



**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL  
O NUCLEAR DE LA PULPA DENTAL UTILIZADA EN LA IDENTIFICACIÓN EN  
ODONTOLOGÍA FORENSE**

Trabajo de Investigación  
requisito para optar al  
Título de Cirujano Dentista

**Alumnas:** Camila Barrios García  
Daniela Cadenas Sarmiento  
Macarena Garrido Díaz

**Docente Guía:** Prof. Dr. Jaime Barraza Mesquida  
Dr. Mario Párraga San Román

## **DEDICATORIA**

Le dedico este trabajo a todas las personas que siempre creyeron en mí, incluso cuando ni yo misma lo hacía, que estuvieron conmigo tanto en los buenos como malos momentos y contribuyeron a que pudiera alcanzar mis metas. Se lo dedico a mis padres por todo su esfuerzo y sacrificio para que hoy yo esté culminando mi carrera universitaria, también a mi familia. A mis amigas por su entrega de ánimo incansable y por vivir mi alegría como suya. A Cristóbal por haberme alentado a volver a estudiar, por apoyarme incondicionalmente y ser el mejor compañero para afrontar este desafío que hoy ve sus frutos gracias a nuestro gran trabajo en equipo. A la familia Arancibia por ser un pilar fundamental para llevar a cabo este proceso. A mi abuela que está en el cielo quien hizo posible esta última etapa universitaria y que sé siempre está caminando a mi lado. En especial quiero dedicar este manuscrito a mi hija Julieta por su comprensión y paciencia que hizo posible sacar adelante mi carrera universitaria y mi tarea como mamá, porque aún siendo una niña me dió su apoyo y me llenó de alegrías en los momentos difíciles, por ser mi motor, mi esperanza, mi mayor razón para dar siempre lo mejor de mí y por ser la mejor hija que puede existir.

***Camila Barrios García***

Llegó el día,

partamos por el origen.

A mi familia: Él árbol resiste por sus raíces

A mis amigas y amigos: Él árbol crece por el sustrato

A los docentes que dejaron huella en mí: La vida crece bajo buena sombra

Familia humana y no humana, amigos, amigas. Muchas gracias. Son el micelio de esta seta que recién emerge.

Son Amor

No podría ser “yo” si no escribo esta dedicatoria a última hora bajo la presión del planeta Venus. Ante y por sobre todo, doy las gracias a mi chistosa y amorosa familia por los tecitos y cafecitos encuarentenados, chocolates perdidos, cariño, ánimo y apoyo. Adriana, Mabel, Milton, Paulina y Eliseo, si ríen, río, reímos, son la dentina de mi esmalte, sin ustedes no tendría sustento y me fracturaría (que ñoña). Esta dedicatoria es por y para ustedes. También a mis amistades, las que fueron y son, gracias por comprenderme siempre que no pude acompañarles y acompañarme cuando yo no lo hice con ustedes, en tiempos de pandemia estuvieron en la base de la montaña esperándome a que bajara victoriosa de la hazaña con el mejor premio de todos, los memes. A cada estudiante de Odontología de esta facultad, solo ustedes entienden la dicha de finalizar este proceso lleno de obstáculos. A quienes me quieren sé que entenderán que no puedo dejar de mencionar artilugios que hicieron la tesis más amigable. Al delfín masajeador por preservar la movilidad de mi brazo, a todas las canciones que me acompañaron, el calefactor de pies que fue un compañero de noches en vela, la tacita del Colo-Colo, y como no mencionarte a ti querida amiga Alexandra Elbakyan, por ser una mujer de ciencia y pirata del océano de conocimientos, pusiste a nuestra disposición todos los artículos que requerimos para este trabajo, sin ti, nada hubiera sido posible.

***Daniela Cadenas Sarmiento***

Durante el recorrido de mi carrera universitaria y desarrollo de la tesis, pasé por altos y bajos rescatando siempre una enseñanza, lo que me hizo crecer como persona y profesional en donde mi familia y amigos estuvieron para apoyarme en todo camino. Por lo que dedico esta tesis primero a mi padre por apoyarme siempre, enseñarme sobre la responsabilidad y constancia para lograr mis metas. A mi madre por escucharme, teniendo una palabra de aliento cuando las cosas no iban bien y enseñarme a ser más tolerante. Gracias a ambos por entregarme los valores que me guiaron a convertirme en la persona que soy hoy, ser un apoyo fundamental entregándome su amor cada día y siempre creer en mí. También quiero agradecer a mi hermano, por ser un pilar importante en mi vida, transmitiéndome siempre buenas energías con una sonrisa y enseñándome lo importante que es ver el lado bonito de la vida. A mis abuelos que siempre me demuestran su amor y orgullo. Y finalmente a mis amigos de la vida y universitarios por convertir la Universidad en una linda experiencia.

***Macarena Garrido Díaz***

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecemos a nuestros profesores por realizar esta tesis junto a nosotras y a pesar de los cambios de planes debido al particular e histórico contexto apoyarnos y poder llevar a cabo este nuevo desafío de la mejor forma

Al Dr. Jaime Barraza por motivarnos a realizar esta tesis en el área de la Odontología forense, transmitirnos su pasión sobre el tema y creer en nosotras profesionalmente, siempre regalando palabras de aliento.

Al profesor Mario Párraga por ser uno de los pilares fundamentales de este trabajo. Desde el primer día nos acogió en su laboratorio con la mejor disposición, compartiendo desinteresadamente su tiempo, consejos y conocimientos en un área desconocida para nosotras. Agradecemos su compromiso, las clases sobre ADN y PCR, las reuniones de zoom, sus rápidas respuestas ante las dudas más ingenuas y por valorar nuestro esfuerzo.

A la Dra. Yamila Oliva y Dra. Hanna Molina por abrirnos el camino al que fue en un momento el desconocido mundo de la Odontología Forense.

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.

Al Dr. Miguel Ángel Muñoz, por todas las simpáticas reuniones, correcciones y confianza en nuestro trabajo.

No podemos omitir a Alexandra Elbakyan, que nos permitió acceder a todos los artículos utilizados en esta tesis.

Sin duda el resultado de esta tesis que construimos con mucho trabajo, esmero y cariño no hubiera sido el mismo sin su apoyo. A todos ustedes, muchas gracias.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
2.1 General	3
2.2 Específicos	3
<b>3 MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
3.1 Ácido desoxirribonucleico (ADN)	4
3.2 Dientes	6
3.2.1 Generalidades e histología	6
3.2.2 Factores que influyen en volumen pulpar	6
3.3 Metodología	7
3.3.1 Descontaminación	8
3.3.2 Extracción pulpar	10
3.3.3 Extracción de ADN	10
3.3.4 Amplificación	13
3.4 Condiciones <i>post mortem</i>	15
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
4.1 Estrategia de búsqueda	18
4.2 Criterios de selección y exclusión	19
4.2.1 Criterios de exclusión	19
4.2.2 Criterios de selección	19
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>20</b>
<b>6 DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
6.1 Condiciones <i>post mortem</i>	30
6.1.1 Temperatura ambiente	30
6.1.2 Bajas temperaturas	32
6.1.3 Sumergidos	33
6.1.4 Enterrados	33
6.1.5 Incinerados	35
6.2 Factores inherentes al diente	37
6.2.1 Tipo de diente	38

6.2.2	Edad	39
6.2.3	Integridad del diente	40
6.2.4	Dientes temporales	41
6.3	Factores inherentes a la metodología	43
6.3.1	Descontaminación	43
6.3.2	Extracción pulpar	45
6.3.3	Extracción de ADN	48
6.3.4	Amplificación del ADN	51
<b>7</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>57</b>

<b>Tabla I:</b>	Estrategia de búsqueda con las palabras clave utilizadas en las bases de datos PubMed .....	18
<b>Tabla II:</b>	Estrategia de búsqueda con las palabras clave utilizadas en las bases de datos SCOPUS .....	18
<b>Tabla III:</b>	Criterios de inclusión y exclusión en búsqueda PubMed y Scopus .....	19
<b>Tabla IV:</b>	Resumen de los principales resultados de la revisión. ....	29
<b>Tabla V:</b>	Estudios que mencionaron uno o más métodos de descontaminación .....	43
<b>Tabla VI:</b>	Métodos de extracción pulpar utilizados por distintos estudios .....	46
<b>Figura 1:</b>	Algoritmo de búsqueda, selección y resultados de artículos .....	21
<b>Figura 2:</b>	Factores que influyen en la cantidad y calidad del ADN discutidos en la revisión .....	22

## **RESUMEN**

La ciencia forense califica al diente como una de las fuentes más confiables para la obtención de ADN, siendo la pulpa la elegida para extraerlo y usarlo en identificación de cuerpos debido a que preserva mejor el material genético por estar protegida por tejido mineral. No obstante, la influencia de diferentes factores en la cantidad y calidad del ADN pulpar ha sido poco abordada. El objetivo de este artículo fue realizar una revisión crítica de la literatura identificando las condiciones post mortem, los factores inherentes al diente y las metodologías que podrían afectar la cantidad y calidad del ADN pulpar. Se realizó una búsqueda sistemática en dos bases de datos (Pubmed y Scopus). Se revisaron 28 artículos de investigación que fueron discutidos críticamente. Se evaluaron una serie de factores inherentes al entierro, inmersión e incineración. En cuanto a los factores inherentes al diente se incluyeron tipo de diente, edad, integridad y dientes temporales. Y, con respecto a la metodología se abarcó la descontaminación de la muestra, la extracción pulpar y la extracción del ADN para finalmente a partir de esta analizar la amplificación del ADN. Se concluyó que las condiciones post mortem son las que más influyen en la cantidad y calidad del ADN pulpar. A pesar de ello, el material genético de la pulpa dental fue suficiente para la identificación reafirmando al diente y la pulpa como una excelente fuente de ADN para identificación de personas en casos forenses.



## **ABSTRACT**

In forensic sciences, teeth are rated as one of the most reliable sources for DNA extraction. Moreover, dental pulp is the key dental tissue chosen for DNA extraction used for corpse's identification. This is because pulpar DNA is best preserved from environmental conditions as it is protected by surrounding hard mineral tissue. However, a topic that has been little addressed is the influence of different factors on the quantity and quality of pulpar DNA that may be extracted. The objective of this article was to carry out a critical review of the current literature identifying the post-mortem conditions, the inherent factors to the teeth, and the methodology that could affect the quantity and quality of pulpar DNA. A systematic search was carried out in two databases (Pubmed and Scopus) to identify studies that dealt with the influence of these variables on the quantity and quality of pulpar DNA. In this work, a total of 28 research articles were reviewed and critically discussed. A series of factors inherent to burial, submersion and incineration were evaluated. Regarding those factors inherent to the teeth, the type of tooth, age, integrity and temporary teeth were included. Regarding methodology, sample decontamination, pulp and pulpar DNA extraction and finally DNA amplification were covered. Our conclusion stands that different post-mortem conditions are the ones that most influence the quantity and quality of pulpar DNA, despite pulpar DNA was always enough for corpse identification purposes. This fact strongly supports the initial idea that teeth and dental pulp were an excellent source of DNA for corpse's identification in forensic cases.

## 1. INTRODUCCIÓN

La odontología forense es un tópico relevante en diferentes investigaciones<sup>1</sup>, considerándose como uno de los métodos más confiables y económicos de identificación<sup>2</sup>, que permite el reconocimiento mediante registros dentales, análisis de restauraciones, prótesis removibles, radiografías, marcas de mordida y fotografías intraorales<sup>3</sup>. Se sabe que en caso de que los dientes se encuentren en mal estado o no existan registros dentales antemortem los investigadores confían en el análisis molecular del ADN<sup>4</sup> para el cual los dientes califican entre las mejores fuentes<sup>5</sup> y específicamente la pulpa debido a que está protegida por tejidos blandos y mineralizados circundantes<sup>6</sup>.

El análisis del ADN pulpar se basa en el tamaño y/o la secuencia de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR). Esta técnica es sensible a la cantidad y al estado en que se encuentre el ADN a amplificar pudiendo generar una amplificación deficiente por daño o fragmentación del ADN. Las alteraciones del ADN podrían deberse a la influencia de múltiples factores que afectarían su cantidad/calidad, que deben ser identificados y considerados para poder optimizar los análisis genéticos. Entre estos factores se encuentran: (1) las condiciones *post mortem* como el intervalo de tiempo, las condiciones ambientales y las temperaturas extremas a las que se ven expuestas las muestras (2) las características inherentes a las muestras dentales como la morfología, el tipo de dentición, la edad cronológica y el estado patológico (3) las metodologías de procesamiento y análisis de la muestra como la amplificación, descontaminación, extracción pulpar y del ADN. Existen pocos estudios<sup>7, 8</sup> que han intentado resolver esta problemática y además son de baja evidencia. Estos estudios revisan las variables nombradas anteriormente por separado y/o no centran su análisis específicamente en el ADN pulpar, por lo que se considera que en la actualidad estos factores que pueden afectar la cantidad y calidad del ADN pulpar en restos dentales no están ampliamente comprendidos.

En nuestro país la odontología forense es una disciplina en desarrollo y no existe tanta información sobre ello por lo que contar con mayor investigación respecto a las distintas variables que afectan el contenido de ADN pulpar podría contribuir a una toma de decisiones más informada sobre la selección óptima de muestras y los métodos más apropiados para tratarlas, a fin de maximizar la tipificación del ADN y conseguir éxito en la identificación personal. Así, los conocimientos aportados podrían colaborar en los protocolos de las entidades legales de nuestro país con la finalidad de agilizar los procedimientos de reconocimiento, entregando un resultado certero y preciso cuando los cuerpos hayan sufrido daños que no permitan su identificación mediante los medios convencionales, beneficiando así a las familias afectadas por la pérdida de seres queridos.

Debido a la importancia del ADN para identificación, su relevancia social y la escasa evidencia sobre los factores que pueden afectar la cantidad y calidad del ADN pulpar dificultando su análisis y por consiguiente la identificación, el objetivo de esta revisión es resumir el conocimiento actual e identificar los diferentes factores en la cantidad y calidad del ADN pulpar examinando la influencia de: (a) condiciones *post mortem*, (b) factores inherentes al diente y (c) factores inherentes a la metodología.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 General**

El objetivo es realizar una revisión narrativa de la literatura científica con la finalidad de describir los factores que influyen en la cantidad y calidad del ADN pulpar dental utilizada en la identificación en odontología forense.

### **2.2 Específicos**

- a. Identificar las condiciones *post mortem* que influyen en la cantidad y calidad del ADN pulpar (nuclear y mitocondrial) usado en odontología forense.
- b. Identificar los factores inherentes al diente que influyen en la cantidad y calidad del ADN pulpar (nuclear y mitocondrial) usado en odontología forense.
- c. Identificar los factores inherentes a la metodología de extracción y muestreo de ADN que influyen en la cantidad y calidad del ADN pulpar (nuclear y mitocondrial) usado en odontología forense.

### **3 MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Ácido desoxirribonucleico (ADN)**

La odontología forense utiliza al Ácido Desoxirribonucleico (ADN) por su potencial para establecer el reconocimiento de la persona a partir de dientes dañados<sup>3</sup>. El ADN es la molécula que lleva codificada la información genética característica de los diferentes seres vivos. Está constituida por una doble cadena<sup>9</sup> y se puede encontrar tanto en el núcleo (ADN nuclear) como en las mitocondrias (ADN mitocondrial)<sup>3</sup>. El ADN nuclear humano es un ADN lineal y hay una copia completa de este ADN nuclear por célula del organismo<sup>10</sup>. Esto representa una copia genómica por célula con la característica que se degrada en el tiempo<sup>3</sup>. Por otro lado el ADN mitocondrial (ADN mit) está formado por una molécula circular y se encuentra en múltiples copias<sup>11</sup> en cada mitocondria, habiendo múltiples mitocondrias por célula. Se caracteriza por ser heredado exclusivamente por vía materna<sup>12</sup>.

Por otro lado, es importante entender cómo el ADN es usado como huella genética. Los perfiles del material genético usados para la identificación de personas se encuentran en regiones no codificantes del ADN<sup>13</sup>, siendo las “Repeticiones Cortas en Tándem” (STR), también conocidas como regiones de ADN microsatélite, las de mayor interés en genética forense<sup>12</sup>. Esto porque son marcadores que se localizan en zonas con alta recurrencia de mutaciones, siendo regiones totalmente desiguales en individuos no relacionados por parentesco. Sin embargo, son regiones con un grado de identidad importante en individuos relacionados por parentesco siendo el grado de identidad mayor cuanto más directa es la relación de parentesco teniendo un alto poder de identificación<sup>13</sup>, a tal punto que constituyen prueba válida admitida en juicios legales, por ejemplo de paternidad. En otro ámbito, el cromosoma “Y” es parte del genoma nuclear específico en hombre que se transmite exclusivamente por vía paterna a la descendencia de hombres permitiendo trazar linajes paternos de varias generaciones. Sin embargo, esto no permite diferenciar genéticamente a los miembros de una familia que compartan la misma línea paterna<sup>12</sup>.

En 2002 Silva y Passos expusieron que en el caso de muestras de ADN demasiado pequeñas o degradadas como las obtenidas de tejidos antiguos como los dientes<sup>13</sup>, la probabilidad de obtener un perfil de ADN a partir del ADN mitocondrial es mayor que con cualquier marcador encontrado en el ADN genómico<sup>14</sup> debido a la gran cantidad de copias que contiene<sup>11</sup>. A esto se suma la variabilidad genética<sup>12</sup> y la menor susceptibilidad a modificaciones químicas y físicas<sup>3</sup> que incrementan la probabilidad de que algunas de ellas se conserven íntegras en el tiempo sin sufrir afecciones por los procesos de degradación. Dentro de las zonas no codificantes del ADN mitocondrial destaca el lazo D-loop que presenta una tasa de mutación 5 veces mayor que el resto del genoma mitocondrial, razón por la que recibe el nombre también de región hipervariable. En este lazo-D existen dos subregiones muy hipervariables denominadas región hipervariable 1(HV1) y 2(HV2) estudiadas habitualmente en los laboratorios forenses, ya que por su alta variabilidad son idóneas para la diferenciación entre líneas familiares y los estudios de parentesco. El ADN mitocondrial se hereda exclusivamente por linaje materno<sup>15</sup>. Esta propiedad es extremadamente útil en los casos de identificación de cadáveres en los que no se dispone de muestras de familiares próximos y se tiene que recurrir a familiares lejanos emparentados por vía materna. Hay que destacar que su principal desventaja es que no permite la identificación de individuos, sino que solo permite establecer parentesco<sup>11</sup> materno a diferencia de los perfiles genéticos obtenidos mediante el análisis de regiones STRs en los cromosomas del ADN nuclear, que ofrecen un mayor poder de discriminación individual, alcanzando índices de identificación en los que la frecuencia de aparición del perfil en la población es tan baja que hace teóricamente imposible la existencia de un segundo individuo no relacionado genéticamente con el mismo perfil de ADN<sup>12</sup>

## **3.2 Dientes**

### **3.2.1 Generalidades e histología**

Los dientes son estructuras que se encuentran en la cavidad oral insertos en los alvéolos, cavidades cónicas del hueso alveolar que forma parte de los huesos maxilares. Anatómicamente los dientes se dividen en dos secciones: 1) la corona que es la porción libre que se encuentra en boca y 2) la(s) raíz(ces) que son las estructuras que se alojan en el hueso<sup>6</sup>.

Histológicamente los dientes están formados por cuatro tejidos diferentes. (1) El esmalte, es una matriz altamente mineralizada que recubre la porción coronal y está compuesta por cristales de hidroxiapatita constituidos por fosfato de calcio y organizados en prismas altamente empaquetados, que lo hace el tejido más duro del organismo. Su permeabilidad es extremadamente escasa como consecuencia de la continua captura de ciertos iones desde la saliva, volviéndolo más resistente y menos soluble<sup>6</sup>, protegiendo a la pulpa de condiciones adversas y constituyendo un elemento protector ante cualquier factor degradante del ADN, como la humedad, las temperaturas extremas y la acción de hongos y bacterias<sup>16,17</sup> favoreciendo así una mejor preservación. 2) La dentina, es un tejido mineral conectivo que constituye el mayor volumen del diente, su espesor varía según el tipo de diente y se compone por cristales de hidroxiapatita y túbulos dentinarios. Esta presenta una dureza menor y mayor permeabilidad respecto al esmalte. 3) La pulpa, es el único tejido blando del diente, se aloja en la cavidad pulpar y está recubierta totalmente por dentina<sup>6</sup>. Es el tejido preferido para la extracción de ADN por ser altamente celular y presentarse en mayor cantidad en comparación a otras estructuras dentales<sup>18</sup>. La densidad celular es mayor en la corona y disminuye en la zona radicular. 4) El cemento, es un tejido que cubre la dentina radicular y tiene una dureza menor que el esmalte y la dentina<sup>6</sup>.

### **3.2.2 Factores que influyen en volumen pulpar**

#### **a) Tipo de diente**

Los seres humanos contamos con dos tipos de dentición, la temporal y la definitiva. Esta última se compone por 4 tipos de dientes. Los incisivos y los caninos con una

raíz, los premolares (no se encuentran en la dentición temporal) con una o dos raíces y los molares con 2 o más raíces<sup>19</sup>, siendo los multirradiculados los menos propensos a desalojarse del alveolo en el periodo post-mortem<sup>20</sup>, por lo que el ADN pulpar de estos dientes y los que se encuentran sin erupcionar<sup>14</sup> reciben protección adicional por el hueso alveolar y maxilar<sup>5</sup>. En ambas denticiones el volumen pulpar dependerá del tipo de diente<sup>6</sup>, siendo proporcionalmente mucho mayor en dientes temporales<sup>21</sup>. En dientes adultos el volumen pulpar es de 0,02 ml. aproximadamente<sup>22</sup>

#### **b) Edad**

Con la edad se produce una aposición dentinaria y obliteración de los túbulos dentinarios con cristales de fosfato de calcio, lo que produce una disminución del tamaño de la cavidad pulpar y por ende de su volumen<sup>6</sup>.

#### **c) Integridad del diente**

La pérdida de la integridad del diente es consecuencia de patologías orales<sup>23</sup>, siendo la más prevalente la caries dental<sup>24,21</sup>, que diluye y destruye localmente los tejidos calcificados de los dientes<sup>25</sup>, facilitando vías de entrada para microorganismos y toxinas hacia la pulpa dental que podrían comprometer su integridad repercutiendo en el ADN. Entre los microorganismos de la microbiota oral el *Streptococcus mutans* ha sido implicado en la patología cariogénica y se ha demostrado la existencia de una microbiota compleja con diferentes géneros y especies involucradas en esta patología<sup>26</sup>. Por otro lado, el complejo dentino-pulpar responde a estas agresiones obliterando los túbulos dentinarios para proteger el tejido pulpar provocando retracción pulpar<sup>25, 6</sup> y por tanto disminuyendo su volumen.

### **3.3 Metodología**

La metodología utilizada para obtener el ADN pulpar para análisis genético implica tanto la selección y pretratamiento de la muestra como la extracción de la pulpa y el material genético<sup>5,7</sup>. Las técnicas utilizadas en el proceso se enfocan en maximizar el rendimiento del ADN y el éxito del perfil genético minimizando los daños a la muestra y la necesidad de protocolos de muestreo y extracción de ADN laboriosos<sup>5</sup>.



### **3.3.1 Descontaminación**

Si bien los dientes presentan una menor porosidad estructural y mayor resistencia a la contaminación<sup>27</sup> no están exentos de sufrirla, siendo este uno de los problemas metodológicos a superar en los análisis genéticos, ya que pueden conducir a falsos positivos y resultados erróneos. Ante esto, previo a la extracción del ADN, los dientes deben ser sometidos a procesos de descontaminación destinados a eliminar contaminantes ambientales, microorganismos y ADN exógeno<sup>7,28</sup>. Existen diversas fuentes de contaminación que podrían interferir con el análisis genético y se pueden clasificar en: (1) contaminación por contacto de la superficie del diente en cualquier momento previo a la extracción del ADN, (2) reactivos, instrumental e insumos de laboratorio contaminados de fábrica, y (3) transferencia involuntaria de ADN durante el curso del análisis genético<sup>28</sup>.

La evidencia señala diversos métodos para eliminar, minimizar o excluir los contaminantes de la superficie de las muestras<sup>5,7,28, 29</sup>. Según Kemp<sup>28</sup>, estos métodos incluyen: Lavar o eliminar físicamente la superficie del diente; exposición o lavado de la superficie dental con ácido, etanol, peróxido de hidrógeno o hipoclorito de sodio; irradiación de la muestra con luz ultravioleta (UV), o combinaciones de 2 o más métodos. En orden decreciente los métodos más utilizados son: remoción de la superficie, lavado o inmersión en hipoclorito de sodio e irradiación con luz UV<sup>7,28</sup>, por lo que se profundizará en estas técnicas.

#### **a) Técnica simple de limpieza**

Este grupo abarca diferentes técnicas de limpieza no invasivas de remoción mecánica, como cepillado o raspado ligero de las superficies y/o limpieza o inmersión con agua destilada o solución salina<sup>7</sup>. Además, son los métodos más utilizados en la literatura.

#### **b) Hipoclorito de sodio**

El hipoclorito de sodio disuelve los tejidos blandos y destruye el ADN proporcionalmente a la concentración, volumen y tiempo de exposición a la solución<sup>29</sup>. Su mecanismo de acción destruye el ADN expuesto a través de daño oxidativo, productos de base clorada y modificación de las bases nitrogenadas, produciendo

escisión y fragmentación de las hebras hasta obtener finalmente bases individuales<sup>28</sup>. Se sospecha que el hipoclorito de sodio destruye el ADN exógeno y no así el endógeno. Sin embargo, la literatura no ha especificado el grado de penetración de este contaminante en el tejido dental, por lo que no se puede concluir que el ADN pulpar no se ve afectado en cantidad y calidad<sup>29</sup>.

### **c) Radiación UV**

La irradiación con luz ultravioleta es muy utilizada, aunque la mayoría suele considerarla complementaria a las otras técnicas<sup>5,7</sup>. Los equipos utilizados liberan dosis determinadas de radiación UV, suficientes para eliminar microorganismos y material genético rompiendo las cadenas de ADN, lo que lo hace un método de descontaminación efectivo<sup>30</sup>.

### **d) Dientes antiguos**

Las muestras arqueológicas o muy antiguas requieren de rigurosos protocolos debido al mayor riesgo de contaminación<sup>31</sup>. Estos contemplan la separación física y limpieza específica de las áreas del laboratorio, limpieza del material empleado, manejo aséptico de reactivos<sup>7</sup>, evaluación y aplicación de criterios de autenticación a lo largo de todas las etapas a modo de evitar que los técnicos que manipulan el ADN antiguo lo contaminen con su propio material genético<sup>7,31</sup> y el procesamiento exclusivo de ADN antiguo en sus laboratorios con el fin de minimizar el riesgo de que productos de PCR de ADN modernos se mezclen con muestras de ADN antiguo<sup>31</sup>.

### **e) Descalcificación**

Algunos estudios realizan un proceso de descalcificación de los tejidos mineralizados, basándose en que el ADN dental está estrechamente unido a agregados cristalinos densos y sin este proceso no sería liberado el material genético<sup>32</sup>. Esta desmineralización se lleva a cabo mediante lavados con EDTA, el cual disuelve la matriz mineral a través de quelación de sales iónicas de calcio<sup>7</sup>, para el posterior procedimiento de digestión enzimática de la matriz orgánica<sup>33</sup> con proteinasa K. Dichos procedimientos se pueden realizar por separado o en uno solo paso<sup>34</sup> como lo hacen

hoy en día la mayoría de los protocolos, que no usan EDTA por separado por el riesgo de eliminar el posible ADN libre<sup>7</sup>.

### **3.3.2 Extracción pulpar**

Por las características del ADN de muestras forenses cualquier pérdida o contaminación puede ser perjudicial en el análisis del mismo, por este motivo, tanto el cuidado como el mantenimiento de estas muestras se hace fundamental<sup>35</sup>.

Se han descrito dentro de la literatura diferentes técnicas para acceder a la pulpa con el fin de recolectar el ADN. Antiguamente la técnica más común fue la trituración, considerada muy destructiva<sup>18</sup> ya que rompía completamente el diente <sup>22</sup>. Al pasar los años, aparecieron técnicas más conservadoras para proteger la integridad del diente, como la de acceso endodóntico oclusal o el seccionamiento del diente, que minimizan la destrucción dental<sup>18</sup>.

Dentro de las técnicas de seccionamiento del diente se describen la técnica de sección longitudinal o corte vertical que utiliza un disco o sierra muy delgada<sup>35</sup>. Y la técnica de corte horizontal a nivel del límite amelocementario o corte cervical, que permite acceder a la cavidad pulpar de manera más directa ya que divide al diente en 2 partes anatómicas bien diferenciadas<sup>17</sup>.

La técnica de acceso endodóntico convencional o perforación oclusal, es un procedimiento que consiste en la perforación de la superficie oclusal para acceder a la cámara pulpar y a los conductos radiculares con una fresa de alta velocidad con sistema de refrigeración para no producir calor, recolectando la pulpa con instrumentos endodónticos estériles<sup>18,36, 27</sup>. Esta metodología se utiliza actualmente en odontología al ser un procedimiento más fácil<sup>17</sup>.

Otra técnica menos mencionada en la literatura es la de fragmentación, que se describe como un golpe en seco al diente para poder obtener la pulpa de su interior<sup>24</sup>.

### **3.3.3 Extracción de ADN**

El proceso de extracción de ADN consta de 3 grandes etapas: lisis (celular y desnaturalización de proteínas), purificación (eliminación de contaminantes químicos

y biológicos) y recuperación del ADN. La etapa de lisis se encuentra presente en todos los métodos de extracción de ADN por ser considerado un paso crítico en la recuperación. En la etapa de purificación se encuentra mayor variabilidad en los protocolos debido a que se emplean diferentes estrategias según los compuestos biológicos y químicos de la muestra<sup>37</sup>. Y en la última etapa, la de recuperación es la más homogénea entre protocolos ya que consiste en la mayoría de los casos en una precipitación con sales y alcohol<sup>40</sup>.

Existen diferentes métodos de extracción de ADN con diversos protocolos de ejecución, entre ellos el ampliamente utilizado método orgánico (fenol-cloroformo) y las resinas quelantes (sílice), preferidos en extracción de ADN de dientes humanos<sup>5</sup>. También se han incorporado otro tipo de resinas (Chelex), sistemas de cuentas magnéticas y el uso de dispositivos de ultrafiltración<sup>7</sup>. A continuación, se detallan aquellos mayormente empleados:

#### **a) Protocolo Fenol-cloroformo**

En este protocolo las muestras son digeridas con proteinasa K y un detergente como dodecilsulfato sódico (SDS). Al material resultante se le agrega una solución de fenol-cloroformo que separa el ADN de los compuestos orgánicos, generando 2 fases; (1) la que contiene los compuestos orgánicos que es descartada y (2) la fase acuosa que contiene el ADN que es trasvasada a un tubo limpio. En la fase de recuperación y concentración del ADN, el protocolo estándar realiza la precipitación con acetato amónico y etanol frío, pero actualmente los protocolos implementan sistemas de filtración por centrifugación y la concentración del ADN se consigue por el uso de dispositivos de ultrafiltración<sup>7</sup>.

#### **b) Protocolo Sílice.**

El método clásico consiste en agregar una solución de digestión de proteinasa K a la muestra. A ese contenido digerido se le añade una solución de sal de tiocianato de guanidinio (GuSCN)<sup>7</sup> que se une al ADN de forma altamente específica, previniendo la co-extracción de inhibidores<sup>38</sup>. Para permitir la precipitación del material genético, a dicha mezcla se le agrega sílice<sup>7</sup> que se une al ADN dependiendo del pH, lo que se

debe tener presente cuando se usan sustancias que lo puedan afectar, ya que un pH sobre 7.5 reduce drásticamente la recuperación de ADN<sup>39</sup>. La fase no precipitada es descartada y se procede a la purificación del precipitado de sílice con lavados con solución etanólica (EtOH 50%, NaCl y EDTA), para finalmente eluir el ADN retenido en la sílice con tampón TE (tris-cl, EDTA)<sup>7</sup>.

Cabe mencionar que hoy en día, a fin de simplificar y estandarizar el método, se utilizan columnas comerciales en las cuales se introduce la suspensión de sílice (o Glass-milk) y se hace pasar el digerido. Existe una variación de este método que no incluye la sal GuSCN y es el protocolo desmineralización-sílice, que consiste en la digestión total de la muestra con un tampón de desmineralización (EDTA, N-laurilsarcosinato sódico y proteinasa K) y, al igual que el protocolo convencional, se basa en la retención y eliminación de inhibidores mediante la purificación con sílice pero con dispositivos de ultrafiltración<sup>7</sup>. En la actualidad, este es el método más comúnmente usado.

### **c) Método de Chelex**

Uno de los métodos de extracción de ácido desoxirribonucleico que se ha utilizado en muchos laboratorios de ADN forense es la resina Chelex, que se realiza en un solo tubo. Chelex es una resina que contienen iones aminodiacetato que quelan de manera altamente específica<sup>40</sup> y fuerte<sup>41</sup> a los iones metálicos polivalentes<sup>40</sup>, como  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ , cofactores de DNAsas por lo que evitan que el ADN sea digerido por ellas <sup>42</sup>. El Chelex también se une a otras sustancias inorgánicas y elimina los inhibidores del extracto de ADN, mientras que su pH alcalino altera las membranas celulares resultando en la liberación de ADN<sup>40</sup>.

La técnica es simple y rápida y no involucra múltiples tubos de transferencia<sup>40</sup>, disminuyendo el número de pasos y el riesgo de contaminación<sup>42</sup>. Como desventaja se plantea que no tiene una acción selectiva sobre las proteínas por lo que puede ser poco fiable<sup>40</sup> y que la falta de purificación previa hace que sea ineficaz en la eliminación de los inhibidores de la PCR<sup>42</sup>.

### **3.3.4 Amplificación**

#### **a) Generalidades de la PCR**

El análisis de restos dentales ha sido facilitado en gran medida por la introducción de la amplificación del material genético gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>43,44</sup>, convirtiéndose en la técnica gold estándar en la literatura<sup>16,18,44,43,45,46,47</sup>.

La PCR es una técnica para la síntesis "in vitro" de secuencias específicas de ADN, siendo una forma simple y muy rápida de multiplicar el ADN dirigido por la enzima ADN polimerasa<sup>48</sup>, obteniéndose millones de copias de una determinada secuencia de ADN<sup>49</sup>. Este proceso consta de 3 pasos (1) Desnaturalización, donde se incuba a alta temperatura (90-98 ° C) y se separa la doble cadena del ADN. (2) Hibridación, donde a través de la disminución de la temperatura<sup>48</sup> (50°C-65°C) los cebadores se unen de forma complementaria a las regiones que flanquean el fragmento que se busca amplificar. Y finalmente, (3) el aumento<sup>49</sup> de la temperatura hasta llegar a la temperatura óptima para la ADN polimerasa, que llevará a cabo la incorporación de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) a la síntesis de ADN de 5' a 3' dirigida desde cebadores, utilizando el ADN objetivo como molde<sup>48</sup>.

#### **b) Electroforesis y PCR convencional**

Una vez realizada la amplificación, es importante comprobar su efectividad por medio de la electroforesis, técnica que permite visualizar el conjunto de moléculas de ADN resultante (amplicones) separadas por peso molecular a través de geles de agarosa. Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular a modo de control, que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos para determinar la especificidad de la reacción<sup>50</sup>. Finalmente, la visualización se logra tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV<sup>50</sup> para su análisis cualitativo y para su análisis cuantitativo por medio de la densitometría de la imagen obtenida<sup>51</sup>.

### **c) PCR tiempo real**

La técnica de PCR convencional como plataforma tecnológica ha sido muy revolucionaria pero requiere pasos adicionales como la electroforesis en gel para la visualización y posterior cuantificación del producto obtenido<sup>52</sup>. Sin embargo, esta cuantificación no es muy exacta dado que se hace al final de la reacción. Debido a esto, aparece como respuesta la PCR en tiempo real que presenta la ventaja de cuantificar mediante técnicas de fluorescencia el producto amplificado en la muestra al final de cada ciclo, monitoreando conforme transcurre la reacción, tiempo real, sin la necesidad de que sea manipulado posteriormente en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa<sup>50,52</sup>. Esto es una gran diferencia con la PCR convencional donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco<sup>50</sup>.

### **d) Aplicaciones y sensibilidad de la técnica**

Sus aplicaciones son variables e ilimitadas, ejemplo de ello que compete a esta revisión es el uso en la identificación de restos biológicos<sup>53</sup>, siendo una herramienta ideal para detectar moléculas de ADN antiguas<sup>54</sup> debido a que la PCR no requiere ADN endógeno de alto peso molecular para amplificar la secuencia diana, pudiéndose amplificar ADN parcialmente degradado y/o desnaturalizado<sup>55</sup>.

La especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la PCR se encuentra directamente influenciada por los diferentes componentes que la integran, como la mezcla de reacción, número de ciclos y la ADN polimerasa<sup>53</sup>. Esta es altamente sensible y a pesar de que permitiría fácilmente la amplificación del ADN contaminante generando falsos positivos, los protocolos de descontaminación aseguran que el ADN objetivo supere en cantidad al ADN contaminante. Sin embargo, siempre hay que seguir controles de contaminación efectivos<sup>54</sup>.

### **e) Inhibidores de la PCR**

Hay situaciones en las que el proceso de amplificación se ve comprometido debido a la presencia de contaminantes exógenos. Estos llamados inhibidores de la PCR son uno de los principales factores limitantes que pueden producir la degradación,

modificación del ADN e/o interferencia con ADN polimerasas termoestables<sup>56</sup> al momento de la identificación de las muestras forenses<sup>7</sup>. Estos inhibidores pueden ser provenientes: (1) del ambiente al que el diente estuvo expuesto (como bacterias, hongos, ácido húmico, ácido fúlvico, metales), (2) contaminantes propios de las muestras (como calcio y colágeno de dientes) o (3) productos de los procesos de extracción (como EDTA, fenol, cloroformo, cloruro de sodio y algunos detergentes). Todas estas sustancias si se extraen conjuntamente con el ADN endógeno pueden inhibir su amplificación<sup>5,32,38</sup>. Aunque existe una amplia gama de inhibidores, las identidades y modos de acción de muchos siguen sin estar claros<sup>57</sup> lo que puede ser un aspecto negativo de la PCR, ya que la mayoría de los problemas comúnmente reportados son resultado de falsos positivos debido a la contaminación cruzada<sup>58</sup>.

#### **f) Método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)**

Se ha desarrollado recientemente el método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Esta técnica, mediante 4 a 6 cebadores especialmente diseñados reconoce un total de 6 secuencias distintas en el ADN objetivo, actuando en un rango de temperatura estable entre 60°C a 65°C<sup>59</sup> y con la ayuda de la ADN polimerasa amplifica el ADN con alta especificidad, eficiencia y rapidez en condiciones isotérmicas<sup>60</sup>. Sumado a esto, presenta la ventaja de tener una mayor estabilidad frente a los inhibidores contenidos en las muestras biológicas que normalmente afectarían el desempeño de una PCR convencional, lo cual contribuye a ahorrar tiempo y a reducir costos en el procesamiento de las muestras<sup>59</sup>.

### **3.4 Condiciones *post mortem***

La odontología forense realiza la identificación por medio del material genético de tejidos dentales provenientes de cuerpos que han estado expuestos a diferentes ambientes y han iniciado su proceso de putrefacción.

Después de la muerte se comienza un proceso de descomposición, que produce cambios morfológicos e histológicos en tejidos como la pulpa dental. Estos fenómenos cadavéricos ocurren en una secuencia específica y a distintos ritmos<sup>61,62</sup> distinguiéndose 2 grupos: (1) la autólisis, que corresponde a los cambios químicos



tisulares y (2) la putrefacción, que es originada por microorganismos . En la autólisis, como consecuencia de la privación de oxígeno *post mortem*, se inhiben e inician fenómenos bioquímicos tisulares como los procesos fermentativos por acción de enzimas hidrolíticas del propio tejido que comienzan la degradación de la materia orgánica produciendo necrosis celular<sup>61,62</sup>. En cuanto a la putrefacción, la tasa de descomposición aumenta proporcionalmente con la invasión y la multiplicación de microorganismos anaerobios que liberan gases de olor pútrido que atrae una variedad de insectos<sup>61</sup>. Esto tiene como consecuencia la degradación del ADN, principalmente por la hidrólisis, la oxidación y la ausencia de mecanismos de reparación enzimática<sup>7,63</sup>. Durante el proceso de descomposición se produce la escisión del ADN en fragmentos y una pérdida acelerada de purinas de las cadenas del material genético que llevan a la modificación del mismo<sup>7</sup>. La velocidad y grado de descomposición del material genético es un proceso que puede tardar de semanas a años, dependiendo de factores endógenos y exógenos<sup>63</sup>, siendo las condiciones ambientales uno de los factores más determinantes<sup>61</sup>.

Se considera que la temperatura es el factor más influyente en la preservación del ADN<sup>7</sup> ya que determina la actividad de las enzimas, 37°C para las que son hidrolíticas y 25°C para las que son proteolíticas, por lo que en este rango de temperatura se produce el proceso de putrefacción que favorece la proliferación de microorganismos<sup>61,64</sup>. Por el contrario, a temperaturas más bajas se ralentizan las reacciones químicas que generan la degradación<sup>65</sup>, inhibiendo o minimizando la actividad microbiana y enzimática favoreciendo la preservación<sup>61</sup>.

En lo que respecta a los componentes del suelo se puede mencionar que en el abundan los ácidos húmicos y fúlvicos que se postula tienen una posible acción inhibitoria sobre las enzimas biológicas<sup>66</sup> y pueden acompañar al ADN en el proceso de extracción, siendo inhibidores muy potentes de la reacción de PCR<sup>67</sup>.

Los dientes de cuerpos que se ven expuestos a altas temperaturas se encuentran protegidos por los tejidos blandos de la cara, la lengua y los tejidos maxilofaciales<sup>68</sup>, que permiten que los dientes posteriores resistan más el daño térmico en comparación con los dientes anteriores que suelen presentar un mayor daño debido a que los labios

se retraen ante la exposición al fuego<sup>69</sup>. Las altas temperaturas producen la evaporación del agua y del material orgánico, llevando a un proceso de contracción de los tejidos dentales que provocará diversos cambios morfológicos tanto a nivel estructural como en la coloración del diente. El daño se definirá dependiendo de la temperatura aplicada, la forma en la que se aplica y el tiempo de exposición. Si el diente es quemado gradualmente el daño será mínimo, contrario a lo que sucede si se expone de manera rápida e intensa al calor, lo que provocaría una rápida evaporación del contenido orgánico ocasionando la separación de la capa de esmalte dejando que arda la dentina que está menos mineralizada<sup>70</sup>.

En cuanto a los cuerpos que se encuentran en ambientes húmedos o inmersos en agua, disminuye la probabilidad de preservar el ADN en cantidad y calidad en la pulpa dental<sup>65</sup>, debido a que el agua<sup>44</sup> favorece la degradación oxidativa e hidrolítica <sup>65</sup> acelerando la pérdida de proteínas. Además, el agua propicia el crecimiento de microorganismos que degradan el colágeno a través de enzimas proteolíticas posterior a la dilución del mineral a la que los dientes son resistentes<sup>71</sup>.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Estrategia de búsqueda

Para elaborar esta revisión de la literatura se compilaron artículos científicos relacionados con el tema de estudio y la pregunta de investigación ¿Qué factores influyen en la cantidad y calidad del ADN mitocondrial o nuclear de la pulpa dental utilizada en la identificación de restos humanos?

Las palabras clave escogidas fueron:

*“DNA”, “dentistry”, “forensic”, “pulp”, “environmental”, “conditions”.*

La búsqueda se realizó en Mayo de 2020 en dos bases de datos electrónicas, PubMed y Scopus. Las estrategias de búsqueda se muestran en la *Tabla I y II.*

Búsqueda de palabras	Palabras clave	Resultados
#1	Dentistry	428.805
#2	DNA Pulp	27.247
#3	Forensic OR environmental OR “conditions”	1.712.131
	#1 AND #2 [mh] AND #3	54

**Tabla I:** Estrategia de búsqueda con las palabras clave utilizadas en la base de datos PubMed

\*Las palabras entre comillas (”) en Pubmed conduce a una búsqueda de esta palabra y otras relacionadas a este término

\* mh significa término encabezados MeSH

Campo de búsqueda avanzada en Scopus con palabras clave	Resultados
TITLE-ABS-KEY (dentistry AND DNA AND pulp AND (forensic OR environmental OR “conditions”)	43

**Tabla II:** Estrategia de búsqueda con las palabras clave utilizadas en la base de datos SCOPUS

\*\*TITLE-ABS-KEY significa “Título del artículo, Resumen, Palabras clave” en Scopus.

Para especificar la búsqueda, se realizaron criterios de inclusión y exclusión como se muestra en la *Tabla III*.

Base de datos	Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
PubMed y Scopus	Idioma: inglés Humanos	De otras especies.

**Tabla III:** Criterios de inclusión y exclusión para búsquedas en PubMed y Scopus

## 4.2 Criterios de selección y exclusión

### 4.2.1 Criterios de exclusión

Los títulos y resúmenes de los artículos arrojados en la búsqueda se evaluaron para excluir aquellos que no se relacionaran con los factores que influyen en la cantidad y calidad del ADN de la pulpa dental utilizado en identificación humana en Odontología forense. Se excluyeron los artículos duplicados arrojados en ambas bases de datos. Los *fulltext* no obtenidos y las revisiones bibliográficas también se excluyeron.

### 4.2.2 Criterios de selección

Se obtuvieron los textos completos en inglés de los artículos relacionados con los factores que influyen en la cantidad y calidad del ADN de la pulpa dental utilizado en identificación humana en Odontología forense para su posterior análisis.

Adicionalmente, se realizó una búsqueda manual de artículos de interés relacionados al tema de investigación que no se encontraron con las llaves de búsqueda desde la base de datos Google Scholar y Elsevier.

## 5 RESULTADOS

La búsqueda arrojó un total de 97 artículos. Después de la eliminación de los duplicados (n = 24), 73 fueron evaluados para su elegibilidad. Se excluyeron un total de 8 artículos debido a que no cumplían con el idioma y/o no pertenecían a especie humana. A continuación, se descartaron 38 estudios por el título y resumen. Y los textos no encontrados y/o que eran revisiones bibliográficas fueron 8. Además, se seleccionaron por búsqueda manual 6 artículos. Incluyendo un total de 26 estudios para su revisión completa y posterior discusión. El organizador bibliográfico utilizado para el desarrollo de este estudio fue Mendeley. El algoritmo de búsqueda y resultados se resumen en la *Figura 1*. La clasificación de los factores que influyen en la degradación del ADN discutidos en la revisión se esquematiza en la *Figura 2*.

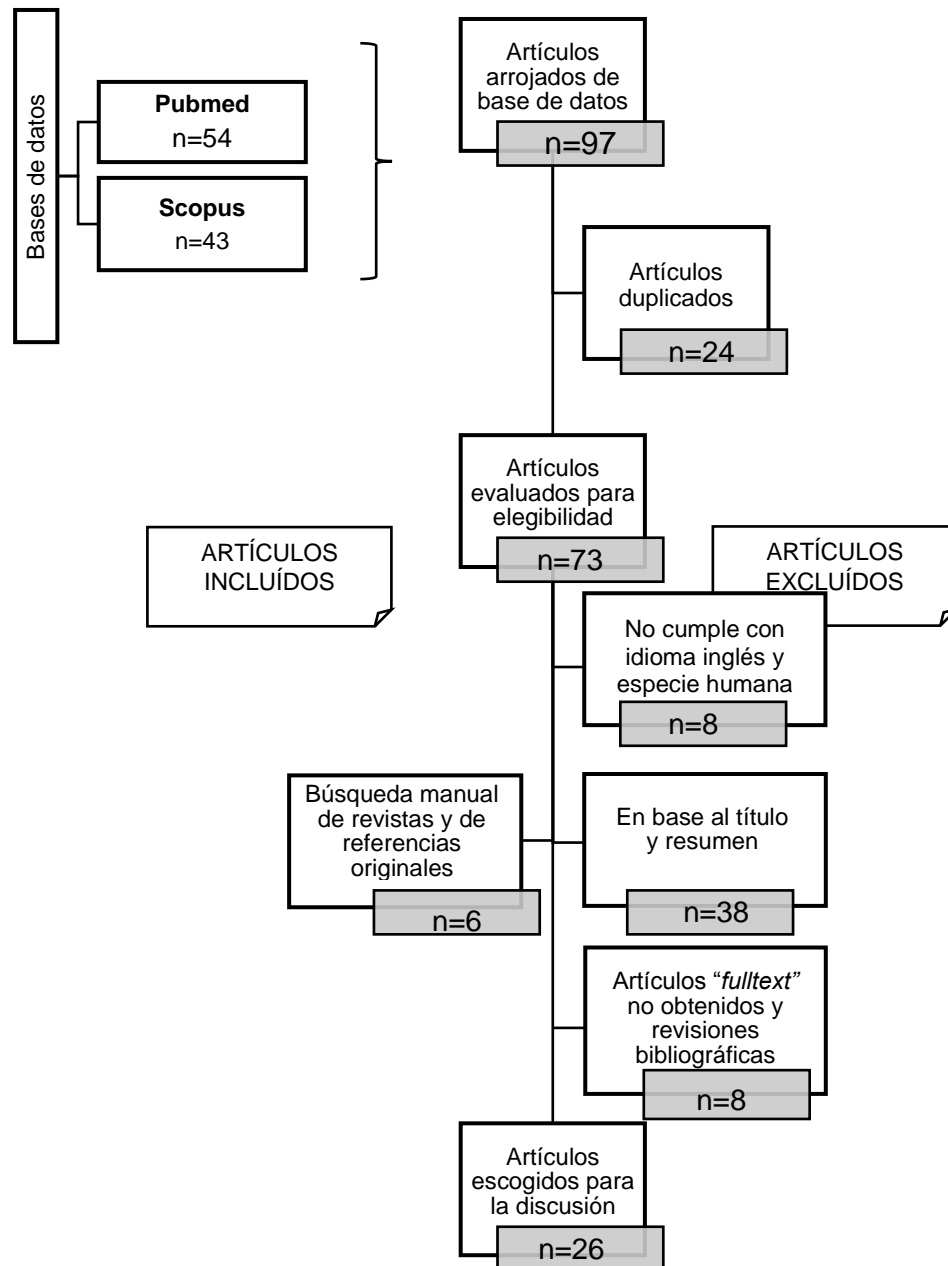
En cuanto al nivel de evidencia, los estudios escogidos en esta revisión son principalmente de tipo experimental que corresponden al nivel más bajo.

En 20 artículos se estudian las condiciones *post mortem* que influyen en la calidad/cantidad del ADN pulpar, evaluando distintas condiciones. En temperatura ambiente se evaluaron 12 estudios<sup>20,43,44,45,46,60,72,73,74,75,76,77</sup>, en bajas temperaturas se analizaron 3 estudios<sup>35,44,75</sup>, en dientes sumergidos 6<sup>20,44,45,74,77,78</sup>, 9 en dientes enterrados<sup>16,20,27,35,44,45,74,77,78</sup>, y dientes incinerados en 8<sup>14,20,43,44,45,55,74,79</sup>.

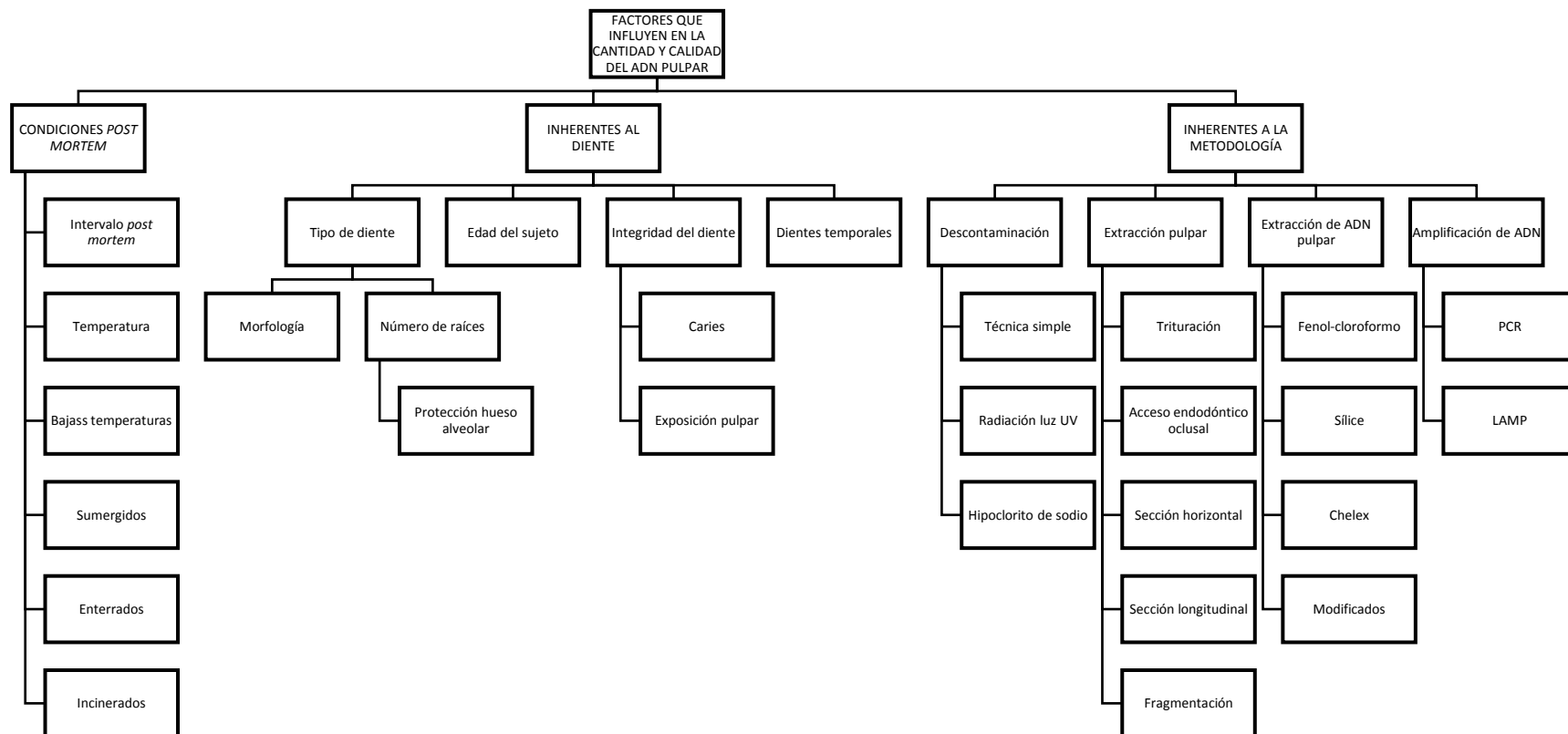
De los artículos seleccionados, 15 evaluaron la influencia de los factores inherentes al diente en la cantidad/calidad del ADN pulpar. Tipo de diente se analizó en 9 estudios<sup>14,18,20,22,43,44,47,72,79</sup>, la edad en 5 artículos<sup>20,22,44,43,80</sup> y la integridad dental en 3<sup>18,24,35</sup>. Además, 2 artículos<sup>46,73</sup> estudiaron dientes temporales.

Los factores inherentes a la metodología que influyen en la cantidad/calidad del ADN pulpar fueron tratados en 22 artículos, la influencia de la descontaminación de la muestra se analizó en 8<sup>17,18,27,35,47,72,75,77</sup>. Los métodos de extracción pulpar en 11<sup>14,17,18,22,24,27,36,44,46,75,78</sup>, la metodología de extracción del ADN 10<sup>16,17,36,45,46,47,55,74,77,79</sup> y el método de amplificación del ADN 10<sup>16,18,20,43,44,45,46,47,55,60</sup>.

Una vez analizados y sistematizados los artículos seleccionados según los criterios de la *Figura 2*, los hallazgos principales se resumieron en la *Tabla IV*. Posterior a esto, se procedió a redactar la tesis en función a los objetivos propuestos.



**Figura 1:** Algoritmo de búsqueda, selección y resultados de artículos



**Figura 2:** Factores que influyen en la cantidad y calidad del ADN discutidos en la revisión

## RESULTADOS: Resumen de principales hallazgos

Factores que Degradan ADN Pulpar en Identificación Humana					
Publicación	Inherentes al Diente	Inherentes a la Metodología y la Técnica	Condiciones <i>post mortem</i>	ADN	Principales Resultados
Khan, Tejasvi y Paramkusa. <sup>78</sup> 2019	N/A	<b>Extracción pulpar:</b> Corte longitudinal en mitades, extirpador pulpar.	<b>Exposición 60 días:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua marina</li> <li>• Tierra</li> <li>Temperatura ambiente.</li> </ul>	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La extracción de ADN fue posible de todas las muestras de pulpa independiente de sus condiciones ambientales.</li> </ul>
Mansour et al. <sup>20</sup> 2019	Tipo diente Edad	<b>Amplificación:</b> PCR	<b>Condiciones <i>post mortem</i> de 1 día a 70 años:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cadáver fresco</li> <li>• Descomposición</li> <li>• Esqueletizado</li> <li>• Enterrado</li> <li>• Incinerado</li> <li>• Temperatura ambiente</li> <li>• Agua</li> </ul>	Dental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los factores post-mortem son más influyentes que la edad y el tipo de diente en la concentración de ADN dental. Se puede obtener ADN dental prometedor de cadáveres con un intervalo <i>post mortem</i> corto.</li> <li>• Muestras expuestas a temperatura ambiente muestra mayor rendimiento que expuesta en suelo con diferencias estadísticamente significativas.</li> <li>• Escasa cantidad de ADN dental en dientes enterrados en el suelo y forensemente esqueletizado después de un largo intervalo <i>post mortem</i>.</li> </ul>
Chowdhury et al. <sup>45</sup> 2018	N/A	<b>Extracción ADN:</b> Método Fenol cloroformo <b>Amplificación:</b> PCR	<b>Exposición 30-60-90 días:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura ambiente</li> <li>• Sumergidos</li> <li>• Enterrados</li> <li>Incinerados: 150°C, 250°C, 350°C</li> </ul>	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución constante en cantidad de ADN al aumentar período de exposición independiente de condición ambiental.</li> <li>• Mayor cantidad de ADN obtenido de dientes expuestos a temperatura ambiente en comparación con otros ambientes.</li> <li>• Dientes enterrados en suelo presentaron menor cantidad de ADN.</li> <li>• No se pudo obtener ADN al exponer a 350°C.</li> </ul>
Alia-García et al. <sup>24</sup> 2015	<b>Integridad del diente:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Caries</li> <li>• Sanos</li> </ul>	<b>Extracción pulpar:</b> Fragmentación	N/A	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La gravedad de la lesión cariogénica y comunidades bacterianas asociadas parecen no tener influencia en identificación.</li> <li>• El método de fragmentación permitió la extracción completa del tejido pulpar en la mayoría de los dientes.</li> <li>• La extracción de ADN fue exitosa en ambos grupos.</li> <li>• Pureza del ADN fue homogéneo en ambos grupos, la concentración fue variable</li> <li>• PCR puede ser limitada por condiciones de la muestra.</li> </ul>



					<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perfil de identificación fue idéntico en ambos grupos, validando el uso de dientes con caries para la identificación forense humana.</li> <li>• De las 120 muestras se obtuvo perfil en 81 de ellas sin diferencias significativas entre ambos grupos.</li> </ul>
Hervella et al. <sup>17</sup> 2015	N/A	<b>Descontaminación:</b> Ácidos, radiación UV <b>Extracción pulpar:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Perforación oclusal</li> <li>• Perforación cervical</li> <li>• Perforación cervical a través del cuello del diente</li> </ul> Se utilizaron limas endodónticas en los conductos. <b>Extracción del ADN:</b> Método fenol-cloroformo	N/A	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El procedimiento de corte cervical parece ser el más adecuado para muestras que contienen ADN degradado debido a la mayor cantidad de moléculas de ADN recuperadas y menos manipulación de la muestra.</li> </ul>
Terada et al. <sup>75</sup> 2014	N/A	<b>Descontaminación simple:</b> Gasa estéril, solución salina <b>1.- Grupo dientes intactos</b> <b>2.- Grupo de pulpa dental:</b> <b>Extracción Pulpar:</b> Sección horizontal en LAC, extirpador pulpar.	<b>Periodos: 1-7-30-180 días:</b> <b>Bajas temperatura:</b> 4-8 °C <b>Temperatura ambiente:</b> 23-34°C	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia de ADN en todas las muestras con cantidad variable entre ellas.</li> <li>• Diferencia estadística en la cantidad de ADN cuando se analizaron los factores tiempo y temperatura de almacenamiento.</li> <li>• La degradación está asociada al factor tiempo cuando los dientes intactos se almacenan a temperatura ambiente</li> </ul>
Zapico et al. <sup>47</sup> 2013.	Tipo de diente	<b>Descontaminación Simple:</b> Cepillo suave, agua destilada estéril. Secado a temperatura ambiente, radiación UV <b>Extracción ADN:</b> Columna de Sílice <b>Amplificación:</b> PCR	N/A	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La radiación con luz UV método menos agresivo de descontaminación.</li> <li>• La cuantificación del ADN depende del tipo de diente y es más bajo en dientes pequeños.</li> <li>• Método basado en columna de sílice es una alternativa viable y mejora el rendimiento de la extracción del ADN respecto a otros métodos.</li> </ul>
Raiman et al. <sup>77</sup> 2012	N/A	<b>Descontaminación técnica simple:</b> Agua esterilizada. <b>Extracción ADN:</b> 4 diferentes protocolos <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Incubación:</b> 56°C en tampón de lisis durante 2-12 hrs.</li> <li>• <b>Filtrado:</b> Columna o precipitado con isopropanol</li> </ul>	<b>Intervalo <i>post mortem</i> de 2 meses a 12 años</b> <b>Condición del cuerpo:</b> Sumergidos, incinerados, descomposición avanzada y esqueletizados. <b>Temperatura ambiente</b>	Dental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intervalo <i>post mortem</i> no afectan el potencial de uso de dientes como fuente de ADN en análisis genético.</li> <li>• El uso de la columna de concentración resultó en una mayor cantidad de ADN sin embargo el isopropanol fue más puro.</li> <li>• Los cuatro diferentes protocolos de extracción de ADN no mostraron diferencias significativas en el número de loci amplificados.</li> <li>• En el 77% de las muestras se pudo amplificar ADN nuclear autosómico y el 23% restante tuvo que realizarse genotipo Y-STR o identificación de ADNmt.</li> </ul>

					<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tendencia perceptible pero no significativa entre cantidad de ADN total recuperado y el tiempo transcurrido después de la muerte.</li> </ul>
Pinchi et al. <sup>18</sup> 2011	<b>Tipo de diente:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• N° de raíces</li> </ul> <b>Integridad del diente:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sanos</li> <li>• Caries</li> </ul>	<b>Extracción pulpar en dos tiempos:</b> <u>1<sup>ra</sup> extracción:</u> <b>Descontaminación :</b> Limpieza mecánica, inmersión hipoclorito 5% 15 minutos, etanol 96%, agua destilada Grupo 1: Acceso endodóntico y limas H. Grupo 2: Puntas de papel. <u>2<sup>da</sup> extracción</u> sin descontaminación previa y se utilizó limas H: Grupo 1: Suero del lavado. Grupo 2: Puntas de papel. <b>Amplificación:</b> PCR	N/A	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diente puede considerarse fuente confiable de ADN durante meses después de la muerte sin procedimiento especial de conservación.</li> <li>• Posibilidad de extraer cantidad suficiente de ADN en condiciones críticas de tiempo, acceso endodóntico y permite varios momentos de extracción en un solo diente.</li> <li>• Posibilidad de repetir con éxito la extracción del ADN dental, incluso cuando la primera extracción no tuvo éxito.</li> <li>• Presencia de caries y la pérdida de tejido externo compromete investigación genética.</li> <li>• Se obtuvieron resultados óptimos en dientes con raíces múltiples.</li> </ul>
Xavier et al. <sup>73</sup> 2011. Estudio piloto*	Dientes temporales	N/A	Exposición a temperatura ambiente en un periodo de 2 a 18 años	Dental Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La cantidad de ADN lograda reveló que los dientes temporales almacenados por menos de 18 años pueden ser una herramienta poderosa para el análisis genético, especialmente como muestra de referencia en identificación.</li> <li>• Los resultados de las muestras de referencia concuerdan con los resultados obtenidos de los dientes primarios.</li> </ul>
Tilotta et al. <sup>22</sup> 2010.	Tipo de diente Edad	<b>Extracción pulpar:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Grupo dientes triturados:</b> Trituración, descalcificación, lavado.</li> <li>• <b>Grupo de acceso endodóntico:</b> Acceso endodóntico oclusal, extirpador pulpar</li> </ul>	N/A	Dental Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calidad y cantidad de ADN obtenido no depende del tipo de diente</li> <li>• La edad no influye en la cantidad y calidad del ADN</li> <li>• La cantidad de ADN con el método de acceso endodóntico oclusal fue significativamente mayor. Se reduce el riesgo de contaminación.</li> </ul>
Alakoç et al. <sup>27</sup> 2009	N/A	<b>Descontaminación:</b> Técnica simple: Lavado con SDS 10%, agua destilada, irradiación UV, agente esterilización en superficie,	Dientes enterrados (Data: 100 d.C)	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La técnica amplificó ADN nuclear con un éxito del 80,1% y la estructura morfológica se conservó en todas las muestras.</li> </ul>

		descalcificación a 4 ° C durante 10 min. <b>Extracción pulpar:</b> Acceso endodóntico oclusal			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica de acceso endodóntico oclusal evita contaminación de la muestra y permite a los investigadores obtener mayor cantidad de pulpa.</li> </ul>
Rubio et al. <sup>72</sup> 2009	<b>Tipo de diente</b>	<b>Descontaminación:</b> Procedimiento de tres pasos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica simple: Eliminación física del esmalte.</li> <li>• Lavado con hipoclorito de sodio</li> <li>• Radiación con luz UV</li> </ul>	Exposición a temperatura ambiente en los periodos de tiempo de 2,5,10 años.	Dental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se cuantificó ADN en el 87.5% de las muestras.</li> <li>• La concentración de ADN más alta se encontró en dientes almacenados por menor periodo de tiempo.</li> <li>• Diferencia significativa en concentraciones de ADN según el intervalo de almacenamiento transcurrido.</li> <li>• La concentración de ADN disminuyó significativamente durante los primeros 2 años.</li> <li>• Los amplicones más pequeños son mucho más propensos a amplificarse que los más grandes en muestras que contienen ADN degradado.</li> <li>• Dientes sanos, molares y premolares producen más ADN, sin embargo, se encontraron concentraciones de ADN similares entre dientes anteriores y dientes posteriores.</li> </ul>
Nogami et al. <sup>60</sup> 2008	N/A	<b>Amplificación:</b> LAMP	<b>Exposición a temperatura ambiente:</b> 1 a 25 años.	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hay casos en los que el análisis de ADN es difícil debido a la descomposición del ADN dependiendo de las condiciones en las que se encuentra el cuerpo.</li> <li>• Se necesitó más tiempo de procesamiento en muestras que estuvieron expuestas a intervalos <i>post mortem</i> mayores.</li> </ul>
Kumar et al. <sup>46</sup> 2005	Dientes temporales	<b>Extracción pulpar:</b> Corte longitudinal, suero <b>Extracción ADN:</b> fenol-cloroformo. <b>Amplificación:</b> PCR	<b>Exposición a temperatura ambiente:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 24 hrs.</li> <li>• 1 mes</li> <li>• 6 mes.</li> </ul>	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los dientes recién extraídos hasta un mes mostraron una precisión en el análisis de ADN pulpar mediante PCR del 100% y se deterioraron con el tiempo debido a la putrefacción de la muestra o a las condiciones locales.</li> <li>• Se considera la amplificación por PCR un método específico para humanos, rápido, sensible y confiable</li> </ul>
Boy et al. <sup>76</sup> 2003	N/A	N/A	<b>Exposición en horas:</b> 24, 48, 72, 120, o 144.  <b>Temperatura ambiente</b>	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin cambios morfológicos en células pulpares en los mismos intervalos de tiempo.</li> <li>• Aparentemente los tejidos circundantes de la pulpa ralentizan degradación del ADN.</li> <li>• Se observó una disminución gradual a través del tiempo.</li> <li>• No se demostró una correlación lineal entre el tiempo y la degradación del ADN.</li> </ul>

Malaver y Yunis <sup>16</sup> 2003	N/A	<b>Extracción ADN:</b> Método fenol/cloroformo <b>Amplificación:</b> PCR	Enterrados por 5 años	Pulpar Dental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se obtuvo tejido pulpar en 5 muestras de 20.</li> <li>• La pulpa genera señal de amplificación de ADN mitocondrial más fuerte respecto a otros tejidos dentales.</li> </ul>
Trivedi et al. <sup>36</sup> 2002		<b>Extracción pulpar:</b> Acceso endodóntico oclusal. <b>Extracción de ADN:</b> <b>1. De 2 pasos:</b> Raspado-aspiración Descalcificación extensa (EDTA, chelex) <b>2 Método convencional</b> Orgánico/diálisis	N/A	Dental Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica de raspado y aspiración garantiza máxima recuperación de material celular y la descalcificación de 2 pasos (EDTA y Chelex) resultó en la eliminación de los inhibidores de la PCR, lo que lleva a una mejor amplificación y tipificación de marcadores de PCR.</li> <li>• ADN aislado por el nuevo método podría amplificarse y ser tipificado con éxito en comparación con el análisis de ADN por métodos de extracción convencional.</li> </ul>
Tsuchimochi et al. <sup>55</sup> 2002	N/A	<b>Extracción ADN:</b> Método Chelex 100 <b>Amplificación:</b> PCR	<b>Incineración por 2 min.:</b> 100 °C, 200 °C, 300 °C, 400 °C, 500 °C	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método Chelex es adecuada para obtener ADN de calidad superior para la amplificación por PCR y el genotipado.</li> <li>• No se pudo recuperar pulpa de algunas muestras incineradas a 500°C.</li> <li>• Las muestras de ADN pueden amplificarse y tipificarse hasta los 400°C</li> <li>• Dientes incinerados a 400 ° C no produjeron productos de PCR.</li> <li>• Pulpa dental rodeada de tejidos duros evita conducción de calor.</li> </ul>
Baker et al. <sup>79</sup> 2001	Tipo de diente	<b>Extracción ADN:</b> En base a sílice.	<b>Incinerados</b>	Dental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El método de extracción a base de sílice produce ADNmt adecuado para la identificación genética de muestras forenses de dientes.</li> <li>• El análisis de secuencia de ADNmt fue exitoso para cada una de las muestras. Ni la condición de la diente ni tipo de diente utilizado hizo una diferencia significativa en la calidad de la secuencia obtenida.</li> <li>• Los dientes son una fuente confiable de ADN incluso después de un tiempo prolongado o estrés ambiental adverso.</li> </ul>
Murakami et al. <sup>74</sup> 2000	N/A	<b>Extracción ADN:</b> Método fenol cloroformo	<b>Expuesto a temperatura ambiente:</b> 3 ,6 meses, 1 ,5 y 22 años <b>Incinerados:</b> 100°C,150°C, 200°C, 250°C durante 30 min. <b>Sumergidos</b> en agua de mar por 1 y 4 semanas.	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinación del sexo fue posible utilizando el método de ADN pulpar extraído de los dientes permanentes recién extraídos, independientemente del tipo de diente.</li> <li>• La cantidad y calidad del ADN fue suficiente en todos los periodos de tiempo en temperatura ambiente.</li> </ul>

			<b>Enterrados</b> durante 1,4 y 8 sem.		<ul style="list-style-type: none"> <li>No se pudo analizar una de las muestras analizada tanto en el grupo de dientes sumergidos como en el grupo de enterrados.</li> <li>En dientes incinerados a 100°C, 150°C y 200°C durante 30 minutos, se pudo determinar el sexo en todas las muestras. En el caso de 250°C se identificaron algunos dientes, pero la banda amplificada fue mucho más débil.</li> </ul>
Mörnstad et al. <sup>80</sup> 1999	Edad	N/A	N/A	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se ha observado una disminución dependiente de la edad en el ADN nuclear de la pulpa.</li> </ul>
Pfeiffer et al. <sup>35</sup> 1999	<b>Integridad del diente:</b>	<b>Descontaminación simple:</b> Lavado, Descalcificación 4 días antes de extracción ADN	<b>Bajas temperaturas Enterrados en tierra:</b>	Pulpar Dental	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADN dientes seccionados disminuye rápidamente en 1<sup>er</sup> periodo y más rápido que en los dientes no seccionados.</li> <li>Extracción de ADN es más efectiva cuando se omite el paso de descalcificación previo.</li> <li>Concentración de ADN se redujo en un 90% después de almacenar los dientes enterrados por un período de seis semanas</li> </ul>
	<b>1<sup>ra</sup> serie:</b> Dientes seccionados a la mitad e intactos		<ul style="list-style-type: none"> <li>6 semanas: seccionados a la mitad</li> <li>18 semanas: sin seccionar.</li> </ul>		
	<b>2<sup>da</sup> serie:</b> Dientes intactos	<b>Descontaminación:</b> Pasos 1 <sup>ra</sup> serie sin descalcificación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>12 meses: sin seccionar.</li> </ul> <b>Bajas temperaturas</b>		
Álvarez García et al. <sup>44</sup> 1996	Tipo de diente: Hueso alveolar Edad	<b>Extracción pulpar:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Triturados</li> <li>Acceso endodóntico oclusal</li> <li>Corte sección horizontal</li> </ul> <b>Amplificación:</b> PCR	Periodo de exposición de 2 sem. a 36 m. <b>Temperaturas bajas:</b> 4°C <b>Temperatura ambiente:</b> 20°C, 40 °C en un <b>Ambientes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Sumergidos</b> en agua salada o dulce durante 15 d. a 6 m.</li> <li><b>Enterrados</b> :Tierra o arena durante 2 sem-6 m.</li> <li><b>Temperatura ambiente:</b> Periodo de 2 sem. a 6 m.</li> <li><b>Incineración:</b>75 ° C, 100 ° C, 200 ° C, 300 ° C, 400 ° C y 500 ° C por 1 a 2 min.</li> </ul>	Dental Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se recuperaron cantidades similares de ADN en los 3 métodos. El corte sección transversal preserva mejor la anatomía de los dientes.</li> <li>No existen diferencias significativas al comparar temperaturas, entre agua de mar y dulce, ni entre enterrado en arena y tierra.</li> <li>Dientes expuestos a temperatura ambiente con mejores resultados que dientes enterrados y dientes sumergidos presentaron la menor cantidad de ADN.</li> <li>Resultados positivos en 100% para los STR en dientes de 10 a 30 años</li> <li>Resultados positivos para todos los marcadores en cuerpo enterrado (+ 50 a.) y se esperan mejores resultados que en los casos experimentales debido a que el agujero apical estaría protegido y, por lo tanto, la pulpa no se degradaría tan fácilmente.</li> </ul> Edad del sujeto al morir influye negativamente en la cantidad y calidad del material genético.

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Periodo post mortem:</b> 10 a 30 años.</li> <li>• <b>Cuerpo enterrado</b> 50 años.</li> </ul>		
Sweet et al. <sup>14</sup> 1995 Reporte de caso*	<b>Tipo de diente:</b> Hueso alveolar	<b>Extracción pulpar:</b> Sección longitudinal	<b>Incinerados:</b> 1090 °C durante 30 a 40 min.	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dientes en hueso alveolar resisten cambios degenerativos <i>post mortem</i> y variaciones extremas de temperatura convirtiéndolos en fuente confiable de ADN meses después de la muerte.</li> <li>• Núcleos celulares se encontraban intactos lo que preservaba ADN.</li> </ul>
Pötch <sup>43</sup> et al. 1992	Tipo de diente Edad	<b>Amplificación:</b> PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura ambiente durante 6 sem. y 4 a.</li> <li>• Incinerado</li> <li>• Descomposición avanzada.</li> </ul>	Pulpar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El rendimiento del ADN no depende del tipo de diente o edad y no es influenciado por las condiciones de almacenamiento o periodos de tiempo.</li> <li>• Se observó que cuando el ambiente permite que la pulpa se momifique, se puede extraer el ADN y la calidad es suficiente para el análisis por PCR.</li> </ul>

**Tabla IV:** Resumen de los principales resultados de la revisión.

\*Los estudios son de diseño experimental.

## 6 DISCUSIÓN

Los resultados de esta revisión incluyen estudios experimentales y un reporte de caso categorizados como evidencia de bajo nivel. Se debe mencionar que la literatura encontrada fue reducida y con alto grado de duplicidad entre las bases de datos escogidas, sumado a que los autores de los artículos se citaban entre sí.

### 6.1 Condiciones *post mortem*

Al hablar de condiciones *post mortem* nos referimos al intervalo de tiempo *post mortem*, la temperatura y el ambiente al cual están expuestas las muestras, todos factores que podrían acelerar, demorar o incluso detener el proceso de degradación.

#### 6.1.1 Temperatura ambiente

Considerando que el tiempo es un factor que podría incidir en la cantidad y calidad del ADN pulpar es de gran utilidad identificar el intervalo de tiempo en que el ADN es apto para la identificación.

En dientes temporales<sup>46,73</sup> utilizados para identificación humana, en 6 meses de exposición<sup>46</sup> hubo una reducción del 60% en el éxito de los perfiles genéticos del ADN pulpar mientras que en otro estudio<sup>73</sup> demostró que en un intervalo de 18 años el ADN se degrada pero la cantidad no dependerá del tiempo transcurrido, en este estudio no hace distinción en la procedencia del ADN dental, imposibilitando la identificación de los reales efectos del tiempo sobre el ADN pulpar<sup>73</sup>. Los resultados de ambos autores podrían explicarse por las características morfológicas e histológicas del diente que protegen al material genético, así como el intervalo *post mortem* o las condiciones propias del diente.

En dentición definitiva se encontró una mínima degradación del ADN pulpar con una disminución gradual a través del tiempo pero sin cambios morfológicos de autólisis en las células pulpares en un intervalo post extracción de 144 horas, además se observaron resultados similares a los descritos anteriormente ya que no se demostró una correlación lineal entre el tiempo y la degradación del ADN, no pudiéndose establecer que a mayor tiempo habrá mayor degradación pulpar<sup>76</sup>.

En intervalos *post mortem* más prolongados de 1 mes a 30 años a temperatura ambiente se observaron diferencias significativas en la cuantificación al comparar el ADN pulpar entre <1 año y 2, 5 y 10 años, destacando que el ADN disminuye significativamente en los 2 primeros años y conforme pasa el tiempo la disminución del material genético es más pausada<sup>72</sup>. No obstante, fue posible obtener ADN en cantidad y calidad suficiente para realizar perfiles genéticos<sup>44,45,60,72,74,75</sup> observándose mayor cuantificación en muestras almacenadas por un periodo de tiempo más corto que 1 año (0 año)<sup>72</sup> mientras que en otras muestras expuestas a mayores intervalos *post mortem* se necesitó más tiempo de procesamiento para la detección, demostrando que existió degradación pulpar<sup>60</sup>. Otro estudio<sup>44</sup> también refuerza la idea de disminución del ADN en el tiempo en muestras sometidas al aire libre durante períodos que varían de 2 semanas a 6 meses. Esto se produce ya que en el periodo *post mortem* comienza un proceso de descomposición y se inician fenómenos bioquímicos tisulares que degradan la materia orgánica<sup>61,62</sup>. A pesar de la degradación en el tiempo a temperatura ambiente bajo esta condición se obtuvieron los mejores resultados de amplificación con respecto a los otros ambientes analizados en la investigación<sup>44,45</sup>.

En cuanto al factor tiempo relacionado con otras condiciones ambientales, estudios evidencian que este impactó disminuyendo significativamente la cantidad del ADN al aumentar los días de exposición de manera transversal en todas las condiciones expuestas. El intervalo *post mortem* transcurrido fue el factor más notable asociado con la degradación del ADN, obteniéndose una mayor cantidad de ADN en muestras dentales que representan un intervalo *post mortem* más corto<sup>20</sup>. Sin embargo, hay estudios que postulan que el tiempo<sup>43</sup> y las condiciones ambientales<sup>43,77</sup> no tienen influencia en el rendimiento del ADN.

En otro sentido, se plantea que la concentración de ADN disminuye significativamente después de 10 días desde la muerte siendo este el período más crítico<sup>20</sup>. En otra investigación se refirió que en los primeros 30 días *post-mortem* había una reducción acelerada de la cantidad de ADN (sobre el 50%) obtenida desde dientes recién extraídos expuestos a diversos ambientes<sup>45</sup>. Pese a estos resultados es complejo



realizar una comparación de los periodos críticos de degradación del material genético ya que los intervalos *post mortem* y las condiciones de exposición estudiadas son heterogéneos. Aún así se puede concluir que en los periodos tempranos hay una aceleración en la disminución del ADN y luego una estabilización en la tasa de disminución.

En lo referente a la influencia del factor tiempo en casos forenses y particularmente en cadáveres en estado de putrefacción, si bien en los estudios no se detalla el tiempo transcurrido, fue en cadáveres frescos donde se mostró la cuantificación de ADN más alta, mientras que los cadáveres exhumados esqueletizados exhibieron la menor cantidad de ADN<sup>20</sup>. Esta disminución se originaría por la irrupción y multiplicación de microorganismos anaerobios<sup>61</sup>, los cuales principalmente por hidrólisis, oxidación y la ausencia de mecanismos de reparación enzimática degradan el ADN<sup>7,63</sup>, pero a pesar de ello se logra la identificación en la mayoría de los casos<sup>43</sup>.

### **6.1.2 Bajas temperaturas**

En el caso de dientes totalmente íntegros y pulpas aisladas sometidas a bajas temperaturas entre 4-8°C por intervalos de 1 a 180 días<sup>75</sup>, se encontró ADN genómico en todas las muestras, presentando variabilidad en las cantidades de ADN con diferencias significativas al relacionarla con tiempo y temperatura de almacenamiento. En los dientes intactos se observó mayor cantidad de ADN en las muestras refrigeradas respecto a las almacenadas a temperatura ambiente, lo que reafirma que existe degradación de ADN en el tiempo cuando se encuentran los dientes a temperatura ambiente<sup>35,75</sup>. Esto se sustenta en que el almacenamiento en seco a bajas temperaturas preserva el material biológico ya que se ralentizan las reacciones químicas que generan la degradación<sup>65</sup>, inhibiendo o minimizando la actividad microbiana y enzimática<sup>61</sup>. A pesar de esta ralentización, es recién a los 25°C donde actúan las enzimas proteolíticas y a los 37°C las hidrolíticas por lo que en este rango comienza el proceso de descomposición que favorece la multiplicación de microorganismos. Por lo que cuando se expusieron dientes a temperaturas de 4°C, 20°C y 40°C por un intervalo de 2 semanas a 36 meses, si bien se obtuvieron resultados positivos para todas las muestras y a pesar que en un marcador específico

hubo disminución en la tasa de éxito de identificación cuando aumentó la temperatura, no se encontraron diferencias significativas entre las tres temperaturas estudiadas<sup>44</sup>.

### **6.1.3 Sumergidos**

En dientes sumergidos in vitro en un intervalo de tiempo de 1 semana a 6 meses fue posible obtener perfiles genéticos<sup>44,45,74,78</sup>. Sin embargo, en algunas muestras la calidad del ADN disminuyó a partir del mes de exposición<sup>44</sup> atribuyéndolo a: (1) el efecto de la dilución del agua por su mayor tasa de hidrólisis en comparación con el aire o suelo (2) la acción del zooplancton<sup>44</sup>, y (3) la presencia de caries que permite la infiltración del agua en la cavidad pulpar degradando la pulpa y el ADN<sup>74</sup>. En cuanto a casos reales, se pudo identificar 9 cuerpos que estuvieron sumergidos en un río en un intervalo de tiempo de 3 meses a 3 años obteniendo perfiles genéticos en todas las muestras<sup>77</sup>.

No se encontraron diferencias significativas en la tipificación del ADN en dientes sumergidos en agua de mar y en agua de río durante períodos de 15 días a 6 meses<sup>44</sup>. En el mismo estudio se observó que los dientes sumergidos en agua arrojan los resultados más pobres de comparación con otros ambientes (aire libre, muestras enterradas, temperatura ambiente)<sup>44</sup>, mientras que otros artículos los sitúan con mejor rendimiento que las muestras enterradas en suelo que tuvieron los peores resultados<sup>20,45</sup> siendo incluso esta diferencia estadísticamente significativa<sup>20</sup>. No obstante, de todas formas, las muestras sumergidas se encuentran dentro de los ambientes con peores resultados.

### **6.1.4 Enterrados**

En dientes enterrados experimentalmente durante 1 semana a 6 meses se obtuvo cantidad y calidad suficiente de ADN para perfiles genéticos en la mayoría de las muestras<sup>35,44,45,74,78</sup> y no se encontraron diferencias significativas en la identificación del material genético en dientes enterrados en tierra o en arena<sup>44</sup>. A las 6 semanas de enterrados disminuyó la concentración del ADN en un 90% y se demostró que existía una correlación de la amplificación con la duración del almacenamiento en el suelo. Después de un año algunas muestras no contenían concentración de ADN nuclear

suficiente para ser detectadas, realizándose amplificación de ADNmt que tuvo éxito en todas las muestras<sup>35</sup>. Los resultados anteriores se podrían explicar por la presencia de bacterias aerobias presentes en suelos arqueológicos normales que desempeñan un rol fundamental en la destrucción de tejido mineralizado, siendo el agua subterránea local, el oxígeno, el pH y la temperatura determinantes del tipo de microorganismos presentes y de la rapidez con que se multiplican<sup>71</sup>.

En el caso de muestras obtenidas de cuerpos no identificados, los intervalos de tiempos de exposición son más amplios fluctuando desde 1 día a 50 años<sup>16,44,77</sup>. En cuerpos que estuvieron enterrados por 5 años de un total de 20 dientes se recuperaron 5 muestras de pulpa lo que podría indicar una influencia del suelo en la conservación del tejido pulpar. No obstante, las señales de amplificación del tejido pulpar fueron las más fuertes en comparación a otros tejidos dentales<sup>16</sup>. En otro estudio<sup>44</sup>, se recuperó ADN suficiente en cantidad y calidad para la identificación de un cuerpo que estuvo enterrado durante 50 años, lo que se atribuye a la protección que sobre los dientes ejercieron los tejidos circundantes. Los resultados de estas investigaciones demuestran la singularidad de cada caso y escena forense.

En otro aspecto, un estudio<sup>20</sup> evidenció que en muestras enterradas disminuye la cantidad del material genético a través del tiempo en comparación a otros ambientes, sin embargo, no especificó el intervalo *post mortem* de exposición.

En muestras arqueológicas de dientes enterrados en suelo de 1000 y 2000 años de antigüedad<sup>27</sup> se obtuvo una tasa de éxito del 80% en la amplificación. Estos resultados demuestran que tanto la dureza del esmalte, como la obliteración de los túbulos dentinarios<sup>6</sup> protegen por cientos de años al material genético de diversos factores ambientales, preservando el ADN pulpar en cantidad y calidad suficiente para la amplificación, siempre y cuando se respeten las normas de descontaminación mencionadas en esta revisión bibliográfica. Y en lo que respecta al suelo, se señala que parte de sus componentes como ácidos húmicos y fúlvicos podrían tener una posible acción inhibidora sobre las enzimas biológicas<sup>66</sup>.

Los estudios demuestran que el tiempo y la tierra son factores que descomponen la pulpa y degradan el ADN<sup>16,20,45</sup>, pero aún así es posible obtener resultados de muestras enterradas antiguas<sup>27</sup>.

### **6.1.5 Incinerados**

En dientes incinerados experimentalmente<sup>44,55</sup> expuestos a una temperatura de 100-200°C por un tiempo de 5 a 10 minutos los resultados negativos se asocian más al tiempo de exposición que a la temperatura<sup>44</sup>.

En el caso de dientes que se expusieron a 250°C por un tiempo de 30 minutos se observó una disminución de cantidad y calidad en la mitad de las muestras y a los 300°C no se logró ningún resultado<sup>74</sup>, al igual que en el estudio de Chowdhury<sup>45</sup> que no se obtuvo ADN a los 350°C no especificando el tiempo durante el cual estuvieron expuestas las muestras a esa temperatura.

Desde los 400°C en dientes expuestos por 1-2 minutos, los resultados positivos de amplificación disminuyeron<sup>44,55</sup>, destacando que a esta temperatura al aumentar 1 minuto de exposición disminuye notablemente la cantidad y calidad del ADN<sup>44</sup>. A los 500°C no se encontraron resultados positivos ya que la pulpa comenzó a carbonizarse<sup>55</sup>.

En casos forenses reales se obtuvieron resultados positivos, pero en la mayoría no se especificó el tiempo y los grados a los que estuvieron expuestas las muestras<sup>20,43,79</sup> excepto en un reporte de caso<sup>14</sup> donde se indica que el cuerpo fue incinerado a 1094°C durante 30-40 minutos encontrando un ADN genómico pulpar intacto con alto peso molecular que permitió identificar exitosamente a la víctima. Sin embargo, los datos presentados en este estudio se contraponen a lo postulado por Álvarez<sup>44</sup> quien manifiesta que en casos reales las temperaturas no superan los 200°C.

Fue posible identificar la mayoría de las muestras de casos reales<sup>14,20,43,79</sup> evidenciando que los tejidos que rodean la pulpa dental evitan la conducción del calor<sup>55</sup>, incluso a temperaturas altísimas por un largo tiempo de exposición, a diferencia de las muestras in vitro que sobre 400°C se ve una disminución notable del rendimiento del ADN que podría explicarse por la ausencia del factor protector de los tejidos

circundantes del diente. A pesar de que los dientes son muy resistentes al cambio de temperatura, las altas temperaturas producen la evaporación del agua y del material orgánico, llevando a un proceso de contracción de los tejidos dentales lo que provocará diversos cambios morfológicos a nivel estructural.

En general, en distintos periodos de tiempo a temperatura ambiente el ADN disminuye en cantidad y calidad sin una relación lineal comportándose de manera similar tanto en dientes temporales como definitivos, pudiendo interpretarse que existen otros factores determinantes involucrados. Además, el tiempo *post mortem* resultó ser un factor crucial en la mantención de la cantidad del ADN presentando mayor cuantificación en tiempos más cortos, pero aun así, en intervalos de tiempo más largos e incluso en cuerpos putrefactos es posible amplificar el ADN con fines de identificación. Se puede establecer que en un primer periodo *post mortem* ocurre una degradación acelerada significativa, mientras que el momento en que ocurre una desaceleración en la degradación es un punto controversial, no pudiendo establecerse un tiempo exacto de duración de la aceleración o comienzo de la desaceleración porque los estudios analizaron intervalos de tiempo que difieren mucho entre sí dificultando su comparación.

Al hablar de muestras sometidas a temperatura ambiente o a temperaturas bajas (4°C-8°C), si bien disminuye la cantidad de ADN a medida que transcurre el tiempo, este rango de temperatura no afecta su calidad arrojando estas condiciones, según la literatura analizada en esta revisión, los mejores resultados de obtención de ADN en comparación a otros medios.

En muestras que se encontraban enterradas disminuyó la concentración del ADN con el tiempo. No obstante, se pudieron identificar con éxito muestras enterradas por 50 años e incluso fue posible obtener perfiles genéticos de muestras antiguas de miles de años enterradas con mejor resultados que en casos experimentales, lo que demuestra la importancia de que el diente se encuentre protegido por tejido blando, además de ser trascendental en este tipo de muestras aplicar normas estrictas de descontaminación y manejo, a fin de no dañar el ADN que probablemente ya se

encuentra degradado. Cabe resaltar que no se encontraron diferencias significativas entre tierra y arena.

En dientes sumergidos en general no se encontraron diferencias significativas entre agua dulce y de mar, pudiéndose obtener perfiles genéticos en muestras con hasta 3 años de inmersión. No obstante, al comparar entre sumergidos y enterrados siempre presentaron los más bajos rendimientos al compararlos con otros ambientes, existiendo controversia en la literatura analizada respecto de cuál de ellos dos arroja peores resultados.

En dientes sometidos a incineración, el efecto en el ADN depende principalmente del tiempo de exposición más que del aumento de temperatura, donde incluso 1 minuto hace la diferencia. En este sentido también se demostró que mientras más protegido esté el diente, ya sea tanto por los tejidos blandos como por los tejidos óseos en dientes retenidos en su alveolo o sin erupcionar dentro del hueso, menor será el efecto del calor en el ADN y mejor será su rendimiento, pudiendo obtenerse un perfil genético incluso cuando se alcanzan temperaturas extremadamente altas.

Los estudios evidencian que independientemente del intervalo *post mortem* y condición de almacenamiento hay disminución en cantidad y calidad del ADN. No obstante, es posible recuperar material genético óptimo para perfiles genéticos. Por otra parte, es difícil establecer comparaciones dado los períodos y condiciones desiguales a las que se sometieron las muestras lo que además dificulta determinar la influencia de los factores de manera independiente sobre el ADN pulpar.

## **6.2 Factores inherentes al diente**

Hay que considerar que los dientes a pesar de tener la misma estructura histológica difieren en forma y tamaño inter e intra individuos. Por lo que es fundamental profundizar en cómo los factores inherentes al diente condicionan el análisis genético, para orientar una selección de dientes que optimice la extracción de ADN y mejorar las tasas de éxito en la identificación humana.

### 6.2.1 Tipo de diente

Diversos estudios avalan la premisa que la cantidad del ADN está influenciado por el tipo de diente<sup>47,72</sup> a pesar de esto se obtuvieron excelentes resultados en los perfiles de identificación<sup>47</sup>, obteniendo mayores cantidades en premolares y molares, lo que se puede explicar por la cantidad de raíces y el mayor tamaño de la cámara pulpar<sup>47,72</sup>.

Si bien las cantidades de ADN fueron similares entre dientes anteriores (media = 26.38 ng/ $\mu$ L) y posteriores (media = 25.95 ng/ $\mu$ L)<sup>72</sup>, estos resultados no son significativamente heterogéneos ni representativos por el pequeño tamaño de la muestra, por lo que la mejor alternativa como muestra ideal serán aquellos que contengan el mayor volumen pulpar y área de superficie de raíz, siendo así los molares los mejores candidatos<sup>72</sup> y ante la ausencia de estos, son alternativas confiables los premolares<sup>5</sup> y caninos<sup>8</sup>.

En contraparte, en algunos estudios no se identificó una influencia del tipo de diente en el ADN dental<sup>18,20,43</sup> ni en la identificación de los perfiles genéticos obtenidos<sup>22</sup>, tanto nucleares como de ADNmt<sup>79</sup>. Es importante destacar que en algunas investigaciones utilizaron tejidos mineralizados como tejidos blandos para hacer el análisis genético<sup>20,79</sup>, por lo que los resultados obtenidos no diferencian el rendimiento del ADN pulpar con el ADN de tejidos mineralizados y por lo tanto las conclusiones pueden estar sesgadas.

Respecto a la influencia del número de raíces en la calidad y cantidad del ADN, se ha demostrado que en dientes multirradiculados se recupera más ADN que en unirradiculado, a pesar de que estos últimos cuentan con un acceso más fácil y regular a la cámara pulpar<sup>18,47</sup>. Este hecho es atribuible a que molares y premolares presentan mayor volumen de la pulpa, área de raíz más grande y más cemento celular por superficie de la raíz<sup>5</sup>. Sin embargo, es posible obtener resultados tanto de dientes con raíces únicas como de dientes con raíces múltiples<sup>18</sup>.

Adicionalmente, el número de raíces puede determinar la retención del diente en el hueso alveolar ya que pueden ser desalojados durante la muerte. Por consiguiente,

los que tienen múltiples raíces son menos propensos a perderse respecto a los anteriores durante la descomposición post-mortem<sup>44</sup>.

En otros estudios también se demuestra que el hueso alveolar protege al foramen apical ya que se han obtenido mejores resultados en cuerpos enterrados en comparación a dientes desalojados, por lo que la pulpa no se degrada tan fácilmente<sup>44</sup>. Del mismo modo ocurre en el reporte de caso<sup>14</sup> Sweet de un cuerpo quemado, en que la identificación de la víctima se realizó por medio de sus 4 terceros molares gracias a que se encontraban incluidos y estaban relativamente bien protegidos por tejidos blandos, hueso alveolar y huesos maxilares, por lo que se pudo recuperar el ADN pulpar obteniendo un alto rendimiento del material genético. Tanto Álvarez<sup>44</sup> como Sweet<sup>14</sup> hacen referencia a la relevancia de los tejidos circundantes del diente para la mantención de la pulpa dental y por tanto un mayor porcentaje de resultado positivo en la identificación humana. Sin embargo, se debe considerar que en ambas investigaciones<sup>14,44</sup> se analiza sólo un cuerpo por lo que al ser muestras reducidas no tienen el grado de evidencia suficiente para asegurar que el hueso alveolar influye en la preservación del ADN pulpar, sugiriéndose profundizar en las investigaciones de este área.

La selección óptima de los dientes y el muestreo de los dientes antes de la extracción de ADN probablemente mejorarán aún más las tasas de éxito del análisis genético.

### **6.2.2 Edad**

Como resultado de la aposición fisiológica de la dentina conforme aumenta la edad se provoca la disminución tanto del tamaño de la cámara pulpar, como la cantidad de pulpa y por ende del material genético siendo características observables y medibles<sup>81</sup> existiendo controversia en la literatura en cuanto a la relación entre la edad y el rendimiento de ADN.

Una serie de estudios que analizaron dientes que pertenecían a personas en un rango de edad entre 14-104 años indica que la edad no influye en el rendimiento de ADN<sup>20, 22,43,80</sup>, tanto nuclear como mitocondrial<sup>80</sup>, ya que en la mayoría de los casos el ADN de alto peso molecular estaba presente<sup>43</sup>, por lo que en las muestras de edad



avanzada se pudo recolectar tejido pulpar de suficiente cantidad y calidad para realizar análisis genético<sup>22</sup>. Otras investigaciones plantean que la edad influye negativamente en la cantidad y calidad del material genético y postulan que este factor podría explicar la no homogeneidad de algunos resultados<sup>44</sup>.

Finalmente, a pesar de que en teoría el aumento de edad del diente conduce a una disminución en el contenido de ADN y un cambio en la distribución de este en todo el diente, los estudios analizados en esta revisión no demuestran que la edad influya en su rendimiento para fines de identificación.

### **6.2.3 Integridad del diente**

La pérdida de integridad del diente se da en exposiciones pulpares y en presencia de caries dental y sus microorganismos asociados que provocan una respuesta dentinaria que conlleva a la retracción pulpar<sup>25</sup> lo que podría afectar la cantidad del material genético del tejido pulpar. Es por esto que se emplean dientes preferentemente sanos para la identificación forense mientras que los dientes con patología de caries generalmente se rechazan puesto que la integridad puede verse comprometida y no se puede descartar la contaminación externa desde diferentes fuentes del ADN, por lo que los resultados finales podrían ser engañosos<sup>24</sup>. Sin embargo, en ausencia de muestras sanas es importante tener en consideración que los dientes no sanos aún pueden producir suficiente ADN para la extracción y posterior análisis

Diversos estudios postulan que el éxito del análisis genético no se ve comprometido por la presencia de caries<sup>18,24</sup> incluso con pérdida de tejido<sup>18</sup>. Así mismo, una investigación<sup>24</sup> evidenció que si bien existe presencia de perfiles bacterianos en dientes con caries, el análisis estadístico no pudo establecer una asociación entre los microorganismos y los perfiles genéticos dentales, indicando que no hay diferencias estadísticas en el rendimiento del ADN en dientes con caries en comparación a dientes sanos, concluyendo que la gravedad de la lesión cariogénica, así como las comunidades bacterianas asociadas, parecieran no tener influencia<sup>18,24</sup>. Ante estos resultados, dientes con procesos de caries leves a moderadas podrían tener mayor valor que un diente anterior sano para el proceso de identificación mediante ADN<sup>5</sup>.

Además de la caries, la exposición pulpar también puede generar contaminación de la pulpa al estar sometida a condiciones ambientales, tal como fue demostrado en una investigación<sup>35</sup> donde las concentraciones de ADN obtenidas de las hemisecciones longitudinales de dientes disminuían rápidamente debido a que el tejido se expuso al medio ambiente al estar enterrados, produciendo una rápida degradación del ADN de las células pulpares en comparación a los dientes que no se seccionaron, lo que se podría explicar por la ausencia de las barreras protectoras. Es importante mencionar que esta variable fue analizada por solo un autor, por lo que se necesita mayor evidencia al respecto para tener mayor representatividad.

Los estudios sugieren la posibilidad de considerar dientes con caries para la identificación humana debido a que como presentan una alta prevalencia, su exclusión disminuiría significativamente el número de muestras. Sin embargo, en el caso que existiera exposición pulpar, este tejido estará propenso a degradarse y contaminarse más rápidamente por no estar protegido en su totalidad. Es necesario realizar más estudios para evaluar el rendimiento de ADN en dientes con caries o restaurados y también en dientes con exposición pulpar.

#### **6.2.4 Dientes temporales**

Durante todo el capítulo se ha hecho referencia a los dientes definitivos, pero es importante destacar que actualmente existe un aumento en el número de delitos contra niños en forma de maltrato, abuso físico / sexual y /o secuestro<sup>46</sup>

En estudios que han analizado el comportamiento de dientes temporales <sup>46,73</sup> se observó que las muestras de referencia (hisopos bucales) concordaban con los resultados obtenidos de dientes primarios<sup>73</sup> y que la cantidad que fue entre 1.33 ng/mL y 154 ng/mL y calidad del ADN pulpar de dientes deciduos es suficiente, para realizar identificación basada en ADN<sup>73</sup> con una precisión de entre un 40% y 100% <sup>46</sup>. Esto demuestra que los dientes temporales pueden ser muestras valiosas para la determinación de un perfil de ADN, resultando extremadamente útil para estas circunstancias.

Tras el análisis de la literatura que abordó los factores inherentes al diente que podrían influir en la cantidad y calidad del ADN pulpar para la identificación humana queda en manifiesto que a pesar de que existe controversia entre los diferentes autores respecto a si el tipo de diente influye significativamente, es un hecho que en dientes posteriores la cantidad de pulpa es mayor lo que no significa que en dientes anteriores no se pueda lograr una identificación con éxito. Por lo anterior, se sugiere que para optimizar el muestreo se seleccionen dientes con mayor volumen pulpar y múltiples raíces, para obtener un mayor rendimiento de ADN y retención en el hueso alveolar, siendo por estas razones los molares los más adecuados y en caso de no contar con ellos, se recomiendan como segunda opción premolares y caninos.

Con respecto a la edad, la evidencia confirma que esta produce cambios morfológicos dentales que podrían afectar el contenido o preservación del ADN. Aún así, la mayoría de los autores analizados en esta revisión postulan que no existe relación entre la edad y la cantidad/calidad del material genético. En cuanto a la pérdida de integridad en dientes con caries, se evidencia que la gravedad de la lesión, así como las comunidades bacterianas asociadas no tienen influencia en el rendimiento del ADN pulpar. Por otra parte, en los casos en que existió exposición pulpar, este tejido fue propenso a degradarse y contaminarse más rápidamente por no estar protegido, lo que reafirma al esmalte como el factor protector más importante del ADN pulpar, además de los otros tejidos duros y blandos.

La dentición temporal se comporta de manera similar a la dentición definitiva en cuanto a degradación del ADN siendo su cantidad y calidad suficiente para obtener perfiles genéticos, lo que resulta de vital importancia debido a la alta tasa de delitos infantiles. Además, gracias a que algunas comunidades acostumbran a conservarlos como recuerdo, estos dientes pueden ser útiles como muestras de referencia.

De acuerdo a los resultados de esta revisión, es complejo determinar la influencia de los factores inherentes al diente ya que presentan variaciones en los diferentes estudios. No obstante, se establece que estos factores no evidencian una influencia determinante en el rendimiento del ADN pulpar por lo que factores exógenos al diente serían más determinantes en este sentido.

### 6.3 Factores inherentes a la metodología

Entre los factores de manejo de la muestra que influyen en la cantidad y calidad del ADN pulpar se encuentran: los métodos de descontaminación de la superficie dental, extracción del tejido pulpar, extracción y amplificación del ADN.

#### 6.3.1 Descontaminación

Se considera que la descontaminación es generalmente un requisito previo para el análisis del ADN, sin embargo, los métodos que han sido diseñados para la eliminación del ADN exógeno tienen un efecto desconocido en el ADN endógeno<sup>29</sup>. Por lo anterior, en la *Tabla V* se resumen las técnicas de descontaminación que fueron mencionadas en los estudios analizados en esta revisión y que coinciden con las técnicas más utilizadas en la literatura.

Publicación	Técnica simple	Hipoclorito de sodio	Luz ultravioleta (UV)	Otro pretratamiento
<sup>47</sup>	X		X	
<sup>17</sup>			X	X
<sup>27</sup>	X		X	
<sup>75</sup>	X			X
<sup>72</sup>	X	X	X	
<sup>77</sup>	X			
<sup>35</sup>	X			X
<sup>18</sup>	X	X	X	

**Tabla V:** Estudios que mencionaron uno o más métodos de descontaminación

La mayoría de los estudios utilizan 2 o más métodos de descontaminación y en algunas publicaciones no especifican o detallan la técnica propiamente tal <sup>35,75,77</sup>.

Según los resultados, la técnica simple de descontaminación se puede utilizar como (1) método único<sup>77</sup>, (2) como paso previo a distintos procedimientos o pretratamientos de las muestras como descalcificación <sup>35</sup> y uso de estabilizadores de ADN<sup>75</sup> y (3) en combinación con otros métodos como generalmente es empleada<sup>27,47,72</sup>. Su uso como

técnica única de descontaminación está justificado en casos con bajo riesgo de contaminación de las muestras<sup>29,75</sup>, arrojando buenos resultados en la amplificación<sup>35,75,77</sup> su implementación de forma única o como paso previo, siendo suficiente para eliminar incluso los contaminantes presentes en muestras enterradas<sup>35,77</sup> que podrían interferir en la amplificación del ADN. Los autores probablemente consideraron que en las condiciones recién descritas el ADN contaminante no penetra profundamente en el diente por lo que una limpieza superficial bastaría para eliminarlo de la muestra<sup>28</sup>, además las características histológicas del diente, sobre todo del esmalte<sup>6</sup> lo hacen una muestra altamente resistente a la contaminación.

Según los resultados de esta revisión, la radiación UV es un método de descontaminación muy utilizado que actúa sobre el ADN exógeno fragmentándolo a través del dímero de timina. Generalmente esta técnica se usa en complemento con otras<sup>17,27,47,72</sup> y algunos autores<sup>47</sup> la consideran una técnica menos agresiva con el ADN endógeno en comparación con los productos químicos utilizados que podrían penetrar en el diente. Además, la luz UV presenta resultados positivos, tanto en muestras in vitro<sup>47,72</sup> como en muestras forenses de importancia arqueológica<sup>17,27</sup> donde también se utiliza como descontaminante de las áreas de manipulación. De acuerdo a los resultados de amplificación de ADN de muestras de hasta 2000 años de antigüedad<sup>17,27</sup>, se puede inferir que la radiación con luz UV elimina eficientemente la contaminación de ADN exógeno presente en la superficie de la muestra sin dañar el ADN endógeno degradado gracias a la presencia de barreras protectoras<sup>82</sup> como el esmalte.

Por otra parte, los estudios detallan la metodología que usaron, tanto en longitud<sup>47,72</sup> de onda como en el tiempo de exposición (entre 10-15 minutos)<sup>27,47,72</sup> y presentan la desventaja de que la técnica de descontaminación no fue evaluada en sus resultados y aunque así hubiera sido, debido a que la técnica UV se utilizó en combinación con otras no se hubiera podido determinar su influencia específica en el material genético.

La limpieza con hipoclorito de sodio es otro de los métodos más empleado en la descontaminación de las muestras en esta revisión, siendo usado principalmente en combinación con otras técnicas<sup>18,72</sup>. A pesar de que el hipoclorito fragmenta las hebras

de ADN<sup>28</sup>, se obtuvieron resultados positivos cuando las muestras fueron lavadas a una concentración del 3% durante 5 minutos con una tasa de éxito del 87.5% de cuantificación de ADN<sup>72</sup> no detectándose ADN exógeno. Iguales resultados se obtuvieron cuando se sumergieron las muestras en una solución de hipoclorito al 5% durante 15 minutos e incluso realizándose la extracción del material genético en distintas oportunidades lo que podría haber determinado un mayor riesgo de contaminación<sup>18</sup>. Estos resultados podrían estar asociados a que el hipoclorito de sodio al ser eliminado completamente de la superficie dental no dañó ni interfirió en la amplificación del ADN, ya que posiblemente degradó solo el ADN exógeno debido a la protección del ADN pulpar por el esmalte<sup>6,83</sup>. Una de las ventajas de estos estudios fue que detallaron la técnica en cuanto a concentración y tiempo de exposición del hipoclorito lo que permite tener la información de utilidad para que a futuro se generen protocolos respecto a esta materia. A pesar de los resultados exitosos obtenidos, aún se está dilucidando si el hipoclorito de sodio afecta el ADN endógeno por su alto potencial de penetración que le permitiría ingresar a la cavidad pulpar y degradar tejido orgánico <sup>28,29</sup> , por lo que se recomienda evitar su uso en dientes con bajo riesgo de contaminación.

Si bien se ha considerado el procedimiento de descontaminación un factor que puede alterar la degradación del ADN<sup>72</sup>, se debe destacar que los estudios no evalúan particularmente la influencia del método de descontaminación, debido a que utilizan técnicas complementarias distintas<sup>18,72</sup> tal como se observa en la *Tabla V*. En base a los buenos resultados en los perfiles genéticos se podría inferir que los métodos de descontaminación no degradan el ADN endógeno, sin embargo, los resultados son interpretados en base a objetivos que no analizan la eficiencia ni influencia de los descontaminantes en el material genético por lo que no se puede asumir una relación directa entre el método de descontaminación y la calidad del ADN.

### **6.3.2 Extracción pulpar**

La extirpación pulpar es un paso crítico dentro de los procedimientos para lograr una eficiente recolección de material genético, máximo rendimiento de la muestra y un análisis exitoso. Por lo mismo, el conocimiento de la técnica que recupere mejor el

ADN es de gran utilidad. De acuerdo con los resultados de nuestra revisión que se resumen en la *Tabla VI*, se exponen las técnicas utilizadas por los autores.

Referencia	Trituración	Acceso endodóntico oclusal	Sección horizontal	Sección longitudinal	Fragmentación
27		X			
36		X			
18		X			
14				X	
78				X	
46				X	
75			X		
22	X	X			
44	X	X	X		
17		X	X		
24					X

**Tabla VI:** *Métodos de extracción pulpar utilizados por distintos estudios*

De acuerdo con los resultados de la *Tabla VI*, la técnica de acceso endodóntico oclusal es la más utilizada<sup>18,27,36</sup>, seguida del corte horizontal<sup>17,44,75</sup> y la sección longitudinal<sup>14,46,78</sup>. En contraparte las menos empleadas son la trituración<sup>22,44</sup> y la fragmentación<sup>24</sup>. Algunos autores dentro de sus objetivos compararon diferentes técnicas entre sí<sup>17,22,44</sup> mientras que otras investigaciones no las contemplaron en los objetivos ni los resultados<sup>14,46,78</sup>

El método de acceso endodóntico oclusal es la técnica actualmente utilizada en odontología por ser un procedimiento fácil<sup>17</sup>. En los estudios que utilizaron esta técnica<sup>18,27,36</sup> incluso si la extracción se realizaba en 2 oportunidades<sup>18</sup>, se obtuvo una tasa de éxito en la identificación del ADN del 60% al 100%. Además, presentó grandes diferencias significativas en cuanto a cantidad y calidad de ADN cuando fue

comparada con la trituración<sup>22</sup>. Esta técnica de trituración se describe como un método sencillo y rápido, pero a pesar de ello tiene varias desventajas: (1) destruye completamente la muestra<sup>22</sup> causando una pérdida irreversible que imposibilita la obtención de datos importantes a través del examen físico; (2) debido a que se pulveriza el diente completamente se desconoce el tejido al cual pertenece el ADN; (3) produce calor que puede degradar aún más el ADN endógeno y (4) aumenta los riesgos de contaminación que llevan a una reducción de la cantidad y calidad del ADN<sup>84</sup>.

De acuerdo a la literatura, la técnica de acceso endodóntico oclusal preserva la anatomía del diente siendo una excelente alternativa cuando se requieren realizar procesos de identificación en más de una oportunidad, siempre que el operador realice el procedimiento con pericia para minimizar el riesgo de contaminación y utilice refrigeración para evitar que el calor del procedimiento afecte la pulpa dental.

Cuando se comparó el acceso endodóntico oclusal con el método de trituración<sup>44</sup> y sección transversal<sup>17,44</sup> todas las técnicas arrojaron resultados positivos<sup>44</sup>. Sin embargo, el método de sección transversal presentó mayor rendimiento (cuantificación del ADN mitocondrial) incluso en muestras prehistóricas en las que este se encontraba degradado<sup>17</sup>. Se demostró que si bien la técnica de acceso endodóntico oclusal y la de corte cervical son técnicas conservadoras, en la última existe menor manipulación dental lo que reduce la posibilidad de contaminación o destrucción permitiendo recuperar una alta cantidad de ADN<sup>17</sup>, premisa que se respalda con los buenos resultados obtenidos con la técnica horizontal en el estudio de Terada<sup>75</sup>.

Por otra parte, la técnica de extracción pulpar de corte longitudinal fue utilizada en un reporte de caso<sup>14</sup>, en un estudio experimental<sup>78</sup> y en dientes temporales<sup>46</sup> con una tasa de éxito sobre el 80% en la amplificación del ADN pulpar. Entre sus desventajas se menciona que es una técnica que requiere destruir longitudinalmente el diente para recuperar efectivamente los tejidos pulpares con más probabilidad de pérdida de tejido pulpar, riesgo que aumenta cuando se tienen raíces finas y curvas. Además, las tasas de éxito obtenidas en los estudios no pueden ser atribuidas a esta técnica ya que las investigaciones <sup>14,46,78</sup> no analizaron en sus objetivos su influencia en la cantidad y



calidad del ADN. Considerando lo anterior se sugiere realizar más investigaciones respecto a este tópico.

En contraste a las técnicas anteriormente expuestas se encuentra la técnica de fragmentación, método sencillo que permite la extracción del tejido pulpar en cantidad suficiente en la mayoría de los dientes con un éxito en la identificación de un 67,5%. Se postula que en comparación a otros métodos esta no disminuye la cantidad y la calidad del ADN<sup>24</sup> en contraposición a lo mencionado anteriormente. Sin embargo, tiene como desventajas que destruye la muestra y es un método menos prolijo que aumenta el riesgo de contaminación<sup>24</sup>. No obstante, existe poca literatura que respalde esta técnica y por consiguiente, no se podría asegurar el éxito en todos los casos.

La correcta elección de la técnica es un paso clave ya que influye directamente en la cantidad del ADN extraído. Sin embargo, de acuerdo a la literatura se ha prestado poca atención a mejorar los métodos de extracción pulpar dental y entre los vacíos identificados se encuentran la nula importancia que se le da al tipo de instrumento utilizado en la recuperación pulpar y la influencia de estos en la cantidad del ADN obtenido, por lo que profundizar en la selección del mejor instrumento para recuperar el tejido pulpar contribuiría a realizar técnicas cada vez más prolijas.

### **6.3.3 Extracción de ADN**

En la metodología de la identificación basada en ADN uno de los pasos clave para asegurar un resultado preciso, consistente y exitoso es la extracción de material genético<sup>37</sup>.

Existen diferentes métodos de extracción de ADN y entre los analizados en esta revisión está el ampliamente utilizado método orgánico (fenol-cloroformo), el método de sílice, el método de Chelex, además de las modificaciones a dichos protocolos. Algunos de los estudios analizados tenían como objetivo principal el estudio del método de extracción de ADN, mientras que otros simplemente lo empleaban sin realizar mayores conclusiones respecto a él, lo que hizo compleja la interpretación de datos.

El método orgánico de fenol cloroformo es considerado la técnica gold estándar de extracción de ADN<sup>42</sup> siendo la más probada en la ciencia forense<sup>40</sup> además de ser relativamente económica. Esta técnica proporciona un alto rendimiento de ADN<sup>42</sup> con una recuperación sustancialmente adecuada en muestras actuales<sup>17</sup> y extremadamente degradadas<sup>40</sup>, tanto antiguas como forenses<sup>17,45,74</sup>, permitiendo la identificación por perfil autosómico, genotipo Y-STR o ADNmt<sup>16,77</sup>.

Se ha demostrado que el método orgánico permite identificación por medio de ADN en dientes definitivos y temporales exfoliados/extraídos con precisión del 100% al mes de extracción y 40% a los 6 meses<sup>46</sup>. Sin embargo, estos resultados no se pueden atribuir a la técnica de extracción del ADN ya que habrían otros factores involucrados que no fueron analizados de manera independiente, como el intervalo *post mortem*. No obstante, se evidencia que la metodología orgánica tiene resultados similares en dentadura permanente y decidua a pesar de tener proporciones pulpares distintas<sup>21</sup> porque con esta técnica se obtienen resultados exitosos en muestras incluso altamente degradadas<sup>40</sup>.

Existen diferentes protocolos según el tipo de sustrato a digerir con tiempos de incubación variables<sup>40</sup>. Se postula que en caso de que se requiera identificación genética urgente, el uso de tiempos cortos de lisis celular arroja resultados de buena calidad y no existen diferencias significativas en la cantidad de ADN obtenido a tiempos mayores de incubación<sup>77</sup>. Si bien esta etapa preliminar de lisis es importante, lo principal en el proceso de extracción es el aislamiento del ADN<sup>40</sup> e incluso con tiempos acotados de lisis el ADN que se logra liberar es suficiente para lograr identificación.

Respecto al precipitado del ADN obtenido por el método orgánico de extracción, la columna de concentración ha arrojado mayores cantidades de ADN que el económico método de precipitado por isopropanol. Sin embargo, no han existido diferencias significativas en la amplificación por lo que el isopropanol habría compensado con una mayor pureza<sup>77</sup>. Lo anterior confirma que los sistemas de columnas han ayudado a aumentar el rendimiento y mejorar la fiabilidad del proceso en comparación con el desafío que significa la manipulación de líquidos<sup>85</sup> en los métodos manuales de precipitación por isopropanol.

Por otra parte, Tsuchimochi<sup>55</sup> usó una metodología basada exclusivamente en el tipo de resina Chelex, demostrando que al realizar una extracción de ADN de la pulpa dental de dientes quemados es tanto o más eficiente que usando la extracción de fenol-cloroformo, obteniendo ADN de calidad superior para la amplificación por PCR. Este resultado se puede explicar debido a que es una técnica que permite obtener resultados más óptimos por sus múltiples ventajas. Entre ellas, que es simple, rápida, elimina impurezas y además, no involucra solventes orgánicos ni múltiples tubos de transferencia, lo que contribuye a disminuir la probabilidad de pérdida o contaminación de la muestra <sup>40</sup>. Por todo lo dicho anteriormente se estima que este procedimiento puede facilitar el uso del PCR en el análisis forense.

Se han realizado modificaciones al método fenol cloroformo<sup>36</sup> agregando una descalcificación extensa de una semana con EDTA en combinación con el uso de la resina tipo Chelex. De esta forma se obtuvo ADN libre de contaminación por RNA, de alto peso molecular, con mayores rendimientos y de mejor calidad, consiguiendo mejores resultados en comparación con otros métodos. Estos resultados se pueden explicar por las ventajas que presenta el Chelex nombradas anteriormente y las cualidades de EDTA como agente quelante de los iones Mg ++ necesarios para la actividad DNasa, protegiendo así al ADN <sup>86</sup>. La extensa descalcificación desarrollada por Trivedi<sup>36</sup> mejoró la recuperación de los componentes celulares y la eliminación de los inhibidores de la PCR logrando una mayor extracción de ADN por este método en comparación con el método tradicional fenol-cloroformo.

En cuanto al método de sílice, este es una buena opción al método fenol-cloroformo ya que la cantidad de ADN extraído es similar e incluso superior a la obtenida de estudios en los que se utilizó el método orgánico. Se puede prescindir del paso de precipitación de ADN y además disminuye la contaminación de proteínas y el daño químico potencial para el investigador<sup>47</sup>. Se evidenció que la descalcificación no es necesaria para conseguir una extracción de ADN eficiente en tejidos calcificados con este método ya que la cantidad de ADN obtenido de dentina y pulpa fueron similares en un estudio que utilizó columnas de sílice sin descalcificación previa de las muestras<sup>47</sup>. La utilización de sílice GlassMilk ha permitido análisis de secuencias de

ADNmt exitosos. Esto se explica porque el método en base a sílice es una buena alternativa al método orgánico comúnmente utilizado, que además involucra menor daño químico, estandarizando y automatizando el procedimiento junto con mejorar el rendimiento de fragmentos de ADN de longitud pequeña a moderada, ya que no precisa de precipitación previa<sup>79</sup>.

El método de extracción que se debe elegir debe ser el más adecuado dependiendo del caso y de las características y condiciones en que la muestra se encuentre al momento de ser analizada, todo ello en función de la mejor recuperación de ADN.

#### **6.3.4 Amplificación del ADN**

Debido a que el ADN extraído se encuentra en pequeñas cantidades, se debe amplificar con el fin de producir suficiente ADN para poder analizarlo y es aquí donde la aplicación de técnicas en odontología forense ha ofrecido una nueva herramienta cuando la identificación por técnicas forenses usuales falla<sup>43</sup>.

Existen diferentes métodos de amplificación, sin embargo, la PCR convencional es el más utilizado, al igual que dentro de los estudios analizados en nuestra revisión <sup>16,18,43,44,45,46,47</sup> donde solo un estudio utilizó PCR en tiempo real <sup>20</sup> y otro utilizó un método diferente de amplificación<sup>60</sup>.

La PCR no requiere ADN de alto peso molecular para amplificar una secuencia. Solo precisa que la secuencia objetivo esté intacta para amplificar ADN incluso si este se encuentra en baja cantidad<sup>46</sup>, parcialmente degradado y/o desnaturalizado. Lo anterior resulta beneficioso para el análisis de muestras de casos forenses, en las que la cantidad y el peso molecular del ADN suelen ser menos que óptimos para el análisis por otros métodos<sup>55</sup>. Por tanto, se vuelve cada vez más importante la técnica en este campo<sup>43</sup>, posicionándose por encima de todos los otros métodos debido a su alta tasa de sensibilidad, especificidad, rapidez y confiabilidad<sup>46</sup>.

Si bien, prácticamente cualquier secuencia de ADN corta definida puede ser analizada de manera fácil y rápida utilizando PCR <sup>87,88</sup> los tejidos dentales han demostrado ser una buena fuente de ADN genómico<sup>45</sup>, con cantidades suficientes y de buena calidad

que consiguen con éxito<sup>43</sup> el análisis basado en PCR para uso forense<sup>45</sup>, logrando identificar con 100% de precisión muestras de dientes temporales analizados 1 mes después de exfoliados y con un 40% luego de 6 meses de exfoliación<sup>46</sup>.

Cuando el ADN pulpar se encuentra degradado o se producen perfiles parciales, se ha demostrado<sup>18</sup> que el kit de amplificación de ADN Minifiler1 es el más sensible y útil, mientras que en los casos que las cantidades de ADN nuclear sean bajas y no se logre la detección, el análisis de ADNmt<sup>16</sup> se puede llevar a cabo con éxito. No obstante, se sugiere que la PCR en tiempo real sería la mejor indicación para amplificar ADN tanto nuclear como mitocondrial si se encuentra en bajas cantidades o arroja resultados negativos con otras técnicas<sup>89</sup>, facilitando así el análisis odontológico de restos<sup>46</sup>

En los casos que la amplificación ha arrojado resultados equívocos (falsos positivos o falsos negativos)<sup>46</sup> las causas pueden estar en errores de manipulación (como la mezcla de muestras o el etiquetado incorrecto), la baja temperatura de la PCR, cebadores largos, alta concentración de sal en el tampón de reacción, baja concentración del ADN, contaminación e inhibidores<sup>46</sup>.

La amplificación e identificación por medio de PCR es precisa y confiable<sup>45</sup> incluso en dientes que han sido sometidos a condiciones ambientales adversas, tanto experimentales<sup>45</sup> como reales<sup>44</sup>, ya que los dientes tienen la ventaja de ser resistentes a la degradación física y ambiental<sup>45</sup> por lo que permiten obtener ADN en cantidades suficientes.

La tasa de éxito de la amplificación se ve influenciada de manera crucial por la concentración inicial del ADN<sup>47</sup>, el tamaño de los fragmentos como factor crítico, la sensibilidad de la electroforesis como método de visualización de los resultados de amplificación<sup>44</sup> que a menudo da una sobreestimación del rendimiento del ADN<sup>43</sup> y la coexistencia de inhibidores de PCR<sup>20</sup>. Con respecto a estos últimos se sugieren altos estándares de asepsia y una temperatura adecuada mientras se realiza la PCR.

Existe un método de amplificación distinto al PCR desarrollado recientemente y que fue utilizado solo en un artículo de esta revisión. Este es el método de amplificación

isotérmica mediada por bucle (LAMP)<sup>60</sup> y tiene la capacidad de amplificar directamente secuencias específicas de ADN en condiciones isotérmicas sin requerir de una plantilla de ADN desnaturalizada. Además, permite la identificación de manera más rápida y más simple que con PCR convencional ya que permite la detección visual de la amplificación gracias a la turbidez blanca que otorga el pirofosfato de magnesio<sup>90</sup>. (subproducto originado en grandes volúmenes en la amplificación) sin necesidad de electroforesis de reactivos especiales. Todo esto la podría convertir en una técnica útil en identificación de cuerpos. Sin embargo, se requieren más estudios sobre este método y sobre la influencia de las condiciones donde se encuentre el cuerpo.

Hemos visto a lo largo de este capítulo que los factores inherentes a la metodología pueden influir en la degradación y en la cantidad y/o calidad del ADN dental.

Respecto a la descontaminación, las 3 técnicas analizadas dieron buenos resultados. Sin embargo, se sugiere realizar técnicas no invasivas ya que sería suficiente para eliminar los contaminantes que podrían interferir en los análisis genéticos sin dañar el ADN endógeno de interés para la identificación. Por lo anterior, el método de descontaminación simple complementado con radiación con luz UV serían los más recomendados por ser menos agresivos con el ADN endógeno. Aun así, faltan estudios que analicen exclusivamente el impacto de la descontaminación en el ADN, así como investigaciones que evalúen el grado de contaminación previo al proceso de descontaminación y cómo afecta en ello el intervalo *post mortem*, haciéndose necesario el desarrollo de publicaciones que cuenten con grupo control para poder determinar la efectividad de la técnica. Todo lo anterior, sumado a la omisión por parte de algunos autores de la metodología de descontaminación utilizada, así como las especificaciones e impacto de esta, dificultan la estandarización y la selección adecuada de los métodos acorde a la variabilidad del caso.

En referencia a la técnica de extracción pulpar, esta determina la cantidad de tejido pulpar obtenido de la cámara y los conductos radiculares siendo un procedimiento crucial en los estudios forenses que requieren analizar material genético, sobre todo en muestras que contienen ADN en pequeños fragmentos, en los cuales es fundamental evitar la pérdida pulpar. Acorde a esto y a los resultados obtenidos en

esta revisión se recomienda el uso de una técnica conservadora, siendo la de sección horizontal a nivel cervical o la de acceso oclusal endodóntico las más idóneas debido a que presentan las ventajas de ser más conservadoras que otras y tener una entrada que permite una visión directa de la pulpa. Aún cuando estas técnicas se consideran sencillas, es necesario contar con todos los instrumentos necesarios y un operador que posea tanto un conocimiento acabado de la anatomía dental como la experticia en la manipulación de las muestras e instrumentos, a fin de evitar la contaminación del ADN, punto crítico en el rendimiento de la amplificación.

En cuanto a las técnicas de extracción de ADN se plantea que el método orgánico presenta como importante ventaja la gran cantidad de ADN recuperado y los métodos basados en sílice la alta eficiencia en la eliminación de inhibidores de la PCR. Sin embargo, el método basado en sílice tiene una mayor relación cantidad/calidad del ADN recuperado y mayor rendimiento de muestras amplificadas respecto al orgánico, lo que lo vuelve especialmente indicado en los casos forenses. Además, este método es más factible de automatizar, elimina el uso de solventes riesgosos para la salud del investigador (fenol:cloroformo). Por todo lo anterior y en base a los resultados encontrados en la literatura, con el afán de complementar las ventajas de ambos métodos se plantea que, dependiendo del caso, se combinen el método orgánico y el método en base a resinas (sílice o chelex). En lo referente a la descalcificación existe controversia en la literatura por lo que no se puede realizar un análisis concluyente.

Los tejidos dentales son una buena fuente de ADN para ser amplificada por PCR con alta sensibilidad, especificidad, confiabilidad y relativa rapidez, incluso en casos con muy poco ADN o ADN parcialmente degradado, como ocurre en casos forenses o cuando la muestra ha estado expuesta a condiciones ambientales extremas. Cuando las cantidades de ADN nuclear sean bajas se recomienda utilizar el kit de amplificación Minifiler<sup>1</sup> que ha demostrado ser más sensible que otros o recurrir al análisis de ADNmt para conseguir una amplificación exitosa. Cuando se necesite amplificar este tipo de muestras, la PCR en tiempo real es la indicación. La tasa de éxito de la amplificación por PCR está influenciada por los inhibidores de PCR y se deben tomar las medidas necesarias para extraerlos o evitar producirlos. En relación al método LAMP a pesar

de presentar ventajas por sobre el PCR, es muy reciente y hace falta mayor investigación sobre cómo influyen en él las condiciones donde se encuentre el cuerpo.

Finalmente se concluye que siempre se debe realizar una selección cuidadosa de los métodos a utilizar ya sea de descontaminación, extracción pulpar, extracción de ADN y amplificación del mismo, considerando las características de las muestras y factores ambientales, con el fin de maximizar el rendimiento del tejido pulpar. En el caso de muestras arqueológicas se deben extremar los cuidados.



## 7 CONCLUSIÓN

En esta revisión de la literatura se identificaron factores que influyen en la cantidad y/o calidad del ADN pulpar para fines de identificación. Se determinó que el factor que más influyó fue el referido a las condiciones *post mortem* a las que se vio expuesta la muestra y que a pesar de ello, el material genético fue suficiente para la identificación. Esto reafirma que el tejido pulpar es una excelente fuente de ADN para estudios forenses. No obstante, también pueden influir en el rendimiento del ADN pulpar el tipo de diente, las técnicas metodológicas y la pericia por parte del operador, destacándose la alta sensibilidad de las técnicas de extracción y amplificación que permiten la obtención de resultados exitosos incluso con baja cantidad y calidad de material genético. Los resultados obtenidos en esta revisión sobre la influencia en el ADN de: (1) las condiciones *post mortem* permiten prever en qué casos y condiciones el ADN pulpar será apto para identificación, (2) los factores inherentes al diente orientarán la selección de muestra más apropiada y (3) la metodología facilita realizar un manejo prolijo y específico de la muestra, aspecto en el que más se puede intervenir.

Se destaca que la literatura encontrada es reducida y de baja evidencia, además los autores se citaban entre sí, lo que fue una limitación en esta revisión. Así queda patente que esta temática es incipiente viniendo esta investigación a aportar a que se genere conocimiento en el área, siendo necesario continuar con la línea investigativa. Se sugiere que en investigaciones futuras se analice únicamente la degradación del ADN pulpar debido a que en algunos artículos de esta revisión no se especificó el origen histológico del material genético. Además, sería de gran utilidad tanto una estandarización como un análisis independiente de las variables para poder hacer comparaciones entre los resultados y pesquisar la influencia en el ADN de cada uno de ellos de forma sinérgica e individual.

## 8 REFERENCIAS

1. Briem Stamm AD. Importancia de la Odontología forense en la identificación humana. *D Penal*. 2016;124:1–2.
2. Pretty IA, Sweet D. A look at forensic dentistry - Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. *Br Dent J*. 2001;190(7):359–66.
3. Prajapati G, Sarode SC, Sarode GS, Shelke P, Awan KH, Patil S. Role of forensic odontology in the identification of victims of major mass disasters across the world: A systematic review. *PLoS One*. 2018;13(6):1–12.
4. Ohira H, Yamamuro Y, Kitagawa Y, Nakagawa K, Yamamoto I, Yamada Y. Effective appropriate use of dental remains and forensic DNA testing for personal identity confirmation. *Leg Med [Internet]*. 2009;11(SUPPL. 1):S560–2.
5. Higgins D, Austin JJ. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Sci Justice [Internet]*. 2013;53(4):433–41.
6. Gómez de Ferraris E, Campos Muñoz A. Histología y embriología bucodental. *J Chem Inf Model*. 2009;2:419.
7. Barrio-Caballero PA. Revision of DNA extraction methods from bone fragments in forensic laboratories. *Rev Esp Med Leg [Internet]*. 2013;39(2):54–62.
8. Mânica S, Shah Syed FM, shoro S, Venkatesh A, Qaq R. What are the most important teeth in the field of forensic odontology? *Bull Int Assoc Paleodont*. 2019;13(2):41–7.
9. Martínez-Frías ML. Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *Semergen*. 2010;36(5):273–7.
10. Álvarez V. Estudio multidisciplinar de la variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones humanas. Tesis Dr. 2008;320.
11. Nugroho MB. El DNA de Locard Genética forense y criminalista. *J Chem Inf*

- Model. 2013;53(9):1689–99.
12. Alonso AA. Conceptos básicos de ADN forense. Cent Estud Jurídicos [Internet]. 2004;1860–71.
  13. Sakari SL, Jimson S, Masthan KMK, Jacobina J. Role of DNA profiling in forensic odontology. J Pharm Bioallied Sci. 2015;7(April):S138–41.
  14. Sweet DJ, Sweet CHW. DNA Analysis of Dental Pulp to Link Incinerated Remains of Homicide Victim to Crime Scene. J Forensic Sci. 1995;40(2):15365J.
  15. Corach D, Sala A, Penacino G, Iannucci N, Bernardi P, Doretti M, et al. Additional approaches to DNA typing of skeletal remains: The search for “missing” persons killed during the last dictatorship in Argen
  16. Malaver PC, Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. Croat Med J. 2003;44(3):306–9.
  17. Hervella M, Iñiguez MG, Izagirre N, Anta A, De-la-Rúa C. Nondestructive Methods for Recovery of Biological Material from Human Teeth for DNA Extraction. J Forensic Sci. 2015 Jan;60(1):136–41.
  18. Pinchi V, Torricelli F, Nutini AL, Conti M, Iozzi S, Norelli GA. Techniques of dental DNA extraction: Some operative experiences. Forensic Sci Int [Internet]. 2011;204(1–3):111–4.
  19. Grey H. Anatomy of the human body.
  20. Mansour H, Krebs O, Pinnschmidt HO, Griem N, Hammann-Ehrt I, Püschel K. Factors affecting dental DNA in various real post-mortem conditions. Int J Legal Med. 2019 Nov;133(6):1751–9.
  21. Anatomía bucodental - Ignasi Serra Renom, Sílvia Serra Ristol, Alícia Serra Ristol - Google Libros [Internet]. [cited 2020 Aug 10].
  22. Tilotta F, Brousseau P, Lepareur E, Yasukawa K, de Mazancourt P. A comparative study of two methods of dental pulp extraction for genetic fingerprinting. Forensic Sci Int. 2010;202(1–3):39–43.

23. Yu C, Abbott P V. An overview of the dental pulp: Its functions and responses to injury. *Aust Dent J.* 2007;52(1 SUPPL.):S4–6.
24. Alia-García E, Parra-Pecharromán D, Sánchez-Díaz A, Mendez S, Royuela A, Gil-Alberdi L, et al. Forensic identification in teeth with caries. *Forensic Sci Int.* 2015;257:236–41.
25. Lee YL, Liu J, Clarkson BH, Lin CP, Godovikova V, Ritchie HH. Dentin-pulp complex responses to carious lesions. *Caries Res.* 2006;40(3):256–64.
26. Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques.* 2007;43(4).
27. Alakoç YD, Aka PS. “Orthograde entrance technique” to recover DNA from ancient teeth preserving the physical structure. *Forensic Sci Int.* 2009;188(1–3):96–8.
28. Kemp BM, Smith DG. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int.* 2005;154(1):53–61.
29. Higgins D, Kaidonis J, Townsend G, Hughes T, Austin JJ. Targeted sampling of cementum for recovery of nuclear DNA from human teeth and the impact of common decontamination measures. *Investig Genet.* 2013;4(1):1–8.
30. Zambrano G. A, Rutala W, Gergen M, Weber D. Descontaminacion ambiental con radiacion UV. *Rev Chil Infectol.* 2010;27(6):573–4.
31. Yang DY, Watt K. Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *J Archaeol Sci.* 2005;32(3):331–6.
32. Huel R. DNA Extraction from aged skeletal sample for STR typing by capillary electrophoresis. 2012;830:XIII, 394.
33. Schwarz C, Debruyne R, Kuch M, McNally E, Schwarcz H, Aubrey AD, et al. New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(10):3215–29.
34. Desmyter S, De Greef C. A more efficient extraction method of human bone

- resulting in improved DNA profiling. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2008;1(1):24–5.
35. Pfeiffer H, Huhne J, Seitz B, Brinkmann B. Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int J Legal Med.* 1999;112(2):142–4.
  36. Trivedi R, Chattopadhyay P, Kashyap VK. A new improved method for extraction of DNA from teeth for the analysis of hypervariable loci. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002;23(2):191–6.
  37. Barbosa C, Nogueira S, Gadanho M, Chaves S. DNA extraction: Finding the most suitable method [Internet]. *Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries.* Elsevier Inc.; 2016. 135–154 p.
  38. Rohland N. DNA extraction of ancient animal hard tissue samples via adsorption to silica particles. *Methods Mol Biol.* 2012;42(3):81–5.
  39. Dukes MJ, Williams AL, Massey CM, Wojtkiewicz PW. Technical note: Bone DNA extraction and purification using silica-coated paramagnetic beads. *Am J Phys Anthropol.* 2012;148(3):473–82.
  40. Lee SB, Shewale JG. DNA Extraction Methods in Forensic Analysis. *Encycl Anal Chem.* 2017;(June 2017):1–18.
  41. Willard JM, Lee DA, Holland MM. Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin. *Methods Mol Biol.* 1998;98:9–18.
  42. Dairawan M, Shetty PJ. The Evolution of DNA Extraction Methods. *Am J Biomed Sci Res [Internet].* 2020;8(1):39–45.
  43. Pötsch L, Meyer U, Rothschild S, Schneider PM, Rittner C. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *Int J Legal Med.* 1992;105(3):139–43.
  44. Alvarez García A, Muñoz I, Pestoni C, Lareu M V., Rodríguez-Calvo MS,

- Carracedo A. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. *Int J Legal Med.* 1996;109(3):125–9.
45. 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 Jul;29(4):470–6.
46. Kumar MG, Hegde AM. Sex identification from exfoliated primary teeth - A PCR study. *J Clin Pediatr Dent.* 2005;30(1):19–21.
47. Zapico SC, Ubelaker DH. Sex determination from dentin and pulp in a medicolegal context. *J Am Dent Assoc [Internet].* 2013;144(12):1379–85.
48. Hill PJ, Stewart GSAB. The polymerase chain reaction in molecular and microbiology. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1992;10(1):343–77.
49. Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Aquat Rev Científica Int Acuic en Español.* 2001;0(15).
50. 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. *Learn Discip ICLS 2010 Conf Proc - 9th Int Conf Learn Sci.* 2010;1:65–72.
51. Wang, Alice M, Doyle, michael V, Mark, David F. Cuantificación de ácidos nucleicos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. 2010;
52. Charanjeet singh. Quantative Real- Time PCR: Recent Advances. *Clin Appl PCR, Methods Mol Biol.* 2016;1392:33–42.
53. Merchán M., Tórres M. DA. Molecular biology techniques for research development. A literature review. *Rev Habanera Ciencias Médicas [Internet].* 2002;15(6):878–89.
54. Yang DY, Eng B, Saunders SR. Hypersensitive PCR, ancient human mtDNA, and contamination. *Hum Biol.* 2003;75(3):355–64.
55. Tsuchimochi T, Iwasa M, Maeno Y, Koyama H, Inoue H, Isobe I, et al. Chelating

resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal aliphoid repeat and short tandem repeats. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002;23(3):268–71.

56. Bessetti BJ. An Introduction to PCR Inhibitors. *Promega Notes.* 2007;9–10.
57. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(10):3741–51.
58. Rys PN, Persing DH. Preventing false positives: Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol.* 1993;31(9):2356–60.
59. Bettin-Martínez A, Villareal-Camacho J, Cervantes-Acosta G, Acosta-Reyes J, Barbosa J, Juan HS. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of human respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection. *Biomedica.* 2019;39(2):415–26.
60. Nogami H, Tsutsumi H, Komuro T, Mukoyama R. Rapid and simple sex determination method from dental pulp by loop-mediated isothermal amplification. *Forensic Sci Int Genet.* 2008;2(4):349–53.
61. Mehendiratta M, Jain K, Boaz K, Bansal M, Manaktala N. Estimation of time elapsed since the death from identification of morphological and histological time-related changes in dental pulp: An observational study from porcine teeth. *J Forensic Dent Sci.* 2015;7(2):95.
62. Molano Osorio M, Mejía M del P, Ardila Medina CM. Participación del odontólogo en la determinación del diagnóstico de la causa de muerte y del intervalo post-mortem. *Med leg Costa Rica.* 2009;26(1):23–34.
63. Allentoft ME, Collins M, Harker D, Haile J, Oskam CL, Hale ML, et al. The half-life of DNA in bone: Measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2012;279(1748):4724–33.
64. Paczkowski S, Schütz S. Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;91(4):917–35.

65. Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W. DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*. 1999;20(8):1722–8.
66. Sutlovic D, Gamulin S, Definis-Gojanovic M, Gugic D, Andjelinovic S. Interaction of humic acids with human DNA: Proposed mechanisms and kinetics. *Electrophoresis*. 2008;29(7):1467–72.
67. Tuross N. The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*. 1994;50(6):530–5.
68. Taylor PTG, Wilson ME, Lyons TJ. Forensic odontology lessons: Multishooting incident at Port Arthur, Tasmania. *Forensic Sci Int*. 2002;130(2–3):174–82.
69. Savio C, Merlati G, Danesino P, Fassina G, Menghini P. Radiographic evaluation of teeth subjected to high temperatures: Experimental study to aid identification processes. *Forensic Sci Int*. 2006;158(2–3):108–16.
70. Merlati G, Danesino P, Savio C. Observations on dental prostheses and restorations subjected to high temperatures: experimental studies to aid identification processes [Internet]. [cited 2020 Aug 10].
71. Turner-walker G. La degradación química y microbiana de huesos y dientes.
72. Rubio L, Martinez LJ, Martinez E, De Las Heras SM. Study of short- and long-term storage of teeth and its influence on DNA. *J Forensic Sci*. 2009;54(6):1411–3.
73. Xavier M, Bento A, Costa A, Corte-Real A, Veloso C, Sampaio L, et al. Primary teeth as DNA reference sample in disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2011 Dec;3(1).
74. Murakami H, Yamamoto Y, Yoshitome K, Ono T, Okamoto O, Shigeta Y, et al. Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples. *Acta Med Okayama*. 2000;54(1):21–32.
75. Terada ASSD, da Silva LAF, Galo R, de Azevedo A, Gerlach RF, da Silva RHA. The use of a DNA stabilizer in human dental tissues stored under different



- temperature conditions and time intervals. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(4):331–5.
76. Boy SC, Bernitz H, Van Heerden WFP. Flow Cytometric Evaluation of Postmortem Pulp DNA Degradation. *Am J Forensic Med Pathol.* 2003 Jun;24(2):123–7.
77. Raimann PE, Picanço JB, Silva DSBS, Albuquerque TCK, Paludo FJO, Alho CS. Procedures to recover DNA from pre-molar and molar teeth of decomposed cadavers with different post-mortem intervals. *Arch Oral Biol.* 2012;57(11):1459–66.
78. Khan R, Avinash Tejasvi M, Paramkusam G. Comparison of gender determination from dental pulp and dentin after exposure to various environmental conditions: A polymerase chain reaction-based SRY gene study. *Contemp Clin Dent.* 2019 Apr;10(2):256–62.
79. Baker LE, McCormick WF, Matteson KJ. A Silica-Based Mitochondrial DNA Extraction Method Applied to Forensic Hair Shafts and Teeth. *J Forensic Sci.* 2001 Jan;46(1):14923J.
80. Mörnstad H, Pfeiffer H, Yoon C, Teivens A. Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *Int J Legal Med.* 1999;112(2):98–100.
81. Marroquin TY, Karkhanis S, Kvaal SI, Vasudavan S, Kruger E, Tennant M. Age estimation in adults by dental imaging assessment systematic review. *Forensic Sci Int [Internet].* 2017;275(June):203–11.
82. Ohta J, Tanaka A. Elimination of contaminating amplified short tandem repeat products by autoclaving and ultraviolet irradiation. *Med Sci Law.* 2018;58(1):25–31.
83. Pilli E, Modi A, Serpico C, Achilli A, Lancioni H, Lippi B, et al. Monitoring DNA Contamination in Handled vs. Directly Excavated Ancient Human Skeletal Remains. *PLoS One.* 2013;8(1):1–6.
84. Adler CJ, Haak W, Donlon D, Cooper A. Survival and recovery of DNA from

ancient teeth and bones. *J Archaeol Sci.* 2011;38(5):956–64.

85. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009.
86. Lade BD, Patil AS, Paikrao HM. Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol. *Springerplus.* 2014;3(1):1–7.
87. Bugawan TL, Saiki RK, Levenson CH, Watson RM, Erlich HA. The use of non-radioactive oligonucleotide probes to analyze enzymatically amplified dna for prenatal diagnosis and forensic HLA typing. *Bio/Technology.* 1988
88. Mullis KB, Faloona FA. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol.* 1987
89. Von Wurmb-Schwark N, Higuchi R, Fenech AP, Elfstroem C, Meissner C, Oehmichen M, et al. Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR. *Forensic Sci Int.* 2002
90. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov 23;289(1):150–4.