



**VARIACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL EN
DIENTES BOVINOS INMERSOS EN EL MAR. ESTUDIO
EXPERIMENTAL**

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnos: Hana Molina Khouzam.
Yamila Oliva Díaz.

Docente Guía: Prof. Dr. Jaime Barraza Mesquida.
Cátedra de Salud Pública.

Valparaíso – Chile
2019

Dedicatorias

Quisiera agradecer en primer lugar a Dios, por ponerme a la gente precisa en el momento indicado, por darme una familia dispuesta a ayudarme en la búsqueda y realización de mis sueños. A mi madre Hana Khouzam por dedicar su vida a la mía, enseñarme lo que es lograr los objetivos con el rigor de la dedicación, por brindarme su sabiduría y abnegación con todo lo que esa palabra significa. Lograste enseñarme a través del ejemplo, ya que pude ver cómo alcanzaste todas tus metas, incluso con las mayores dificultades que la vida te presentó. Gracias mamá. A mi padre Julio Molina, por entregarme una mirada de tranquilidad en los momentos difíciles, por su pureza de alma y espíritu que casi no se ve en estos tiempos y que ayuda a aclarar el camino en momentos de tempestad. A mi hermano Julio Molina Khouzam, uno de los pilares fundamentales en mi vida, sin ti no estaría acá hermano, porque tú me levantaste cuando pensé que no podría siquiera empezar este camino, me tomaste de la mano y caminaste junto a mi durante todo este trayecto, gracias por estar conmigo en mi momento más difícil y crítico, gracias por haberme guiado como un padre y por corresponderme tu amor desinteresadamente mediante la preocupación y dedicación que me entregaste y me sigues entregando.

Agradezco a los abuelos que Dios me dio, Rudith y Patricio, por siempre estar pendiente de cómo me encontraba mediante una llamada telefónica, por rezar todas las noches por mi integridad y porque lograra pasar mis ramos. Tata, desde el cielo te dedico esto a ti también.

A mi pololo Giampaolo, gracias por acompañarme en la mayor parte de este camino, por estar a mi lado en los momentos en que me veía sobrepasada, mirar desde primera fila mis triunfos y caídas, y aun así, nunca dejar de creer en mí, y por seguir haciéndolo, incluso en ocasiones más que yo misma. Tu paciencia, entrega y madurez lograron penetrar este a veces duro caparazón y con ello facilitar mi camino, con la adición de un ingrediente que me ayudó a que aquellos días grises se vieran más iluminados.

A mi gran amiga Carolina Bravo, cuya amistad se generó desde los inicios de nuestra vida. A pesar de que la distancia no siempre nos permite estar juntas, nunca he dejado de sentirte en mi vida. Difícilmente olvidaré esa llamada telefónica que te hice en mis primeros días de universidad y lejos de mi casa, y como lograste invadir mi espacio con tu calidez. Pocas personas me conocen en todas mis facetas, y una de esas eres tú, gracias por formar parte de mi vida.

Y finalmente, quiero agradecer a dos grandes amigas que logré hacer durante mi etapa en la universidad. Le doy gracias a la vida por ponerlas en mi camino, Yamila y Fernanda. Si hay algo que puedo asegurar, es que de estos largos años en la universidad salí con esta hermosa amistad que espero continúe por toda la vida. Yami, lo logramos! y Fer, te esperamos, pronto será tu turno querida amiga.

Hana Molina Khouzam

Dedico esta tesis a mi familia por su apoyo incondicional durante mi proceso de formación, por esos momentos que dudamos y sufrimos, por confiar en mí a pesar de la adversidad, ya que sé que muchas veces lo pasamos mal, pero eso jamás impidió que no nos mantuviéramos unidos. A mi madre Irma, gracias por luchar por mí desde pequeña y enseñarme los valores que hoy orgullosamente me hacen ser mejor persona, gracias por ser madre y padre para mí, y por confiar ciegamente en mi logro profesional, y gracias por dejar tus necesidades de lado, por conseguir lo que hoy celebramos, ya que este título es también tuyo. Como no recordar a mi padre que, aunque no esté presente ayudo a cumplir mi sueño, sé que estarías muy orgullo. A mi hermano Andrés, tía Inés, hermanas Macarena y Jimena, y sus respectivas familias, de los cuales estaré eternamente agradecida por sacrificarse por mí y acompañarme en mi vida para lograr mis objetivos. Gracias por ser mi familia y por hacerme sentir inmensamente amada.

A mi pololo Cristian quien me alentó a seguir adelante cada vez que vacile de mis capacidades y quien con simples detalles me llenaba de fuerza de seguir luchando. Gracias por sólo confiar en mí y nunca dudar de mis aptitudes como futura profesional, porque gracias a ti hoy puedo escribir estas palabras ya que en ningún momento dudaste en ayudarme a cumplir con ese ramo que me tenía mal, gracias por estar conmigo.

A mis amigas del Sur y del Norte que con una palabra de aliento lograron subirme el ánimo muchas veces, quienes me ayudaron a superar conflictos durante estos años de estudio ya que a veces una llamada, una visita o un mensaje crean una sonrisa. A mi amiga gran amiga y apoyo Ivanisa, siempre estaré agradecida con el destino de juntar nuestros caminos, por esas noches en vela, por esas comidas, las risas y las penas, por simplemente estar conmigo y ser mi amiga. Te debo mucho y fuiste un pilar fundamental de apoyo para lograr este momento tan esperado para ambas, tú ya lo conseguiste y ahora yo también. Por último, a Hana quien me sorprendió lo bien que nos complementamos en la realización de este proyecto, a la cual, supe conocer y entender durante este año que trabajamos arduamente. Gracias por esos momentos que sufrimos juntas, que nos enojamos, que nos reímos y que celebramos. Trabajar contigo fue un agrado y estoy muy feliz de haber realizado esta tesis junto a ti ya que no solo gane una gran compañera sino una amiga.

Gracias a todos por ser parte de este sueño...
Yamila Oliva Díaz

Agradecimientos

Realizar esta tesis ha sido uno de los mayores desafíos que hemos debido enfrentar como estudiantes de pregrado, ya que elegir un tema poco aceptado por el estudiantado y con una especialidad que no es conocida, como lo es la Odontología Legal y Forense, hace que la tarea de seguir adelante sea cada vez más difícil. Por ende, todo se lo debemos a nuestro docente guía el Dr. Jaime Barraza Mesquida, quien fue el encargado de mostrarnos la Especialidad desde una mirada más detallada, además, quien nos motivó a seguir el camino de la investigación y quien nos dio las herramientas para formar esta tesis, la cual construimos con esmero y pasión. Jamás creímos soñar con realizar un proyecto de investigación y que independiente de las dificultades, disfrutamos cada minuto su realización, y que sin la ayuda de nuestro profesor nada hubiese resultado. Agradecemos las horas de tiempo que nos otorgó para juntarse con nosotras y resolver nuestras dudas, la paciencia y su vocación como docente para enseñarnos su mundo, en la Tanatología, el compromiso con sus estudiantes para llevar a buen puerto la finalización de este proyecto y, como no agradecer el cariño que nos brindó con sus palabras, sus consejos, su apoyo, su capacidad de observación al fijarse en esos detalles tan mínimos e imperceptibles para otra persona, pero tan claros para él. Gracias Doctor Barraza por aceptar ser nuestro docente y por enseñarnos todo lo que ahora amamos, porque muy pocos alumnos pueden realmente estar orgullosos del trabajo que realizamos en conjunto y del gran proyecto que ahora vamos a presentar.

Queremos Agradecer a uno de los pilares fundamentales para la realización de este proyecto, a nuestro querido Profesor Dr. Mario Párraga San Román, quien desde el primer día nos recibió con los brazos abiertos y una sonrisa en su rostro, jamás nos había visto, pero no dudó en ayudarnos y en dejar a nuestra disposición su tiempo para enseñarnos desde cero, desde el uso de una pipeta hasta obtener ADN. Sabemos que el destino nos juntó de alguna manera para que usted fuera también nuestro docente guía. Estamos muy agradecidas por su compromiso para con nosotras y la Odontología, ya que su trabajo es la base de la investigación. Además, fue nuestro buzo estrella ya que fue a dejar las muestras en el mar y también fue el encargado de darnos la lamentable noticia de que una muestra se la había devorado un lobo marino. Nunca pensamos que un animal se comería nuestra tesis (llega a sonar tragicómico). Por todo ello, queremos darle las gracias, por ser parte de este proyecto, por aceptarnos y darnos cobijo en su lugar de trabajo todos estos largos meses, por guiarnos, enseñarnos y mostrarnos el mundo de las ciencias a través del PCR y la Electroforesis, técnicas que jamás pensamos realizar en nuestra carrera ni en nuestra vida y que gracias a usted tuvimos el privilegio de aprender.

Los proyectos no son individuales siempre hay un equipo de trabajo detrás y esta no es la excepción, por lo que queremos dar las gracias al Laboratorio de Ciencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, quienes nos brindaron sus instalaciones y materiales para la realización del proyecto. Al

personal que tuvo la buena voluntad de acompañarnos, enseñarnos y colaborar con nosotras especialmente a la Docente Camila escobar quien nos facilitó su tiempo y disposición para enseñarnos y ayudarnos en la realización de esta tesis.

Queremos Agradecer al Centro de Buceo Pichidangui, quienes sin ningún interés particular y de forma desinteresada quisieron ser parte de este proyecto. Nos apoyaron en la realización principal de la investigación, poniendo a nuestra disposición sus instalaciones, tiempo, trabajo y materiales. Estamos muy agradecidas por la colaboración y por el profesionalismo que demostraron en este estudio, principalmente por el manejo de las muestras (Anexo 1, Figura I).

El Matadero Frigorífico la Calera fue el único que nos dijo que si al momento de solicitar colaboración para otorgarnos las muestras, sin pedir nada a cambio, después que nos negaran la ayuda en otros mataderos de la región. Ellos quisieron colaborar y formar parte de este equipo y nos facilitaron las instalaciones y el personal, y quienes nos ayudaron a preparar las muestras finales. Por ende, queremos darle las gracias por su ayuda desinteresada y por la buena voluntad en la participación en este proyecto.

Por último, queremos agradecer a los docentes que de alguna manera participaron en la elaboración de este proyecto de tesis. Al Dr. Wilfredo González, quien en un día y sin sospechar, reflexionó una idea que ahora es el objetivo principal de nuestra tesis. Al Dr. Ricardo Moreno, quien nos facilitó la tarea para realizar esta tesis al proponernos darle un giro hacia la utilización de dientes de bovino. Finalmente, al Dr. Issac García, quien aceptó generosa y desinteresadamente ser nuestro profesor informante, ayudándonos a corregir y presentar un proyecto de tesis completo para los docentes, estudiantes y los interesados en esta investigación.

A todos ustedes, muchas gracias.

Hana Molina Khouzam y Yamila Oliva Díaz.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	3
2.1 Odontología Forense.....	3
2.1.1 Generalidades.....	3
2.1.2 Descomposición de un cuerpo en el Mar.....	3
2.1.2.1 Profundidad en metros en el Mar.....	4
2.1.2.2 Tiempo en días en el mar.....	5
2.2 Ácido Desoxirribonucleico.....	6
2.2.1 Generalidades.....	6
2.2.2 Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial.....	7
2.3 Reacción en cadena de la Polimerasa	8
2.3.1 Generalidades.....	8
2.3.2 Electroforesis.....	9
2.4 Dientes Humanos.....	10
2.4.1 Generalidades.....	10
2.4.2 Pulpa Dental.....	10
2.5 Dientes de Bovino.....	10
2.5.1 Generalidades.....	10
2.5.2 Diferencias y Similitudes con dientes humanos.....	11
3. Objetivos	14
4. Pregunta de investigación.....	14
5. Hipótesis	14
6. Materiales y Métodos.....	15
6.1 Tipo de Estudio	15
6.2 Universo	15
6.3 Criterios de Inclusión y Exclusión de Bovinos.....	15
6.4 Criterios de Inclusión y Exclusión de las muestras.....	16
6.5 Muestras.....	16
6.5.1 Aprobación del estudio y carta autorización.....	16
6.5.2 Tamaño Muestral.....	16
6.5.3 Forma de Selección.....	17
6.5.4 Unidad de estudio	17
6.6 Definición de las variables a estudiar.....	17
6.6.1 Variable Dependiente	17
6.6.2 Variables Independiente	17
6.7 Proceso de Recolección y Procesamiento de la información.....	18
6.8 Cortes, Análisis de ADN, Fluorimetría, Electroforesis y PCR.....	21
6.8.1 Cortes de las muestras.....	21
6.8.2 Análisis de ADN.....	21
6.8.3 Fluorimetría.....	22
6.8.4 Electroforesis.....	22
6.8.5 PCR.....	23
6.9 Determinación de la Calidad del ADN Mitocondrial.....	24
7. Resultados.....	26

7.1 Cuantificación del ADN inicial.....	26
7.2 Resultados Electroforesis	29
7.3 Resultados PCR.....	31
8. Discusión.....	35
9. Conclusión	37
10. Sugerencias.....	38
11. Resumen	39
12. Referencias	41
13. Anexos1, 2 y 3	

1. Introducción

En la actualidad existen viajes aéreos, marítimos, cruceros de placer, exploraciones científicas en el mar, etc. que conllevan a que masivamente los seres humanos estén expuestos a situaciones de accidentes y/o catástrofes naturales. Los desastres masivos, corresponden a un fenómeno que ocurre de manera natural en todo el mundo, entre ellos, los tsunamis son uno de los más devastadores, dejando un alto número de fallecidos. Uno de los más importantes fue el ocurrido en Indonesia el 2004 con 230.000 personas fallecidas. Sin embargo, el terremoto y tsunami más destructivo a nivel mundial fue el ocurrido en Valdivia en 1960, con una intensidad de 9,5 en escala Richter y con un estimado de 10.000 muertos.¹

En el actual mundo globalizado, la información proporcionada por la Odontología Forense representa un tópico relevante en diferentes investigaciones, aportando información significativa que contribuye a su esclarecimiento.² Se ha utilizado a la medicina como una herramienta de reconocimiento, sin embargo, existen situaciones en las que la identificación mediante huella dactilar o reconocimiento facial son imposibles de ser utilizadas, entonces surge la interrogante *¿Qué hacer cuando no se puede identificar un cadáver mediante métodos convencionales?* En estos casos los investigadores confían en el análisis molecular. La información del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) ofrece el potencial para establecer el reconocimiento de una persona a partir de restos humanos.

El establecimiento de la identidad utilizando las características individuales de los dientes, se remonta a la antigua Roma. A través de la historia, se han reportado diferentes casos donde aspectos inherentes a los tejidos de la cavidad oral han jugado un rol preponderante en una identificación categórica.²

A pesar de existir distintos métodos en Odontología Forense, la utilización de ADN es el método más fiable y preciso en identificación humana, entonces surgen las preguntas: *¿Por qué no se utiliza este método en un país con alta siniestralidad?,* y *¿Por qué utilizar el ADN mitocondrial?* En casos de accidentes donde ocurre fragmentación extrema, los investigadores frecuentemente confían en el análisis molecular. La información del ADN ofrece el potencial para establecer el reconocimiento de la persona a partir de restos y contribuir a la identificación positiva, más aún, el uso de ADN mitocondrial que entrega información por la vía de linaje materno. Su beneficioso uso está en el alto número de copias y la herencia materna del ADN mitocondrial (ADNmt), así como su amplia caracterización en las poblaciones humanas en todo el mundo, lo que lo convierte en una herramienta de análisis extremadamente útil para la identificación de las muestras degradadas.³

Los resultados obtenidos en un estudio publicado en Croacia en 2003 dieron evidencia de que el diente y los tejidos que lo componen se pueden utilizar como una fuente de ADN, a pesar de haber sido sometido a la putrefacción; Y que tejidos

dentales, contienen suficiente ADN para permitir la amplificación del ADN mitocondrial, que se puede utilizar en la identificación humana. ⁴ Sin embargo, cada vez es más difícil obtener un número suficiente de dientes humanos en buen estado para crear muestras homogéneas. Por esta razón, los sustratos derivados de otras especies se han propuesto como alternativas.⁵

Los dientes de bovino con respecto a los dientes humanos presentan muchas ventajas para su uso como sustituto de dientes de personas para la investigación. Entre estas ventajas se encuentran que al ser dientes de mayor tamaño hacen que su manipulación y obtención sean más fáciles, además su similitud tanto macroscópicamente como microscópicamente con los dientes de un individuo. ⁶

El empleo de dientes dispuestos individualmente en el mar no se asemejaría totalmente a las condiciones en las que se encontraría un resto humano que ha sido afectado según la magnitud del accidente o catástrofe, siendo esta de tal proporción que el cuerpo frente al impacto podría sufrir desmembramiento parcial o total. Durante el proceso de búsqueda de cadáveres, al personal encargado se le hará más factible visualizar fragmentos óseos de mayor dimensión que un diente suelto en el mar, por sus extensas características oceanográficas.

Siguiendo esta lógica, es que buscamos reproducir al máximo estas condiciones y situaciones en la que se desarrollaría un desastre con inmersión en el mar, es por ello, que se sumergirá mandíbulas de bovino, con la finalidad de imitar el estado de un diente dentro de su alveolo, protegido tanto por la tabla vestibular como lingual, lo que ofrece un ambiente más cercano a la realidad, que es encontrar parte de un maxilar - y no dientes solitarios- en las profundidades del mar.

2. Marco Teórico

2.1 Odontología Forense

2.1.1 Generalidades

La Odontología Forense es la rama de la Odontología que trata el manejo correcto, seguido por el examen, evaluación y presentación de pruebas dentales para un procedimiento judicial penal o civil, en interés de la justicia. Los dientes humanos se han considerado como una excelente elección para determinar la identidad de un individuo.⁷

Definida como una especialidad que, apartándose de la terapéutica, forma un lazo de unión entre la Odontología y el derecho, en lo que respecta al cumplimiento de las leyes, la aplicación de sus conocimientos Odontológicos al servicio de la justicia, al recoger indicios y evidencias en la escena del crimen, aplicando métodos para identificación humana en la víctima o en los presuntos autores del hecho. Los indicios y evidencias al ser trasladados y estudiados en laboratorios especializados permiten la emisión del informe o peritaje.⁸

La cavidad bucal es considerada, por sus numerosas estructuras, duras y blandas, como la "caja negra" del cuerpo humano. Las estructuras duras como dientes y huesos maxilares aportan gran información para el proceso de identificación, siendo no menos importante los tejidos blandos, como el paladar y los labios, pues contribuyen con datos interesantes al dejar marcas, surcos, estrías y rugosidades, que cumplen con las propiedades de los métodos de inmutabilidad y perennidad.⁸

2.1.2 Descomposición de un cuerpo en el mar.

La importancia de conocer el tiempo de descomposición que sufre un cuerpo al estar en contacto con el agua marina tras un desastre masivo es importante para determinar la posibilidad de obtener ADN a partir de los tejidos del cuerpo y facilitar su reconocimiento frente a las condiciones que presenta el mar, tanto si se ve influenciada por la profundidad, tiempo y sus factores locales propios (como temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, densidad, conductividad y presión) que puedan facilitar la descomposición.

Estudios iniciales de descomposición de cadáveres en el agua de mar realizado con cadáveres de ballenas, mostraron que estos en el fondo marino pasan por tres etapas de descomposición durante un largo período de tiempo. La "*fase de carroñeros móviles*", donde grandes cantidades de carroñeros vertebrados e invertebrados eliminan la mayoría de los tejidos blandos dentro de los cuatro a dieciocho meses de la muerte. La "*etapa de enriquecimiento de oportunistas*", que ocurre desde aproximadamente cuatro meses hasta un año y medio. Finalmente, la etapa "*sulfofílica*" que se caracteriza por una gran diversidad de microbios anaeróbicos que se alimentan del esqueleto restante durante décadas.⁹ Estos

microorganismos pueden ser responsables de la contaminación microbiológica que puede sufrir el material genético, lo que además suele estar favorecido por la humedad.

Volviendo a las etapas de putrefacción, otros estudios usaron cadáveres de cerdos sumergidos en el mar, observando un primer periodo de solo unas horas, en el que la putrefacción compromete la desaparición de mitocondrias y la fragmentación de la reticulina. Tras este, un segundo periodo correspondiente a los 3 o 4 días post mortem en que hay afectación celular sin comprometer al núcleo, mientras que cuando la autólisis afecta al núcleo se va fraguando la desaparición de morfología celular. Este periodo tiene una duración de más de 4 días. En este mismo estudio, se observó que luego de 30 días los cerdos sumergidos en el mar habían sido esqueletizados por la actividad de alimentación constante de los camarones y cangrejos.¹⁰⁻¹² Es decir, en poco tiempo bajo el mar, se puede llegar a perder el componente “blando”, lo que entregaría la posibilidad de extraer ADN en cantidad y calidad suficiente. De esta manera quedaría solo la posibilidad de extraer material genético desde los huesos y/o dientes.

2.1.2.1 Profundidad en metros en el Mar

Bajo el mar existen diferentes concentraciones de oxígeno dependiendo de la profundidad a la que nos encontremos. Mientras mayor sea esta, los niveles de oxígeno van disminuyendo, lo que provoca que los animales marinos no sean atraídos al lugar, siendo incapaces de penetrar para llegar a los órganos o tejidos internos. En general, la mayoría de los crustáceos no toleran la hipoxia grave, por lo tanto, muestras que se encuentran a menor profundidad deberían sufrir mayor degradación de tejidos blandos producto de los animales ahí presentes. Los experimentos de campo también mostraron que los crustáceos y mariscos preferían permanecer en aguas más oxigenadas para digerir los restos blandos del cerdo.¹⁰ Esto lo podemos homologar con el ser humano, ya que se considera que la piel humana es similar a la piel de cerdo, tanto física como fisiológicamente hablando, por lo que podría esperarse que reaccione de manera similar a este tipo de resultados.

Se ha demostrado que los cuerpos perdidos en el mar pueden ser fácilmente transportados desde el lugar de deposición por corrientes o mareas¹¹. Los estudios actuales también han demostrado que la actividad faunística por sí sola puede mover un cuerpo y desarticular las extremidades con bastante rapidez.¹⁰ Por ende, se determinó a partir de esto dos profundidades que serán estudiadas, 5 metros y 20 metros. La primera se relaciona con lo que le pasaría a un cadáver o restos de cadáver dispuestos en el mar, que irán pasando por un proceso de putrefacción, lo que llevará a la formación de gases por reacciones químicas como la digestión y descomposición, esto evita que se vayan al fondo del mar en un primer momento. Bajo este escenario, los crustáceos y mariscos que viven en condiciones de oxígeno van a digerir los restos blandos, quedando en una fase inicial los restos óseos a estas profundidades¹⁰, lo que explicaría determinar la profundidad de 5 metros.

Por otro lado, están las limitantes a las que se encuentran los buzos, a medida que se desciende aparecen los barotraumas. La exposición a cambios de presión atmosférica pueden ocasionar en el ser humano diversas enfermedades.¹³ De acuerdo con lo comunicado en la literatura, la enfermedad más común corresponde al barotrauma ótico, que se caracteriza básicamente por la incapacidad de la trompa de Eustaquio para igualar rápidamente la presión intraótica con la presión ambiental durante el buceo al efectuar la inmersión o el ascenso.¹³ Existe evidencia de que a contar de los 25 metros de profundidad, pueden comenzar a instalarse patologías relacionadas con la inmersión al mar, como el caso expuesto en el artículo de Río Vázquez 2003.¹⁴ Por esta razón se determina la profundidad de 20 metros para el estudio.

2.1.2.2 Tiempo en días en el Mar.

Existen diversos estudios en que se han sometido a dientes a distintas condiciones. En uno de ellos, se sumergieron dientes en un recipiente con agua salada. Comprobaron que la cantidad de ADN obtenido disminuyó con el tiempo al aumentar el periodo de tiempo en que los dientes estaban expuestos al agua salada, siendo los resultados a los 30 días de 25.285 µg/ml, a los 60 días de 21,73 µg/ml y a los 90 días de 16.095 µg/ml¹⁵. Sin embargo, de igual forma pudieron amplificar secuencias de ADN mediante PCR en dientes sumergidos en agua salada durante 4 semanas (a los 60 y 90 días, no se especificó). Esto sugiere que la condición húmeda de agua salada no causa la degradación autolítica o decaimiento del contenido de ADN en el interior de los dientes.¹⁶ A pesar de estos datos, no se encontraron estudios en que los dientes estén sumergidos directamente en el mar, siendo lo más cercano este reciente estudio, en que se buscó asemejar las condiciones salinas del mar, pero no sus condiciones ambientales.

En el anterior estudio citado, en que se sumergió cuerpos de cerdos en las profundidades del mar, se pudo observar descomposición de tejido blando en los periodos estudiados que corresponden a 46, 33 y 35 días. Por lo tanto, bajo esta premisa, se usarán dos periodos de tiempo, correspondientes a 33 y 60 días, para de esta forma asemejar las condiciones normales en que el tejido óseo es separado del tejido blando que lo protege, lo que nos permitiría estudiar tejido óseo (dientes) cuando ya no tenemos otra fuente de obtención de ADN.¹⁵ Por lo que, tomando como base un estudio en que se sumergieron cerdos al mar, se observó que luego de 30 días estos cuerpos fueron esqueletizados por la actividad de alimentación constante de los camarones y cangrejos. De esta manera al quedar solo restos óseos, la única posibilidad de identificación se enfoca en extraer material genético desde los huesos y/o dientes.

2.2 Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

2.2.1 Generalidades

La secuenciación del ADN significa determinar el orden de los cuatro componentes básicos químicos, llamados "bases", que forman la molécula de ADN. La secuencia les informa a los científicos la clase de información genética que se transporta en un segmento específico de ADN.¹⁷

En la doble hélice de ADN, las cuatro bases químicas se unen siempre con la misma pareja para formar "pares de bases". Adenina (A) siempre forma pareja con timina (T); citosina (C) siempre forma pareja con guanina (G). Este emparejamiento es la base para el mecanismo mediante el que las moléculas de ADN se copian cuando las células se dividen, y también es la base para los métodos usados en la mayoría de los experimentos de secuenciación de ADN. El genoma humano contiene alrededor de tres mil millones de pares de bases que detallan las instrucciones para crear y mantener a un ser humano.¹⁷

En la última década del siglo XX, se crearon sondas moleculares radiactivas para identificar regiones altamente variables de ADN, y se estableció que hay patrones específicos de cada individuo. Estos fueron nombrados como huellas de ADN.¹⁸ En los casos de paternidad y de identificación humana, las pruebas de perfil de ADN son totalmente fiables, y se aceptan como pruebas legales en los tribunales. En el caso de cualquier incidente de víctimas en masa, el ADN juega un papel vital en la identificación de las personas. El ADN se puede obtener a partir de todos los tejidos del cuerpo humano; los huesos y dientes califican como mejores fuentes de ADN de restos humanos descompuestos.¹⁹

Los dientes adquieren especial importancia cuando se trata de identificar restos de larga data o calcinados, lo que hace imposible obtener ADN de ellos.⁴ Lo mismo ocurre cuando se intentan identificar restos que han estado sumergidos por largo tiempo.²⁰ Por lo tanto, los dientes tienen información genética, lo que la convierte en la primera opción para la extracción de ADN para fines de identificación forense.

Los resultados de un estudio de Malaver P. Yunis J. mostraron que las muestras de pulpa dieron la señal más fuerte de amplificación. En cuanto a la dentina y el cemento, algunas muestras dieron señales más fuertes de la dentina, mientras que otros dieron la señal más fuerte del cemento. Los resultados obtenidos en este estudio dieron evidencia de que el diente y los tejidos que lo componen se pueden utilizar como una fuente de ADN, a pesar de haber sido sometido a la putrefacción; Y que tejidos dentales, contienen suficiente ADN para permitir la amplificación del ADN mitocondrial, que se puede utilizar en la identificación humana.⁴

El ADN obtenido a partir de muestras de dientes produce cantidades

suficientes de material genético útil para el análisis basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Hay varias condiciones ambientales forenses extremas que un cuerpo humano podría encontrar en destrucciones masivas. Por lo tanto, es de suma importancia estudiar los efectos de condiciones extremas en restos humanos.¹⁵

2.2.2 Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial

El ADN mitocondrial corresponde a un pequeño cromosoma dispuesto de manera circular, ubicado en la mitocondria y que solo se hereda de la madre. A diferencia del ADN nuclear, que está presente en dos copias en la célula y tiende a degradarse con el tiempo. El ADN mitocondrial ofrece una alternativa dado que está presente en múltiples copias en las mitocondrias habiendo muchas mitocondrias en cada célula. Por tanto, la cantidad de copias de ADN mitocondrial por célula es mucho mayor que la de las copias de ADN nuclear.²¹ Durante mucho tiempo se han hecho estudios de microsatélites mitocondriales en muestras forenses debido a su naturaleza polimórfica, por lo tanto, el uso de ADN mitocondrial se ha defendido, ya que posee un alto número de copias, la herencia materna, y el alto grado de variabilidad de la secuencia entre individuos.^{22,23} Por otra parte, en las investigaciones que involucran personas desaparecidas, se puede comparar el ADN mitocondrial del perfil de identificación de restos humanos con el perfil de un pariente potencialmente materno.²⁴

Tres regiones de ADN mitocondrial humano-específicos se amplificaron mediante ensayos de qPCR singleplex, donde solo se amplifica una sola secuencia en un tubo de reacción siendo más fácil y rápido de optimizar, para proporcionar un índice de la degradación del ADN para muestras modernas, degradadas o antiguas. Los ensayos desarrollados mostraron un ser humano específico, sensible teniendo un límite de detección (LOD) de 10 copias, exacta (dentro del 10% de error relativo, para la mayoría de diluciones diana) y preciso (dentro de $\pm 10\%$ a 95% de confianza, para la mayoría de diluciones diana). Estos ensayos proporcionan información muy valiosa sobre la cantidad y la calidad de ADN mitocondrial humano dentro de una muestra.²⁴ En otro estudio llevado a cabo por Kholief et al., se comprobó que es posible obtener ADN en cantidad suficiente para poder llevar a cabo la amplificación de regiones específicas de ciertos genes, independientemente de que el diente presente o no caries.²⁵

Por lo tanto, a partir de esta información, podemos afirmar que el uso de ADN mitocondrial, es valioso en la práctica de identificación humana, ya que a partir de este podemos obtener información de linaje materno. Esto es relevante en la medida en que, si analizamos el ADN de un diente de cadáver y lo comparamos con un examen de sangre de la madre, hermana o abuela, podremos saber si corresponde al hijo/a, hermano/a o nieto/a de manera efectiva.

2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

2.3.1 Generalidades

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consiste en copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines.²⁶

Cuando hacemos una reacción de PCR simulamos lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que queremos estudiar –donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar–, los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, y se pueden necesitar otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa).²⁷

El termociclador calienta o enfría los tubos a tres temperaturas distintas, que se repiten una y otra vez (lo que se llama los ciclos de reacción), la primera es a 95°C (y a este paso se le llama desnaturalización) durante la cual las dobles cadenas del ADN se abren o desnaturalizan, quedando en forma de cadenas sencillas; después el termociclador ajusta la temperatura en un intervalo entre 40°C y 60°C (llamada de alineamiento), a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, y aquellas uniones más estables (las que son complementarias) durarán mayor tiempo, quedando los oligonucleótidos “alineados” formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'; al agregar unas bases más, los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases y estabilizan más la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio para el siguiente paso. Después la temperatura sube a 72 °C (paso que se conoce como extensión), ya que 72°C es la temperatura en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad, y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado.²⁷

En el primer ciclo, con estas tres temperaturas, se sintetizarán los primeros fragmentos a partir del ADN genómico. Estos primeros fragmentos no tendrán el tamaño esperado, serán un poco más grandes ya que la taq (enzima termoestable) copiará hasta donde le sea posible, se obtendrán en cantidades tan pequeñas que al final no podremos detectarlos. Después se repiten una vez más las tres temperaturas, pero en este segundo ciclo, los oligonucleótidos, además de unirse al ADN que pusimos al inicio, también se unirán a los fragmentos recién sintetizados del primer ciclo, por lo tanto, en este segundo paso la polimerasa sintetizará 2

fragmentos largos copiados directamente del ADN y 2 fragmentos del tamaño esperado, que es el tamaño que hay entre los dos oligonucleótidos que hemos usado. De esta forma, con cada ciclo aumentará el número de fragmentos del tamaño que queremos. Cabe mencionar que antes y después de estos ciclos se programan dos pasos, uno de 95°C durante varios minutos para iniciar la desnaturalización, y al final de los ciclos, un paso último de extensión a 72°C para permitir que la taq termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.²⁷

Para este tipo de PCR es necesario que uno de los oligonucleótidos tenga la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del ADN, y el otro deberá llevar la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se quiere amplificar (por lo cual se les llama forward y reverse) para que uno sea complementario a la cadena que forma el otro; si no es así no podría amplificarse el sitio que se necesita. Como cada pedazo sintetizado sirve como base para sintetizar otros en el siguiente ciclo, el número de copias aumentará en forma exponencial.²⁷

2.3.2 Electroforesis

El término Electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos.²⁸

La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE (Tampón de Tris, Acetato y EDTA). En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que, durante la electroforesis migran hacia el polo positivo.²⁸ Así, moléculas de ADN de diferente tamaño, van a migrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de ADN va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN. En el caso de los geles de agarosa, se le añade Bromuro de Etidio, sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de ADN aplicado y los marcadores de peso molecular.²⁸

2.4 Dientes Humanos

2.4.1 Generalidades

Los dientes son órganos anatómicos duros, ubicados dentro de los procesos alveolares de los huesos maxilares a través de un tipo especial de articulación denominada gonfosis. Están conformados macroscópicamente por una corona y raíz, y microscópicamente por distintos tejidos, como son el esmalte, dentina, cemento y pulpa dental. El ser humano presenta dos tipos de denticiones, una temporal y una definitiva dependiendo de la fase de desarrollo.²⁹

2.4.2 Pulpa Dental

La pulpa dental es clasificada como un tejido conectivo laxo localizado en la porción central de cada diente. Esta pulpa es un tejido conectivo especializado, delicado, que contiene vasos sanguíneos de pared delgada, nervios y terminaciones nerviosas encerradas dentro de la dentina. Cada pulpa se abre en el interior del tejido que rodea el diente, el periodonto, a través del ápice del conducto radicular.²⁹

La pulpa tiene una zona central y una zona periférica, que se observa tanto en la pulpa coronal como en la radicular. La zona central contiene grandes arterias, venas y troncos nerviosos que entran en la pulpa desde el conducto apical y prosiguen hacia la cámara pulpar coronal. Los fibroblastos son las células preponderantes, que viven en una sustancia intercelular de glucosaminoglucanos y fibras de colágeno. Los odontoblastos son las segundas células más corrientes. En la periferia, la zona odontogénica consta de odontoblastos y zonas libres de células y rica en células. Adyacente a la zona rica en células hay una capa de nervios parietal.²⁹

La pulpa dental gracias a sus componentes, puede cumplir una serie de funciones vitales para la pieza dentaria, además de ello, provee una buena fuente de obtención de material genético, gracias a la presencia de múltiples células, como lo son los fibroblastos y odontoblastos.³⁰

2.5 Dientes de Bovino

2.5.1 Generalidades

Los dientes de bovino están dispuestos de modo que forman sobre los bordes de la mandíbula, un arco casi parabólico. En los bovinos no es continuo, puesto que el maxilar superior no dispone parte de la dentadura y, en el inferior, se interrumpe dejando un espacio sin dientes, llamado barra.³¹

Los Bovinos son animales heterodontes, ya que tienen dientes con formas y funciones diferentes. Presentan 8 dientes ubicados en la parte anterior de la mandíbula, incisivos, primeros medianos, segundos medianos y finalmente los

extremos.³²

En el bovino se diferencian incisivos y molares. Los incisivos (de incidir = cortar) son planos y con un borde cortante y están situados en la entrada de la boca. Los molares (de muela = piedra de molino), son voluminosos y con una superficie libre dispuesta para triturar.³²

La fórmula dentaria que se presenta en el maxilar superior, es que a cada lado hay seis dientes (tres premolares y tres molares) y que, en la mandíbula, a cada lado los dientes suman diez (cuatro incisivos, tres premolares y tres molares) y, por lo tanto, el bovino tiene doce dientes en la mandíbula superior y veinte en la inferior, con lo que su dentadura total consta de 32 dientes. El bovino, entonces, tiene el mismo número de piezas dentarias que el hombre, pero distribuidas en forma diferente, pues la fórmula nos dice que no posee colmillos ni incisivos superiores y que es mayor el número de premolares. Parecería en esta comparación, que los colmillos se hubieran transformado en premolares. Como hemos visto dos son las clases de dientes del bovino: incisivos y molares. Los incisivos son ocho, ubicados en la entrada de la boca y sobre la extremidad anterior del maxilar inferior. En el maxilar superior, repetimos, no hay incisivos.³²

DENTICION TEMPORAL	BOVINO	DENTICION PERMANENTE	BOVINO
Incisivos Superiores	0	Incisivos Superiores	0
Incisivos Inferiores	8	Incisivos Inferiores	8
Caninos Superiores	0	Caninos Superiores	0
Caninos Inferiores	0	Caninos Inferiores	0
Premolares Superiores	6	Premolares Superiores	6
Premolares Inferiores	0	Premolares Inferiores	6
Molares Superiores	0	Molares Superiores	6
Molares Inferiores	6	Molares Inferiores	6
TOTAL	20	TOTAL	32

Tabla I: Fórmula dentaria de los dientes de bovino.³²

2.5.2 Diferencias y similitudes con los dientes humanos.

Los dientes de bovino con respecto a los dientes humanos presentan muchas semejanzas, por lo cual es factible su uso como sustituto de dientes de humano para la investigación.

Los seres humanos en cuanto a su dentición son de tipo bifodontos, es decir, presentan dos denticiones, una primaria y otra permanente, y son heterodontes, por lo que presentan diferentes formas anatómicas entre sus distintos grupos dentarios. Los bovinos al igual que los humanos tienen características heterodontes y bifodontas.⁵

Los dientes humanos son similares morfológicamente e histológicamente a

los de algunos mamíferos, pero los dientes bovinos presentan algunas características especiales como son la composición histológica y su forma anatómica que, entre otras características, los hacen ideales para su utilización como sustituto en dientes humanos en investigaciones.⁵

De todas las características que comparten los grupos dentarios, tanto de los dientes humanos como de bovinos, existe un grupo particular de dientes que por sus características microscópicas y macroscópicas tienen el mayor grado de similitud con los dientes humanos, y estos corresponden a los incisivos. Los incisivos son los dientes de bovinos que mayor similitud anatómica y estructural presentan comparándolos con los dientes humanos³³, por lo que nos limitaremos a la descripción anatómica de estos.

Los incisivos de los bovinos macroscópicamente presentan al igual que los dientes humanos, una corona y una raíz, con un estrechamiento entre los dos llamada cuellos; y una pulpa en su interior; a su vez está conformado por esmalte, dentina y cemento, que según otros estudios realizados no tendrían diferencia morfológica.⁵

La corona del incisivo del bovino es de 21 mm de cervical a incisal y un grosor vestíbulo lingual de 8.5 mm.³³ En comparación con un incisivo humano que presenta una longitud coronaria de 10 mm y grosor vestíbulo palatino de 7 mm.³³ Está conformado por una cara anterior o labial convexa estriada, una cara lingual o posterior dispuesta casi en bisel un poco cóncava y un borde superior convexo cortante en un diente nuevo que se irá desgastando por el uso. La raíz es cónica con leve displaceración hacia mesial.⁵

El esmalte es una sustancia vidriosa, blanca y muy dura, la cual forma una capa más o menos fina sobre la corona terminando a la altura del cuello. El esmalte posterior es poco espeso. La dentina es blanca y dura, presenta una cavidad interna, ocupada por la pulpa dentaria.⁵

Se demostró que la composición de esmalte en los dientes de bovinos corresponde a un 95% de sales minerales, mientras que la dentina posee un 77% de sales minerales y es menos duro que el esmalte³³, por lo que, son más similares a las características del diente de un ser humano. Los resultados muestran que el tamaño de los cristales de hidroxapatita del esmalte de humano son mayores al esmalte de bovino. Por consiguiente, la micro dureza del esmalte de bovino puede ser más similar a la del esmalte del humano en comparación a otros animales.³⁴

La pulpa dentaria está contenida en la cavidad del diente, en esta se alojan vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. A nivel histológico, en este tejido se puede identificar la misma disposición y cantidad de elementos constitutivos de la pulpa humana, como son: la zona odontoblástica, la zona poco celular, la zona celular y la zona a celular de la pulpa.⁵

A nivel microscópico se observó que la dentina estaba formada

principalmente por túbulos dentinarios. Uno de los estudios hecho en dentina por Lezcano y Navarro et al., demostró que los túbulos dentinarios atraviesan todo el espesor en forma de “S itálica” acentuada. Además, en el estudio de Posada y Sánchez, et al., se reconocen tres tipos de dentina, compuestas principalmente por colágeno tipo I y son la dentina primaria y junto a ésta la pre dentina, la dentina secundaria y la dentina terciaria. A diferencia de los dientes humanos, no se encuentra la dentina interglobular.⁵

Estudios realizados por Schilke y col., destacan que el tamaño de los túbulos dentinarios en dientes de bovinos es mayor que en los dientes humanos, no así con el diámetro de los mismos. En lo que concierne a la cantidad de túbulos, en la porción coronal ocurre lo mismo que en dientes humanos, cerca de la pulpa es mayor la cantidad de túbulos dentinarios que en su periferia.³²

Esto se puede corroborar de manera empírica mediante el estudio de Posada y Sánchez, et al., que al comparar el diámetro de los túbulos dentinales cerca de la pulpa, se encuentra que para los dientes de bovino es de 2.4 - 2.8 micras y en humanos es de 2.5 micras; en la porción media de la dentina, para bovinos es de 2-2.4 micras y en humanos es de 1.2 - 1.5 micras; y en la unión amelodentinaria para bovinos es de 1.6 - 1.9 micras y en humanos es de 900 nanómetros.⁵ Lo que demostraría la similitud en ambas denticiones.

Puentes y col., realizaron estudios comparando la composición química, resistencia a la compresión y módulo elástico, encontrando que los dientes humanos presentan valores mayores que los dientes bovinos y que al análisis químico con espectrografía de emisión, se encontró una gran similitud de elementos constitutivos.³²

La utilización de dientes bovinos en estudios in vitro de biomateriales odontológicos brindaría mayor facilidad de manipulación considerando la diferencia de tamaño de los dientes bovinos y sus homólogos humanos.

Por otro lado, entre los dientes humanos y los bovinos existen similitudes histológicas en técnica de diente por desgaste y existen estudios realizados sobre características químicas que complementan la justificación para su utilización en futuros trabajos de investigación en odontología reemplazando la utilización de dientes humanos, que en la actualidad son más difíciles de conseguir y son de un tamaño más pequeño, lo que entorpece la manipulación y el análisis de los diferentes tejidos dentarios.³²

Por lo tanto, los dientes de bovino con respecto a los dientes de humanos, presentan muchas ventajas para su uso como sustituto de dientes humanos para la investigación de materiales dentales, como lo son las similitudes tanto microscópicas como macroscópicas. En todos los estudios donde la composición química de los sustratos se consideró relevante, se debe optar por los dientes de bovino como un sustituto de los dientes humanos.³⁴

3. Objetivos

General

Determinar la calidad de ADN mitocondrial extraído de dientes de bovinos sumergidos a dos distintas profundidades en el mar durante dos periodos de tiempo.

Específicos

1. Determinar la calidad de ADN mitocondrial de dientes bovinos.
 - Sumergidos a 5 metros durante 33 días.
 - Sumergidos a 5 metros durante 60 días.
 - Sumergidos a 20 metros durante 33 días.
 - Sumergidos a 20 metros durante 60 días.

2. Comparar la calidad de ADN mitocondrial de dientes de bovinos.
 - Sumergido a 5 metros durante 33 días y 60 días.
 - Sumergido a 20 metros durante 33 días y 60 días

4. Pregunta de Investigación

¿Se ve alterada la calidad del ADN mitocondrial de dientes de bovinos sumergidos en el mar y mantenidos por dos distintos períodos de tiempo y dos profundidades distintas?

5. Hipótesis

La calidad del ADN mitocondrial obtenido de dientes de bovinos se ve alterada por la inmersión de estos en el mar durante dos distintos períodos de tiempo y en dos profundidades distintas.

6. Materiales y Métodos

6.1 Tipo de estudio

Se considera un estudio analítico, ya que busca comprobar una hipótesis. Es experimental porque manipula artificialmente factor de estudio por parte del investigador, y por la aleatorización de los casos o muestras en dos grupos, llamados grupo control y grupo experimental que permite su comparación.

6.2 Universo

Incisivos inferiores temporales de bovino de 12 meses de edad, donados por el Matadero Frigorífico La Calera en marzo del año 2019.

6.3 Criterios de Inclusión y Exclusión de los bovinos

Criterios de Inclusión:

- Bovinos de la misma raza.
- Bovinos de 12 meses de edad: Esta edad fue determinada por la cronología de erupción, que permite asegurar que incisivos temporales ya se encuentran erupcionados y es la edad de sacrificio de los bovinos. Se limita a una misma edad (y no rango etario) para eliminar posibles sesgos relacionados con retracción de cámara pulpar por aumento de carga masticatoria a lo largo de los años, lo que podría afectar la cantidad de ADN mitocondrial del que podemos disponer desde la pulpa.
- Bovinos con no más de 24 horas de fallecidos.
- Mandíbulas con los 8 incisivos temporales presentes.
- Incisivos sanos de bovino.
- Incisivos con corona indemne.

Criterios de Exclusión:

- Bovinos con enfermedades sistémicas.
- Dientes que no sean incisivos.
- Dientes con Traumatismos dento alveolar (TDA).
- Restos radiculares.

6.4 Criterios de Inclusión y Exclusión de las Muestras

Criterios de Inclusión:

- Dientes con Ápice abierto.

Criterios de Exclusión:

- Dientes sin pulpa.

6.5 Muestras

6.5.1 Aprobación del estudio y Carta de autorización.

El presente proyecto ha sido aprobado de acuerdo a los Protocolos del Comité Institucional de Bioseguridad de Investigación de la Universidad de Valparaíso. Las muestras procesadas en este trabajo han sido donadas en forma voluntaria mediante asentimiento verbal y una carta firmada por el Gerente del Matadero Frigorífico La Calera.

6.5.2 Tamaño Muestral.

Para determinar el tamaño de la muestra, se usó el método aplicado a animales denominado “Ecuación de Recursos”, que permite calcular la Potencia de un análisis y así asegurar que no se usen muchos animales (en nuestro caso N° de dientes que va relacionado al número de animales), y, por tanto, se hagan determinaciones en exceso, con el consiguiente sobre gasto de materiales (costo), tiempo y esfuerzo.³⁵

Así, en nuestro estudio se contemplan 7 grupos:

- Control tiempo 0.
- Control tiempo 33 días.
- Control tiempo 60 días.
- Inmersión 5 metros durante 33 días.
- Inmersión 5 metros durante 60 días.
- Inmersión 20 metros durante 33 días.
- Inmersión 20 metros 60 durante días.

Para cada grupo consideramos un número de dientes igual a 4. Aplicando la fórmula de la ecuación de recursos:

$$E = (N^{\circ} \text{ total de unidades experimentales} - N^{\circ} \text{ de grupos})$$

Dónde N° total de unidades experimentales = N° de grupos x N° de individuos en

cada grupo.

En nuestro caso tenemos 7 grupos, el N° de individuos en cada grupo es de 4 y el N° total de unidades experimentales= $7 \times 4 = 28$. Luego $E = 28 - 7 = 21$.

El valor E óptimo debe estar entre 10 y 20 según lo establece el método.

6.5.3 Forma de selección.

Muestreo no probabilístico. Los dientes fueron recolectados del Matadero Frigorífico la Calera. Las muestras se obtuvieron de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión. Las mandíbulas de bovinos con los dientes fueron recolectadas el 5 de abril de 2019, donde se seleccionaron 4 mandíbulas con 32 dientes temporales en total para realizar este estudio. Las mandíbulas fueron donadas por el Matadero mediante un consentimiento firmado.

6.5.4 Unidad de estudio.

ADN mitocondrial de la pulpa dental de dientes temporales de bovinos.

6.6 Definición de las variables a estudiar.

6.6.1 Variable dependiente.

- Calidad de ADN: Variable cualitativa dicotómica. Se evaluará a partir de las diferentes variables, tiempo y profundidad, si se determina una amplificación positiva o negativa del ADN mitocondrial expuesto a las distintas condiciones adversas del mar.

6.6.2 Variables independientes.

- Profundidad en metros: Variable cualitativa dicotómica. Las profundidades serán agrupadas en dos categorías, siendo de 5 y 20 metros; Esto permitirá evaluar si se ve afectada la amplificación de ADN mitocondrial en estas dos distintas categorías.
- Tiempo en días: Variable cualitativa dicotómica. Se dividirá en 2 grupos con diferentes periodos de tiempo de 33 días y 60 días. Esto permitirá evaluar si se ve afectada la amplificación de ADN mitocondrial en estas dos distintas categorías.

6.7 Proceso de Recolección y Procesamiento de la información.

Se recolectaron las muestras desde el Matadero Frigorífico de la Calera, luego de explicar la finalidad de la investigación y que esta solicitud fuera plasmada oficialmente mediante una carta de aprobación (Anexo 2, Figura II). Además, se hizo entrega de una carta sobre las características específicas de cada uno de los bovinos que posteriormente serían seleccionados para el estudio (Anexo 2, Figura III), los cuales corresponden a:

- Máximo de 24 horas de muertos. Con la finalidad de asemejar el tiempo post mortem de una persona antes de su descomposición.
- Que el animal se encuentre sano.
- Edad de 12 meses.
- Que el motivo de su muerte no sea por fines de este estudio, si no que predeterminada con fines comerciales externos al proyecto de tesis.

Se comenzó a seleccionar las muestras según los criterios de inclusión y exclusión, junto a ello, la cantidad de dientes que presentaban, si correspondían a dientes temporales o definitivos y la integridad de su corona (Anexo 3, Figura IV).

Se procedió a cortar las mandíbulas en la zona edéntula, entre los molares e incisivos, con una sierra eléctrica. De esta forma solo se obtienen las muestras de interés para así obtener una hemimandíbula control y una experimental a partir de la mandíbula de un mismo bovino.

Se etiquetaron las hemimandíbulas experimentales con los números 1, 12, 15 y 30 y las hemimandíbulas control con los números 2, 11, 16 y 29 (Anexo 3, Figura V). Estos números fueron escogidos al azar y no presentan ningún significado. Cada número fue previamente plastificado para su identificación, amarrado con un alambre al hueso, al cual se le realizó un orificio con un taladro. Por lo tanto, obtenemos 4 hemimandíbulas de control y 4 hemimandíbulas de experimentación, como se observa en la Figura VI.

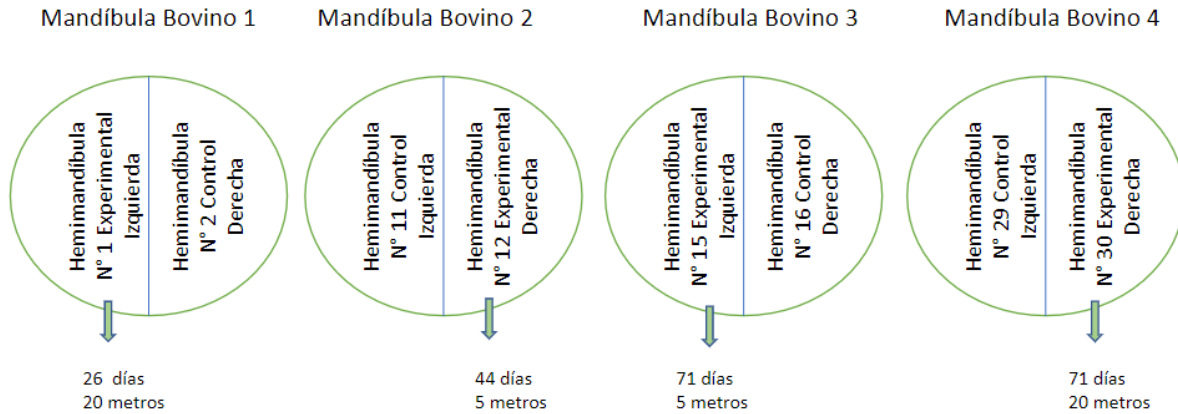


Figura VI: Enumeración y distribución de hemimandíbulas control y experimentación de los bovinos en estudio.

Las hemimandíbulas Control fueron sometidas a extracción con instrumental de Cirugía que consiste en un elevador fino, fórceps recto, tijera recta e instrumental de examen (Anexo 3, Figura VII). Se obtuvo un diente que corresponde al análisis inmediato, al cual se le extrajo la pulpa 48 horas después de obtener las muestras (Anexo 3, Figura VIII). Dos dientes fueron categorizados en el grupo control a temperatura ambiente durante 33 días y 60 días en tubos de plástico con orificios y dejados a ese tiempo para después poder realizar el análisis de ADN. Este procedimiento se realizó en cada mandíbula y todos los dientes fueron rotulados con el número y estado de control correspondiente.

En tanto, a las muestras experimentales se les realizó una ferulización previa con composite y alambre, con la finalidad de proteger los dientes ante posibles amenazas del medio marino. Además, se amarró otro alambre alrededor de la corona a nivel cervical de los dientes (Anexo 3, Figura IX). Ambos alambres se unieron para posteriormente ser sujetado a la malla de pescar, que se usó con el objetivo de proteger las muestras y fue rotulada con la identificación "Tesis de Odontología. Universidad de Valparaíso. No Retirar" (Anexo 3, Figura X). Cada malla fue posicionada según su categorización, por lo que, dos mandíbulas fueron colocadas con pesos y amarradas a 20 metros, y otras dos a 5 metros en una roca, hasta el retiro posterior de acuerdo a los días del estudio.

El retiro de las muestras fue realizados los días 44 y 71. Este retraso se debió a las condiciones del mar (marejadas) y periodos de limpieza de los equipos de buceo del Centro de Buceo Pichidangui, que impidieron su recolección en las fechas anteriormente estipuladas. Además, la muestra de experimentación N°1 desapareció del lugar, posiblemente por la depredación de seres vivos marinos, por lo que debió ser repuesta con otra mandíbula, ocupando su lugar y rotulándose con el N°5, y dejándola por un periodo de 26 días a 20 metros de profundidad.

Al ordenar las muestras, estas fueron clasificadas, como se muestra en la tabla N° 1, por bovino, donde cada uno está compuesto por su control inmediato (CI), Control ambiental (CA) a 44 días y 71 días; y Experimental (E) de acuerdo al tiempo y profundidad de exposición.

Para realizar la comparación de dientes de control inmediato, dientes control a temperatura ambiente y dientes experimentales, se debió agrupar dientes correspondientes a distintos bovinos (Figura XI).

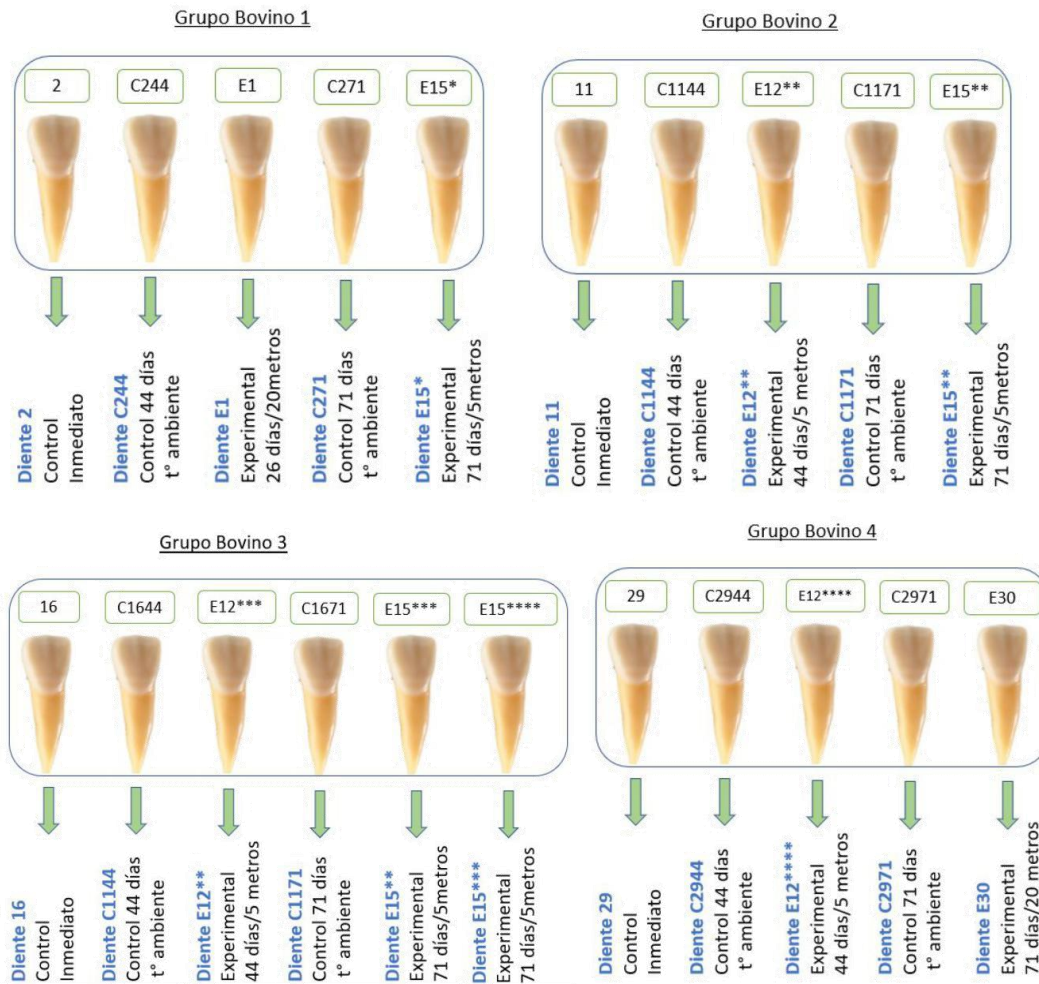


Figura XI: El bovino 1 al no tener muestra de 71 días, se reemplazó por una nueva hemimandíbula de bovino rotulada con el N° 15 para asemejar las condiciones. El Bovino N°2 de igual forma se le agregó una muestra N°15 que estaba a 71 días. El Bovino N°3 no contaba con muestra experimental de 44 días, por lo que adicionó la E12 expuesta a 44 días y al bovino N°4 se le incorporó de igual manera un E12 a 44 días. De esta manera todos los grupos de bovino presentan la misma cantidad de muestras y bajo las mismas condiciones para su comparación.

6.8 Cortes, Análisis del Ácido Desoxirribonucleico, Fluorimetría, Electroforesis y Reacción en Cadena de la Polimerasa.

6.8.1 Cortes de las muestras

Las muestras fueron cortadas previamente con un disco Carborundum, único por diente, de forma horizontal (a nivel del límite amelocementario), mientras que otros dientes fueron cortados además de forma vertical en la raíz para facilitar la extracción de ADN.

Se usó extirpadores pulpares, únicos por diente, para la extracción de la pulpa más consistente, en comparación a la que se encontraba en estado líquido, que fue extraída con una micropipeta de 0.5 a 20 μ l (Anexo 4, Figura XII, XIII, XIV).

Cada muestra extraída fue colocada en tubos Falcón de 1.5 ml y rotulada con los siguientes números: En el caso de las muestras de control inmediato 2, 11, 16 y 29 que fueron analizadas de forma inmediata 48 horas después del deceso del bovino. Las muestras de control a temperatura ambiente fueron rotuladas en sus tubos como C2 44 días, C2 71 días, C11 44 días, C11 71 días, C16 44 días, C16 71 días, C29 44 días y C29 71 días, y analizadas de acuerdo a los días de exposición. Las muestras de experimentación extraídas los días correspondientes al estudio fueron marcadas según el número de la hemimandíbula, el tiempo de exposición y el orden del diente a extraer desde el incisivo central hasta el cuarto incisivo, por un asterisco que va desde * al ***.

6.8.2 Análisis del Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial

Se realizó el análisis del ADN mitocondrial en dos días consecutivos ya que así lo estipulaba el kit comercial (QIAamp DNA investigador kit; Cat, no. 56504). Por lo tanto, el día uno después de la recolección del ADN pulpar se pesó en una balanza, previamente calibrada con un tubo vacío. Una vez obtenido se encendió el baño termostático y se esperó a que llegase a 56 °C. Posteriormente, se agregó con una pipeta 180 μ l de buffer ATL y se agitó para homogeneizar. Luego se agregó 20 μ l de proteinasa K, se realizó un vórtex, por medio de una vibradora, la cual permite mezclar y agitar la muestra, se colocaron las muestras en un flotador en el baño termostático hasta el siguiente día (Anexo 4, Figura XV).

El segundo día, nos aseguramos que los tubos tuviesen un lizado completamente homogéneo. Se dejó el baño termostático a 70 °C y paralelamente se agregó 4 μ l de RNAsa A (100 mg/ml), se mezcló con vórtex durante 15 segundos y se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 minutos y luego se dió un Spin, que consiste en un centrifugado para precipitar el contenido del tubo (Anexo 4, Figura XVI).

Se agregó 200 μ l de Buffer AL a la muestra y un vórtex de 10 segundos para mezclar. Se incubó por 10 minutos en el baño termostático a 70 °C, y se le dió un

spin.

Se le agregó 200 µl de Etanol (96^o-100^o), se dió una mezcla y Spin. La mezcla se debió cambiar a una mini columna QIAmp de forma cuidadosa (dentro del tubo colector de 2 ml), se centrifugó a 6.000 g (8.000 rpm) por 1 minuto y se traspasó la mini columna a un tubo colector nuevo, descartándose el tubo con el filtrado. Se abrió cuidadosamente la mini columna y se le agregó 500 µl de Buffer AW1, se centrifugó a 6.000 g (8.000 rpm) por 1 minuto y se traspasó a otro tubo colector nuevo. Se le agregó 500 µl de Buffer AW2, se centrifugó a 20.000 g (14.000 rpm) por 3 minutos. Se traspasó el contenido de la mini columna a un nuevo tubo limpio de 2 ml, se centrifugó a máxima potencia por 1 minuto. Se pasó la mini columna a un tubo limpio de micro centrifuga de 1,5 ml y se agregó 100 µl de Buffer AE y dejó incubando a temperatura ambiente por 1 minuto. Finalmente se centrifugó a 6.000 g (8.000 rpm) por 1 minuto, se eliminó la columna y se tapó la muestra (Anexo 4, Figura XVII).

6.8.3 Fluorometría

Permite cuantificar el ADN, por lo que se agregó 199 µl del Quantifluor ONEds DAN a unos tubos especiales y luego se agrega 1 µl de la muestra de ADN, en este caso las 21 muestras. Posteriormente se realizó un vórtex de 10 segundos para mezclarlos y se deja a temperatura ambiente por 5 minutos protegidos de la luz. (Anexo 5, Figura XVIII).

6.8.4 Electroforesis

Se realiza el gel de Agarosa con 0.8 gr de Agarosa, la cual se pone en la matriz disuelto en 100 ml de Buffer específico para geles llamado TAE al 0,5x. Se coloca en el microondas por 3 minutos y se retira con un protector de mano especial para no quemarse, se deja reposar hasta que se enfríe. Luego se agrega 5 µl de Bromuro de Etilio a la matriz de la mezcla.

Se prepara la máquina de Electroforesis, se arma el pocillo en conjunto con la peineta que permitirá obtener las celdillas y se agrega el gel donde se debe esperar 10-15 minutos para que gelifique. Una vez listo se posiciona en la máquina de electroforesis, donde las celdillas van del polo negativo al polo positivo, se agrega TAE 0.5X para correr geles cubriendo toda la caja de electroforesis y el gel mismo.

Luego, se debe poner en la primera celdilla el Ladder, marcador de peso molecular, 3 µl. En las siguientes celdillas se coloca una mezcla previamente realizada con las concentraciones de 1 µl de Buffer, 4 µl de H₂O y 1 µl de ADN para formar en total 5 µl. estas concentraciones fueron destinadas a las muestras de control inmediato 2, 11, 16 y 29. Las concentraciones de los controles ambientales fue de 5 µl de ADN y 1 µl de Buffer, en total hizo 6 µl (Anexo 5, Figura XIX).

Las mezclas de las muestras de experimentación fueron de 10 µl de ADN y 2 µl de Buffer, en total fue de 12 µl. De esta manera se posiciona cada muestra en las celdillas de forma ordenada según su control Inmediato (CI), control ambiental

(C) y su experimental (E) como se observa en la tabla II. Se deja actuar por 45 minutos y se pueden observar los resultados correspondientes.

Bovino 1	Bovino 2	Bovino 3	Bovino 4
1) CI 2	6) C1 11	11) CI 16	17) CI 29
2) C2 44 días	7) C11 44 días	12) C16 44 días	18) C29 44 días
3) E1	8) E12**	13) E12***	19) E12****
4) C2 71 días	9) C11 71 días	14) C16 71 días	20) C29 71 días
5) E15*	10) E15**	15) E15***	21) E30
		16) E15****	

Tabla II: Orden de las celdillas con el MIX correspondiente en el gel de Electroforesis.

6.8.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó en primera instancia una prueba de PCR con la muestra C2971 para determinar la temperatura de alineamiento a la cual se podrá distinguir la banda de ADN en la electroforesis. Entonces, se ocuparon 9 tubos en total, donde 8 presentan ADN y 1 corresponde al control negativo sin ADN, como se muestra en la siguiente imagen:

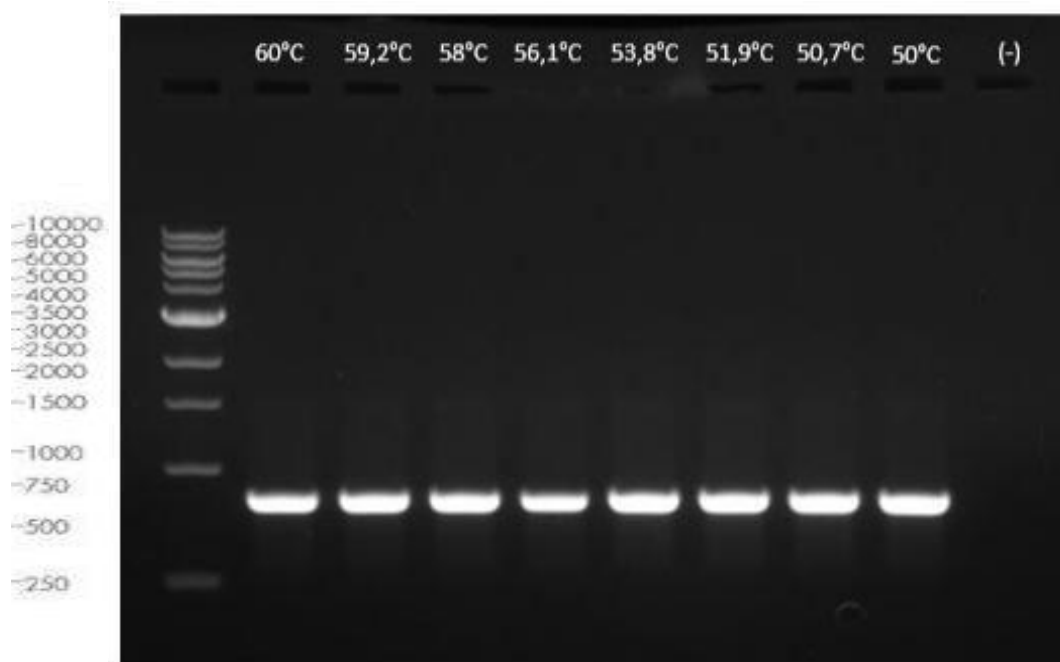


Figura XX: PCR de prueba para medición de T° ideal de trabajo con primers de bovino.

El método consiste en hacer un Mix que contiene 10,5 µl de H₂O, 12,5 µl de zafiro, 0,5 µl de Primer F -Forward- (10 µM), 0,5 µl de Primer R -Reverse- (10 µM), estos Primer permitirán la amplificación de la región del gen de loop D, región variable HV1 propio del bovino, donde el primer F es 5'-CAGAATTTGCACCCTAACCAA- 3' y el R es 5'-GGGGCCTGCGTTTATATATTG-3', y además se mezcla 1 µl de ADN, lo que al sumar debiese dar la cantidad de 25 µl para cada tubo que se analizará (Anexo 5, Figura XXI). Es importante destacar que la cantidad de H₂O y ADN puede variar en relación a la concentración total de la mezcla. Sin embargo, cada uno de los componentes se debe multiplicar por la cantidad de tubos que se analizarán, por ende, todo será multiplicado por nueve a excepción del ADN, de esta manera obtendremos el resultado en µl que se debe ocupar para formar el Mix, que se distribuirá entonces 24 µl (sin contar el 1 µl de ADN) en 9 tubos, de los cuales, a 8 se le agrega 1 µl de ADN y el control negativo se le agrega 1 µl de H₂O para formar los 25 µl en total y finalmente se centrifuga por 10 segundos (Anexo 5, Figura XXII).

Las muestras serán dispuestas en el termociclador en la primera columna y el negativo en la segunda columna, se programa para determinar distintas temperaturas a 30 ciclos (Anexo 5, Figura XXIII).

De acuerdo al análisis de la figura XX, se determinó que a 54°C se observa la banda de ADN, por lo tanto, se prosigue a realizar tres PCR en días distintos, donde en el primer PCR se ocupó 1 µl de ADN para 21 muestras y 1 muestra aparte sería el control negativo. Es por ello, que todas las concentraciones fueron multiplicadas por 22 para obtener el Mix, el cual fue distribuido en 24 µl por cada tubo y se le agregó 1 µl de ADN (exceptuado al control negativo que se le agregó agua).

En el segundo PCR se ocupó dos Mix, uno con 1 uL de ADN llamado Mix 1, y otro con 5 µl de ADN denominado Mix 2. En la mezcla se disminuyó a 6.5 uL el H₂O para así cumplir con los 25 uL de la mezcla.

En el tercer PCR se ocupó nuevamente dos Mix. Mix 1 con 1 µl de ADN y un Mix 3 con 11.5 µl de ADN y 0 de H₂O para así cumplir con los 25 µl de la mezcla. Previo a un centrifugado, se colocaron las muestras en el termociclador por 40 minutos a 54°C. En forma paralela, se preparó el gel de Agarosa y la máquina de electroforesis.

Una vez obtenidas las muestras del termociclador, ésta se fue agregando a las celdillas del gel de agarosa. Primero se dispuso el Ladder de 1kb de 3 µl, después en el mismo orden en que se pusieron las muestras en la electroforesis, se pusieron con una pipeta 8 µl de cada muestra. Finalmente, se esperó un tiempo de 45 minutos y se observaron los resultados.

6.9 Determinación de la Calidad del Ácido desoxirribonucleico Mitocondrial

La calidad del ADN se observó a partir del análisis de PCR, donde se midió en relación al marcador molecular el tamaño de la banda y que tan íntegra se observaba. Por lo tanto, una banda bien delimitada representa que no se encuentra degradada y tiene calidad de ADN, por el contrario, una banda no íntegra representa la baja calidad del ADN estudiado. (Figura XXIV)

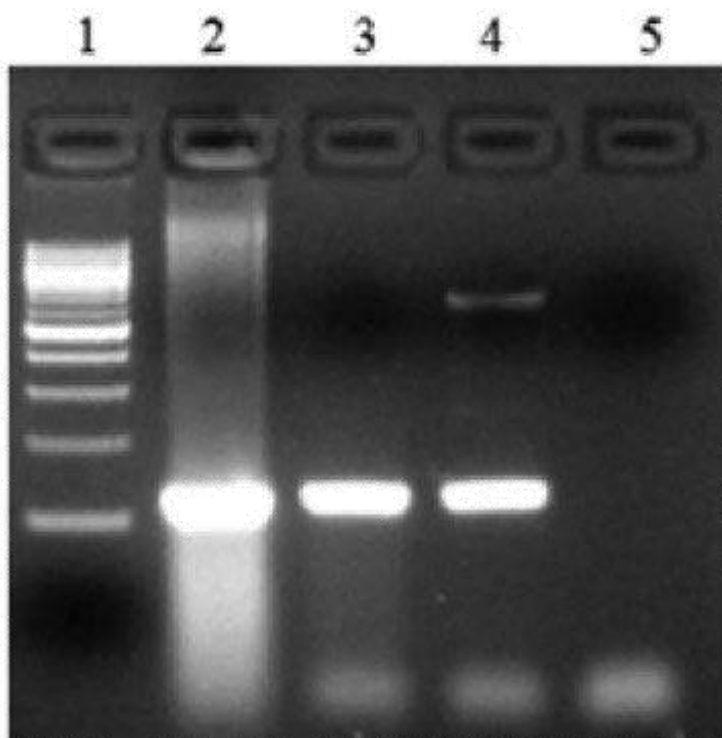


Figura XXIV: Se observa en la columna 1 el Ladder. La columna 2 el ADN degradado, la 3 también se observa el ADN degradado, pero menor que la columna anterior, la columna 4 se ve un ADN íntegro en comparación con las demás columnas.³⁶

7. Resultados

7.1 Cuantificación del ADN inicial

Se realizó una cuantificación inicial de ADN, con el uso de ONE DNA, de cada una de las muestras obteniéndose los siguientes resultados:

Bovino 1:

Diente	Cuantificación de ADN
2 (Control Inmediato)	144 ng/μl
C244 (Control 44 días a temperatura ambiente)	24 ng/μl
E1 (Experimental 26 días - 20 metros)	0,7 ng/μl
C271 (Control 71 días a temperatura ambiente)	36 ng/μl
E15* (Experimental 71 días - 5 metros)	1,02 ng/μl

Tabla III: Cuantificación de ADN medida en ng/μl correspondiente a los dientes del grupo Bovino 1.

Bovino 2:

Diente	Cuantificación de ADN
11 (Control Inmediato)	108 ng/μl
C1144 (Control 44 días a temperatura ambiente)	13 ng/μl
E12** (Experimental 44 días - 5 metros)	Más bajo que el Blanco
C1171 (Control 71 días a Temperatura Ambiente)	22 ng/μl
E15** (Experimental 71 días - 5 metros)	1,02 ng/μl

Tabla IV: Cuantificación de ADN medida en ng/μl correspondiente a los dientes del grupo Bovino 2.

Bovino 3:

Diente	Cuantificación de ADN
16 (Control Inmediato)	55 ng/μl
C1644 (Control 44 días a temperatura ambiente)	43 ng/μl
E12*** (Experimental 44 días - 5 metros)	0,889 ng/μl
C1671 (Control 71 días a temperatura ambiente)	33 ng/μl
E15*** (Experimental 71 días - 5 metros)	1,39 ng/μl
E15**** (Experimental 71 días - 5 metros)	1,67 ng/μl

Tabla V: Cuantificación de ADN medida en ng/μl correspondiente a los dientes del grupo Bovino 3.

Bovino 4:

Diente	Cuantificación de ADN
29 (Control Inmediato)	62 ng/μl
C2944 (Control 44 días a temperatura ambiente)	75 ng/μl
E12**** (Experimental 44 días - 5 metros)	0,439 ng/μl
C2971 (Control 71 días a temperatura ambiente)	62 ng/μl
E30 (Experimental 71 días - 20 metros)	3,79 ng/μl

Tabla VI: Cuantificación de ADN medida en ng/μl correspondiente a los dientes del grupo Bovino 4.

Los resultados de la cuantificación del ADN se observan en el siguiente gráfico:

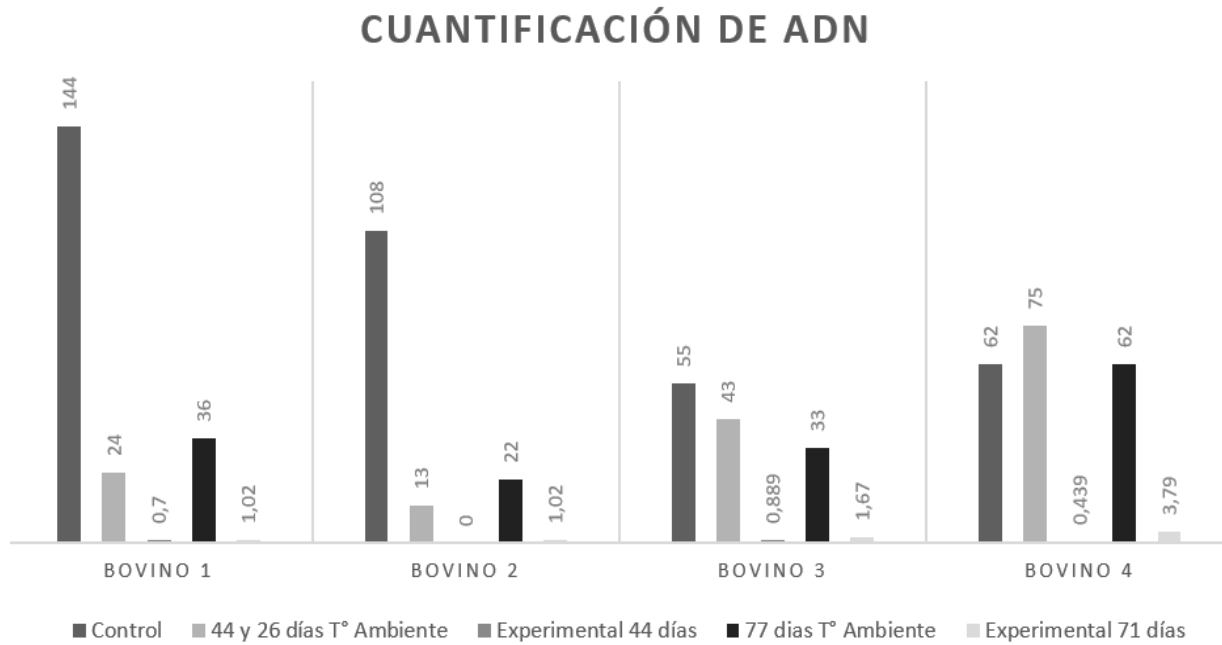


Figura XXV: Gráfico de barras que esquematiza el peso en ng/μl del ADN de cada diente de bovino de la muestra de estudio.

7.2 Resultados Electroforesis

Electroforesis N° 1

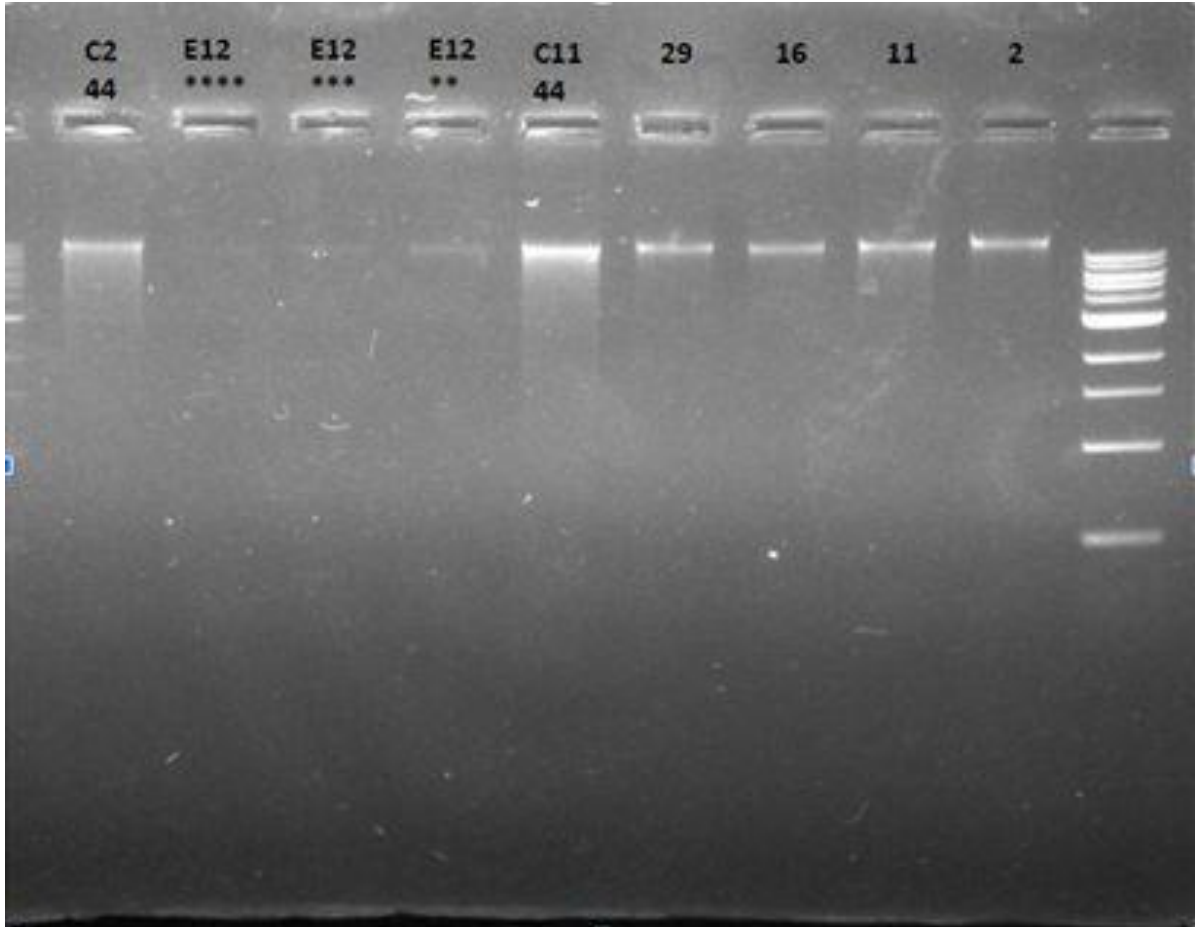
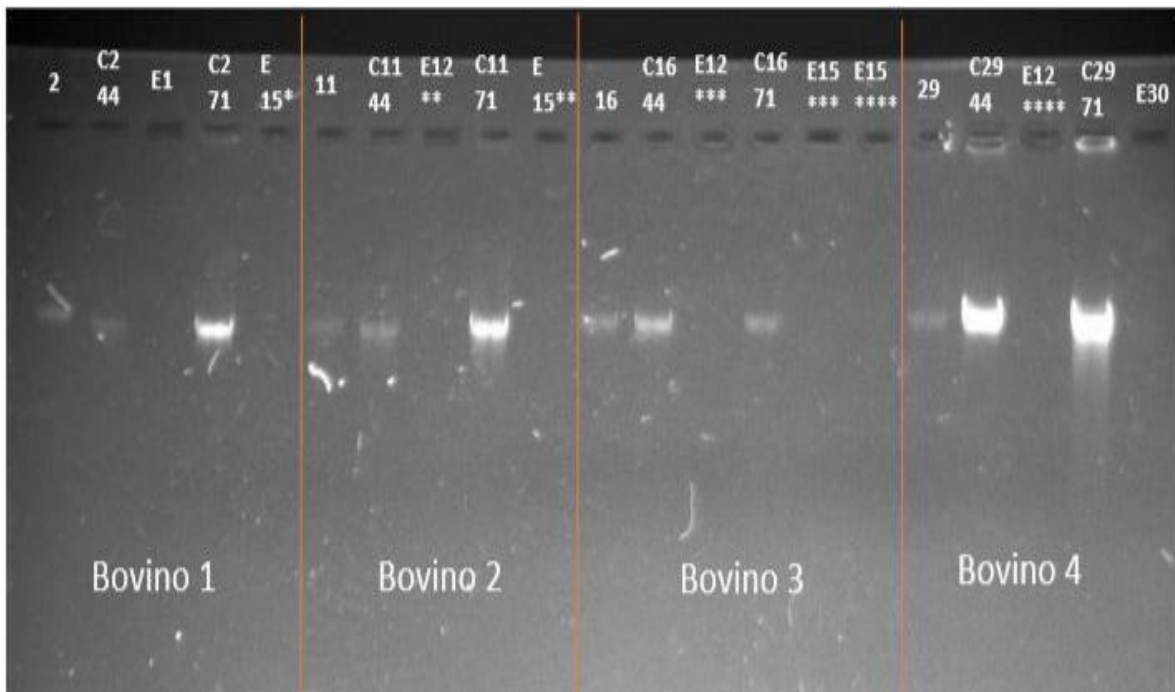


Figura XXVI: Electroforesis realizada con 1 μ l de ADN cada una. C244 control a temperatura ambiente durante 44 días, E12****, E12***, E12** control experimental a 5 metros durante 44 días. C244 y C1144 controles a temperatura ambiente durante 44 días; 29, 16, 11, 2 Controles inmediato.

Se observan bandas visibles y nítidas en dientes 2 y 16. Bandas visibles, pero menos nítidas en dientes E12*, E12** y E12***, y bandas visibles pero degradadas (poco nítidas) en dientes 11, 29, C244 y C1144.

Electroforesis N°2



XXVII: BOVINO 1: 2 Control Inmediato; C244 Control 44 días a temperatura ambiente; E1 Experimental 26 días; C271 Control 71 días a temperatura ambiente; E15* Experimental 71 días. BOVINO 2: 11 Control Inmediato; C1144 Control 44 días a temperatura ambiente; E12** Experimental 44 días; C1171 Control 71 días a temperatura ambiente; E15** Experimental 71 días. BOVINO 3: 16 Control Inmediato; C1644 Control 44 días temperatura ambiente; E12*** Experimental 44 días; C1671 Control 71 días a temperatura ambiente; E15*** y E15**** Experimental a 71 días. BOVINO 4: 29 Control Inmediato; C2944 Control 44 días a temperatura ambiente; E12**** Experimental 44 días; C2971 Control 71 días a temperatura ambiente; E30 Experimental 71 días.

Electroforesis realizada con 1 µl de ADN a grupo control inmediato, 5 µl de ADN a grupo control a temperatura ambiente y 10 µl de ADN a grupo experimental. Se observan bandas degradadas en dientes C271, C1144, C1171, C1644, C2944 y C2971.

7.3 Resultados PCR

PCR N°1

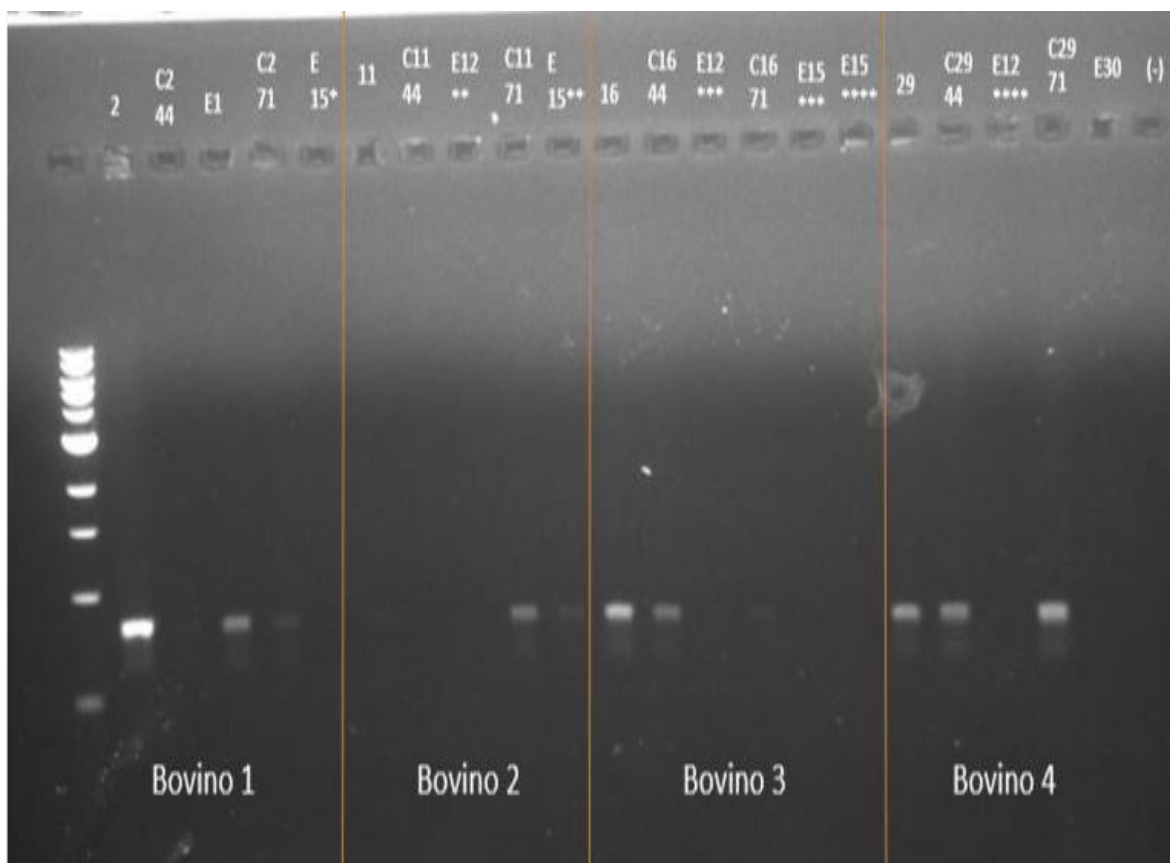


Figura XXVIII: Se utilizó para este PCR un MIX 1 con 1 μ l de ADN para cada uno de los grupos.

BOVINO 1: 2 Control Inmediato; C244 Control 44 días a temperatura ambiente; E1 Experimental 26 días; C271 Control 71 días a temperatura ambiente; E15* Experimental 71 días. BOVINO 2: 11 Control Inmediato; C1144 Control 44 días a temperatura ambiente; E12** Experimental 44 días; C1171 Control 71 días a temperatura ambiente; E15** Experimental 71 días. BOVINO 3: 16 Control Inmediato; C1644 Control 44 días temperatura ambiente; E12*** Experimental 44 días; C1671 Control 71 días a temperatura ambiente; E15*** y E15**** Experimental a 71 días. BOVINO 4: 29 Control Inmediato; C2944 Control 44 días a temperatura ambiente; E12**** Experimental 44 días; C2971 Control 71 días a temperatura ambiente; E30 Experimental 71 días.

Se observa la banda en las muestras: 2, E1, C1171, 16, C1644, 29, C2944 y C2971. Además, se observan bandas menos visibles pero presentes en las muestras 11, C244, C271, E15**, E12** y C1671 y no se observan bandas en las muestras E15*, C1144, E12**, E15***, E15****, E12**** y E30.

PCR N°2

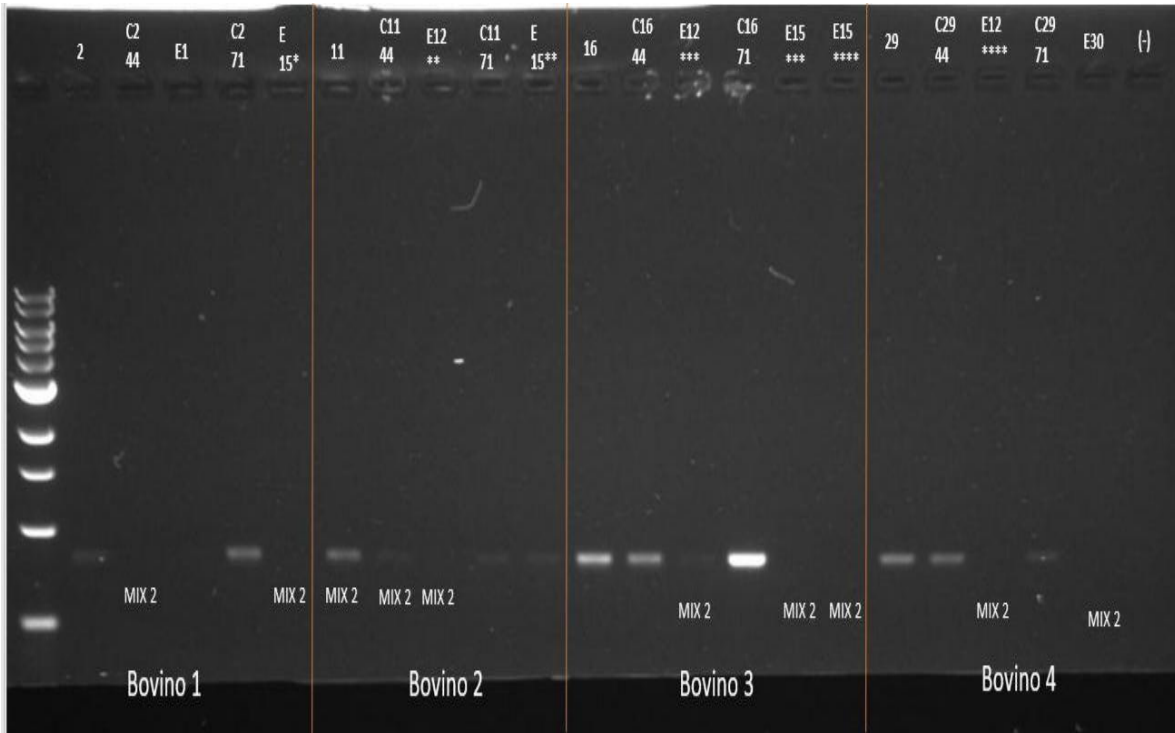


Figura XXIX: BOVINO 1: 2 Control Inmediato; C244 Control 44 días a temperatura ambiente; E1 Experimental 26 días; C271 Control 71 días a temperatura ambiente; E15* Experimental 71 días. BOVINO 2: 11 Control Inmediato; C1144 Control 44 días a temperatura ambiente; E12** Experimental 44 días; C1171 Control 71 días a temperatura ambiente; E15** Experimental 71 días. Se observa una banda nítida en muestras C271, 11, 16, C1644, C1671, 29 y C2944. Se observa una banda menos nítida en muestras 2, C244, E1, C1144, C1171, E15***, E12*** y C2971. No se observa E15*, E12**, E15***, E15****, E12**** y E30. BOVINO 3: 16 Control Inmediato; C1644 Control 44 días temperatura ambiente; E12*** Experimental 44 días; C1671 Control 71 días a temperatura ambiente; E15*** y E15**** Experimental a 71 días. BOVINO 4: 29 Control Inmediato; C2944 Control 44 días a temperatura ambiente; E12**** Experimental 44 días; C2971 Control 71 días a temperatura ambiente; E30 Experimental 71 días.

Se realizó el PCR utilizando los siguientes MIX:

- MIX 1: grupos a los que se les agregó 1 µl de ADN.
- MIX 2: grupos a los que se le agregó 5 µl de ADN.

Se observan bandas nítidas en las muestras C271, 11, 16, C1644, C1671, 29, C2944. Se observan bandas menos nítidas en las muestras 2, C244, E1, C1144, C1171, E12*** y C2971. No se observan bandas en las muestras E15*, E12**, E15***, E15****, E12**** y E30.

PCR N°3

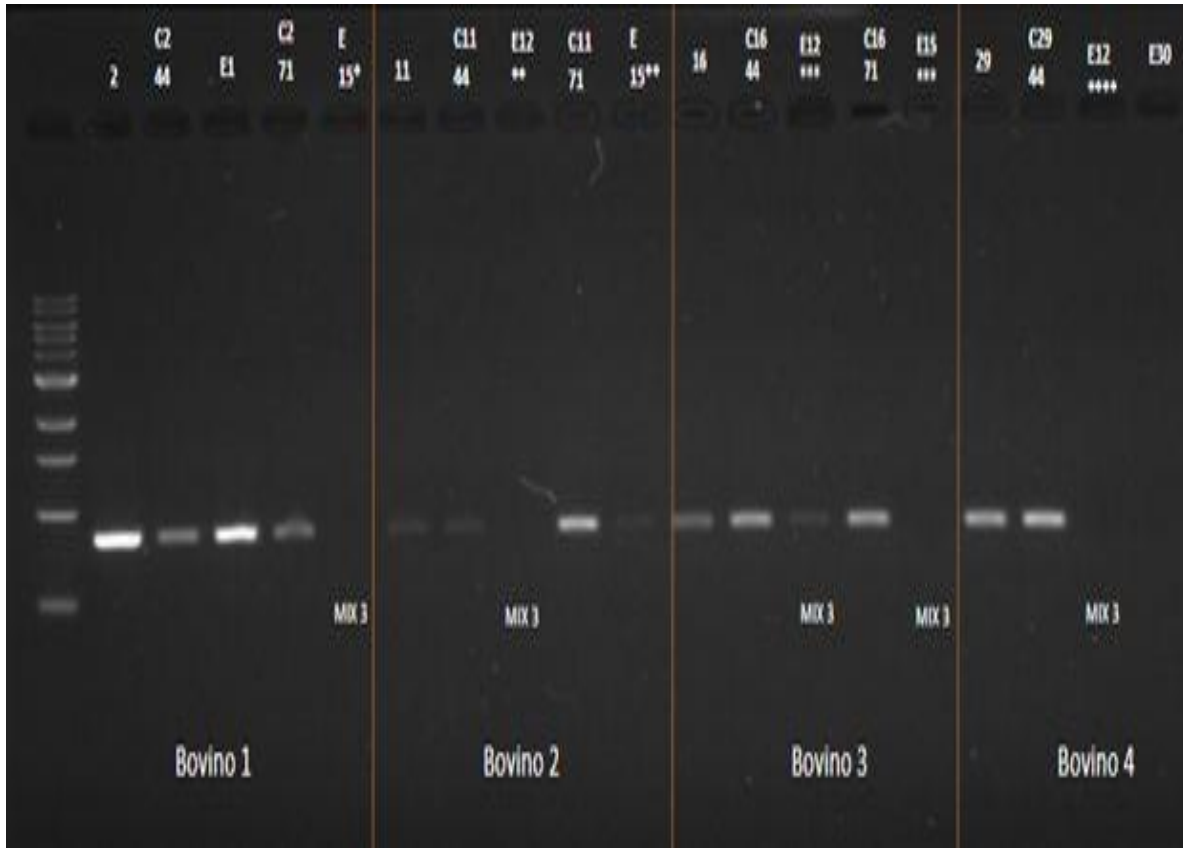


Figura XXX BOVINO 1: 2 Control Inmediato; C244 Control 44 días a temperatura ambiente; E1 Experimental 26 días; C271 Control 71 días a temperatura ambiente; E15* Experimental 71 días. BOVINO 2: 11 Control Inmediato; C1144 Control 44 días a temperatura ambiente; E12** Experimental 44 días; C1171 Control 71 días a temperatura ambiente; E15** Experimental 71 días. BOVINO 3: 16 Control Inmediato; C1644 Control 44 días temperatura ambiente; E12*** Experimental 44 días; C1671 Control 71 días a temperatura ambiente; E15*** Experimental a 71 días. BOVINO 4: 29 Control Inmediato; C2944 Control 44 días a temperatura ambiente; E12**** Experimental 44 días; E30 Experimental 71 días.

Se realizó el PCR utilizando los siguientes MIX:

- MIX 1: grupos a los que se les agregó 1 µl de ADN;
- MIX 3: grupos a los que se le agregó 11,5 µl de ADN.

Se observan bandas nítidas en las muestras 2, C244, E1, C271, C1171, 16, C1644, C1671, 29 y C2944. Se observan bandas menos nítidas en las muestras 11, C1144, E15** y E12***. No se observan bandas en las muestras E15*, E12**, E15*** y E30.

Del total de 21 muestras analizadas mediante electroforesis, 5 muestras se ven de manera íntegra; 9 muestras se observan, sin embargo, estas se encuentran en forma de bandas degradadas; Y 7 muestras no son visibles mediante electroforesis, como se muestra en el siguiente gráfico:

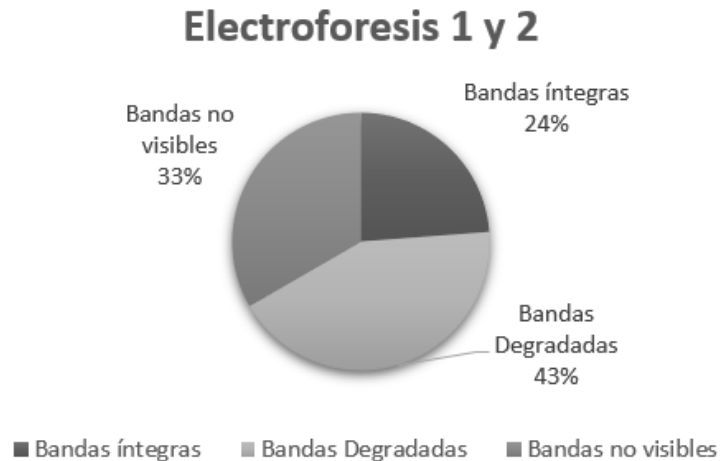


Figura XXXI: Gráfico de torta que describe las bandas de ADN de cada muestra. Aquellas que fueron íntegras, degradadas o no visibles en la electroforesis.

Del total de 21 muestras analizadas mediante amplificación con PCR, 16 pudieron ser observadas mediante las bandas en el PCR (en intensidad visible y menos visible) y 5 muestras no pudieron ser observadas mediante PCR, lo cual se esquematiza en el siguiente gráfico:

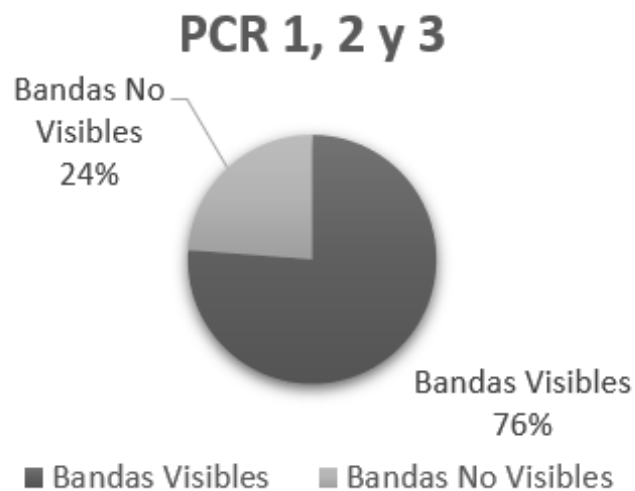


Figura XXXII: Gráfico de Torta que describe las bandas de ADN visibles y no visibles del total de las muestras en la técnica de PCR 1,2 y 3.

8. Discusión

El ADN mitocondrial puede proporcionar un medio para la identificación forense cuando no es posible el uso de ADN nuclear, debido a la degradación o la falta de cantidad.²⁴

En un estudio realizado por Chowdhury en el año 2018, en que expuso dientes a distintas condiciones, se observó que hay una disminución de alrededor del 50% del ADN obtenido en dientes recién extraídos en comparación a los que se habían desecado a temperatura ambiente durante un período de 1 mes. El ADN obtenido de los dientes desecados durante 60 días y 90 días mostró cierta estabilidad, aunque hubo una disminución en el valor. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en el presente estudio, en que se dejó dientes de bovino expuestos a temperatura ambiente por periodos de 44 días y 71 días. Del total de 8 muestras, 6 muestras mostraron que a pesar de existir cantidad de ADN mitocondrial posible de amplificar mediante PCR, éste se encontraba degradado y presentaba menos estabilidad con el paso de los días, lo que se pudo observar en el análisis de electroforesis con presencia de bandas menos nítidas (Figura XXVI y Figura XXVII). Este hecho podría explicarse mediante el fenómeno propio de descomposición y putrefacción del tejido pulpar a temperatura ambiente que vio mermada la calidad del mismo.

Otra de las condiciones que estudió el experimento realizado por Chowdhury fue el de exponer tejido pulpar a condiciones de agua salada, en él, se realizó la extirpación de la pulpa y el tejido se almacenó en solución salina. A diferencia de este estudio, en que se expuso la hemimandíbula completa al mar. Los resultados fueron diferentes en algunos aspectos. Mientras en el estudio citado se observó que la solución salina sirvió como un excelente medio de almacenamiento, demostrando de manera concluyente que la extracción de ADN es posible incluso en las circunstancias más adversas, en nuestro estudio podemos observar que de los 9 dientes expuestos en el mar, 3 pudieron ser amplificados mediante PCR, por lo tanto, dientes expuestos a condiciones de mar presentan disminución de la calidad del ADN, no pudiendo ser amplificado a contar de los 44 días, sin embargo, en un periodo de 26 días, la cantidad y calidad de ADN mitocondrial presente en el tejido pulpar permite su adecuada amplificación. Esto podría explicarse ya que, a mayor cantidad de días expuestos en el mar, los animales marinos consumen más cantidad de tejido blando presente en la mandíbula del bovino, este hecho perjudica la mantención del diente en su alveolo (por las características propias del hueso mandibular de bovino). Por otro lado, los dientes temporales utilizados en este experimento, corresponden a bovinos de 12 meses de edad, los cuales se encuentran en periodo de recambio de dentición, lo que explicaría los distintos grados de apertura en el foramen apical (desde completamente abierto, hasta cerrado), esta variabilidad influyó directamente en el mantenimiento del tejido pulpar, el cual, fue más fácilmente removido del diente una vez que éste se desprendió de su alveolo. Por otro lado, en vista de que el tejido pulpar se pierde del diente por el tamaño del foramen apical, queda la posibilidad de que el material

genético permite la amplificación en menos de la mitad de la cantidad de muestras expuestas en el mar por las características propias de los dientes de bovino y del hueso mandibular de bovino, y no necesariamente porque las condiciones de mar no permitan la mantención del tejido en cuanto a calidad y cantidad a los 71 días de exposición.

En cuanto a la integridad y mantención de la calidad del ADN mitocondrial de dientes de bovino expuestos a temperatura ambiente versus condiciones de mar, podemos sostener que a pesar de que las diversas condiciones a las que se expone un tejido en el mar pueden ser factores de riesgo, la calidad de ADN mitocondrial en estos casos es mejor que la acontecida a temperatura ambiente. En esta última, se obtuvo una importante cantidad de ADN mitocondrial, sin embargo, su calidad no fue la más óptima (bandas degradadas), mientras que en condiciones de mar se obtuvo una considerablemente menor cantidad de ADN mitocondrial, pero esta pequeña cantidad es reproducida de mejor manera por la electroforesis, debido posiblemente a que las bajas temperaturas de las profundidades del mar actúan como un medio conservador de la pulpa dental en periodos menores a 44 días.

Aunque cualquier tejido es susceptible para realizar extracción de ADN y su uso en amplificación por PCR, los tejidos dentales nos ofrecen la ventaja de ser resistentes a la degradación física y ambiental, y han demostrado ser una buena opción, esto no es aplicable a dientes de bovino de 12 meses de edad, ya que a pesar de tener características microscópicas y macroscópicas semejantes a los dientes humanos, la presencia de un extenso foramen apical en algunos de los dientes, genera una vía de escape para el tejido pulpar en condiciones de exposición al mar.

9. Conclusión

Considerando los resultados obtenidos en este estudio, el cual tiene como objetivo determinar la calidad del ADN Mitocondrial en dientes de bovinos inmersos en el mar a distintas profundidades y tiempo, se puede concluir que:

Las condiciones de mar resultan ser un medio de conservación de la calidad del ADN mitocondrial, sin embargo, no de la cantidad de este. Mientras que la condición de temperatura ambiente conserva la cantidad de tejido pulpar, pero no su calidad.

El hueso mandibular de bovino no se asemeja al de humano, ya que el primero no presenta hueso vestibular, lo que impide asemejar las condiciones en que se encontraría un resto mandibular o maxilar de humano en casos de desastres masivos.

Por lo tanto, las variables tiempo y profundidad no afectan de forma lineal la calidad del ADN mitocondrial, ya que el principal factor de influencia en la protección y mantención del tejido pulpar enriquecido de ADN mitocondrial corresponde a la estructura dental, tamaño de foramen apical y composición del hueso mandibular. Sin embargo, en dientes con ápice cerrado que estuvieron expuestos al mar, se vio afectada la calidad del ADN en mayor medida con el aumento de paso de los días, siendo más perjudicado a los 71 días de permanencia.

Tanto a 26 días como a 44 días es posible, en todos los casos (5 metros y 20 metros), encontrar ADN mitocondrial en calidad y cantidad suficientes para fines de identificación forense.

10. Sugerencias

Como sugerencias para futuras investigaciones se aconseja aumentar el tamaño muestral de manera que los resultados sean extrapolables a cualquier otro tipo de estudio. Otro factor importante es seleccionar bovinos de menor edad, que presenten dientes temporales con ápice cerrado y poder realizar un análisis más íntegro de la calidad de ADN.

Es importante considerar la protección de las muestras de estudio de una forma más adecuada para estar expuestas en el mar. De esta manera, evitamos que los depredadores puedan acceder con una mayor facilidad.

También se recomienda disminuir la variable tiempo y realizar análisis dentro de un mes en distintos días de la calidad del ADN. Además, se aconseja sopesar la posibilidad de determinar cómo futuras variables la salinidad del mar y la temperatura como posibles factores de riesgo o protección de la calidad de ADN en la pulpa de dientes.

Finalmente, se sugiere con este estudio poder extrapolar la metodología para el análisis con muestras en dientes humanos y así poder determinar realmente si las variables estudiadas afectan o no la calidad del ADN en pulpa dental humana.

11. Resumen

Introducción: La información del ADN permite establecer reconocimiento de personas mediante restos humanos que no es posible por métodos tradicionales. El ADN mitocondrial presenta múltiples copias en la célula y entrega información del grupo familiar materno. Por ende, los dientes se pueden utilizar como una fuente de ADN, a pesar de haber sido sometido a la putrefacción.

Objetivo: Determinar la calidad del ADN mitocondrial (ADNmt) de dientes de bovinos sumergidos a dos distintas profundidades en el mar durante dos periodos de tiempo.

Materiales y Método: Hemimandíbulas de Bovino fueron agrupadas en grupos (control-inmediato, control-temperatura ambiente (TA), control-experimental). Las muestras obtenidas se analizaron mediante electroforesis y PCR.

Resultados: La totalidad de muestras a TA fueron vistas en electroforesis y PCR. 3 de 9 muestras expuestas al mar pudieron amplificarse.

Discusión: En periodos de 44-71 días fue posible amplificar el ADNmt, pero, se encontró degradado. Esto podría explicarse por la descomposición y putrefacción del tejido pulpar a TA. Ante condiciones de mar pudimos observar que 3 de 9 muestras pudieron ser amplificadas, por ello, dientes expuestos al mar presentan disminución de la calidad de ADNmt, no pudiendo ser amplificado a contar de los 44 días, empero, a 26 días, la cantidad y calidad de ADNmt permite su amplificación.

Conclusiones: Las condiciones de mar conservan la calidad del ADNmt, sin embargo, no de la cantidad, al contrario de los de TA. La mayor influencia en la mantención y protección del tejido corresponde a la estructura dental, tamaño del foramen apical y composición mandibular.

Abstract

Introduction: DNA information allows to establish recognition of people through human remains that is not possible by traditional methods. Mitochondrial DNA presents multiple copies in the cell and delivers information from the maternal family group. Therefore, teeth can be used as a source of DNA, despite having ever been to rot..

Objective: To determine the quality of mitochondrial DNA (mtDNA) of teeth of submerged cattle at two different depths in the sea during two periods of time.

Materials and Methods: Bovine hemimandibles were grouped in groups (control-immediate, control-ambient temperature (TA), control-experimental). The samples obtained were analyzed by electrophoresis and PCR.

Results: All samples at TA were seen in electrophoresis and PCR. 3 of 9 samples exposed to the sea could be amplified.

Discussion: In periods of 44-71 days it was possible to amplify mtDNA, but it was found degraded. This could be explained by the decomposition and putrefaction of the pulp tissue at TA. Before sea conditions we observed that 3 out of 9 samples could be amplified, therefore, teeth exposed to the sea have a decrease in the quality of mtDNA, and cannot be amplified after 44 days, however, at 26 days, the amount and mtDNA quality allows its amplification.

Conclusions:

Sea conditions retain the quality of mtDNA, however, not quantity, unlike those of TA. The greatest influence on tissue maintenance and protection corresponds to the dental structure, size of the apical foramen and mandibular composition.

12. Referencias

1. La tercera [Internet]. El día que un megaterremoto cambió la geografía de Valdivia y la historia de la sismología en el mundo. Abril 2015. [Consultado 05 de Julio 2019]. Disponible en: <https://www.latercera.com/noticia/el-dia-que-un-megaterremoto-cambio-la-geografia-de-valdivia-y-la-historia-de-la-sismologia-en-el-mundo/>
2. Briem A. Importancia de la Odontología Forense en la identificación humana. Diario Penal 2.16.124
3. Ohira H, Yamamuro Y, Kitagawa Y, Nakagawa K. Effective appropriate use of dental remains and forensic DNA testing for personal identity confirmation. *Legal Medicine*. 2009. 11: S560–S562.
4. Malaver P. C, Yunis J. J. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croat. Med*. 2003. 44: 306–9.
5. Wordpress [Internet]. Argentina: Introducción a la Producción Animal - FCV - UNNE. Concepto, importancia. Limitaciones. Cronometría dentaria en las distintas especies. 2016 [citado en enero de 2019]. disponible de <https://ipafcv.files.wordpress.com/2014/04/8-cronometrc3ada-dentaria-de-bovino-ovinos-caprinos-y-porcinos.pdf>.
6. Posada M. Sanches C. Gallego G. Vargas A. Restrepo L. López J. “Dientes de bovino como sustituto de dientes humanos para su uso en la odontología”. Revisión de literatura. *Revista CES Odontología*. 2006. 19; 1.
7. Pretty I. A, Sweet D. A look at forensic dentistry - Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. *Br. Dent. J*. 2011. 190: 359–366.
8. Chango-Iza R, Guevara O, Armas A. La Odontología Forense y su aplicabilidad en el procesamiento de escenas del crimen y demás eventos catastróficos. *Odontol. Sanmarquina*. 2016. 19;1: 52-55.
9. Smith C, Baco A. Ecology of Whale Falls At the Deep-Sea Floor. *Oceanogr. Mar. Biol. an Annu. Rev*. 2003.41: 311–354.
10. Anderson G. S, Bell L. S. Deep coastal marine taphonomy: investigation into carcass decomposition in the Saanich Inlet, British Columbia using a baited camera. *PLoS One*9. 2014.
11. Anderson G. S, Bell, L. S. Impact of marine submergence and season on faunal colonization and decomposition of pig carcasses in the salish sea. *PLoS One*11. 2016.

12. Anderson G. S, Bell, L. S. Comparison of faunal scavenging of submerged carrion in two seasons at a depth of 170 m, in the strait of Georgia, British Columbia. *Insects*8. 2017.
13. Padilla L. Carrillo C. Figueroa Z. Chaín C. Corbalá F. Haro G. et al. Análisis epidemiológico-ocupacional del barotrauma ótico en buzos profesionales. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2002. 40;4.
14. Río V, Gil J, Téllez L, Batista B. Neumoencéfalo secundario a barotrauma durante el buceo. *Rev Cub Med Mil.* 2003. 8;1.
15. Chowdhury R. Singhvi A, Bagul N, Bhatia S, Singh G, Goswami S. Sex determination by amplification of amelogenin gene from dental pulp tissue by polymerase Chain Reaction. *Indian J. Dent. Res.* 2018. 29; 470–476.
16. Zapico S. C, Ubelaker D. H. Sex determination from dentin and pulp in a medicolegal context. *J. Am. Dent. Assoc.* 2013. 144: 1379–1385.
17. Secuencia del DNA. National Human Genome Research Institute [Internet]. Consultado 28 de junio 2019]. Disponible en: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN>.
18. Jeffreys A. J. commentary Genetic fingerprinting. *Nat. Med.* 2015. 11: 1035–1039.
19. Higgins D, Austin J. J. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Sci. Justice.* 2013. 53: 433–441.
20. Humphreys M. K, Panacek E, Green W, Albers E. Comparison of protocols for measuring and calculating postmortem submersion intervals for human analogs in fresh water. *J. Forensic Sci.* 2013. 58: 513–517.
21. Taanman, J. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. 1999. 1410.
22. Zapico S. C, Ubelaker D. H. Relationship between mitochondrial DNA mutations and aging. Estimation of age- At-death. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2016. 71: 445–450.
23. Pandey R, Mehrotra D, Kowtal P, Mahdi A. A, Sarin R. Mitochondrial DNA from archived tissue samples kept in formalin for forensic odontology studies. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 2014. 4: 109–113.
24. Goodwin C, Higgins D, Tobe S, Austin J, Wotherspoon A, Gahan ME, et al. Singleplex quantitative real-time PCR for the assessment of human mitochondrial DNA quantity and quality. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 2018. 14: 70–75.

25. Kholief M, El Shanawany S, Gomaa R. Sex determination from dental pulp DNA among Egyptians. *Egypt. J. Forensic Sci.* 2017. 7: 0–6.
26. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad.* 2013. 2; 2: 70-78.
27. Espinoza L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (ed) *Ecología molecular.* INE, CONABIO y UNAM; 2007. p. 517-540 del capítulo 27.
28. Padilla C, Dapena J, Martínez E, Bárcena J, García C. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. *Vdocumentsmx [Internet].* [consultado 05 de Julio 2019]. Disponible en: <https://vdocuments.mx/17-electroforesis-de-acidos-nucleicos-en-geles-de-agar-osa-.html>.
29. Herrera M, Mera C, Neira I, Soto N, Velez N. Complejo dentino pulpar. En: Herrera M. Mera Carolina. Neira I. Soto N. Velez N. *Pulpa Dental.* Cátedra Histología y Embriología del Sistema Estomatognático.
30. Gómez N. Trabajo de actualización bibliográfica. Función sensitiva de la pulpa dental. *Dolor. Electronic Journal of Endodontics Rosario.* 2011. 2; 21.
31. Producción Animal [Internet]. Sitio Argentino de Producción Animal: dentadura de los bovinos; cronometría dentaria referida a la raza holando argentino 1979. [Consultado 05 de Julio 2019]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/denticion_y_protesi/s/14-dentadura_holando.pdf.
32. Lezcano M, Navarro J, Gili M, Zamudio M. Caracterización histológica de tejidos dentarios bovinos con utilización del microtomo ISOMET© en la técnica histológica. *Acta odontológica venezolana.* 2016. 54; 1.
33. Wordpress[Internet] Chile: seminario anatomía dientes anteriores. Especialidad de Endodoncia. Universidad de Valparaíso. 2013 [citado en febrero 2019]. Disponible de <http://www.postgradosodontologia.cl/endodoncia/images/EspecialidadEndodoncia/Seminarios/2013-2014/DocSeminarioAnatom%C3%ADaDientesAnteriores1.pdf>.
34. Ortiz A, Teruel J, Alcolea J, Hernández A, et al. Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. 2017. 1-29.
35. Meads R, Gilmour S, Mead A. *The design of experiments, statistical principles for practical applications.* Cambridge University Press. 1988.

36. Ochoa J, Ciuderis K, Lim A, Bolin S, Langohr I. Toxoplasmosis Sistémica en un Canguro Rojo (*Macropus rufus*) Cautivo. *Int. J. Morphol.* 2012. 30; 1.

Anexos

Anexo 1:



Figura I: Logo del Centro de Buceo Pichidangui.

Anexo 2:

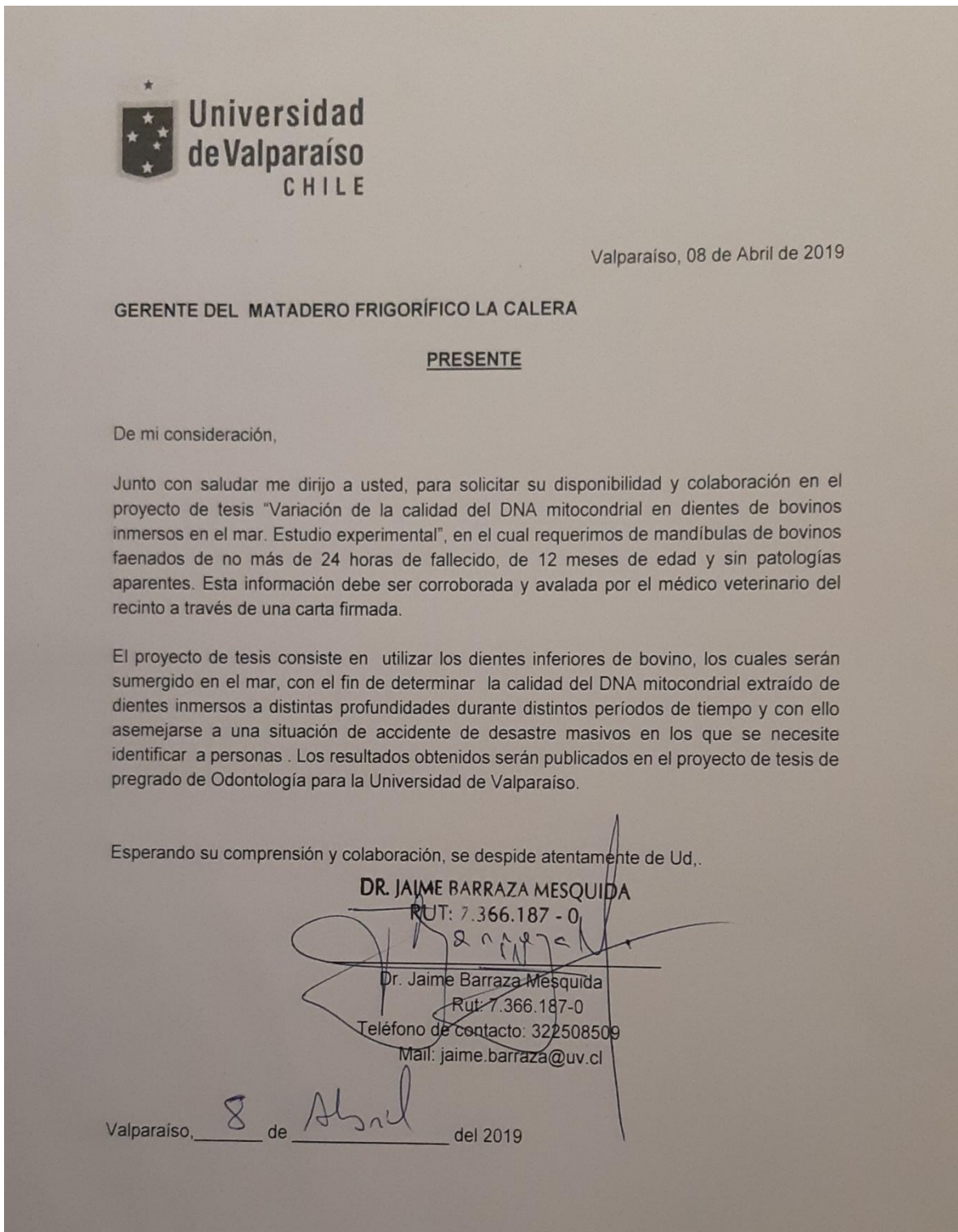


Figura II: Carta al gerente del Matadero explicando el proyecto de investigación.



Valparaíso, 08 de Abril del 2019.

GERENTE DEL MATADERO FRIGORÍFICO LA CALERA

PRESENTE

De nuestra consideración:

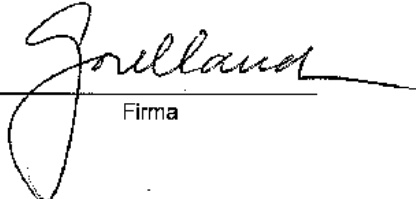
Junto con saludar me dirijo a Usted, para solicitar su colaboración para validar la información sobre las muestras de animales que nos dispondrán con la finalidad de avalar las siguientes características de los bovinos de estudio:

- Edad de 12 meses de edad.
- Misma raza.
- Ausencia de enfermedad o alguna patología sistémica.
- Fallecimiento en un máximo de 24 horas.
- Muerte no atribuible a proyecto de tesis.

Información avalada por el persona a cargo:

Nombre: Gonzalo F. Orellana L.
Rut: 13.866.128-K
Contacto: GOZALANAL@FRIGOCAL.cl

Valparaíso, 15 de julio del 2019


Firma

Gonzalo Orellana Latín
Jefe HSEQ
Frigorífico La Calera Ltda.
13.866.128-K

Figura III: Carta del Gerente del Matadero especificando las características de las muestras.

Anexo 3: Recolección de las muestras

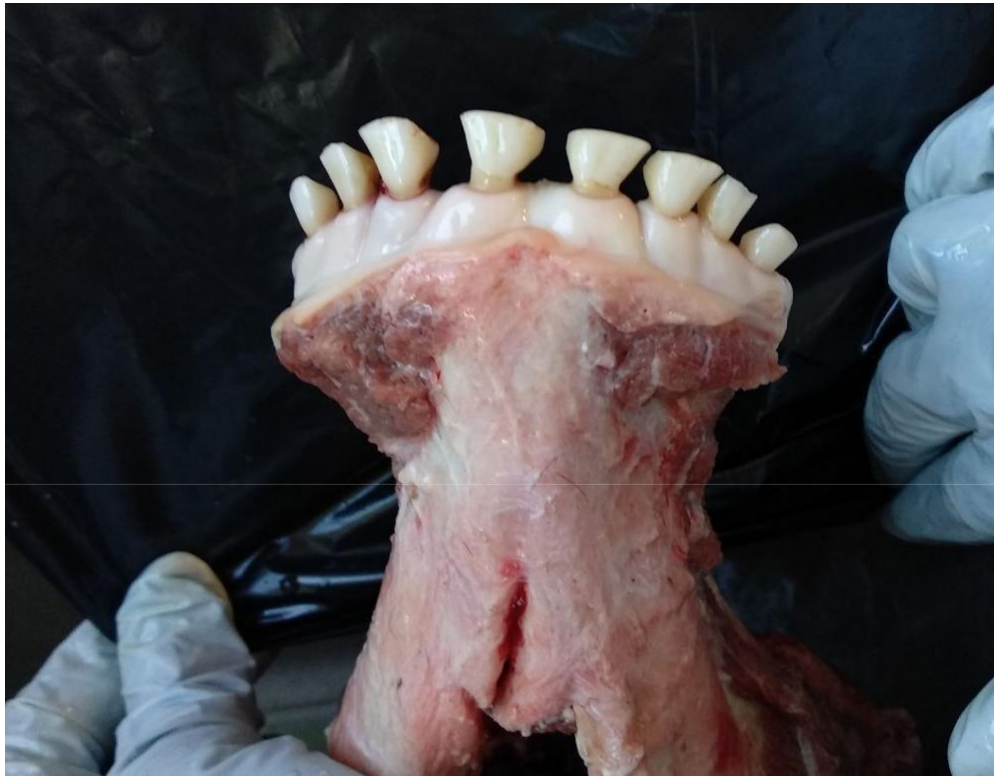


Figura IV: Mandíbula de bovino con los 8 incisivos temporales.



Figura V: Hemimandíbulas de bovinos identificadas con su número correspondiente.



Figura VII: Extracción de dientes de control de bovinos.



Figura VIII: Control Inmediato de las muestras Nº2, Nº11, Nº16 y Nº29.



Figura IX: Ferulización de dientes de hemimandíbulas experimentales de bovino



Figura X: Malla de pescar para contener la hemimandíbula. Además, presenta la identificación de "Proyecto de tesis Odontología UV".

Anexo 4: Corte de dientes y Análisis de ADN pulpar de Bovino.

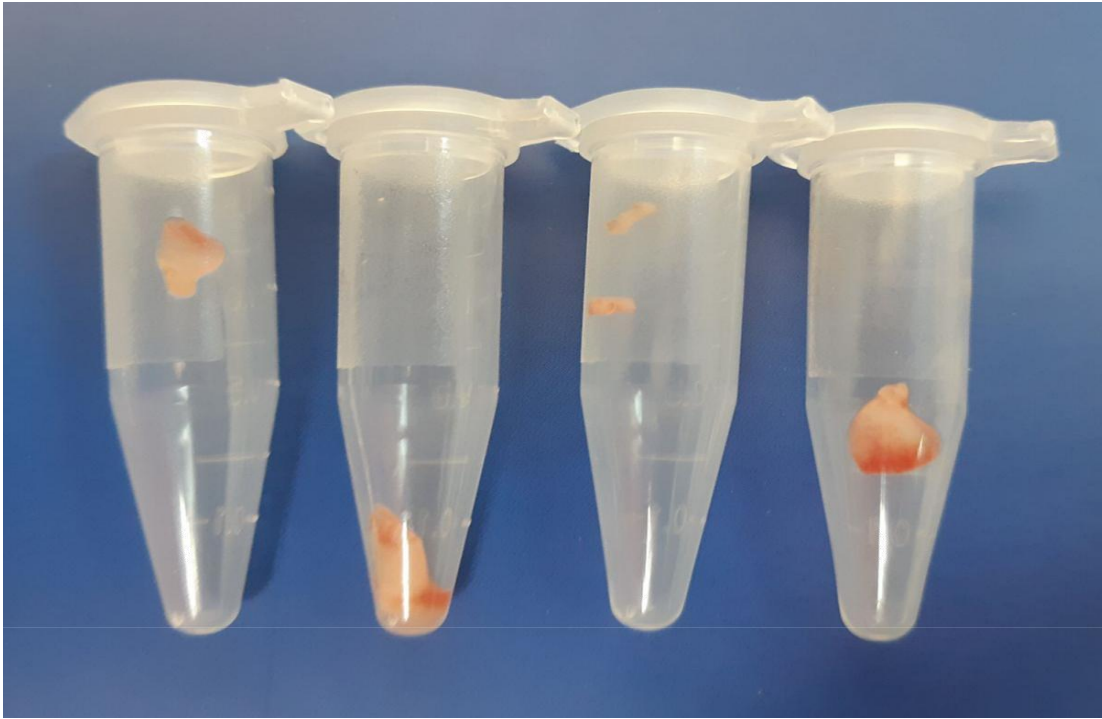


Figura XII: Pulpa de las muestras de Control inmediato.

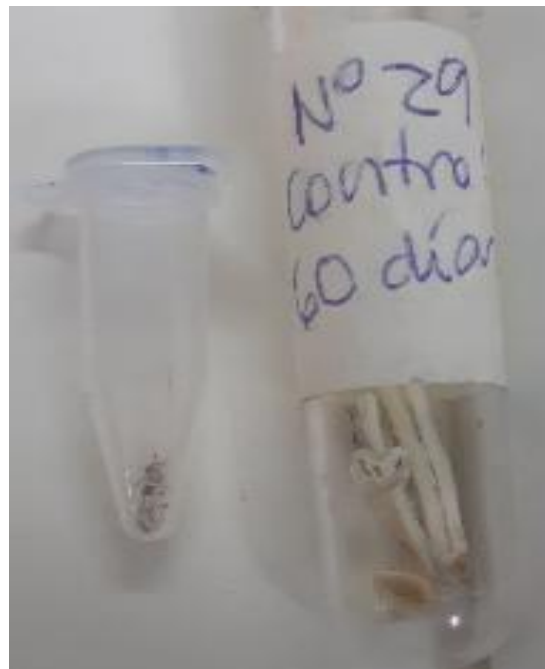


Figura XIII: Estado de la Pulpa de las muestras de control a temperatura ambiente.

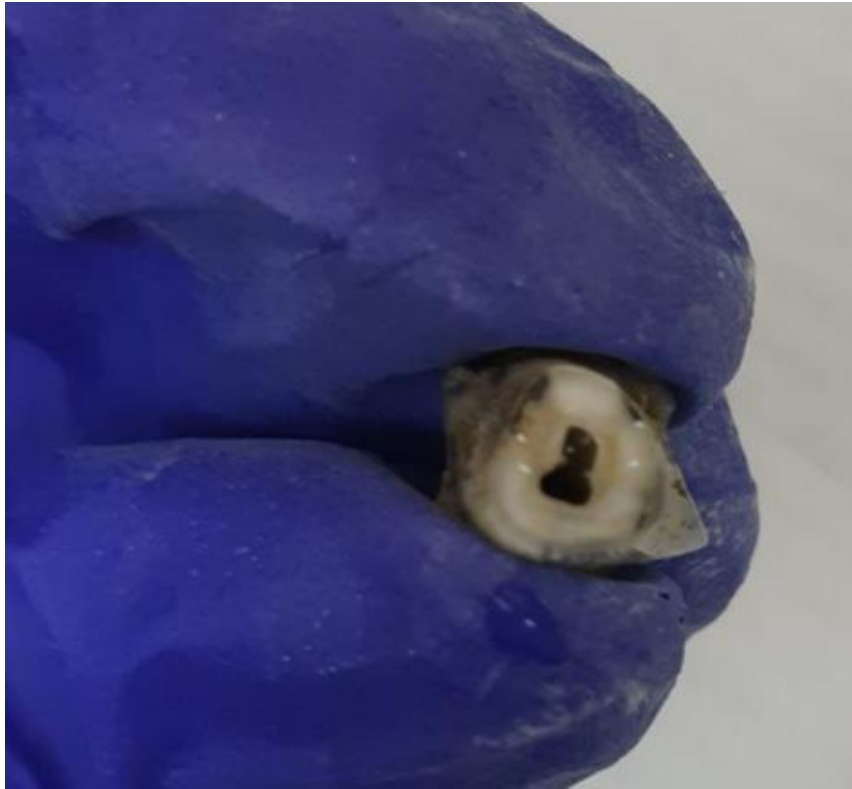


Figura XIV: Estado de la Pulpa en las muestras experimentales.



Figura XV: Mezcla de Pulpa dental, Buffer ATL y Proteinasa K

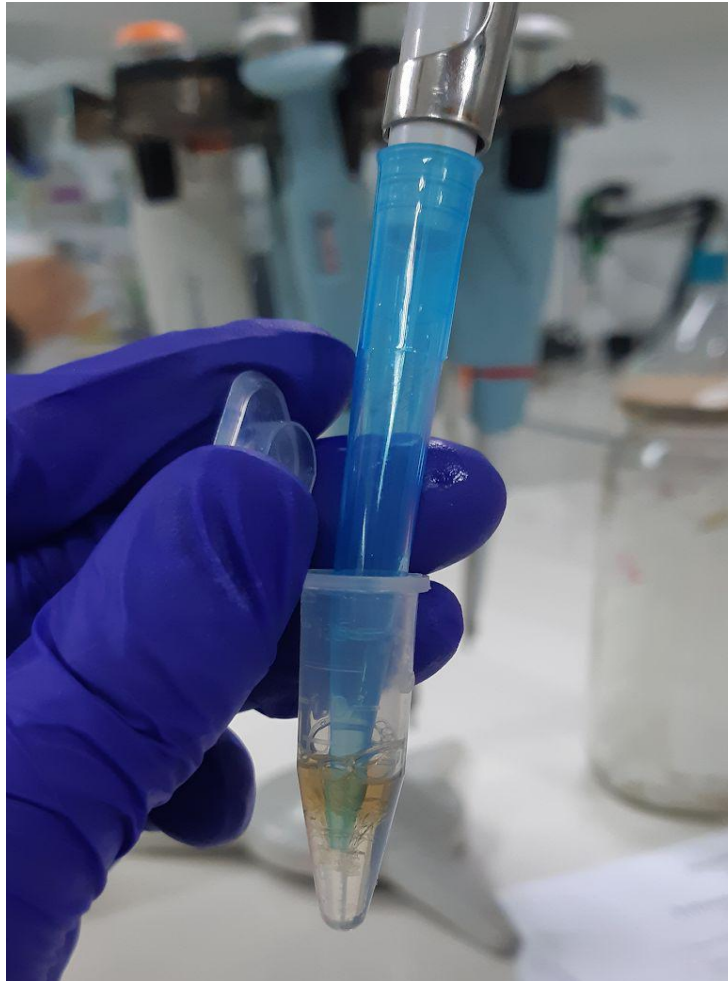


Figura XVI: Mezcla con RNAsa A segundo día de análisis.

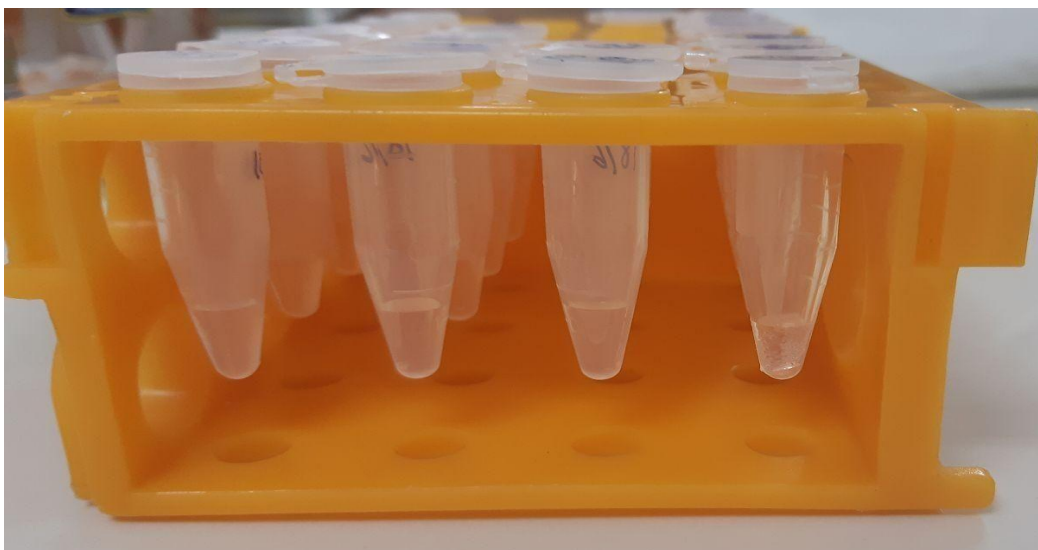


Figura XVII: Muestras con el ADN de los Dientes de Bovino.

Anexo 5: Fluorómetro, Electroforesis y PCR.



Figura XVIII: Se agrega 199 uL del Quantifluor ONEds DNA y se cuantifica el ADN.

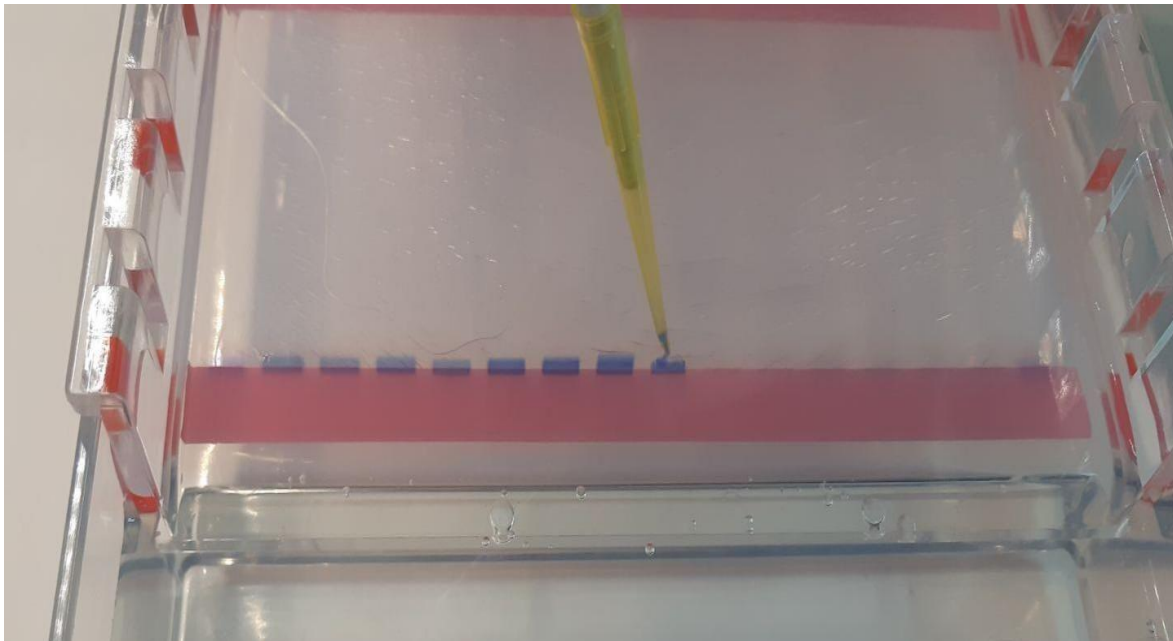


Figura XIX: Se agrega ADN en las celdillas del Gel de Agarosa para realizar la electroforesis.

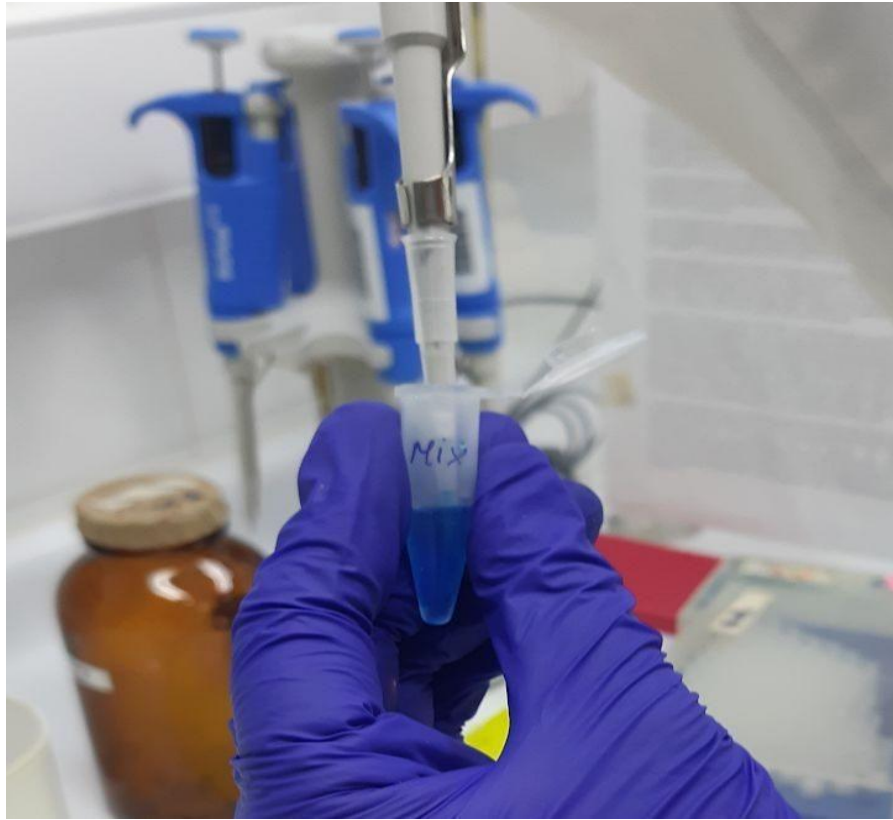


Figura XXI: Preparación del Mix para análisis de PCR.



Figura XXII: Distribución del Mix en cada una de las muestras de ADN.

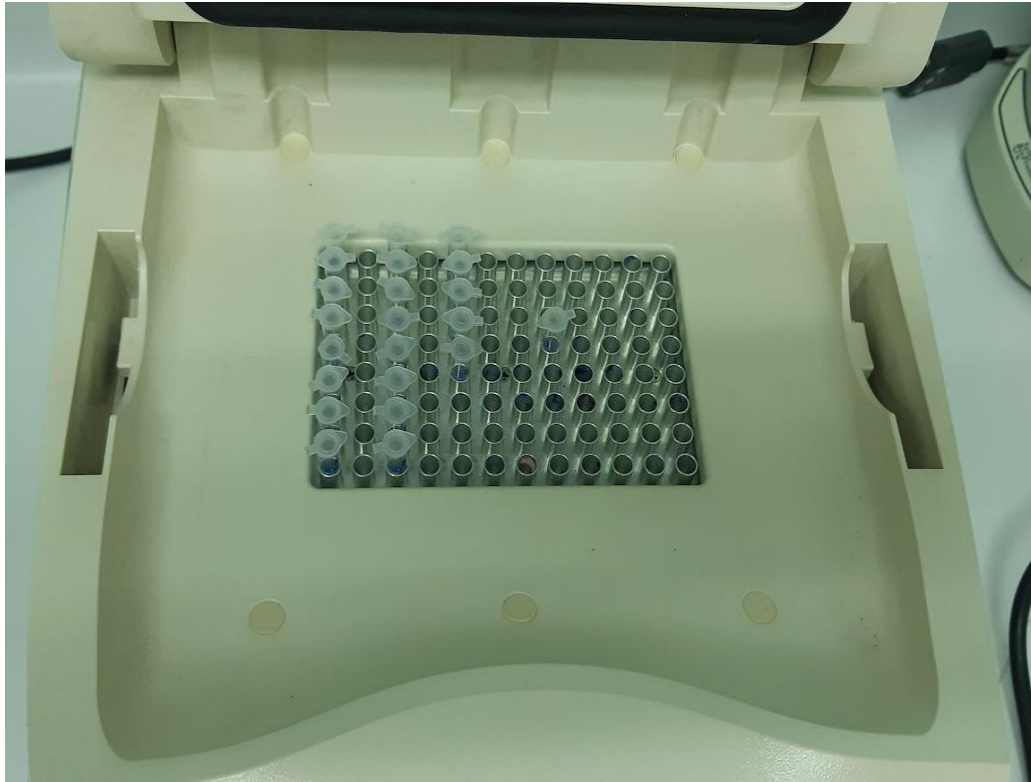


Figura XXIII: Posicionamiento de las muestras en el Termociclador.