de dentina con la edad.

Según otro estudio realizado por *Montserrat Hervella et al.* se realiza la comparación entre tres procedimientos conservadores (perforación oclusal, perforación cervical y corte cervical) se ha visto que el corte cervical da un mayor rendimiento del ADN a la hora de una identificación positiva.¹¹

En uno de los artículos revisados³ se menciona que la incubación completa del diente en EDTA y proteinasa K da buenos resultados, con unas proporciones de éxito entre el 90 y 70 por ciento en ADN nuclear y ADN mitocondrial. Sin embargo, no hay más estudios que hablen de este método, ya que los protocolos preferidos siguen siendo la pulverización del diente por dar casi siempre resultados positivos.

6.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EN PIEZAS ANTIGUAS

Desde el principio de la investigación del ADN, el problema que han tendido las muestras antiguas es que todo el ADN que les queda es poco y está en diversos estados de degradación. Además, no hay muchos datos sobre como la relación entre el tiempo y el ambiente afectan a la conservación o degradación del ADN, sobre todo porque tampoco hay estudios y no se sabe cómo funciona la degradación per se. Comprender el proceso de degradación o descomposición es importante no solo para identificar especímenes que contengan ADN, sino también para ver la correlación entre la longitud del fragmento de ADN y su número de copias para apoyar su autenticidad. Normalmente las técnicas de extracción usadas están diseñadas para muestras frescas y que aún tiene una estructura celular intacta o relativamente poco dañada.¹⁸

El ADN antiguo se caracteriza por falta de estructuras celulares, estar dañado de diversas formas y contener una gran cantidad de inhibidores de PCR que dificulta aún más la amplificación de dicho ADN¹⁹, sin embargo, a la vez la estructura dental es menos porosa lo cual ayuda a prevenir la contaminación exterior¹⁸

Según el artículo publicado por *E. Meyer et al.*¹⁹ el tamaño de un producto de amplificación se correlaciona de forma inversa con su eficacia en la PCR por lo que si se consigue un amplicón de más de 150 pares de bases de ADN es poco probable que ese ADN sea de origen arqueológico. También menciona que otra posibilidad para verificar la autenticidad de la antigüedad del ADN es ver el ratio entre la forma D/L del ácido aspártico y otros aminoácidos.

Para analizar piezas o muestras antiguas la mayoría de los autores están de acuerdo en que necesitan un proceso de descontaminación previo a través de distintos métodos (eliminación de la capa superficial dental, irradiación UV, lavado con agua destilada, diversos agentes desinfectantes usados en la práctica dental, etanol...no hay acuerdo entre autores sobre este apartado)

Un estudio realizado por *Yeşim Doğan Alakoç et al.* analizan la efectividad de utilizar un método no destructivo en 72 dientes procedentes de dos excavaciones arqueológicas (una del año 1000 y otra del año 100) accediendo a la cámara pulpar de forma ortógrada (como si fuera una endodoncia). Usando limas endodóncicas K fueron capaces de recolectar material para la posterior extracción de ADN consiguiendo una identificación positiva en 58 dientes (80.1 % tasa de éxito),

además fue posible restaurar el diente a su morfología original y lo más importante de todo es que se mantuvo la pieza dental completa.

La mayoría de los artículos están de acuerdo que, aunque haya veces que no es posible la identificación a través del ADN nuclear en piezas antiguas, en muchas ocasiones se produce una identificación positiva a través del ADN mitocondrial.

6.3. IDENTIFICACIÓN A TRAVÉS DEL ADN MITOCONDRIAL

La mayoría de los artículos consultados utilizan el ADN mitocondrial para la identificación de un sujeto cuando el ADN nuclear no se encuentra disponible o está extremadamente dañado.

El ADN mitocondrial tiene solo 13 genes en comparación con cerca de los 100000 en el ADN nuclear, además de tener un gran peso molecular que sobrevive durante periodos más prolongados¹⁷. Como ya se comentó en otro apartado de este trabajo se hereda completamente por parte materna lo cual tiene una implicación importante a la hora de identificar un individuo.

Las técnicas de extracción no varían con respecto a las comentadas anteriormente, tan solo los loci a identificar son diferentes.

En una investigación realizada por *Montserrat Hervella et al.*¹¹ para determinar qué tipo de acceso al diente se producía un mayor rendimiento de ADN tanto nuclear como mitocondrial, vieron que el ADN mitocondrial se encuentra con mayor abundancia a nivel del cuello del diente en la dentina, aunque es abundante a lo largo de todo el tejido dental útil para la identificación (pulpa, cemento y dentina).

Otro estudio¹⁸ encaminado a analizar el rendimiento del ADN mitocondrial en diferentes áreas del diente humano muestra la mayor cantidad de ADN mitocondrial se encontraría en el cemento del diente. Los autores del estudio se encargaron de separar los distintos tejidos que forman el diente y analizarlos por separado para ver cual producía un mayor rendimiento para el ADN mitocondrial y se vio que el cemento a nivel apical era el que destacaba con un peso molecular de hasta cuatro veces más que la dentina. Este mismo estudio formula una hipótesis en la que dicen que el cemento al tener células nucleadas inmersas en el tejido podrían tener también mayor cantidad de ADN nuclear dado que los odontoblastos de la pulpa y las prolongaciones

odontoblásticas se degradan más rápidamente que los cementocitos, sin embargo, los autores no pudieron experimentar dicha hipótesis.

Según *Denice Higgins et al.* el ADN mitocondrial es capaz de sobrevivir en dentina esclerótica y mineralizada según se va aposicionando causando la oclusión de los túbulos dentinarios y su posterior degeneración junto con el nervio asociado.³ Esta característica contribuye a la posterior identificación, aunque aún no se sabe cuáles son los mecanismos por los que ocurre estos procesos. Estos mismos autores mencionan que en otro estudio realizado anteriormente se demostró que la alta velocidad de fresas tiene un impacto negativo en la recuperación del ADN mitocondrial y se sugiere que el corte o la pulverización del diente se produzca a una velocidad baja para reducir la producción de calor evitando una mayor degeneración del ADN.³

7. CONCLUSIONES

1. Se ha realizado una revisión bibliográfica analizando 19 artículos referidos a los métodos de extracción de ADN procedente de dientes.
2. En cuanto a métodos destructivos o no destructivos no hay consenso absoluto dado que la identificación se consigue con ambas técnicas.
3. En caso de extracción de ADN de piezas antiguas son más frecuentes las técnicas destructivas por efectividad, coste y tiempo, aunque las técnicas conservadoras se están imponiendo.
4. El ADN mitocondrial se usa cuando no es posible realizar un análisis de ADN convencional dado que produce una identificación positiva bajo condiciones extremas de conservación de los dientes.
5. Las técnicas de extracción del ADN mitocondrial no varían con las técnicas empleadas para el ADN nuclear.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Mayall SS, Agarwal P, Vashisth P. Dental DNA Finger-printing in Identification of Humans Remains. *Ann Dent Spec.* 2013;1(1):16–9.
2. Manjunath BC, Chandrashekar BR, Mahesh M, Vatchala Rani RM. DNA Profiling and forensic dentistry – A review of the recent concepts and trends. *J Forensic Leg Med.* 2011 Jul;18(5):191–7.
3. Higgins D, Austin JJ. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Sci Justice.* 2013 Dec;53(4):433–41.
4. Alkass K, Saitoh H, Buchholz BA, Bernard S, Holmlund G, Senn DR, et al. Analysis of Radiocarbon, Stable Isotopes and DNA in Teeth to Facilitate Identification of Unknown Decedents. *Konigsberg L, editor. PLoS One.* 2013 Jul 29;8(7):e69597.
5. Someda H, Gakuhari T, Akai J, Araki Y, Kodera T, Tsumatori G, et al. Trial application of oxygen and carbon isotope analysis in tooth enamel for identification of past-war victims for discriminating between Japanese and US soldiers. *Forensic Sci Int.* 2016 Apr;261:166.e1-166.e5.
6. Sakari SI, Jimson S, Masthan KMK, Jacobina J. Role of DNA profiling in forensic odontology. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015 Apr;7(5):140.
7. Datta P, Datta S. Role of deoxyribonucleic acid technology in forensic dentistry. *J Forensic Dent Sci.* 2012 Jan;4(1):42.
8. Kemp BM, Smith DG. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int.* 2005 Nov;154(1):53–61.
9. Barbosa C, Nogueira S, Gadanho M, Chaves S. DNA extraction: finding the most suitable method. *Molecular Microbial Diagnostic Methods.* Elsevier Inc.; 2016. 135-154 p.
10. Standard operating procedure for sampling bone and tooth specimens from human remains for DNA testing at the ICMP. *Int Comm Missing Pers.* 2015;

11. Hervella M, Iñiguez MG, Izagirre N, Anta A, De-la-Rúa C. Nondestructive Methods for Recovery of Biological Material from Human Teeth for DNA Extraction. *J Forensic Sci.* 2015 Jan;60(1):136–41.
12. Alia-García E, Parra-Pecharromán D, Sánchez-Díaz A, Mendez S, Royuela A, Gil-Alberdi L, et al. Forensic identification in teeth with caries. *Forensic Sci Int.* 2015 Dec;257:236–41.
13. Ata-Ali J, Ata-Ali F. Forensic dentistry in human identification: A review of the literature. *J Clin Exp Dent.* 2014;6(2):e162-7.
14. Hughes-Stamm S, Warnke F, van Daal A. An alternate method for extracting DNA from environmentally challenged teeth for improved DNA analysis. *Leg Med.* 2016 Jan;18:31–6.
15. Pinchi V, Torricelli F, Nutini AL, Conti M, Iozzi S, Norelli G. Techniques of dental DNA extraction: Some operative experiences. *Forensic Sci Int.* 2011 Jan;204(1–3):111–4.
16. Zupanič Pajnič I, Debska M, Gornjak Pogorelc B, Vodopivec Mohorčič K, Balažic J, Zupanc T, et al. Highly efficient automated extraction of DNA from old and contemporary skeletal remains. *J Forensic Leg Med.* 2016 Jan;37:78–86.
17. Muruganandhan J, Sivakumar G. Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry. *J Forensic Dent Sci.* 2011 Jan;3(1):38.
18. Adler CJ, Haak W, Donlon D, Cooper A. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *J Archaeol Sci.* 2011 May;38(5):956–64.
19. Meyer E, Wiese M, Bruchhaus H, Claussen M, Klein A. Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. *Forensic Sci Int.* 2000 Sep 11;113(1–3):87–90.