

**PROCESOS DE DESCONTAMINACIÓN DEL DIENTE HUMANO PREVIO AL
MÉTODO DE PULVERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL
GENÉTICO. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

**POR: AMANDA IGNACIA BEHM SÁENZ Y GASTÓN ANDRÉS
LANNEFRANQUE ANTEQUERA**

**Tesis presentada en la carrera de Odontología de la Universidad del Desarrollo para
optar al título profesional de Cirujano - Dentista**

PROFESOR GUÍA

**Dra. Gabriela Herrera Suárez., Licenciada en odontología, Magíster en educación
universitaria para ciencias de la salud**

Diciembre 2019

SANTIAGO

DEDICATORIA:

Este estudio va dedicado a todas las personas que nos han apoyado durante este proceso arduo y esforzado.

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos el constante apoyo de nuestra tutora la Dra. Gabriela Herrera, por su tiempo, buena disposición, enseñanzas y apoyo constante en el desarrollo de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1-2
MARCO TEÓRICO	3-9
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13-15
RESULTADOS	16-22
DISCUSIÓN	23-26
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28-30

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
TABLA 1 Términos de búsqueda	14
TABLA 2 Resultados de la búsqueda	16-17
TABLA 3 Estudios elegidos para análisis	19-22

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1 Selección de estudios según PRISMA	18

RESUMEN

A lo largo de la historia de la medicina y sus múltiples especialidades y ramas, encontramos la especialidad de medicina forense, la cual se encarga de realizar los análisis pertinentes al cadáver o resto cadavérico humano mediante estructuras que lo permitan, como piel, huesos, pelo, etc., logrando de esta forma identificar al sujeto, determinar causa de muerte y/o data de muerte. En varias situaciones este proceso es imposible dadas diversas circunstancias externas como incendios, desastres naturales importantes o simplemente condiciones extremas donde el estudio de tejidos como los anteriormente mencionados no es factible y solo los dientes, dada su alta resistencia, son los únicos ejemplares que persisten y pueden ser estudiados. Es precisamente en estas situaciones donde la odontología forense cobra suma importancia, llevando a cabo un proceso específico y minucioso para obtener información de una parte del cuerpo humano tan pequeña como lo es el diente.

El propósito del presente estudio es, mediante una revisión bibliográfica de la literatura, analizar los procedimientos de descontaminación previos al método convencional de obtención de ADN o pulverización, a partir de estructuras dentarias en seres humanos.

Para poder realizar este trabajo se buscará de forma exhaustiva la literatura disponible en EBSCO (Dentistry & Oral Sciences Source, Academic Search Ultimate), PubMed y SciELO Citation Index, a partir de palabras claves previamente establecidas (Forensic dentistry, DNA, Teeth, Pulverización, Teeth grinding, Odontología forense, ADN, Dientes, Pulverización, Rugoscopy, Lip) con el fin de sintetizar la información recabada. Este análisis estará limitado a lenguaje español e inglés, estudios clínicos y/o revisiones sistemáticas realizadas en humanos, los cuales se encuentren disponibles como texto completo y acotado a los últimos 10 años.

En la búsqueda se obtuvieron 226 estudios de los cuales sólo 13 cumplieron con todos los requisitos de inclusión, estos fueron ingresados para su completo análisis.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los campos de acción clínico del odontólogo forense se encuentra una amplia gama de actividades como por ejemplo; evaluación y análisis de traumatismos orofaciales en casos de maltratos, abusos, accidentes, etc., identificación de cadáveres o restos cadavéricos expuestos a condiciones extremas o desastres naturales, en donde las únicas estructuras remanentes y viables para estudiar sean las estructuras dentarias, estimación de edad del individuo pre y/o post mortem, identificación, análisis y comparación de marcas de mordida, patrones labiales (queiloscopy) patrones de rugas palatinas (rugoscopy), estudios arqueológicos, entre otros (Sofian, C, 2017).

Los procedimientos identificatorios mediante estructuras dentarias han jugado un rol clave en situaciones de desastres naturales o frente a alteraciones que puedan ser causadas por el ser humano, debido a que los dientes resisten condiciones extremas de temperatura y pueden proveer información valiosa en la identificación de una persona. La identificación de víctimas tradicionalmente recae sobre los esfuerzos combinados de la policía, dentistas y patólogos en donde la información recabada ante mortem de los individuos es comparada con la información post mortem de las víctimas (Manjunath, 2011).

Generalmente la información recabada ante mortem corresponde a modelos de estudio realizados en yeso, radiografías, fichas clínicas donde se registran las acciones realizadas a los individuos implicados (restauraciones), entre otros. Lamentablemente, cuando no se encuentra disponible esta información, sólo los perfiles de ADN son los que permiten la identificación exacta del individuo, los cuales son analizados con otra muestra de ADN del mismo individuo ante mortem obtenido a través de utensilios como cepillos de dientes,

peines, sangre almacenada o simplemente con muestras de ADN de algún pariente de primera línea (Padres , hermanos y/o hijos) (Manjunath, 2011).

Dada la gran cantidad de información presente en la literatura y en consecuencia de lo anteriormente expuesto, el propósito del presente estudio es, mediante una revisión bibliográfica de la literatura, analizar los procedimientos previos de decontaminación de las estructuras dentarias humanas, para luego ser sometidos al método convencional de obtención de ADN o pulverización, de tal modo de lograr sintetizar adecuadamente esta información y generar una ayuda para el odontólogo forense o aspirante a la especialidad.

MARCO TEÓRICO

Odontología forense:

Dentro de las múltiples ramas existentes de la profesión odontológica, la odontología forense corresponde a la disciplina científica en donde el marco de interés es el diente, la cavidad oral y todas sus implicancias, comenzando con su morfología y análisis de los componentes estructurales, en pos de obtener información para solventar casos legales y/o criminales (Spirov, Vancho, 2017).

La relevancia de la odontología forense se remonta desde el siglo pasado; los primeros registros disponibles en los cuales esta disciplina actúa como apoyo en la determinación de la edad cronológica de los individuos corresponden al siglo XX en Inglaterra (Senn DR, 2013).

Este campo de la odontología cobra suma importancia en aquellas situaciones donde se requiera la identificación de cuerpos o restos humanos mediante estructuras dentarias, en donde el cadáver o resto cadavérico se encuentre sin posibilidad de identificar de otras maneras dado su grado de destrucción. (Moreno et al, 2009). En estos casos otros tejidos de interés para la identificación médico-legal como sangre, pelo, piel, uñas, huesos, etc., generalmente se encuentran con un alto grado de degradación, o derechamente ausentes, debido a su poca resistencia y pueden no ser viables para su posterior estudio (Spirov, Vancho, 2017). Se ha demostrado mediante diversos estudios que los dientes pueden llegar a resistir hasta 1600°C sin una pérdida importante de su microestructura (Moreno et al, 2009), es por esto que en situaciones extremas, como desastres naturales importantes, exposición prolongada a fuego, desecación, descomposición, inmersión prolongada, agentes químicos, físicos, etc. (Moreno et al, 2009)., o la investigación de casos criminales,

el reconocimiento individual mediante estas estructuras, pueden proporcionar la base para la identificación del cuerpo o restringir el alcance del proceso de investigación (Somedá, 2009).

Con respecto a la estructura dentaria propiamente tal, otra característica que les otorga resistencia, es que estos se encuentran articulados en el hueso alveolar del maxilar y de la mandíbula, tejidos óseos que, unidos a los tejidos blandos, mucosos, epiteliales y musculares otorgan mayor protección a estas estructuras. (Rubio, Leticia, 2016).

Material genético (ADN):

En cuanto al contenido de interés de la estructura dentaria, material genético o ADN, el ADN que mayoritariamente prima es el ADN mitocondrial (ADNmt) versus el ADN nuclear (ADNn) (Rubio, Leticia; 2016), este se mantiene inalterable dentro de la arquitectura dentaria dado que los dientes son la estructura del cuerpo humano que se preserva de mejor manera y por mayor tiempo, debido a su alta rigidez y resistencia. (Reesu, Augustine, & Urs, 2015)

En cada célula existen entre 250 a 1000 mitocondrias, las cuales varían dependiendo de las necesidades metabólicas y funcionales de la célula, y en cada mitocondria existen varias copias de ADN, es decir existe un número mucho mayor de copias de ADN mitocondrial que ADN nuclear por célula (Bellizzi D, 2013).

Es por esto que en muestras forenses muy críticas (con escasa cantidad de ADN o con ADN en mal estado) tenga más éxito el análisis de ADN mitocondrial que el de ADN nuclear. Sin embargo, el ADN mitocondrial presenta una peculiaridad: se hereda única e

íntegramente de la madre, debido a que en la fecundación el material genético mitocondrial paterno se desprende, por lo que no existe combinación con este. Esto puede generar problemas en caso de que el único material genético comparable sea de origen paterno (Bellizzi D, 2013).

Las características básicas hacen útil el uso de ADN mitocondrial en investigación forense y antropológica son:

1. El elevado número de copias por célula, da una mayor probabilidad de que por lo menos alguna resista los efectos dañinos del medio ambiente, tiempo, químicos, etc., sin ser degradada.
2. Su menor tamaño facilita la conservación en el tiempo a pesar de que las condiciones no sean apropiadas; esto se debe a que al ser más pequeño las probabilidades de ser afectado son menores que las del ADN nuclear.

Estas características aseguran la estabilidad del ADN mitocondrial postmortem comparado con el ADN nuclear (Bellizzi D, 2013).

El diente es la fuente más valiosa para extraer ADN dentro de todas las estructuras que conforman el cuerpo humano, ya que es una caja sellada que preserva el ADN de condiciones ambientales extremas, a excepción de su entrada apical. Esto ha llevado a la investigación de varios tejidos de la especie como fuente potencial de material genético probatorio. Recientemente, los dientes han sido objeto de estudios de ADN, ya que el tejido dental envuelve físicamente la pulpa y ofrece una configuración anatómica de gran durabilidad (Abreu-Glowacka. M, 2011).

Con respecto al ADN nuclear, este análisis es efectivo debido a la recombinación genética, la cual diferencia a todas las personas, inclusive a los gemelos univitelinos. Esto se debe a la infinidad de combinaciones entre gametos en la meiosis (Butler J.M, 2001).

Genética forense y ADN:

La genética forense se define como el uso de ciertas técnicas empleadas para la identificación de los individuos, en base al análisis de ADN o material genético.

Para obtener el material genético de las estructuras dentarias, se debe acceder al contenido interno de este, el cual corresponde a la pulpa dental. Ésta es definida como un tejido conectivo laxo de consistencia suave y gelatinosa, con gran inervación sensorial, microcirculación abundante y una gran presencia de distintos grupos celulares, la cual ocupa la cavidad central y conducto (s) radicular (es) de cada diente de ambas arcadas (maxilar y mandíbula). Todas estas características la convierten en un elemento sumamente útil en la obtención de información genética (Carrasco, P, 2017).

Las pruebas de ADN también juegan un papel importante en la identificación forense. Sin embargo, la investigación genética para este propósito utiliza un protocolo metodológico que requiere un laboratorio equipado con tecnología específica para garantizar la efectividad y, por lo tanto, se convierte en un procedimiento costoso, que requiere tiempo y es operador dependiente (Datta P, 2012).

Actualmente existen diversas técnicas descritas en la literatura, para obtener ADN de las estructuras dentarias. Estas tienen como objetivo la obtención de pulpa y / o dentina. Se describen secciones horizontales o verticales a diferentes niveles, accesos endodónticos oclusales o apicales, con posterior raspado o taladrado del interior del diente mediante instrumental endodóntico manual o mecanizado, otros métodos simplemente muelen todo o parte del diente por trituración entre dos placas de acero, con un mortero, molino de huesos, molinillo de tejido o molinillo criogénico (Higgins, D, 2013).

En cuanto a la obtención de la muestra de ADN, el método más utilizado actualmente corresponde al de pulverización (Hervella, Iñiguez, Izagirre, Anta, & de-la-Rúa, 2015), en donde básicamente la estructura dentaria es microgranulada hasta obtener un polvo fino mediante molienda manual o automática en frío para extraer ADN de todas las células de tejido dentario (Hervella, Iñiguez, Izagirre, Anta, & de-la-Rúa, 2015), esta técnica presenta varias desventajas, dentro de las cuales tenemos que el diente es completamente destruido, por lo que futuros estudios radiográficos, anatómicos o bioquímicos son imposibles de realizar, pero sigue siendo el método de preferencia dada su alta efectividad (Sofian, C, 2017).

Todas las técnicas de obtención de ADN dental requieren un tratamiento previo de la estructura dentaria, el cual consta varias etapas y la primera de estas siempre es la descontaminación superficial. Existen múltiples técnicas de descontaminación utilizadas actualmente, tales como; lavar con NaClO (hipoclorito de sodio), sumergir los dientes en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), lavar con psoraleno y posterior irradiación con luz UV, entre otros. Lamentablemente, varias de estas técnicas son dañinas para el ADN en

estudio, por lo que se recomienda aplicar técnicas simples de limpieza; tales como, cepillado de los dientes o un ligero raspado y limpiar luego con agua libre de ADN (Higgins, D, 2013).

Un mal manejo previo de la estructura dentaria podría provocar serias consecuencias tales como alteraciones severas del material genético endógeno o mezcla de éste con material genético exógeno (contaminante de la estructura), por lo cual el estudio genético de laboratorio podría ser un fracaso (Higgins, D, 2013).

Dado esto, es importante mencionar que la globalización ha traído consigo los problemas de una sociedad cambiante debido a la movilidad actual de la población mundial, creando nuevos desafíos y dificultades para la profesión (Pittayapat P, 2012). Por lo cual es mandatorio agilizar procesos y facilitar el trabajo de las personas.

Debido a las múltiples maneras de manejar la estructura dentaria previo al procedimiento de pulverización para la obtención de ADN, y como estas pueden alterar el objetivo del estudio, es importante tener en cuenta maneras de asegurar un diente lo más descontaminado posible, de manera rápida y eficiente, sin el riesgo de afectar el material genético endógeno (Higgins, D, 2013).

De acuerdo a la información disponible en la literatura se realizará una revisión con respecto al método de pulverización y procesos de descontaminación previos de dientes humanos para la obtención de ADN, estableciendo de esta manera una ayuda al entorno odontológico forense, en cuanto a una recolección, integración y síntesis de la literatura

actual con respecto a este proceso que antecede a la pulverización como método de obtención de ADN.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En la literatura se puede apreciar una gran cantidad de procesos de descontaminación previos a llevar a cabo el método de pulverización de la estructura dentaria para la obtención de ADN viable para el posterior estudio, por lo que no existe un procedimiento estandarizado.

HIPÓTESIS

Por medio de esta revisión bibliográfica se reunirá información más canalizada, filtrada y estructurada de un proceso previo de descontaminación del diente humano para la obtención de ADN (material genético), mediante el método de pulverización.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Reunir información con respecto a procesos previos de descontaminación del diente humano, para extraer ADN (material genético) mediante el método de pulverización.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Buscar información en las bases de datos EBSCO, PubMed y SciELO Citation Index con respecto procesos previos de descontaminación del diente humano, para la posterior obtención de ADN mediante el método de pulverización.
2. Leer la información encontrada en las bases de datos EBSCO, PubMed y SciELO Citation Index con respecto procesos previos de descontaminación del diente humano, para la posterior obtención de ADN mediante el método de pulverización.
3. Resumir para luego presentar la información encontrada en las bases de datos EBSCO, PubMed y SciELO Citation Index con respecto a procesos previos de descontaminación del diente humano, para la posterior obtención de ADN mediante el método de pulverización.
4. Discutir los resultados obtenidos y sugerir un proceso de preparación del diente humano, previo a ser pulverizado para la obtención de ADN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica con respecto al método de pulverización de dientes humanos para la obtención de ADN en tres buscadores: EBSCO (Dentistry & Oral Sciences Source, Academic Search Ultimate), PubMed y SciELO. En cada uno se utilizaron palabras claves específicas para la búsqueda las cuales son:

- Forensic dentistry
- DNA
- Teeth
- Pulverización
- Teeth grinding
- Odontología forense
- ADN
- Dientes
- Pulverización
- Rugoscopy
- Lip

Con respecto a los términos de búsqueda específicos para cada buscador, estos se detallan en la (Tabla 1).

Tabla 1. Términos de búsqueda

<i>Base de datos</i>	<i>Términos de búsqueda</i>
EBSCO (Dentistry & Oral Sciences Source, Academic Search Ultimate)	<ul style="list-style-type: none"> • ((Forensic dentistry) AND (DNA) AND (teeth)) • ((Odontología forense) AND (ADN) AND (Dientes)) • ((teeth grinding) AND (Forensic dentistry)) • ((Forensic dentistry) AND (DNA) NOT (rugoscopy) NOT (lip))
PUBMED	<ul style="list-style-type: none"> • ((Forensic dentistry) AND (DNA) AND (teeth)) • ((teeth) AND (Forensic dentistry) AND (Pulverization)) • ((teeth grinding) AND (Forensic dentistry)) • ((Forensic dentistry) AND (DNA) NOT (rugoscopy) NOT (lip))
SciELO Citation Index	<ul style="list-style-type: none"> • ((Odontología forense) AND (ADN) AND (Dientes)) • ((Forensic dentistry) AND (DNA) AND (teeth)) • ((Dientes) AND (Odontología forense)) • ((Forensic dentistry) AND (DNA) NOT (rugoscopy) NOT (lip))

Esta búsqueda está limitada por criterios de inclusión y de exclusión, estos son:

1. Criterios de inclusión:
 - a. Trabajos publicados en EBSCO (Dentistry & Oral Sciences Source, Academic Search Ultimate), PubMed y SciELO Citation Index, que contengan las palabras claves descritas en la (tabla 1).
 - b. Estos deben ser desde el año 2009 hasta el 2019.
 - c. Trabajos en inglés y en español.
 - d. Estudios realizados en humanos.
2. Criterios de exclusión:
 - a. Literatura gris : literatura no indexada a los buscadores especificados
 - b. Estudios que no hablen sobre el método de pulverización
 - c. Estudios que no especifiquen el tratamiento previo del diente para la obtención de ADN por pulverización

RESULTADOS

Tabla 2. Resultados de búsqueda

<i>Base de datos</i>	<i>Términos de búsqueda</i>	<i>Resultados</i>
EBSCO (Dentistry & Oral Sciences Source, Academic Search Ultimate)	((Forensic dentistry) AND (DNA) AND (teeth))	24 resultados (ING)
EBSCO (Dentistry & Oral Sciences Source, Academic Search Ultimate)	((Odontología forense) AND (ADN) AND (Dientes))	1 resultado (ESP)
EBSCO (Dentistry & Oral Sciences Source, Academic Search Ultimate)	((teeth grinding) AND (Forensic dentistry))	4 resultados (ING)
EBSCO (Dentistry & Oral Sciences Source, Academic Search Ultimate)	((Forensic dentistry) AND (DNA) NOT (rugoscopy) NOT (lip))	29 resultados (ING)
EBSCO (Dentistry & Oral Sciences Source, Academic Search Ultimate)	((Odontología forense) AND (ADN) NOT (rugoscopia) NOT (labio))	2 resultados (ESP)

PUBMED	((Forensic dentistry) AND (DNA) AND (teeth))	42 resultados (ING)
PUBMED	((teeth) AND (Forensic dentistry) AND (Pulverization))	2 resultados (ING)
PUBMED	((teeth grinding) AND (Forensic dentistry))	2 resultados (ING)
PUBMED	((Forensic dentistry) AND (DNA) NOT (rugoscopy) NOT (lip))	94 resultados (ING)
PUBMED	((Odontología forense) AND (ADN) NOT (rugoscopia) NOT (labio))	0 resultados
SciELO Citation Index	((Odontología forense) AND (ADN) AND (Dientes))	1 resultado (ESP)
SciELO Citation Index	((Forensic dentistry) AND (DNA) AND (teeth))	3 resultados (ING)
SciELO Citation Index	((Dientes) AND (Odontología forense))	15 resultado (ESP)
SciELO Citation Index	((Forensic dentistry) AND (DNA) NOT (rugoscopy) NOT (lip))	6 resultados (ING)
SciELO Citation Index	((Odontología forense) AND (ADN) NOT (rugoscopia) NOT (labio))	1 resultado (ESP)
Total		226

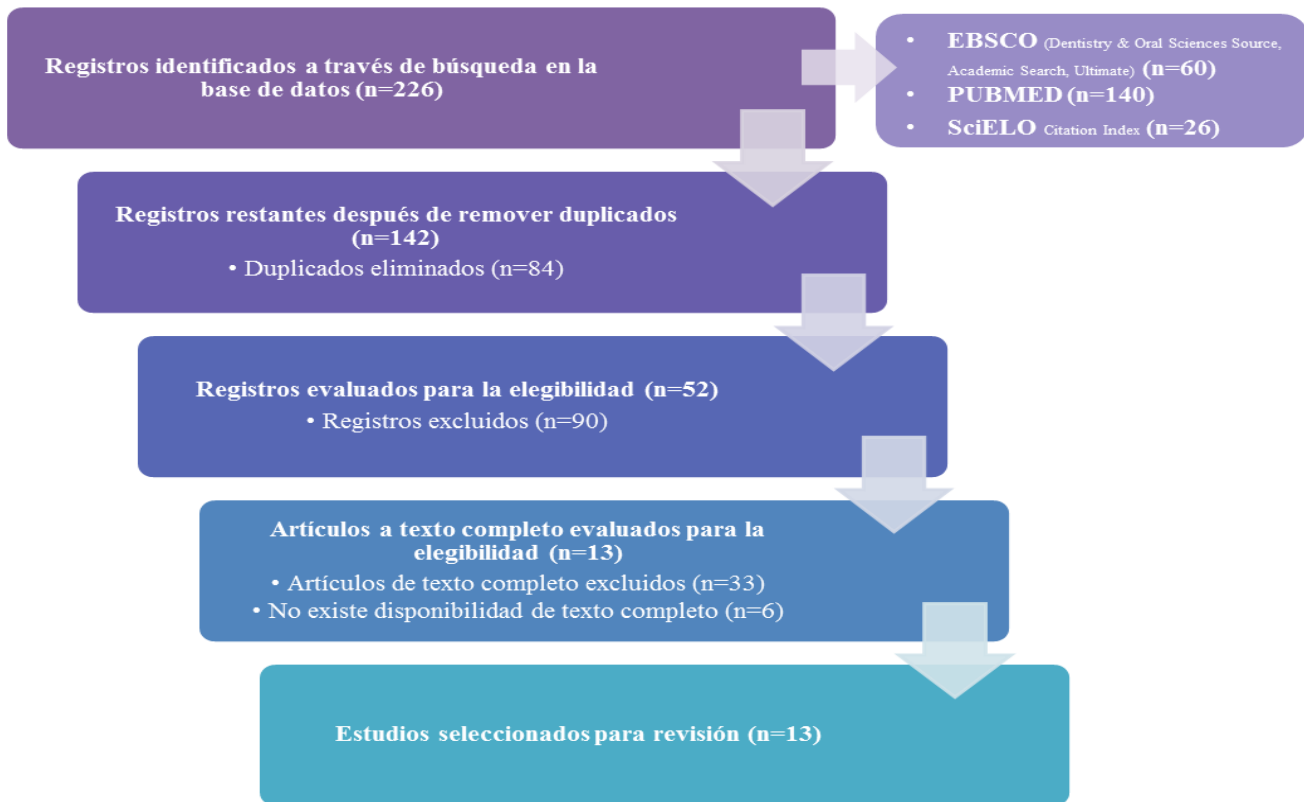


Figura 1. Selección de estudios según PRISMA

Las bases de datos utilizadas, arrojaron un total de $n = 226$ estudios, de los cuales 60 provienen de EBSCO (Dentistry & Oral Sciences Source, Academic Search, Ultimate), 140 de PUBMED y 26 de SciELO Citation Index. En primera instancia se procedió a eliminar aquellos estudios que se encontraban duplicados, quedando un total de $n = 142$, luego los abstracts fueron acuciosamente revisados, dejando un total de $n = 52$ y finalmente se revisan los textos completos quedando un total de $n = 13$ estudios que reúnen los criterios de elegibilidad para ser revisados por los autores. El diagrama de flujo de la selección de

artículos se muestra en la figura 1, con un total de n = 226 estudios encontrados mediante literatura electrónica, de los cuales solo n = 13 reunieron los criterios de elegibilidad.

Un 69,2% de los artículos ocupan agua para la descontaminación del diente previo a ser pulverizado, algunos únicamente (7,7%), otros como coadyuvante de otros químicos o simplemente para eliminar estos últimos, se utilizó principalmente agua destilada, esterilizada y agua ultrapura (libre de nucleasas), 69,2% de los artículos utilizan hipoclorito de sodio (NaOCl) o “cloro comercial”, 61,5% luz ultravioleta, en donde los periodos de exposición a esta fuente varían desde los 5 minutos hasta los 60 minutos, 53.8% utilizan algún tipo de abrasión mecánica (Scaler, cepillo, lavadora ultrasonica, curetas, bisturí, etc.), 15.3% de los artículos utilizaron etanol en altas concentraciones (80-100%), 15.3% de los artículos utilizaron ácido clorhídrico (HCL), 7.7% de los artículos utilizaron hidróxido de sodio (NaOH), 7,7% utilizó Alconox® al 5% detergente y finalmente, 7,7% utilizó formaldehído (CH₂O) at 10 %.

Ver tabla 3. Todos estos procedimientos previos son llevados a cabo con el fin de eliminar el material genético exógeno que no es de interés para el estudio.

Tabla 3. Estudios elegidos para análisis

ESTUDIOS ELEGIDOS PARA ANÁLISIS				
ESTUDIOS	TIPO DE ESTUDIO	OBJETIVOS	PROCEDIMIENTO DE DESCONTAMINACIÓN	RESULTADOS
Spirov, V. (2017).	in vitro	Determinar qué grupo dentario posee mayor cantidad de ADN y que tejido de este (pulpar o tejidos duros) aportan la	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar bajo la llave de agua - limpiar con un bisturí y un cepillo - Lavar en lavadora ultrasónica con NaOCl al 1% 	Cantidad de ADN según grupo dentario: <ul style="list-style-type: none"> - Incisivos: 0.06437ng/μl/g de diente - Premolares: 0.069942ng/μl/g de diente - Molares: 0.230011ng/μl/g de diente Cantidad de ADN según tejido:

		mayor cantidad de ADN	<p>dos veces por 10 min, reemplazando la solución de NaOCl entre lavados</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lavar en lavadora ultrasónica dos veces con agua destilada, reemplazando el agua entre lavados - Se deja secar durante toda la noche en una campana de humos 	<p>Tejido duro:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Incisivos: 0.052877ng/μl/g de diente - Premolares: 0.0568887ng/μl/g de diente - Molares: 0.4063847ng/μl/g de diente <p>Pulpa:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Incisivos: 26.32441ng/μl/g de diente - Premolares: 67.96987ng/μl/g de diente - Molares: 128.72151ng/μl/g de diente <p>*100% de muestras son Viabiles</p>
Zapico, S. C. (2013).	in vitro	Poder determinar el sexo del individuo mediante dentina y pulpa obtenido de dientes humanos	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar con un cepillo de dientes suave bajo agua destilada esterilizada corriente - Secar a temperatura ambiente - Exponer a luz UV por 15 min por lado (254 nanómetros) 	<p>96.3% de viabilidad de las muestras</p> <p>*Viabilidad dependiente del tipo de diente</p>
Rubio, L.(2013).	in vitro	Utilizar un enfoque dual cuantitativo y cualitativo para analizar la degradación del ADN dental producida por el paso del tiempo desde la muerte del diente, en condiciones ambientales controladas.	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar por 1.5 min en NaOCl al 10% - Enjuagar repetidas veces con agua - Exponer a luz UV (256 nm) por 10 min (Telstar Mini-V/ PCR, Telstar Industrial S.L., Terrassa, Spain) 	<p>Concentración de ADN en el tiempo :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0° meses 378.8ng/ml - 1°meses 163.9ng/ml - 3°meses 193.4ng/ml - 6° meses 150.7ng/ml - 12°meses 187.1 ng/ml - 18°meses 35.0ng/ml <p>*98.3% de viabilidad de las muestras La falla fue en el método de amplificación del ADN</p>
Ghaleb, S. (2019).	in vitro	Explicar cómo reconstruir un perfil biológico de cuerpos descompuestos o esqueletizados y establecer una referencia para otro investigador.	<ul style="list-style-type: none"> - Raspar la superficie externa con una hoja de bisturí estéril - Exponer a luz UV por 5 min 	<p>100% de las muestras fueron viables</p>
Rubio, L. (2018).	in vitro	Correlacionar los cambios de color en el diente humano sometido a diferentes temperaturas con la concentración de ADN presente	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar con agua destilada post-extracción - Se limpia la superficie externa con curetas - Secado a 21°C y 65% de humedad - Lavar por 1.5 min en NaOCl 10% - Enjuagar repetidas veces con agua 	<p>Viabilidad muestra de ADN:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Grupo control: 100% - 100°C x 60': 90% - 200°C x 60' : 80% - 400°C x 60' : 20% <p>*La viabilidad varía dependiendo del tiempo de exposición y la temperatura.</p>

			<ul style="list-style-type: none"> - Exponer por 10 min a luz UV (256-nm) (Telstar Mini-V/PCR, Telstar Industrial S.L., Terrassa, Spain). 																									
Hughes-Stamm, S. (2016).	in vitro	Desarrollar un acceso endodóntico mínimamente invasivo con limas a la cámara pulpar y dentina y comparar su eficacia en la extracción de ADN comparada con el método estándar de pulverización	<ul style="list-style-type: none"> - Sumergir en cloro comercial al 20% por 5 min - Sumergir en etanol al 100% por 5 min - Secar a 30°C durante la noche 	<p>Cantidad total de ADN cuantificable por muestra: (pg ADN/mg dentina)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Limado</th> <th>Pulverizado</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1-</td> <td>179.3</td> <td>124.79</td> </tr> <tr> <td>2-</td> <td>29</td> <td>0.81</td> </tr> <tr> <td>3 -</td> <td>6</td> <td>0.43</td> </tr> <tr> <td>4-</td> <td>39.21</td> <td>3.56</td> </tr> <tr> <td>5-</td> <td>1.67</td> <td>0.32</td> </tr> <tr> <td>6-</td> <td>9.6</td> <td>1.83</td> </tr> <tr> <td>7-</td> <td>3.6</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> <p>* Una explicación posible de que el ADN cuantificable sea mayor en el proceso de limado es que el procedimiento descontaminación no fue adecuado previo a pulverizar para remover todo el ADN exógeno, y el limado evita la superficie externa del diente.</p>		Limado	Pulverizado	1-	179.3	124.79	2-	29	0.81	3 -	6	0.43	4-	39.21	3.56	5-	1.67	0.32	6-	9.6	1.83	7-	3.6	0
	Limado	Pulverizado																										
1-	179.3	124.79																										
2-	29	0.81																										
3 -	6	0.43																										
4-	39.21	3.56																										
5-	1.67	0.32																										
6-	9.6	1.83																										
7-	3.6	0																										
Ossowski, A. (2013).	in vitro	Desarrollar un procedimiento universal para las tumbas de los prisioneros de la segunda guerra mundial, permitiendo realizar un proceso de identificación completo con el uso de análisis de ADN en conexión con estudios históricos y antropológicos.	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar con NaOCl al 5% - Enjuagar con agua destilada - Exponer a luz Uv por 30 min 	Del total de individuos que conformaban la muestra n=10, al 100% fue posible realizarle estudio genético, sin embargo solo el 20% fue posible generar un perfil biológico, dado la existencia de familiares vivos de primera línea.																								
Higgins, D. (2013).	Revisión sistemática	Resaltar los beneficios y las dificultades de utilizar tejidos dentales específicos para la extracción de ADN y hacer recomendaciones para la selección de dientes y muestreo que maximizará el éxito de la tipificación de ADN.	<ul style="list-style-type: none"> - Remover físicamente agentes externos de la superficie del diente con cepillo suave - Lavado con agua libre de ADN - Exponer a luz UV 	Técnicas simples de limpieza (cepillado, raspado leve con bisturí) para remover físicamente agentes externos y lavar con agua libre de ADN. Evitar agentes químicos que puedan dañar el ADN endógeno.																								
Raimann, P.	in vitro	Pobar cuatro diferentes protocolos para extraer	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar con agua estéril 	77% de las muestras fueron viables																								

E. (2012).		ADN de dientes molares y premolares de 26 cadáveres con intervalos post mortem de 2 meses a 6 años.		*No se observaron diferencias significativas en el método de obtención de ADN
Speller, C. F. (2012).	in vitro	Analizar la existencia de ADN en tejidos duros encontrados de un cráneo, y de ser así, asesorar a las autoridades para encontrar familiares para futuras pruebas de compatibilidad	<ul style="list-style-type: none"> - Sumergir en cloro comercial al 100% o (6%NaOCl) por 7 min - Sumergir en (HCl) (1N) por 1 min - Sumergir en (NaOH) (1 N) por 1 min - Enjuagar con agua destilada UltraPura TM DNase-/RNase-free (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) - Secar bajo luz UV por 60 min 	100% de las muestras fueron viables
Zupanic Pajinic, I.(2012).	in vitro	Realizar un estudio de eficiencia de tres nuevos kits de amplificación con el estándar europeo (ESS) de loci para tipificación de repetición en tándem corto autosómico (STR) de restos esqueléticos de la segunda guerra mundial exhumados de fosas comunes en eslovenia	<ul style="list-style-type: none"> - Lavar en 5% Alconox detergent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) - Enjuagar con agua - Sumergir en etanol 80% - Exponer a luz UV por 2×30-minutos, rotando en 180° entre cada exposición 	99% de las muestras fueron viables * La falla fue en el método de amplificación del ADN
Rubio, L. (2009).	in vitro	Analizar la degradación de ADN de 24 dientes humanos extraídos, luego de ser almacenados a temperatura ambiente por 0, 2, 5 y 10 años.	<ul style="list-style-type: none"> - Se retira tejido blando o hueso adherido al diente con bisturí - Secado con aire - Se sumerge en (NaOCl) al 3% por 5 min. - Se enjuaga con agua estéril - Se seca bajo una luz UV (256-nm) (Philips TUV 30 W, Microzone Corp., Nepean, Ontario, Canada) Por 10 min. 	82% de las muestras fueron viables *El proceso de descontaminación puede alterar el proceso de obtención de ADN y el tipo de diente puede alterar la cantidad de ADN
Prata,	in vitro	Evaluar la extracción de ADN de dientes, siendo	<ul style="list-style-type: none"> - Sumergir en 25 mL de (HCl) al 37 % 	El (HCl) al 37 % no obtuvo muestras de ADN viables

N.(2017).		expuestos a distintas soluciones químicas.	<ul style="list-style-type: none"> - Sumergir en 25 mL de (CH₂O) al 10 % - Sumergir en 25mL de (NaOCl) al 2.5 % por 4 días 	<p>El formaldehído (CH₂O) al 10 % obtuvo un 100% de viabilidad de las muestras</p> <p>El hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2,5 % obtuvo un 100% de viabilidad de las muestras</p>
-----------	--	--	---	--

DISCUSIÓN

En procedimientos identificatorios forenses, en donde el cuerpo se encuentre muy dañado o degradado dadas las condiciones climáticas o ambientales presentes, los dientes son usualmente la única fuente de información que se tiene. (Spirov, Vancho; 2017). Estas estructuras muchas veces se encuentran con el órgano pulpa ausente, fuente más valiosa de ADN, dadas condiciones de calcificación pulpar o tratamientos endodónticos, por lo que se debe recurrir a los tejidos duros (dentina y cemento celular) mediante pulverización, los cuales aportan suficiente material genético para el estudio en casos de ausencia pulpar (Spirov, Vancho; 2017).

No obstante al momento de realizar estudios de cadáveres o restos cadavéricos de larga data, restos esqueléticos enterrados, entre otros, las estructuras dentarias no están exentas de ser contaminadas por otros organismos como bacterias o virus, los cuales en la mayor parte de las veces pueden contaminar externamente la superficie dentaria con otro tipo de material genético que no es de interés (Hughes-Stamm, 2015). Por lo que para lograr un análisis adecuado de material genético mediante el método de pulverización, el diente requiere una serie de tratamientos de descontaminación de superficie, que aseguren que se obtenga la información estrictamente necesaria y no se mezcle con otros tipos de ADN exógenos, cuyo interés es nulo, y es más, daría información equivocada o simplemente no

permitiría lograr el objetivo de amplificación de las cadenas de ADN, en orden de lograr la identificación del cuerpo. (Higgins; 2013)

El tratamiento de descontaminación del diente, previamente a ser pulverizado para obtener una muestra de material genético viable para su posterior estudio, actualmente no está estandarizado (Higgins, 2013) y ,dadas las circunstancias, puede ser variado según lo que reporta la literatura seleccionada, ya sea con tratamientos físicos (luz ultravioleta, limpieza con scaler, cepillo, lavadora ultrasónica, lavado con agua estéril, etc) o tratamientos químicos (Hipoclorito de sodio, ácido clorhídrico, peróxido de hidrógeno, etc). Estos tratamientos pueden ser empleados tanto de manera única (físico o químico por sí solo) o la combinación de ambos. (Rubio, L, 2009; Zapico, S, 2013; Spirov, Vancho, 2017; Rubio, L, 2018)

Algunos de los componentes químicos empleados también podrían dañar el ADN endógeno de la muestra, como lo sería el NaOCl (Higgins, D, 2013) (Zapico, S. C, 2013) por lo que no se lograría el objetivo del estudio, y aplicar esta maniobra sería contraproducente. Así mismo es importante volver a recalcar la importancia del cemento celular (tejido ubicado a nivel radicular), cuyo contenido celular es altamente rico en información genética y tratamientos mecánicos como raspado con bisturí o raspado con curetas (Rubio, L, 2009; Zapico, S, 2013; Spirov, Vancho, 2017; Rubio, L, 2018), podrían eliminar gran parte de este tejido dejándolo fuera como fuente de obtención de ADN.

Se ha demostrado en estudios comparativos de métodos de obtención de ADN (pulverización y limado endodóntico por el ápice dentario) mediante dientes ambientalmente afectados, que el tratamiento de superficie debe ser rigurosos, de lo contrario agentes externos pueden afectar la muestra y otorgar menor cantidad de información o derechamente ausencia de esta (Hughes-Stamm, S, 2015).

Es importante mencionar el rol de ciertos agentes físicos como el cepillado ligero con agua corriente para eliminar restos groseros extra dentarios sin dañar la superficie radicular (Zapico, S.C, 2013), la luz UV como agente antibacteriano de superficie (Higgins, D, 2013), siendo uno de los métodos menos invasivos reportados (Zapico, S.C, 2013) agua libre de DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Speller, CF. Et al - 2012) que asegura un lavado eliminando residuos de ADN exógeno siendo complementado con lavadora ultrasónica, que son elementos que no dañan el material genético endógeno y tampoco afectan la morfología dentaria.

Además del tratamiento de superficie de descontaminación existen factores propios del diente, como por ejemplo tamaño del diente, tamaño cameral del diente, número de raíces, conductos, etc., que condicionan la cantidad de material genético disponible, en donde se ha demostrado que la cantidad menor de material genético presente es en los incisivos (Spirov, Vancho, 2017) y más aún si estos no presentan pulpa, podría no obtenerse suficiente cantidad de material genético (Zupanic Pajnic, 2012). Por lo tanto en estos casos el proceso de descontaminación de superficie podría no tener mayor efecto.

Como complemento de este proceso, no se puede dejar de lado que el individuo que maneje el diente debe estar debidamente protegido (Guantes estériles, pechera estéril, mascarilla descartable, gorro descartable lentes de protección, etc) y en un ambiente lo más aséptico posible (Hughes-Stamm, S. 2016)., de lo contrario el manejo minucioso del diente propiamente tal no tendría efecto si se contamina por otras fuentes.

CONCLUSIONES

Aún no se encuentra completamente establecido un protocolo estricto de tratamiento superficial externo del diente, pero dentro de la literatura revisada se pueden establecer ciertas sugerencias para el odontólogo forense o aspirante a este, de como proceder frente a estos casos.

Se recomienda comenzar con un cepillado suave con agua corriente para la remoción de elementos extra dentarios, luego sumergir el ejemplar en una tina ultrasónica con agua libre de ADN para eliminar restos superficiales más pequeños o difíciles de remover con el cepillo, para finalmente ser ubicado bajo lámpara de luz UV por toda la superficie. En el caso de que al extraer el diente del cadáver o resto cadavérico este sea acompañado por hueso o tejido blando adherido, eventualmente se podría usar un bisturí o cuesta cuidadosamente solo en las zonas de presencia de estos sin raspar la raíz.

Es estrictamente necesario el permanente empleo de barreras de bioseguridad y un riguroso procedimiento para poder obtener una muestra que no se encuentre contaminada y/o alterada, ya que esto nos puede llevar a resultados erróneos o no concluyentes, alterando así el fin y propósito del estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu-Glowacka, M.; Zaba, C.; Koralewska-Kordel, M.; Michalak, E.; Lorkiewicz-Muszynska, D. & Tezyk, A. (2011) DNA studies performed on a mummified body from Forensic Department Museum of Poznan University of Medical Sciences. *Arch. Med. Sadowej. Kryminol.*, 61(2):181-7.

Bellizzi D., DAquila P., Scafone T., Giordano M., Riso V., Riccio A., Passarino G. (2013) The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern. *DNA research*, 20 (6): 537-547.

Butler, J.M. (2001) *Forensic DNA Typing. Biology and Technology Behind STR Markers.* Academic Press. 1: 1-3

Carrasco, P., Brizuela, C., Rodriguez, I., Muñoz, S., Godoy, M., & Inostroza, C. (2017). Histological transformations of the dental pulp as possible indicator of post mortem interval: a pilot study. *Forensic Science International*, 279, 251-257. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.09.001

Datta P, Datta SS.(2012) Role of deoxyribonucleic acid technology in forensic dentistry. *J Forensic Dent Sci.*4:42-6.

Ghaleb, S., Hassan, D., Elroby, F., Mogassabi, K., Alemam, A. (2019). Identification of victims from mass grave discovery near Benghazi, Libya. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 67: (24-27).doi.org/10.1016/j.jflm.2019.07.012

Hervella, M., Iñiguez, M. G., Izagirre, N., Anta, A., & de-la-Rúa, C. (2015). Nondestructive methods for recovery of biological material from human teeth for DNA extraction. *J Forensic Sci*, 60(1), 136-141. doi:10.1111/1556-4029.12568

Higgins, D., & Austin, J.J. (2013). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Science & Justice*, 53(4), 433-441. doi:10.1016/j.scijus.2013.06.001

Hughes-Stamm, S., Warnke, F., van Daal, A. (2016). An alternate method for extracting DNA from environmentally challenged teeth for improved DNA analysis. 18:31-6. doi: 10.1016/j.legalmed.2015.11.008.

Tilotta, F., Brousseau, P., Lepareur, E., Yasukawa, K., De Mazancourt, P.(2010) A comparative study of two methods of dental pulp extraction for genetic fingerprinting, *Forensic Science International* 202 e39–e43.

Manjunath, B. C., Chandrashekar, B. R., Mahesh, M., & Vatchala Rani, R. M. (2011). DNA Profiling and forensic dentistry. A review of the recent concepts and trends. *Journal of forensic and Legal Medicine*, 18(5), 191-197.

Moreno S, Merlati G, Marin L, Savio C, Moreno F.(2009) Effects of high temperatures on different dental restorative systems: Experimental study to aid identification processes. *J Forensic Dent Sci*, 1:17-23.

Mullis, K.B. and Faloona, F. (1987) Specific synthesis of dna in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.

Ossowski, A., Kuś, M., Brzeziński, P., Prüffer, J., Piątek, J., Zielińska, G., ... Parafiniuk, M. (2013). Example of human individual identification from World War II gravesite.

Forensic Science International, 233(1-3), 179–192. doi:10.1016/j.forsciint.2013.09.00

Pittayapat P, Jacobs R, De-Valck E, Vandermeulen D, Willems G. (2012). Forensic odontology in the disaster victim identification process. *J Forensic Odontostomatol*. 30(1): 1-12.)

Prata, N., de Vasconcellos Costa, M., Reis Branco, G., Ferreira, L., dos Santos, C., Ademir, F., Paranhos, L., de Oliveira, J. (2017). Testing the Extraction of DNA from Human Teeth Exposed to Different Chemical Solutions. *International journal of odontostomatology*,11(2), 173-177. oi.org/10.4067/S0718-381X2017000200009

Raimann, P. E., Picanço, J. B., Silva, D. S. B. S., Albuquerque, T. C. K., Paludo, F. J. O., & Alho, C. S. (2012). Procedures to recover DNA from pre-molar and molar teeth of decomposed cadavers with different post-mortem intervals. *Archives of Oral Biology*, 57(11), 1459–1466. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.08.014

Reesu, G. V., Augustine, J., & Urs, A. B. (2015). Forensic considerations when dealing with incinerated human dental remains. *J Forensic Leg Med*, 29, 13-17. doi:10.1016/j.jflm.2014.10.006

Rubio, L., Martinez, L. J., Martinez, E., & de las Heras, S. M. (2009). Study of Short- and Long-Term Storage of Teeth and Its Influence on DNA. *Journal of Forensic Sciences*, 54(6), 1411–1413. doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01159.x

Rubio, L., Santos, I., Gaitan, M. J., & Martin de- las Heras, S. (2013). Time-dependent changes in DNA stability in decomposing teeth over 18 months. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(3/4), 638–643

Rubio, L., Sioli, J. M., Gaitán, M. J., & Martin-de-Las-Heras, S. (2018). Dental color measurement to predict DNA concentration in incinerated teeth for human identification. *PloS one*, 13(4), e0196305.

Rubio, L., Sioli, J. M., Santos, I., Fonseca, G. M., & Martin-de-las-Heras, S. (2016). Alteraciones Morfológicas en Dientes Sometidos a Altas Temperaturas con Interés Forense. [Morphological Changes in Teeth Exposed to High Temperatures with Forensic Purposes]. *International Journal of Morphology*, 34(2), 719-728.

Senn DR, Weems RA. (2013) Manual of forensic odontology. 5ed. Boca Ratón, Florida: CRC Press Taylor & Francis Group; DOI:10.1201/b13744.

Sofian, C. (2017). Extracción de ADN de los dientes. Trabajo de fin de grado en la facultad de Odontología. Universidad de Sevilla. <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/65186>

Someda, H.; Saka, H.; Matsunaga, S.; Ide, Y.; Nakahara, K.; Hirata, S. & Hashimoto, M.(2009) Age estimation based on three-dimensional measurement of mandibular central incisors in Japanese. *Forensic Sci. Int.*, 185(1-3):110-4.

Speller, C. F., Spalding, K. L., Buchholz, B. A., Hildebrand, D., Moore, J., Mathewes, R., Yang, D. Y. (2012). Personal identification of cold case remains through combined contribution from anthropological, mtDNA, and bomb-pulse dating analyses. *Journal of forensic sciences*, 57(5), 1354–1360. doi:10.1111/j.1556-4029.2012.02223.x

Spirov, V., Dimitrovski, O., Menceva, Ž., Duma, A., & Jakjovski, Z. (2017). Forensic Dentistry – the key to the truth. *Stomatoloski Glasnik Srbije*, 64(3), 113-120. doi: 10.1515/sdj-2017-0011

Zapico, S. C., & Ubelaker, D. H. (2013). Sex determination from dentin and pulp in a medicolegal context. *Journal of the American Dental Association (JADA)*, 144(12), 1379–1385.

Zupanic Pajinic, I., Gornjak Pogorelc, B., Balazic, J., Zupanc. T., & Stefanic, B. (2012). Highly efficient nuclear DNA typing of the World War II skeletal remains using three new autosomal short tandem repeat amplification kits with the extended European Standard Set of loci. *Croatian Medical Journal*, 53(1), 17-23. doi: 10.3325/cmj.2012.53.17