



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Derecho  
Especialidad Licenciatura en Criminología línea terminal en  
Ciencias Forenses



*"Justicia y Derecho, Espíritu de mi pueblo"*

**RENDIMIENTO DEL ADN AISLADO DE PIEZAS DENTALES SOMETIDAS A  
CONDICIONES EXTREMAS: CREMACIÓN Y CORROSIÓN**

**Presenta:**

**Dalia Méndez Calderón**

**Directora de tesis: Dra. Rosa Pérez Serrano**

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Mtro. Oscar Ángel Gómez Terán  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Margarita Cruz Torres  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Mtra. Teresita de Jesús Arroyo Córdova  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Mtra. Liduvina Pérez Olvera  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Mtro. Ricardo Ugalde Ramírez

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma

Director de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.

## RESUMEN

El análisis de la variación del ADN ha supuesto una enorme revolución en la Medicina forense. Desde que en 1985 Alec Jeffreys introdujo la huella genética ha habido una evolución continua en el tipo de marcadores genéticos y en las tecnologías mundiales. Los microsatélites en cromosomas autonómicos son actualmente los marcadores más utilizados, pero los polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) van emergiendo como marcadores del futuro y son ya útiles para muchas aplicaciones específicas, al igual que ocurre con polimorfismos en cromosomas sexuales o el ADN mitocondrial que son herramientas fundamentales para los investigadores forenses.

La presente investigación expone los hallazgos en el estudio y búsqueda de ADN en piezas dentales sometidas a condiciones similares a la cremación y la corrosión, de las cuales, al presentar cierto grado de deterioro, fue posible corroborar la existencia de material genético útil para la identificación de cuerpos que no pueden ser reconocidos a través de herramientas más comunes o por métodos más simples, como la media filiación o el dactilograma, de esta manera, la investigación pretende otorgar un medio ventajoso en el campo de la identificación forense.

## AGRADECIMIENTOS

Reconozco y agradezco el apoyo recibido para la realización de mi proyecto por parte de la Facultad de Medicina de la UAQ, Coordinación de Investigación y Posgrado en Odontología de la Facultad de Medicina, y a Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER 2018). En especial a la Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea, gracias a su ayuda y disposición de dejarme hacer uso del Laboratorio de Genética y Biología Molecular, sin esta posibilidad me hubiera sido imposible la realización de mi tesis. Al Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez que fue un colaborador clave para mi proyecto, sin su guía y conocimiento, los resultados de mi tesis serían completamente diferentes.

Así mismo agradezco a mi directora de tesis Dra. Rosa Martha Pérez Serrano por su apoyo e inducción en este proceso.

Y por último pero no menos importante, reconozco la labor, el compromiso, el apoyo y la realización de proyecto y tesis por parte de mi compañera y amiga Mayte Romero Camargo quien también es titular.

Y a todos aquellos que creen en este proyecto.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
ÍNDICE .....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.1.1 Antecedentes.....	3
1.1.1.1 Genética .....	3
1.1.1.2 Genética forense .....	5
1.1.1.3 Bases de datos genéticos.....	7
1.1.1.4 Odontología forense .....	14
1.2 Justificación.....	15
1.3 Objetivo.....	16
1.3.1 Objetivos particulares .....	16
1.4 Preguntas de investigación .....	17
1.5 Hipótesis .....	17
II. MARCO TEÓRICO .....	18
2.1 Ciencias forenses .....	18
2.2 Genética forense.....	18
2.3 Ácido Desoxirribonucleico y huella genética .....	18
2.4 Piezas dentales.....	19
III. METODOLOGÍA.....	22
3.1 Materiales.....	22
3.1.1 Dispositivos.....	22

3.1.2	Reactivos y soluciones .....	22
3.2	Desarrollo.....	23
3.2.1	Exposición a la variable de condiciones similares a la cremación .....	23
3.2.2	Exposición a la variable de condiciones de corrosión.....	24
3.2.2.1	Preparación de solución corrosiva.....	24
3.2.3	Extracción de la pulpa dental .....	25
3.2.3.1	Extracción por corte .....	25
3.2.3.2	Extracción por pulverización.....	25
3.2.3.3	Extracción por corte con fijación en resina .....	25
3.2.4	Aislamiento del ADN.....	26
3.2.4.1.1	Método de aislamiento de DNA por reactivo Trizol .....	26
3.2.4.1.3	Método de aislamiento de DNA por reactivo Ficoll .....	26
3.2.4.1.4	Método de aislamiento de DNA por reactivo fenol-cloroformo.....	26
3.2.5	Análisis de pureza del ADN .....	28
3.2.5.1	Nanospectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc) a 260 nm.....	29
	Análisis de la cantidad y calidad del ADN.....	29
3.2.5.2	Electroforesis en gel de agarosa .....	29
	Preparación de gel de agarosa.....	29
3.2.6	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	30
3.2.7	Análisis Estadístico .....	31
3.3	Ética de estudio.....	32
IV.	RESULTADOS .....	33
4.1	Exposición a condiciones extremas .....	33
4.2	Método de obtención de la pulpa dental .....	33

4.3 Método de aislamiento del ADN.....	34
4.4 Rendimiento de ADN .....	34
4.5 Descripción de cambios morfológicos.....	35
4.7 Aislamiento de ADN .....	42
4.8 Medición de ADN en NanoDrop.....	44
4.9 Electroforesis en gel de agarosa.....	47
4.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	48
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
VI. DISCUSIÓN.....	50
VII. IMPACTO .....	54
BIBLIOGRAFÍA .....	56
ANEXOS .....	59
Decálogo de la manipulación genética.....	59

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## I. INTRODUCCIÓN

Los estudios del ADN, en el campo de la genética forense, han generado un gran impacto en diversas áreas como el esclarecimiento de delitos graves, certificaciones aduaneras, investigación biológica del parentesco (tanto paternidad como maternidad), comercio ilegal de animales y principalmente la identificación de restos humanos en desastres naturales, terrorismo, desaparición y trata de personas.

Cabe mencionar que en las investigaciones criminales se deriva un apartado dedicado a la investigación criminalista, la cual se encarga fundamentalmente de determinar en qué forma se cometió un presunto delito y/o quién lo cometió. Por esta razón, es indispensable la identificación del material sensible significativo como las muestras biológicas deterioradas, degradadas o alteradas cuyo ADN puede resultar de baja calidad lo que dificulta el análisis genético.

En diversas ocasiones, los métodos convencionales de identificación son deficientes para generar un análisis de vestigios que se encuentran en alto grado de descomposición. En virtud de lo anterior, estandarizar un método efectivo que aisle ADN íntegro y de buena calidad, es de suma importancia para garantizar el correcto análisis por medio de la genética forense.

El presente proyecto pretende determinar el rendimiento del ADN aislado de piezas dentales sometidas a condiciones extremas (cremación y corrosión), con la finalidad de describir un método estandarizado que sirva de precedente para futuras investigaciones.



## 1.1 Planteamiento del problema

Las ciencias forenses se conforman de una gran variedad de disciplinas científicas que en la actualidad han desempeñado un papel fundamental para la ciencia y más específicamente para la resolución de delitos. La generación de evidencia que se emana de las ya mencionadas sirve como material probatorio durante el proceso jurídico y ante las instituciones que procuran y administran la justicia en nuestro país.

Los estudios del ADN, en el campo de la genética forense, han generado un gran impacto en diversas áreas como el esclarecimiento de delitos graves, certificaciones aduaneras, investigación biológica del parentesco (tanto paternidad como maternidad), comercio ilegal de animales y principalmente la identificación de restos humanos en desastres naturales, terrorismo, desaparición y trata de personas.

Cabe mencionar que en las investigaciones criminales se deriva un apartado dedicado a la investigación criminalista, la cual se encarga fundamentalmente de determinar en qué forma se cometió un presunto delito y/o quién lo cometió. Por esta razón, es indispensable la identificación del material sensible significativo como las muestras biológicas deterioradas, degradadas o alteradas cuyo ADN puede resultar de baja calidad y dificulta el análisis genético.

En diversas ocasiones, los métodos convencionales de identificación son deficientes para generar un análisis de vestigios que se encuentran en alto grado de descomposición. En virtud de lo anterior, estandarizar un método efectivo que garantice el aislamiento de ADN íntegro y de buena calidad es de suma importancia para garantizar el correcto análisis por medio de la genética forense.

El presente proyecto pretende determinar el rendimiento del ADN aislado de piezas dentales sometidas a condiciones extremas (cremación y corrosión), con la finalidad de describir un método estandarizado que sirva de precedente para futuras investigaciones.

### 1.1.1 Antecedentes

#### 1.1.1.1 Genética

La Genética es una ciencia que comprende sus inicios a partir del siglo XIX y XX, pues se inicia con el redescubrimiento de las leyes de Mendel en 1900 y no fue hasta 1906 que el británico William Bateson acuñó el término y escribió el primer libro de texto. (Gallori, 2012)

Durante el periodo 1850-1900 la biología emerge a partir del desarrollo de investigaciones, considerando los últimos vestigios medievales y aristotélicos y surge una visión unificada cuyo paradigma no es esencialmente distinto del nuestro. La teoría celular se había establecido ya en los años 30, pero en 1858 el fisiólogo alemán R. Virchow introduce una generalización adicional, el principio de la continuidad de la vida por *división celular*, que sintetiza en su célebre frase “*omnis cellula e cellula*”. Se establece entonces la célula como la unidad de reproducción. El reconocimiento de la célula como unidad reproductora condujo al abandono de la generación espontánea y del preformacionismo. Un animal o una planta se originan de una simple célula mediante un proceso epigenético, a través de sucesivos estados de diferenciación de un huevo indiferenciado. La célula contiene las potencialidades de generar un organismo. Esta generalización llevó casi compulsivamente a la búsqueda de la base material de la herencia. (Bateson, 1902)

Continuando con el mismo autor, tras la segunda guerra mundial se produce el verdadero asalto a la naturaleza física del material hereditario. La genética de procariotas inicia los nuevos horizontes de indagación. Se establece finalmente el ADN como la sustancia genética. A ello le sigue el descubrimiento del dogma del flujo de la información genética: ADN -> ARN -> proteínas. También se producen grandes avances en el conocimiento de la estructura y función de los cromosomas. Por último, en los setenta surgen las técnicas de manipulación de ADN que afectarán revolucionariamente a todas las disciplinas de la genética. Se listan a continuación los principales hitos de este periodo.

A partir de los 1940 se aplican de un modo sistemático las técnicas moleculares a la Genética, resultando en un éxito extraordinario. Se inicia el acceso en el nivel

molecular: la estructura y función de los genes es el próximo frente del avance genético.

Simultáneamente a estos descubrimientos, Seymour Benzer publica en 1955 su primer trabajo sobre la estructura fina del locus rII en el fago T4. En 1961, François Jacob y Jacques Monod proponen el modelo del operón como mecanismo de regulación de la expresión génica en procariontes. Charles Yanofsky y su equipo demuestran la colinearidad entre genes y sus productos proteicos en 1964. (ídem).

En 1966 R. Lewontin, J. L. Hubby y H. Harris aplican la técnica de la electroforesis en gel de proteínas al estudio de la variación aloenzimática de las poblaciones naturales, obteniéndose las primeras estimas de la variación genética de un sinnúmero de especies. La teoría neutralista de la variación molecular introducida por el japonés M. Kimura en 1968 suministra la primera explicación satisfactoria al exceso de variación hallada. (Rodwell, A. Bender, M. Botham, Kennelly, & Weil, 2016)

Los 70 presencian el advenimiento de las técnicas de manipulación del ADN. En 1970 se aíslan las primeras endonucleasas de restricción y H. Temin y D. Baltimore descubren la transcriptasa inversa. En 1972 se construye en el laboratorio de Paul Berg el primer ADN recombinante in vitro. El año 1977 fue pródigo: se publican las técnicas de secuenciación del ADN de Walter Gilbert y de Frederick Sanger; Sanger y sus colegas publican, a su vez, la secuencia completa de 5387 nucleótidos del fago  $\phi$  X174; varios autores descubren que los genes eucariotes se encuentran interrumpidos (intrones). (ídem).

A partir de este momento y con base en el desarrollo científico se abre camino a la llamada "era Genómica"; la cual partió con el proyecto Genoma humano, con un presupuesto inicial de 3 mil millones de dólares promovido por un Consorcio Público Internacional con la participación de EEUU, Reino Unido, Japón, Francia, Alemania, China y otros países, tenía como objetivo principal la consecución de la secuencia completa del genoma humano, el texto lineal formado por la secuencia de las cuatro bases químicas del ADN que contiene las instrucciones para construir un ser humano. Iniciado en 1990, el proyecto se dio por concluido en el 2003, dos años antes de lo previsto.

Se iniciaba una nueva era de investigación basada en la genómica que afectaría crucialmente a la biología, a la salud y a la sociedad. Con ello se inaugura una nueva era. (Bowler, 1989)

### **1.1.1.2 Genética forense**

La Genética forense es una especialidad de la Genética que incluye un conjunto de conocimientos de Genética necesarios para resolver ciertos problemas jurídicos.

Los tipos de casos de investigación biológica de la paternidad, pericias de criminalística biológica (estudio de vestigios biológicos de interés criminal como manchas de sangre, esperma, filamentos pilosos, saliva, osamenta, etc.) y, finalmente problemas de identificación.

En Europa existen alrededor de 300 laboratorios de Genética forense y específicamente en España más de 40, aunque sólo alrededor de una docena hacen pruebas de investigación criminal. En los Países Escandinavos, Holanda o Irlanda, la pericia se realiza en grandes laboratorios estatales (habitualmente un laboratorio para criminalística y otro para pruebas de paternidad) y en otros países como Italia, Portugal o Alemania está distribuida en laboratorios más pequeños. En otros países como Bélgica, Francia o Austria, la situación es intermedia. En el Reino Unido prácticamente se realizará todo en grandes laboratorios privados desde el cierre final anunciado para marzo del 2012 del Forensic Science Service. (Buckleton , Triggs , & Walsh , 2005)

La genética forense es una subespecialidad de la genética, la cual apareció tras el descubrimiento del grupo ABO en el año 1900 a cargo de Karl Landsteiner y con la subsecuente demostración de la herencia de este grupo en 1910 (Grandini, 2009).

Durante el proceso de innovación y desarrollo de las técnicas y métodos de análisis genéticos enfocados a los estudios de genética forense, el caso Pitchfork fue uno de los más representativos, obteniendo una gran repercusión social. Ocurrió en la década de 1980 en Leicestershire, Inglaterra y consistió en el hallazgo de los cadáveres de dos colegialas Mann y Dawn Ashworth.

De acuerdo a la investigación realizada y una vez al examinar los cadáveres, se encontraron en ellos lesiones que referían abuso sexual y estrangulación. En ausencia de cualquier pista útil para determinar el autor de dichos hechos, la policía interrogó a un portero local deficiente mental, llamado Richard Buckland, quien confesó haber violado y estrangulado a una de ellas; sin embargo, a la nula existencia del principio de certeza en una investigación, era necesario ratificar dicha declaración mediante un método factible y confiable.

Mientras tanto, un doctor de nombre Jeffreys había desarrollado un método de análisis de regiones de ADN denominadas repeticiones en tándem en número variable (VNTR), que difieren en longitud entre los miembros de una población, por lo que la Universidad de Leicester lo invitó a probar ese nuevo método de análisis de ADN (denominado huella genética) en el caso. El análisis reveló una correspondencia entre los perfiles de ADN de las muestras de semen obtenidas en las dos escenas del crimen. Lo anterior dejó un precedente de la participación de una persona implicada en ambos casos. Este resultado permitió descartar como sospechoso al portero de nombre Richard Buckland.

Con la finalidad de localizar una coincidencia con la muestra desconocida, la policía solicitó muestras de sangre de los adultos de la región, por lo que se ofrecieron un total de 4000 hombres excepto uno. Como respuesta a la negativa voluntaria, se emitió una orden de arresto y presentación del hombre para obtener su muestra. Como era de esperarse, existió una similitud por completo entre la muestra en cuestión y Pitchfork.

El caso Pitchfork (pionero en el ámbito jurídico) no fue solo el primer caso criminal resuelto mediante la obtención de perfiles de ADN, sino que también fue el primer caso en el que los perfiles de ADN condujeron a la exculpación de una persona inocente.

Otros de los casos más relevantes que generaron polémica para poder darles solución o que tenían cierto grado de dificultad para poder detener al presunto responsable, han podido ser resueltos a partir de la genética forense, utilizándose para identificar a los criminales con una precisión increíble cuando existe evidencia

biológica. De la misma manera, el ADN se puede utilizar para descartar a los sospechosos y exonerar a las personas erróneamente acusadas o condenadas por delitos. Resumiendo dicha idea, la tecnología del ADN es cada vez más vital para resoluciones y presentación de pruebas, estos ejemplos de casos son:

El caso de los asesinatos de niños de Atlanta tuvo lugar en un período de dos años entre 1979 y 1981, 29 personas (casi todas niños) fueron estranguladas por un asesino en serie. Los cadáveres eran lanzados a un río. Se tuvo a un sospechoso de nombre Wayne Williams, el cual al inspeccionar su casa, en total, había cerca de 30 tipos de fibras ligadas a los elementos, sus vehículos e incluso su perro que resultaron positivas con evidencias colectadas en las víctimas.

El caso de Ted Bundy como responsable de más de 30 asesinatos pero no lograba encontrar pruebas físicas que le relacionaran directamente con ninguno de ellos. Cuando Bundy debía acudir al juicio se escapó y mató a tres personas más. Gracias a los restos hallados esta última vez Bundy fue enviado a prisión. Fue gracias a la marca de un mordisco en la víctima, que coincidía con la forma de los dientes de Bundy. También se encontraron fibras en el vehículo del asesino pertenecientes a la ropa de la niña asesinada. Ted Bundy fue finalmente, condenado a muerte.

Con estos ejemplos es posible comprender la eficacia del actuar de la genética forense, generando a su vez la posibilidad de la creación de nuevas herramientas que brinden viabilidad, certeza, rapidez, captura de datos y comparativas, pues es indispensable realizar las confrontas cuando se tiene una prueba testigo y una prueba presuntiva, de aquí que se desarrolle una base de datos.

### **1.1.1.3 Bases de datos genéticos**

Los bancos de datos genéticos comenzaron a establecerse hace algunas décadas, para obtener, procesar y almacenar información genética humana con diferentes propósitos. Entre sus objetivos se cuenta:

- 1- Facilitar la investigación relacionada con el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de algunas de las miles de enfermedades humanas causadas por mutaciones en un solo gen (o enfermedades monogénicas).

- 2- Facilitar la investigación farmacogenómica, es decir, identificar genes vinculados con la respuesta del organismo a fármacos y tóxicos.
- 3- Individualizar variantes genéticas asociadas con mayor probabilidad de desarrollar determinadas enfermedades comunes.
- 4- Establecer la identidad genética de personas y sus relaciones familiares, sobre la base de que las características del ADN de cada individuo son exclusivas, irrepetibles (excepto en gemelos idénticos) y hereditarias.

Por otra parte, la información referente a los perfiles genéticos y la variabilidad molecular que es útil en el ámbito forense puede almacenarse de forma digital o como documentos en papel.

El Banco de datos se define como un conjunto amplio de perfiles genéticos pertenecientes a personas individuales que han llevado a cabo alguna actividad delictiva. Es decir, después de la detención a que haya lugar y tras la obtención de la muestra y análisis adecuado del ADN para los marcadores genéticos comentados con anterioridad, se obtiene el perfil genético. Este perfil se ha incorporado a un fichero que es el banco de datos. De forma general los bancos de datos policiales se utilizan principalmente para investigar delitos e identificar sospechosos. (Albarellos, 2009)

Por lo tanto el banco de datos se nutrirá de delincuentes y/o de la población reclusa. También existen bancos de datos en los que se almacenan perfiles genéticos individuales de muestras biológicas recogidas en el lugar de los hechos (sangre, semen, saliva, etc.) y que no pertenecen a ninguna persona identificada o asociada a la actividad policial o jurídica. (ídem).

Muchas veces esta información puede ser importante para la resolución de un caso y se guarda en un fichero con la esperanza de que quizá algún día se podrá saber a quién pertenecen. Por ejemplo, si el sospechoso es un delincuente habitual y en un futuro se conoce su perfil genético al realizar un nuevo acto delictivo, se le podrá

relacionar con el caso antiguo. Por último existe una tercera categoría de bancos de datos, los de interés humanitario, es decir, que contienen el perfil genético de personas desaparecidas o de familiares suyos, con la esperanza de poder ser identificadas algún día. También existen bancos de datos particulares para situaciones determinadas, como el elaborado por las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos donde se almacenan los perfiles genéticos de todos sus miembros, para poder identificar adecuadamente los cadáveres en caso de fallecer y quedar el cuerpo maltrecho dificultando su identificación por los métodos habituales. Dicho banco se instituyó antes de la Primera Guerra del Golfo (1991) y se demostró especialmente útil para la identificación de los cadáveres en el ataque suicida del 11-S al Pentágono. (Brena Sesma, 2008)

En la actualidad es ya habitual generar un banco de datos con los perfiles genéticos de las víctimas y de sus familias después de un accidente aéreo o una gran catástrofe, ya sea un desastre natural o un ataque terrorista.

El **primer banco de datos** de interés policial fue desarrollado por el Forensic Science Service del Reino Unido en 1995 y recibe el nombre de UK National DNA Database (por cierto, es de destacar que cuando se le puso el nombre no existía la diferenciación entre banco y base de datos; en realidad en este caso se trata de un banco de datos y no de una base de datos). El perfil genético de los individuos se obtiene mediante el análisis de 10 STR, en concreto los denominados: FGA, TH01, VWA, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D16S539, D18S51, D19S433 y D21S11. (Noriega, 2013)

Además se analiza el gen Amilogenina, que tiene una variante para el sexo femenino y otra diferente para el masculino, permitiendo averiguar dicho carácter en una muestra biológica. Estos marcadores son también el núcleo de los utilizados a nivel de bancos de datos de diferentes países europeos y de la Interpol. Pero sin duda, el banco de datos más famoso es el CODIS (Combined DNA Index System) que fue desarrollado a partir de 1996 por el laboratorio del FBI con la ayuda de científicos externos. Se preseleccionaron 17 STR para finalmente escogerse 13 en 1997. Algunos de estos marcadores genéticos son comunes a los descritos



anteriormente, mientras que otros son nuevos. En concreto el sistema CODIS está formado por los STR siguientes: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 y D21S11. También está incluido el gen Amilogenina para poder identificar el sexo de la muestra. Estos marcadores STR presentan unas características de transmisión genética, fiabilidad de análisis, estudio simultáneo además de automático y unos elevados niveles de discriminación que los hacen idóneos para los bancos de datos. Muchos países utilizan uno de estos dos sistemas de STR o combinaciones parecidas. Así, tanto la Policía Nacional como la Guardia Civil utilizan el sistema CODIS. (ídem).

Continuando con el mismo autor, una base de datos no es más que la recopilación de las frecuencias (abundancias relativas expresadas como porcentajes) estimadas en una población para cada variante de un marcador genético concreto y para todos los sistemas genéticos considerados.

Es importante resaltar que no contienen informaciones individuales, sino las abundancias en términos de porcentajes de las diferentes variantes genéticas a nivel poblacional. Las bases de datos se utilizan para calcular las estimas sobre cuán probable es encontrar por azar un perfil concreto en una determinada población. Se entiende por población cualquier grupo humano que definamos, tal como un país, una región o una localidad.

Se puede hacer una distinción por etnias concretas dentro de una de estas unidades geográficas, que en algunos casos puede ser muy importante. Una buena base de datos precisa la información genética de una muestra de un número elevado de individuos de la población.

Se recomienda que el tamaño de la muestra (número de individuos analizados) sea como mínimo de 100.

Además, dichos individuos no deben tener relaciones de parentesco entre ellos, sino algunas variantes genéticas estarían más representadas de lo que están en la población y otras poco representadas o incluso ausentes. Como se verá más adelante es fundamental en Genética Forense contar con buenas bases de datos,

es decir, bases donde se obtengan datos o información fidedigna de los integrantes de una sociedad y a su vez, destacando su perfil genético con sus implicaciones.

Por tanto, y a modo de resumen, debe quedar claro que un banco de datos es un sistema de contenido en el que se almacenan perfiles genéticos (entre otros datos, como información básica-general) de personas individuales y concretas cuya utilidad es conocer si una muestra biológica pertenece a una determinada persona o no. En cambio, una base de datos resume la información genética global de toda una población, no conteniendo por tanto información individualizada. Su utilidad es cuantificar de forma estadística cual es la probabilidad de encontrar por azar un determinado perfil genético en dicha población, sea o no de interés policial o jurídico. ( MESTRES NAVAL & VIVES-REGO, 2009)

<b>NOMBRE DE LA BASE DE DATOS</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>LINK</b>
EMBL	Alemania	<a href="http://www.embl.de">www.embl.de</a>
CODIS Y (NCBI)	Estados Unidos	<a href="http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/index.html">http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/index.html</a>
Base de Datos Nacional de Perfiles de ADN	España	privado
GenBank	Rockville Pike	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>
AceDB database		<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>
UCSC Genome DNA (DDBJ)	California	<a href="https://www.sanger.ac.uk/science/tools/acedb">https://www.sanger.ac.uk/science/tools/acedb</a>
	Japón	<a href="https://genome.ucsc.edu/">https://genome.ucsc.edu/</a>

La empresa de CODE Genetics obtuvo una licencia en 1998 para crear y manejar una base de datos llamada Health Sector Database (HSD) con información de diversos historiales médicos conexa con información con datos genealógicos procedente de registros nacionales, la cual aún es de gran utilidad en la actualidad (Klug, Cummings, Spencer, y Palladino, 2013).

En el año de 1987 se crea en Argentina el primer Banco Nacional de Datos Genéticos, un archivo público y sistemático de material genético y muestras biológicas de familiares de personas secuestradas y desaparecidas durante la dictadura militar argentina. Actualmente el Banco Nacional de Datos Genéticos en Argentina funciona como organismo autónomo desde el 2009. (Estado Argentino, 2002).

Referente a avances en el continente americano, desde 1997 en Estados Unidos, tanto agencias estatales como federales disponen de bases de datos de perfiles de ADN. El FBI (Federal Bureau Investigation) cuenta con el Sistema combinado de indexación de ADN (CODIS, Combined DNA Index System), el cual contiene diferentes bases de datos de perfiles genéticos de delincuentes, personas desaparecidas y muestras biológicas encontradas en lugares de investigación forense, el cual basa su identificación en marcadores genéticos en 20 diferentes repeticiones cortas en tándem (STR por sus siglas en inglés) (Klug, Cummings, Spencer, y Palladino, 2013).

En España existen en la actualidad alrededor de 20 laboratorios acreditados para la realización de análisis de ADN en el ámbito judicial, los cuales contribuyen mandando sus resultados a la Base de Datos Nacional de Perfiles de ADN, en la que actualmente hay alrededor de 200.000 perfiles genéticos registrados, y se utiliza el sistema informático CODIS del Departamento de Justicia de EEUU (*ídem*). Esta base de datos se convirtió en un potente recurso desde el año 2000 hasta nuestros días (PR Newswire, 2018).

En la Universidad de los Andes en Chile, los académicos Patricio Carrasco y Carolina Inostroza crearon un nuevo sistema para extraer ADN de los dientes que, además de resultar más certero y completo que los actuales, no destruye la pieza dentaria (Sepúlveda, 2013).

Desde 2015, el Centro de Fertilidad y Genética en Madrid, instituciones que colaboran con antropólogos y arqueólogos en la recuperación de restos óseos, desarrollaron el “Proyecto Encuentra”, en el cual se creó una base de datos con la

que intentan ayudar a los afectados por casos de bebés robados, (CEFEGEN, 2015).

En este mismo sentido es primordial concientizar y esclarecer que son de especial importancia las bases de datos de ADN, ya que su apoyo en el ámbito jurídico o legal enfoca tres funciones básicas:

- 1) La identificación de vestigios biológicos de interés en la investigación criminal de muy diversos delitos.
- 2) La identificación de restos humanos y personas desaparecidas.
- 3) La investigación biológica de la paternidad y otras relaciones de parentesco.

Una vez contemplando que una base de datos genómicos almacena información con fines de investigación criminal, se entiende que los perfiles de ADN anónimos obtenidos de vestigios biológicos de la escena del delito (estudio criminalístico) pueden ser comparados de forma sistemática entre sí, así como con los obtenidos de individuos que son sospechosos o condenados en una causa penal, ofreciendo una herramienta muy eficaz de identificación humana y fomentando una aplicación directa en el ámbito de la prevención, siendo de potencialidad para reducir el índice de criminalidad de determinados delitos sin autor conocido y, especialmente, aquellos en los que existe una alta reincidencia.

Con base en el segundo y tercer enfoque ya mencionados, la utilización de estas bases de datos tiene vital importancia en los procesos de identificación de desaparecidos, ya sea en circunstancias por citar algunas como: conflictos bélicos o en grandes catástrofes que afectan a un gran número de víctimas cuyo estado en el que se conservan puede limitar, o incluso imposibilitar, la identificación de los cuerpos por los métodos forenses convencionales. Por esta razón, los perfiles genéticos obtenidos pueden ser comparados de forma sistemática con un índice de perfiles de referencia de familiares (saliva o sangre), u obtenidos de muestras ante-mortem de las víctimas mediante cepillos de dientes, peines o piezas dentales de las cuales se considera que su extracción de perfil genético no sólo es posible ante-mortem sino también post-mortem; y es precisamente esta característica fundamental la que permite realizar una serie de estudios y experimentación, para

lograr determinar un parámetro de bajo qué condiciones es posible obtener ADN de calidad y en cantidad.

Para obtener material genético de un cadáver humano podemos recuperar tejido epitelial o médula ósea, pero en el caso de un cadáver en estado de descomposición avanzado, un cadáver calcinado o deshecho, la recuperación de este tipo de tejido se vuelve complicado, es por ello que los dientes se vuelven una opción viable para la recuperación de material genético, pues la capacidad de resistencia de los dientes es mayor y la pulpa dental, de la cual se puede rescatar este material genético, queda protegida gracias al recubrimiento dentario de gran resistencia, y, en varios casos, puede hasta quedar completamente íntegra, facilitando análisis en laboratorio. (Willems, Clement, & Sweet O.C., 2010)

#### **1.1.1.4 Odontología forense**

La odontología ha sido una ciencia de gran impacto y aporte en el ámbito forense en los procesos de identificación de cadáveres o restos humanos en calidad de identidad desconocida. En un reporte de investigación sobre dos casos de cadáveres quemados realizado en Colombia, reveló que los cuerpos calcinados conservaban piezas dentales, las cuáles ayudaron a revelar su identidad (Marín y Moreno, 2004).

En este tenor, el estudio del sistema dental ha sido siempre motivo de interés para investigadores en varias de las áreas del conocimiento humano. Antropólogos, biólogos, zoólogos, paleontólogos, genetistas, odontólogos entre otros, han estudiado los dientes por la gran información que aportan al campo específico de cada investigador.

La dentadura representa una de las regiones anatómicas más importantes del cuerpo, debido a que brinda gran cantidad de información acerca del individuo en torno a aspectos generales y particulares de su biología, tales como la edad, el sexo, la ancestría, la nutrición, la salud, e incluso la estatura, esta última variable a través de estudios odontométricos. (Krenzer, 2006)

Esta singularidad radica en que los dientes son los registros fósiles más abundantes. Los dientes, al estar constituidos histológicamente por elementos muy duros, resisten fácilmente el paso del tiempo llegando a convertirse en el tejido humano menos destructible (Harris, Ponitz, & Ingalls, 1998), inclusive a veces, es la única evidencia de la presencia del hombre dentro de los contextos arqueológicos. En este sentido, constituyen muestras fundamentales y de primer orden en las investigaciones antropológicas y por consiguiente, en el ámbito de la criminalística se clasifican como indicios biológicos con gran importancia para la obtención de ADN e identificación.

En una investigación realizada en colaboración con investigadores de España y Chile, se estudiaron los principales cambios morfológicos que presentan diversas piezas dentales sometidas a altas temperaturas en un horno especial, imitando condiciones de cremación (Rubio, Sioli, Santos, Fonseca, y Martín de Las Heras, 2016).

## **1.2 Justificación**

Cuando se ha cometido un delito en cualquier parte del mundo se formulan las siguientes preguntas: ¿Qué ocurrió? ¿Quién lo cometió? ¿Cómo se ejecutó? ¿En dónde? ¿Cuándo? ¿Por qué? ¿Con qué? Sin embargo, la implementación de reglas, sistemas y herramientas que ayuden a obtener el resultado correcto no ha sido fácil.

La situación que se vive actualmente en gran parte de la República Mexicana, así como en otras partes del mundo, respecto a cadáveres calcinados, encontrados en fosas clandestinas con alto grado de descomposición, deterioro y/o deformidad, de los cuales no es perceptible alguna señal particular o su constitución morfológica para realizar un reconocimiento más simple, otorga un muy alto el grado de dificultad en cuanto a la identificación de estos mismos, por lo que las autoridades ministeriales y forenses se topan con una importante problemática del orden público.

El análisis de ADN posiblemente se ha convertido en una de las más grandes herramientas forenses, puesto que nadie puede alterar su secuencia de ADN ya sea

en cadáveres, o en personas vivas después de dejarlo en el lugar donde se cometió un delito. Sin embargo, esto no significa que la genética forense no se enfrenta a diversos retos u obstáculos, ya que existen protocolos y estándares a cumplir y por ende, vestigios que se encuentran en circunstancias específicas y con ciertas complicaciones para su obtención de muestra (ADN de calidad) y embalaje. Lamentablemente los protocolos convencionales de extracción de ADN se han reportado como insuficientes e inespecíficos para aislar ADN íntegro en diversos vestigios biológicos, lo que se dificulta realizar análisis genéticos confiables.

Es por ello que se vuelve una necesidad mejorar los métodos y técnicas dentro de esta área científica, por lo que la presente investigación pretende describir un método de aislamiento que permita obtener una buena calidad y cantidad suficiente de ADN, en dientes sometidos a condiciones extremas (cremación y corrosión), útil para la identificación humana en el ámbito forense.

### **1.3 Objetivo**

Determinar el rendimiento del ADN aislado de órganos dentales sometidos a las condiciones extremas de cremación y corrosión en adultos.

#### **1.3.1 Objetivos particulares**

- Exponer a condiciones extremas, cremación y corrosión, las piezas dentales extraídas de adultos.
- Estandarizar el método de extracción de la pulpa dental y aislamiento del ADN.
- Medir el rendimiento del ADN en cuanto a la cantidad, pureza, integridad y viabilidad para estudios genómicos.
- Analizar los resultados obtenidos para describir el método y la pieza dental con mejores rendimientos.

#### 1.4 Preguntas de investigación

En el presente apartado, y como resultado del planteamiento del problema, surgen las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cómo se determina el rendimiento del ADN aislado de piezas dentales sometidos a las condiciones extremas de cremación y corrosión en adultos?
- ¿Se obtendrá ADN de calidad y cantidad en piezas dentales sometidas a condiciones extremas?

---

- ¿Es viable la identificación mediante la extracción de ADN de piezas dentales sometidas a condiciones extremas: cremación y corrosión?
- ¿Es posible desarrollar un protocolo efectivo para la extracción de ADN en piezas dentales sometidas a cremación y corrosión?

#### 1.5 Hipótesis

Hi

El rendimiento de ADN aislado de piezas dentales sometidas a condiciones extremas de cremación y corrosión se determina a partir de las variables de cantidad y calidad; esto mediante la recuperación de la pulpa dental por apertura longitudinal con posterior flushing del canal radicular.

Hi

Es factible desarrollar un protocolo detallado para el aislamiento de ADN en piezas dentales, con pasos específicos debido a las características particulares que presentan dichas piezas y por las condiciones a las que fueron expuestas. Por tanto, con un ADN en cantidad y calidad, será viable la identificación genética a través de estas piezas dentales.



## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Ciencias forenses**

Las ciencias forenses son un conjunto de disciplinas que cuentan con diversas tecnologías, herramientas y técnicas relativas al estudio e investigación de problemas de orden jurídico. Algunos ejemplos de estas disciplinas son: criminalística, balística, dactiloscopia, medicina forense, entre otras. Dentro de estas disciplinas yace la genética forense. (Vargas Alvarado, 2017)

### **2.2 Genética forense**

La genética es aquella rama de la biología encargada del análisis de los caracteres controlados por los genes, transmitidos de generación en generación, así como de su estructura y modificaciones, en los seres vivos. (M, Ossowski, & Zielińska, 2016)

Continuando con el mismo autor, como subespecialidad auxiliar, la genética forense se encarga de estudiar de forma especializada las regiones variables, llamadas también polimórficas, presentes en el DNA (ácido desoxirribonucleico) de los individuos, con el fin de establecer la identidad de víctima o victimario implicados en un hecho delictivo, o cadáveres en calidad de desconocidos, ya que el término forense alude al apoyo jurídico en la resolutive de algún delito, pruebas de parentesco o identificación de personas.

En el ámbito jurídico, la genética forense aporta herramientas objetivas para la resolución de casos y una de sus principales aplicaciones es la generación de base de datos genómicos.

### **2.3 Ácido Desoxirribonucleico y huella genética**

El ADN (por sus siglas: ácido desoxirribonucleico) es una molécula cuya unidad básica son los nucleótidos, cada uno de ellos formado a su vez por un grupo fosfato, una molécula de azúcar (desoxirribosa) y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina y citosina), en la cual se almacena toda la información que es heredada y que sirve como identificación de una persona al ser , única e irrepitible (Grandini, 2009).

Esta molécula se encuentra en el núcleo celular y la mitocondria, por ello se puede encontrar en cada célula somática del cuerpo la información genética del individuo. Es por ello que la saliva, líquido hemático, un folículo piloso o hasta un diente, pueden ser indicios útiles hallados en un lugar de investigación para análisis forenses y aporten información esclarecedora en la investigación de probables delitos e identificación de personas.

Estas muestras biológicas que podemos encontrar en un lugar de investigación pueden ser susceptibles a daños o deterioro debido a las mismas condiciones del entorno, lo cual podría afectar en el rendimiento y calidad del ADN aislado

En el artículo “Forensic Identification” publicado en la Revista Española de Medicina Legal, se determinaron los principales factores de degradación del ADN en muestras biológicas: temperatura, humedad, pH, componentes del suelo así como elementos ajenos que se adviertan en él (Barrio, 2013); con ello surge el interés de involucrar a las ciencias forenses, es decir, es indispensable llevar a cabo la interdisciplinariedad que trabajen por el mismo objetivo, ya que la intención es salvaguardar los elementos o material sensible significativo de índole biológico que esté asociado con algún delito. La misión de la criminalística es disminuir la incidencia de esos factores para obtener ADN íntegro y posteriormente poder realizar el análisis en materia de genética forense, finalizando con su confronta. De los mayores retos a los que se enfrentan los profesionales en criminología, en este tipo de situaciones, es el nivel de erosión, descomposición y poca cantidad de los restos recuperados, dificultando su identificación por métodos convencionales.

En este sentido, los avances en las herramientas biomoleculares han revolucionado los estudios en las ciencias forenses, en especial en el área de la genética forense.

#### **2.4 Piezas dentales**

Los dientes tienen una estructura similar al hueso, por lo que se les confiere una gran capacidad de resistencia ante condiciones extremas, por ejemplo, pueden resistir una temperatura de hasta 1000°C (Grandini, 2009). Presentan una elevada tolerancia a traumatismos, exposición prolongada al ambiente y baja corrosión, y otra gran ventaja es la cantidad suficiente de piezas dentales con que contamos las

personas (los adultos poseen 32) y principalmente, son el sitio de almacenamiento de la pulpa dental, la cual es un reservorio de material genético (Alia, y otros, 2015). En virtud de lo anterior, las piezas dentales se han convertido en un recurso clave para la identificación de personas.

Se menciona que la capacidad de resistencia se debe a su estructura y organización compleja. De la superficie al interior, se encuentra primero el esmalte (acelular, avascular y sin inervación, su función es proteger al diente y es considerado como la sustancia más dura del organismo), cemento (sección calcificada con baja presencia de células, su función es unir la dentina y la pared del alveolo para anclarse a las fibras del ligamento periodontal), dentina (tejido altamente mineralizado con presencia de odontoblastos) y la pulpa dental (tejido conectivo laxo con irrigación e inervación con mucha cantidad de células) (Corte Real, Anjos, Vieira, y Gamero, 2012).

Por sus características, la pulpa dental es el tejido ideal para el aislamiento del ADN (*ídem*). Sin embargo, presenta una mayor tasa de degradación y difícil acceso, por tal motivo se han probado diferentes métodos de procesamiento tanto físicos como químicos con resultados contradictorios (Dutra Corrêa, y otros, 2017).

Desde el primer reporte de aislamiento de ADN en dientes (Hänni, Laudet, Sakka, Bègue, y Stéhelin, 1990) se han mencionado diversas complicaciones como la degradación de la muestra, la baja cantidad obtenida y elevada contaminación, de tal forma que es necesaria la estandarización del proceso para optimizar los resultados y garantizar una calidad suficiente para su posterior análisis genómico (Hughes Stamm, Warnke, y Van Daal, 2016).

Un factor que impactan directamente en la calidad de la muestra es el grado de conservación del diente, si bien se conoce su alta resistencia como pieza completa, poco se ha reportado sobre el rendimiento en el aislamiento de ADN en piezas dentales expuestas a condiciones extremas (Dobberstein, Huppertz, Wurmb Schwark, y Ritz Timme, 2008).

Existen otros factores que influyen en la viabilidad de ADN aislado como el tipo de diente, la edad cronológica, la presencia de enfermedades periodontales, la degradación post-mortem, las técnicas de limpieza y el tipo de proceso de extracción (Higgins y Austin, 2013).

El obtener ADN de buena calidad y en cantidad suficiente, permite realizar las técnicas basadas en biología molecular y bioinformática con la finalidad de identificar el origen del material genético encontrado. Entre las pruebas más frecuentes se encuentran: el análisis de Secciones Repetidas en Tándem (STR), los Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNPs) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Higgins, Kaidonis, Townsend, y Austin, 2014). Los análisis bioinformáticos permiten comparar el ADN aislado contra muestras recuperadas de vestigios del sospechoso (por identificar) como de familiares directos con la finalidad de generar una asociación entre ellos. De esta forma, se puede identificar finalmente los restos en cuestión.

Dirección General de Biotecnología

### **III. METODOLOGÍA**

Tipo de estudio: Descriptivo, Observacional, transversal, prospectivo.

El enfoque de la presente investigación será de tipo mixta: cuantitativo y cualitativo, donde se realizarán análisis de causa-efecto. El alcance es correlacional porque se tratará de explicar la relación entre las variables cremación y corrosión con calidad y cantidad, con un diseño experimental y una muestra no probabilística-dirigida.

#### **3.1 Materiales**

Los materiales que serán empleados se enlistan a continuación.

##### **3.1.1 Dispositivos**

- Centrifugadora
- Equipo de electroforesis
- Termocicladora
- Nanoespectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc)
- Horno Muflas Terlab, TE-M12D
- Micropipetas de los siguientes volúmenes: 10 µl, 100 µl y 1000 µl

##### **3.1.2 Reactivos y soluciones**

- PBS 1x estéril
- Buffer de lisis
- Proteinasa K
- RNAsa
- Solución de precipitación de proteinasas
- Isopropanol
- Etanol 70%
- H<sub>2</sub>O RNA
- Fenol-cloroformo
- Reactivo TRI (TRIzol)

### **3.2 Desarrollo**

La experimentación es una etapa precisa para el desarrollo de la presente investigación, ya que tras la obtención de muestras y el envío al laboratorio, los genetistas forenses proceden a la obtención de los perfiles genéticos de las muestras dubitadas como lo son sangre, semen, saliva, orina, pelos, tejidos, restos celulares en objetos usados o tocados y piezas dentales (siendo estas nuestro centro de investigación) y las muestras de referencia (normalmente una toma bucal mediante hisopo o una muestra de sangre) utilizando los siguientes procedimientos:

- Extracción y purificación del ADN.
- Cuantificación del ADN humano obtenido para asegurar así la obtención de perfiles de alta calidad y reproducibilidad.
- Amplificación y marcaje fluorescente de las regiones variables de ADN de interés (STR, ADNmt, Y-STR) utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Separación por electroforesis y detección de los segmentos de ADN marcados generados mediante PCR.
- Comparación de los perfiles genéticos obtenidos e interpretación de los resultados.

En este proyecto se procesaron 50 piezas dentales extraídas de adultos divididas en dos grupos: grupo de piezas dentales sometidas a cremación grupo de piezas dentales sometidas a corrosión.

#### **3.2.1 Exposición a la variable de condiciones similares a la cremación**

En un horno de calor seco (Muflas Terlab, TE-M12D) se colocaron las piezas dentales a diferentes temperaturas a partir de los 100° C (200° C, 300° C, 400° C, 500° C, 600° C) por 60 min.

Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se documentaron descriptiva y fotográficamente las piezas dentales, así como los cambios generados en cada una a partir de la exposición a estas temperaturas, para después

introducirlas en tubos eppendorf con PBS 1x estéril y comenzar con el protocolo de aislamiento de ADN pertinente.

### 3.2.2 Exposición a la variable de condiciones de corrosión

Siguiendo las medidas de precaución pertinentes, se prepararon soluciones corrosivas con hidróxido de sodio a diferentes concentraciones (10M, 20M, 30M) en el interior de diversos frascos, los cuales fueron colocados en una campana de extracción. Posterior a ello se sumergieron las piezas dentales en las soluciones en los siguientes intervalos de tiempo: 24 horas, 10 días y 20 días. Transcurrido el intervalo de tiempo, las piezas dentales fueron extraídas de la solución corrosiva, puestas a temperatura ambiente y guardadas en tubos eppendorf con PBS 1x estéril para su posterior procesamiento para aislar ADN de las mismas.

#### 3.2.2.1 Preparación de solución corrosiva

**Fórmula:  $g=PM (M)$**  (diluir en 1 litro)

$g=40$  (10M)

$g=400$

$400 \rightarrow 1000$  ml

$16g \rightarrow 40$  ml

En H<sub>2</sub>O MQ (agua tridestilada) y en tubo Falcon de 50 ml

4 de julio de 2018

Diente	1 M	10 M	20 M	30 M
1	1.6 g	16 g	32 g	48 g
2	1.6 g	16 g	32 g	48 g
3	1.6 g	16 g	32 g	48 g
Total	4.8 g	48 g	96 g	144 g
	x3= 14.4 g	x3= 144g	x3= 288g	x3=432g

**Total= 880 g**

### **3.2.3 Extracción de la pulpa dental**

Debido a las diferentes condiciones que se obtuvieron de las diferentes piezas dentales se optó por tres diferentes métodos de extracción de pulpa dental. Para realizar cada una de ellas se valoró la integridad y características de cada pieza dental.

#### **3.2.3.1 Extracción por corte**

Cada pieza dental se seccionó en dos partes, realizando un corte transversal con ayuda de una prensa-guillotina y se expusieron los canales radiculares. Con una lima estéril y con apoyo del microscopio, se retiró con cuidado el tejido pulpar y se colocó en tubos eppendorf con Buffer PBS 1x estéril, cada uno de ellos debidamente cerrado y rotulado. Una vez en el laboratorio se almacenaron a una temperatura de -4°C para mantener la integridad de la muestra.

#### **3.2.3.2 Extracción por pulverización**

Después de someterlas a temperatura ambiente luego de su exposición a condiciones extremas, a una temperatura a partir de los 400°C, se observó que la integridad se veía comprometida, ya que fácilmente se podían seccionar con tan solo aplicar fuerza manual, por esta razón se optó por pulverizarlas y no realizarles corte; dando paso a que las piezas dentales fueron introducidas en bolsas plásticas estériles y pulverizandolas con extremo cuidado a través del uso de un mortero. Todo vestigio del interior de la bolsa estéril fue vaciado en un tubo eppendorf con buffer PBS 1x estéril y guardado en una temperatura de -4° C.

#### **3.2.3.3 Extracción por corte con fijación en resina**

Posterior a diversos intentos con corte ordinario y pulverización, una significativa cantidad de piezas dentales fueron encapsuladas en resina, formando un bloque sólido que brinda protección a la pieza dental asegurando su integridad.



Una vez que se deja secar y se endurece la resina, se le realiza el corte transversal, quedando completamente expuesta la cavidad dentaria para poder realizar la extracción de pulpa dental como se realizó en la extracción por corte.

### **3.2.4 Aislamiento del ADN**

#### **3.2.4.1.1 Método de aislamiento de DNA por reactivo Trizol**

- Agregar 500 ul de isopropanol frío a la fase acuosa por cada mililitro de Trizol
- Homogenizar
- Incubar por 10 minutos
- Centrifugar por 10 minutos a 12,000 g a 4°C
- Descartar sobrenadante (conservar la segunda capa observada en el tubo)

#### **3.2.4.1.3 Método de aislamiento de DNA por reactivo Ficoll**

- Agregar PBS a la muestra y mezclar
- Agregar la muestra con PBS al tubo con Ficoll por la orilla del tubo, teniendo cuidado de no mezclar
- Centrifuga a 25 minutos a 2200 rpm
- Retirar la capa de suero
- Conservar la segunda capa observada en el tubo

#### **3.2.4.1.4 Método de aislamiento de DNA por reactivo fenol-cloroformo**

Este método fue modificado en base a las condiciones a las que se expusieron las piezas dentales.

- Descongelar las muestras
- Centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos
- Vaciar contenido de tubo falcon (dientes) en caja Petri

- Lavar las muestras en la caja Petri con PBS 1x estéril con 1.5 ml
- Posteriormente en tubo eppendorf realizar lavado con PBS 1x estéril
- Centrifugar a 13, 000 rpm a 4° C durante 10 minutos
- Eliminar sobrenadante con pipeta  
(Se repiten los lavados 3 veces)
- Agregar 30 ul de buffer de lisis cel. y 30 ul de proteinasa K (en dientes aplicamos el doble de proporción: 60 ul)
- Vortexear hasta que la muestra se resuspenda
- Incubar a 80° C por 5 minutos (se vortexea ocasionalmente y se deja enfriar de 5 a 10 minutos)
- Agregar 1.5 ul de RNasa (la RNasa es una enzima que degrada)
- Invertir la muestra 25 veces
- Incubar a 37° C por 30 minutos
- Dejar a temperatura ambiente por 5 min
- Agregar 100 ul de solución de precipitación de proteinasas (esta solución se debe colocar en refrigeración)
- Mezclar con vórtex por 20 segundos
- Centrifugar a 13, 000 rpm por 10 minutos (evitar decantar el sobrenadante, este se pasa a un nuevo tubo eppendorf, dejando las proteínas libres)
- Agregar 500 ul de fenol cloroformo y centrifugar  
(Se repite el paso anterior)
- Pasar sobrenadante a nuevo tubo (realizarlo con cuidado, este paso es crucial para en el proceso)
- Agregar 600 ul de isopropanol al 100%

- Invertir dos veces lentamente
- Incubar en hielo durante 10 minutos
- Mezclar invertido el tubo 50 veces
- Centrifugar a 13, 000 rpm por 10 minutos
- Quitar el isopropanol con pipeta y secar con papel absorbente
- Lavar el pellet con 300 ul de etanol al 70% e invertir el tubo 20 veces
- Centrifugar a 13, 000 rpm durante 5 minutos
- Eliminar el etanol con pipeta y secar con papel absorbente  
(Cuando se eliminen soluciones con pipeta, se debe cuidar no acercarse mucho la punta al pellet)
- Exponer de 1 a 2 horas a 37° C o a temperatura ambiente de 5 a 6 horas  
(Ya que se extrajo el exceso con pipeta, se dejaron los tubos abiertos al aire libre durante 10 minutos)
- Agregar 50 ul de solución de hidratación (en este caso utilizamos como solución H<sub>2</sub>O RNA)
- Incubar a 65° C por 30 minutos (en el caso corregido, hidratamos en refrigerador por 24 horas)

### **3.2.5 Análisis de pureza del ADN**

La concentración se cuantificará en el Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc (Nanoespectrofotómetro destinado a la cuantificación de ácidos nucleicos) (especificar integridad, cantidad y calidad...)

### **3.2.5.1 Nanoespectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc) a 260 nm**

Este instrumento es un espectrofotómetro UV-Visible compacto y autónomo diseñado para el análisis de microvolúmenes de ácidos nucleicos y una amplia variedad de proteínas purificados.

#### **Análisis de la cantidad y calidad del ADN**

Mediante este nanoespectrofotómetro es posible determinar el grado de pureza del ADN y ARN extraído. Se analizan dos relaciones de absorbancia entre dos rangos de A280/260 y A260/230. Utilizar al resuspender nuestro ADN soluciones con bajo contenido de sodio a un pH neutro mejora los resultados.

En este procedimiento en específico se utilizó la solución: H<sub>2</sub>O libre de ARNasas para resuspender la muestra.

Los resultados esperados para un DNA puro (calidad) son de: 1.8-2.0 de A280/260 y de 1.9-2.1 de A260/230.

La contaminación por fenol disminuirá los resultados en la relación A260/230. Los contaminantes proteicos tienen un valor de alta absorbancia a 280 nm y por lo tanto producen una baja relación A280/260.

Serán seleccionadas las muestras que estén dentro del rango de la relación de 260-280 nm de 1.8-2.1 o en promedio de 2.

### **3.2.5.2 Electroforesis en gel de agarosa**

La integridad se determinará mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se tendrá registro con un fotodocumentador (SYNGENE G0) con luz ultravioleta. Para eliminar la contaminación con ARN, las muestras se tratarán con RNasa I (Roche) durante 15 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos a 70°C.

#### **Preparación de gel de agarosa**

1.- Por cada 100 mililitros de TAE se añade el 1% de agarosa (se aplica 1 gramo de agarosa).

2.- Se coloca en el microondas por 20 segundos para deshacer grumos (verificar la transparencia de la solución y de ser necesario volver a introducir la solución en el microondas en ciclos de no más de 20 segundos hasta que la solución esté completamente homogénea).

3.- Por cada 100 mililitros de la solución se añade 10 µl de Bromuro de Etidio.

Protocolo de electroforesis Notas importantes:

- Manejar siempre las muestras y DNA en hielo. Ser cuidadoso de evitar la acumulación de agua deshielada y que los tubos se volteen.
- Cuando se encuentre abierto un frasco o tubo, evite hablar y generar corrientes de aire.
- Utilice guantes nuevos y limpios.
- Las puntas para micropipetas deberán estar estériles.
- Ser muy cuidadosos a la hora de transferir la fase acuosa sin tocar la siguiente fase.
- A partir del periodo de precipitación, no vuelva a vortexear el ADN.
- Antes de resuspender la muestra, corrobore que no existan restos de etanol.

### **3.2.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Las muestras que cumplan con los estándares de calidad previos, se determinará su viabilidad para análisis genómicos por medio de PCR.

“La PCR se ha usado en investigaciones criminales para generar cantidades de DNA a partir de una mancha de sangre seca en la ropa de un sospechoso o aún del DNA presente en parte de un solo folículo piloso dejado en la escena de un crimen. Con este fin se seleccionan regiones del genoma para amplificar que sean muy polimórficas (esto es, que varíen con gran frecuencia en la población), de modo que no haya dos individuos que tengan los mismos fragmentos de DNA valorados” (Karp, 2014).

#### **Ciclo de PCR**

- Desnaturalización inicial a 95° C por 1 minuto

- Desnaturalización 95° C por 15 segundos
- Alineación de 55° a 65° C por 15 segundos (para el caso del gen PPIA se expuso a 60 C)
- Extensión a 72° C por 15 segundos

Compuestos del Master mix

- 1 - PCR grade water
- 2 - 10  $\mu$ m de Foward Primer
- 3 - 10  $\mu$ m de Reverse primer
- 4 - Radiant 2x Taq Master Mix
- 5 – DNA

El orden de colocación de los elementos del master mix en el tubo correspondiente es conforme el orden numérico de los mismos.

Procedimiento:

- Se vierten el agua, foward y reverse primer en el tubo. Se vortexean alrededor de 5 segundos.
- Posteriormente se agrega el master mix y al final el ADN. La enzima debe estar comservarse a temperaturas bajas y no debe someterse a vortex. Así mismo se resuspende con la pipeta y el ADN.
- Se introducen en termociclador y comienza el ciclo de PCR.

### **3.2.7 Análisis Estadístico**

Los resultados serán registrados en una base de datos de Excel. Los resultados cualitativos se reportarán en frecuencia y porcentaje y los cuantitativos en media, desviación estándar y rango. Para detectar diferencias estadísticamente

significativas entre los grupos para las variables cuantitativas se aplicará Análisis de varianza (ANOVA). La significancia estadística será establecida en  $p < 0.05$ .

### **3.3 Ética de estudio**

Con lo que respecta a la ética de estudio existió en apego al Decálogo de manipulación genética de Javier Gafo (ver Anexo 1).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1 Exposición a condiciones extremas**

En un primer momento se realizó la selección de las piezas dentales para someterlas a las condiciones antes mencionadas.

Grupos de estudio:

Piezas dentales expuestas a cremación y corrosión.

Se efectuó la organización de estas piezas en dos grupos: piezas dentales expuestas a cremación y piezas dentales expuestas a corrosión.

### **4.2 Método de obtención de la pulpa dental**

Con base en las características resultantes de las piezas dentales expuestas, se llevaron a cabo tres métodos diferentes para obtener la pulpa dental, los cuales fueron:

- a) Por corte
- b) Pulverización
- c) Fijación en Resina

(véase apartado METODOLOGÍA)

Se logró establecer que el método por corte resulta óptimo para piezas dentales expuestas a condición de cremación hasta una temperatura máxima de 400°C.

El método de pulverización resulta más factible en piezas dentales cuya exposición a condición de cremación oscilaba entre los 400°C y 800°C debido a que la integridad de la pieza dental se veía comprometida y se fragmentaba con facilidad sin necesidad de corte. Así mismo se realizó pulverización de piezas dentales entre 100°C y hasta 800°C observando una ligera contaminación con demás elementos propios del diente como dentina, esmalte, colágeno, hasta sarro.

En el caso del método por fijación en resina, se obtuvieron resultados óptimos desde una exposición de temperatura de 100°C hasta los 800°C, destacando que la cantidad de pulpa dental extraída resulta mayor que de los anteriores métodos, esto debido a que la integridad del diente se conserva de manera positiva al cubrirlo con



la resina y dejar secar la misma para posterior realizar el corte transversal y así hacer una limpieza más puntual, de esta manera, la pulpa resulta menos contaminada.

### **4.3 Método de aislamiento del ADN**

Se llevaron a cabo tres métodos:

- a) Método de trizol
- b) Método de ficoll
- c) Método de fenol-cloroformo (modificado)

Mediante los métodos de trizol y ficoll el ADN aislado era muy deficiente en términos de cantidad y calidad, por lo que se determinó que estos no eran viables para esta investigación.

Sin embargo, al realizar el aislamiento de ADN por el método de fenol-cloroformo, con las respectivas modificaciones de acuerdo con las condiciones expuestas, se obtuvo mayor cantidad de ADN y con mayor pureza, es decir, menos contaminado de proteínas y enzimas.

### **4.4 Rendimiento de ADN**

Algunos factores a considerar para obtener un mayor rendimiento de ADN en términos de cantidad y calidad, se basan en características como:



- Tamaño de la pieza dental (entre más grande sea la pieza dental, mayor cantidad de pulpa tendrá).
- Edad del poseedor del diente
- Tiempo en que el diente ha estado expuesto a las diversas condiciones ambientales



Estas características influyeron en esta investigación de manera en que en ocasiones teníamos como resultado que un diente que fue expuesto a una mayor temperatura contaba con mayor rendimiento de ADN que uno que fue expuesto a una menor temperatura.




#### 4.5 Descripción de cambios morfológicos



Gracias a la documentación descriptiva y fotográfica de las piezas dentales posterior a su exposición a las condiciones extremas, logramos detectar los cambios de mayor importancia en cada una, destacados en las siguientes tablas de acuerdo con los dientes expuestos a condiciones de cremación y corrosión.

- Exposición a CREMACIÓN:

CONDICIÓN	INTEGRIDAD	COLOR	CONSISTENCIA	FOTO
Sin exposición	Permanecen íntegros.	Se observaron con un ligero incremento de tonalidad de color amarillo	Su dureza y estructura permanecen.	
100°C	Permanecen íntegros.	Se observaron con un ligero incremento de tonalidad de color amarillo y una mancha de color cobrizo en la parte inferior de la corona.	Su dureza y estructura permanecen.	

200°C	Permanecen íntegros.	Se observan con un incremento considerable de color amarillo, observando que hay ligeras quemaduras en todo el diente, se observa también una quemadura en la corona en la parte inferior.	Endurecimiento de la presencia de sarro, manteniéndose su estructura y dureza.	
300° C	Permanecen íntegros	Se tornan de color cobrizo tenue con quemaduras en la parte media inferior de la corona.	Su dureza y estructura se mantienen.	

400°C	Se observa una carbonización distinguida en las raíces y se acentúa en donde había presencia de caries, sin embargo mantienen la integridad.	Se tornan de color negro las raíces y las coronas toman un color crema a café.	Las coronas permanecen con su estructura y consistencia sin embargo es posible seccionar los dientes manualmente.	
500°C	Se observa una carbonización más uniforme entre las raíces y las coronas, permaneciendo su integridad.	Adquieren un color negro en las raíces y en las coronas, aun permaneciendo ciertas zonas de las coronas amarillentas	Ya no es necesario uso de máquina para seccionar pues es posible manualmente.	
600°C	A esta temperatura se observa una fragmentación instantánea aunque, se observa cremado	Se observa de color negro la raíz y el interior, la corona se torna grisácea.	La estructura de la corona sigue manteniendo su forma	

	uniforme tanto externo como interno sin embargo aún no hay exposición de pulpa dental.			
700°C	Se observa una fragmentación instantánea entre raíces y coronas una carbonización uniforme en las raíces	Se tiene un color grisáceo en las coronas y un color negro en las raíces.	Hay pérdida considerable de consistencia y dureza, pues queda una estructura débil y muy fácil de corromper manualmente.	
800°C	Se observa fragmentación entre corona y raíz	Se torna color negro total, tanto al interior como al exterior.	Aparentemente se ve una buena estructura, sin embargo queda muy sensible al tacto.	

- Exposición a CORROSIÓN:

CONDICIÓN	COLOR	CONSISTENCIA	INTEGRIDAD	FOTOGRAFÍA
Corrosión en NaOH a 10 M	Amarillo cobrizo	Rígida en su mayoría	se observa una ligera separación entre la corona y la raíz, hay cambio de estructura	
Corrosión en NaOH a 20 M	Amarillo cobrizo	Semi-rígida	Pieza dental fragmentada.	
Corrosión en NaOH a 30 M	Amarillo cobrizo con algunos restos blancos	Semi-rígida con restos blandos	Pieza dental fragmentada y pulverizada, el NaOH eliminó restos de sarro que recubrían el diente	

## Descripción de ilustraciones

	(Foto individual) 600°C
 <p>19 de junio</p>	Apertura longitudinal, exposición de canal pulpar. 600°C
	Pulverización de piezas dentales a 600°C
	Pulverización de piezas dentales en sustancia PBS para los lavados

	<p>Se utiliza un soporte, cubierta de resina para mantener la estructura dentaria y lograr hacer corte transversal con máquina, obteniendo una pulpa más integra, así mismo, se logra observar las capas que conforman la pieza dental, denotando el color cobrizo al interior del diente.</p>
	<p>Se realiza el mismo procedimiento anterior, destacando que es notable la carbonización uniforme tanto en el exterior como al interior de la pieza dental.</p>

Posterior a la exposición, se realizó el aislamiento de ADN a través de tres métodos estandarizados sobre la base de revisión de literatura de otros métodos validados previamente (véase el apartado de metodología); esto se realizó en las primeras tres parejas de dientes sometidas a la condición de cremación:

- Pareja #1: sometidas a 100°C
  - Pareja #2: sometidas a 200°C
  - Pareja #3: sometidas a 300°C
- } Total de dientes procesados: 6



El método que se llevó a cabo para este grupo de dientes fue el de “Fenol-Cloroformo”.

Donde se obtuvieron resultados poco fiables ya que la cantidad de ADN recuperada no resultó óptima, por lo que fue necesario experimentar con modificaciones en los métodos.

Las adecuaciones que se implementaron fueron las siguientes:

- En la etapa de incubación de las muestras a una temperatura de 80°C, se deben “vortexear” ocasionalmente.
- Se cambió la forma de decantar y dejar secar a temperatura ambiente.
- Al momento de extraer el isopropanol con la micropipeta, no acercarse demasiado (dejar un espacio considerable) al pellet.

#### **4.7 Aislamiento de ADN**

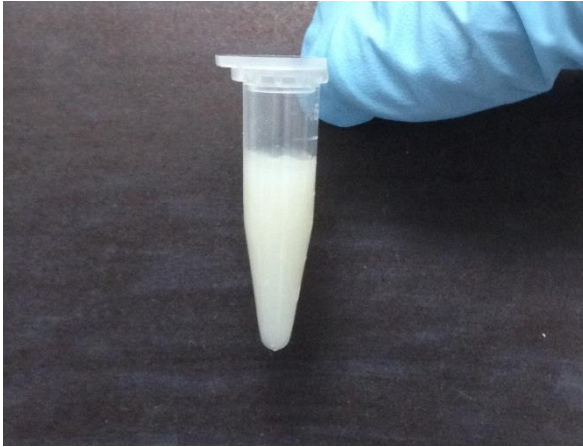
Una vez culminado el periodo de corrosión de las primeras 6 piezas dentales, las cuales sufrieron fragmentación, se exploró la posibilidad de extraer su pulpa dental, de las cuales no se pudo extraer de manera íntegra ni completa a través de la extracción por corte, por lo que se procesaron los fragmentos recuperados de las piezas dentales.

Debido al exceso de hidróxido de sodio que pudiesen presentar las muestras anteriormente mencionadas, se optó por realizarles lavados con PBS 1x estéril y de esta forma eliminar cualquier remanente del mismo.

Posterior a obtener los fragmentos de pieza dental corroídos, se guardaron en tubos Falcon con 15 ml de buffer PBS a una temperatura de -4° C, para su almacenaje. Para realizar los lavados se recurrió a descongelar las muestras, centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante (PBS) y los fragmentos de cada pieza dental se vaciaron en una caja Petri, en la cual se les añadió 1.4 mililitros (1400 µl) con una micropipeta se procedió a lavarlos con PBS 1x sobre los fragmentos alrededor de 15 a 20 minutos, buscando con este procedimiento recuperar la mayor cantidad de pulpa dental de los mismos.

Posterior al lavado, se colocaron las muestras en tubos eppendorf de 1.5 ml etiquetados con la concentración molar de hidróxido de sodio.

De cada muestra dental se recuperaron dos tubos eppendorf llenos.



Para corroborar la utilidad del método de aislamiento corregido con la sustancia fenol-cloroformo se realizó la extracción de DNA en muestras de tejido hepático animal (pollo), se corrieron las muestras en gel de electroforesis observando resultados positivos, ya que se comprobó la existencia del DNA aislado en el gel.

#### 4.8 Medición de ADN en NanoDrop

A continuación, se muestran unas tablas de relación con la cantidad de ADN aislado de las diferentes muestras procesadas detectado por el nano espectrofotómetro anteriormente mencionado. La cantidad apta de dicha concentración para análisis y procedimientos es considerada mínimo de 20 ng/μl.

Dientes cremados Piezas dentales sometidas a cremación

<b>Muestra</b>	<b>Concentración Ng/μl</b>	<b>Relación 260/280</b>	<b>Relación 260/230</b>
1	54.1	1.08	0.69
2	56.9	1.28	1.14
3	37.0	1.31	1.51
4	49.9	1.25	1.33
5	48.9	1.33	1.50
6	38.9	1.33	1.20
7	17.1	1.37	1.07
8	41.8	1.35	0.87
9	233.6	1.50	0.49
9	192.5	1.48	0.49
10	36.9	1.30	1.11
11	30.8	1.29	0.85
12	21.8	1.26	1.14
13	30.9	1.24	0.76
14	29.3	1.22	0.80
15	40.6	1.77	1.54
16	16.4	1.79	0.07
7A	363.4	1.53	0.51
1062018	160.6	1.36	1.18
2062018	111.9	1.37	1.13
400° 03- 09-18	4.9	1.64	0.48

<b>400°(2) 03-09-18</b>	3.7	1.54	0.47
<b>600° 03- 09-18</b>	1.7	1.52	0.61
<b>600°(2) 03-09-18</b>	2.4	1.80	0.33
<b>400° 20- 09-18</b>	23.0	1.77	0.46
<b>400°(2) 20-09-18</b>	5.5	1.82	0.43
<b>600° 20- 09-18</b>	2.3	1.55	0.34
<b>600°(2) 20-09-18</b>	12.4	1.42	0.53
<b>400° 09- 10-18</b>	1.9	1.26	0.31
<b>600° 09- 10-18</b>	1.6	1.50	0.43

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dientes corroídos Piezas dentales sometidas a corrosión

<b>Muestra</b>	<b>Concentración Ng/μl</b>	<b>Relación 260/280</b>	<b>Relación 260/230</b>
<b>10M 10d A</b>	46.3	1.25	0.89
<b>10M 10d B</b>	27.0	0.95	0.14
<b>10M 20d A</b>	65.5	1.14	0.30
<b>10M 20d B</b>	40.1	1.34	1.19
<b>20M 10d A</b>	29.5	1.33	0.66
<b>20M 10d B</b>	6.6	1.25	0.50
<b>20M 20d A</b>	18.3	1.35	0.99
<b>20M 20d B</b>	-0.6	2.14	0.48
<b>30M 10d A</b>	13.0	1.34	0.88
<b>30M 10d B</b>	-11.4	1.13	0.44
<b>30M 20d A</b>	40.9	1.33	0.52
<b>30M 20d B</b>	28.2	1.33	0.61

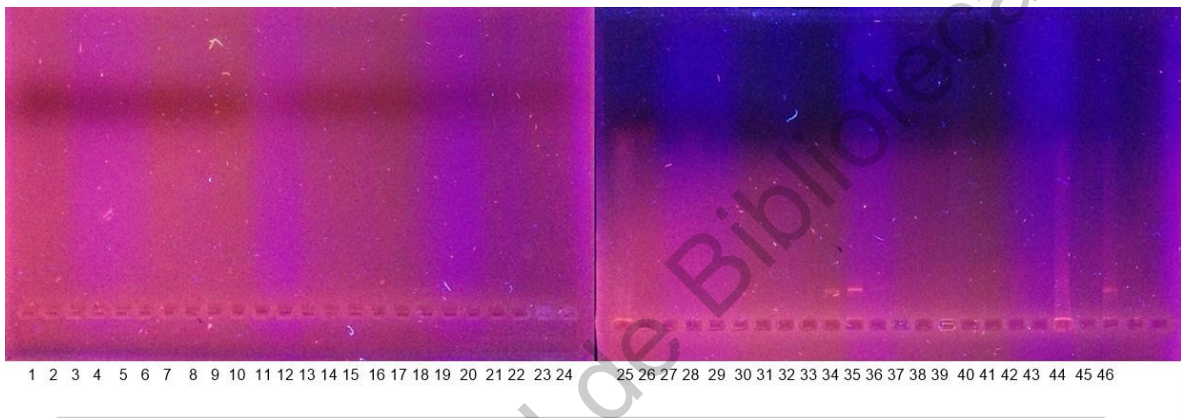
Las muestras etiquetadas con "B" son el residuo de cada muestra lavada, por ello cabe la posibilidad de guardar relación con la cantidad de DNA aislado, es decir, que la concentración del material genético sea menor.

A partir de esta medición se analizó el procedimiento realizado para realizar posibles observaciones del mismo, corregirlo y lograr aislar mayor cantidad de ADN y de mejor calidad. Se determinó corregir el tiempo de secado al aire libre y aumentarlo a más de 5-10 minutos, así mismo realizar la descontaminación de Fenol-cloroformo de manera más minuciosa e hidratar las muestras con agua libre de RNAsas (último paso) un mínimo de 24 horas. Luego de corregir el protocolo de aislamiento de ADN con fenol-cloroformo se procesaron las demás piezas dentales con este mismo.

#### 4.9 Electroforesis en gel de agarosa

La integridad del DNA obtenido se determinó mediante electroforesis en agar al 1%. Las muestras que mostraron bandas fueron seleccionadas para PCR, las cuales son: número 25, 35, 44 y 46.

La imagen esta al revés. Recuerden que se colocan los pozos por la parte superior y los números por la parte inferior. Solo coloquen la fotografía de la derecha. Se numeran los pozos y en la parte inferior del gel se coloca la descripción de que muestra está en cada pozo.



Con los resultados que están aquí plasmados, así como los que me mandaron en el archivo adjunto ya deben agregar discusión.

#### 4.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las muestras que fueron introducidas al termociclador para PCR fueron cuatro, las cuales fueron identificadas como: #15, 20M24Hrs2, #1 y #2.

12.5 ul de master mix -> 75 ul

1.0 ul de forward -> 6 ul

1.0 ul de primer reverse -> 6 ul

2 ul de ADN -> 12 ul

8.5 ul de H<sub>2</sub>O agua tridestilada -> 51 ul

192ul total de master mix entre 6 tubos corresponde a 32 ul en cada tubo

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Una vez llevado a cabo la experimentación establecida, se puede discernir que, en efecto, se cumplió la hipótesis principal, pues se logró determinar que el rendimiento de ADN aislado de piezas dentales sometidas a condiciones extremas de cremación y corrosión se obtiene a partir de las variables de cantidad y calidad, esto, mediante la recuperación de la pulpa dental por apertura longitudinal con posterior flushing de canal radicular de las diferentes piezas dentales procesadas.

Así mismo, fue factible el cumplimiento de una segunda hipótesis, ya que se desarrolló y estableció un protocolo detallado para el aislamiento de ADN de piezas dentales con pasos específicos, considerando las características particulares de las piezas dentarias, así como la condición a la que fueron expuestas (cremación o corrosión), dando por resultado una viabilidad de la identificación humana a través de la genética forense.

La presente investigación se consideró como innovadora ya que, al ser pionera en el ámbito de la Criminología, Criminalística y más específicamente en la Genética Forense en México y por consiguiente en el estado, permite nuevas formas o mecanismos de resolución del delito e identificación de víctimas.

Esta nueva herramienta e impacto en la Genética Forense se caracteriza por resultados tanto positivos como negativos.

Se logra plantear y determinar una estandarización de un método totalmente fiable para la recuperación u obtención de ADN en piezas dentales sometidas a condiciones extremas de cremación y corrosión con el reactivo de fenol-cloroformo con las respectivas modificaciones, que se determinaron a partir de una exhausta experimentación de prueba, error y estandarización.

Así mismo, el método más fiable para obtención de pulpa dental es el método por corte con fijación en resina, puesto que es del que se extrae más pulpa y menos contaminada por elementos propios del diente (esmalte, dentina, colágeno, sarro, etcétera).



Se logra determinar en el caso de cremación que hasta a una temperatura de 800°C hay presencia de ADN en piezas dentales y es viable su extracción.

En el caso de corrosión la viabilidad de extraer ADN es bajo el sometimiento de 30 M durante 30 días.

En piezas dentales con un nivel de deterioro extremo, por ejemplo, con la cavidad interna expuesta y vulnerada, es dudable la existencia de suficiente cantidad de ADN para estudios forenses, por lo que es tarea de los criminalistas realizar búsquedas exhaustivas de indicios en el lugar de hallazgo de los cadáveres y encontrar piezas dentales completas o, en su defecto, piezas dentales cuya cavidad interna no ha sido expuesta.

No obstante, es de vital importancia considerar la cantidad de piezas dentales recuperadas, puesto que un mayor número de piezas dentales favorecería el análisis de los mismos, puesto que se puede recuperar una mayor cantidad de pulpa dental y de esta manera obtener mayor contenido de material genético para la identificación de las víctimas.

Gracias a los cambios morfológicos detectados de las piezas dentales expuestas a las condiciones extremas presentadas en la presente investigación, pudiesen ser de gran valor a la hora de realizar la inspección en campo, puesto que, al encontrarse con determinada pieza dental cuyos rasgos sean parecidos a los aquí descritos, el criminalista o experto forense puede advertir sobre la condición extrema a la que probablemente el diente fue expuesto, y de la misma manera, la víctima presentada.

Esta es una aproximación cercana, más no absoluta, debido a que únicamente se procesaron piezas dentales, y en un caso extremo de índole jurídico, todo el cuerpo de la víctima puede ser expuesta por completo a cualquiera de estas condiciones extremas, variando el grado de afectación de la pieza dental.

## **VI. DISCUSIÓN**

En esta investigación se recurrió al análisis de ADN nuclear, sin embargo, también es posible realizar análisis del ADN mitocondrial, pues como ya se mencionó con

anterioridad, es aún más factible obtener un ADN con mayor integridad, puesto que este es aún más resistente y se encuentra en mayor cantidad. (Barrio Caballero, 2013)

Así mismo es de suma importancia considerar los factores internos y externos de la víctima en cuestión, por ejemplo, su edad, ya que los dientes pueden presentar alteración por el envejecimiento de la persona.

Es necesario realizar la extracción del ADN de manera inmediata a su hallazgo, por lo que, tanto criminalistas como expertos forenses deben procesar este tipo de indicios a la brevedad, ya que pueden verse alterados por condiciones externas, es por esto, que es preciso el cuidado y la buena praxis del perito en cuestión, porque aunque algunos pueden llegar a tomarlo a la ligera, en el Código Nacional de Primer Respondiente es un ejemplo donde se establece una metodología para procesar y gracias a esta investigación aclaramos y reafirmamos que el tiempo que pasa es evidencia que se pierde, por lo que por esta razón se planteó un método de eficacia para cuidar el tiempo de procesamiento de una pieza dental y así obtener ADN de calidad y en cantidad.

Como otro punto a considerar, debe tomarse en cuenta la forma que presentan las piezas dentales, esto debido a que, investigaciones precedentes de otros países, principalmente en España, plantean que la forma incluso puede reflejar estatura y origen étnico de una persona.

Todos estos puntos pueden desarrollarse minuciosamente en futuras investigaciones.

Así mismo y no menos importante, a fin de discusión, planteo algunas investigaciones en estadística con el propósito de lograr evidenciar un panorama de cómo están presentes las problemáticas sociales de las fosas clandestinas, la identificación humana y la falta de posibles soluciones, eficacia y certeza, entendiendo que la mayoría de las catástrofes, delitos y problemáticas sociales, suelen entrar en el campo de la subjetividad hasta no llegar con un dictamen de un juez o bien, hasta no adquirir una prueba científica, sin embargo me permito denotar

dicha información en este apartado, porque me gustaría que se comprenda la dimensión de las problemáticas ya mencionadas y que cada lector pueda tener una postura propia y así consideren el valor de dicho proyecto.

Como punto clave, para poder aterrizar la funcionalidad del proyecto, es preciso saber que se ha dado a conocer públicamente por el Subsecretario de Derechos Humanos, Población y Migración, Alejandro Encinas, el primer informe oficial en México, en materia de ubicación y registro de fosas clandestinas, cuerpos y restos humanos encontrados en éstas.

Para consultar el informe, estadísticas y ley a detalle visite:

- 1.- <https://www.gob.mx/segob/prensa/presentan-primer-informe-oficial-en-materia-de-fosas-clandestinas>
- 2.- <https://aristequinoticias.com/1410/mexico/en-lo-que-va-del-gobierno-de-amlo-hallaron-594-fosas-clandestinas-y-asesinaron-a-38-periodistas-y-defensores-de-derechos-humanos/>
- 3.- <https://articulo19.org/registro-nacional-de-fosas-clandestinas-y-fosas-comunes-un-avance-en-el-cumplimiento-de-la-ley-general-en-materia-de-desaparicion-forzada/>

En este sentido, y una vez analizando los datos duros, reafirmo y sustento lo establecido en los apartados de planteamiento del problema y justificación, ya que realmente se obtienen de este informe cifras y datos concretos que permiten entender la magnitud de la problemática y de cuanta necesidad existe de buscar y encontrar métodos de solución encaminada a la identificación. Así mismo en este mismo informe se comunica que se incrementará un fondo económico para este tipo de investigaciones, por lo que se debe prever que existan las herramientas necesarias y que a su vez, ofrezcan garantía de los resultados que se arrojen en una investigación, entonces la pregunta qué hago a los lectores es: ¿Tiene lugar este proyecto planteado para la resolución de identificación de personas?

Por otro lado, y dando soporte al planteamiento anterior, los únicos detalles que existen o la única estadística que se obtiene para conocer las condiciones en las

que se encontró un cadáver o murió una persona, es cuántas muertes existen de acuerdo a su clasificación (datos que son aportados por las fiscalías al INEGI),y que es la siguiente:

1. ENFERMEDAD
2. ACCIDENTALES
3. HOMICIDIO DOLOSO
4. HOMICIDIO CULPOSO
5. SUICIDIO

(Para mayor información, consulte la página oficial del INEGI o el sig. Link. <https://www.inegi.org.mx/temas/mortalidad/> ).

En esta clasificación se encuentran contabilizados todos los cadáveres encontrados sin dar mayores especificaciones, ya que a los cadáveres con características deficientes para obtención de ADN simplemente se le rinde en un dictamen como estado “NO VALORABLE”.

Por esta misma razón anterior, es lamentable que no exista una estadística y una “buena” base de datos de cuantos cadáveres encontrados y catalogados con la etiqueta de “NO VALORABLE” son depositados en una fosa común por razones de que no logran ser identificados o reclamados.

(Para un mayor entendimiento de la clasificación de personas desaparecidas y cadáveres consulte INFOGRAFÍA - Registro Nacional de Datos de Personas Extraviadas o Desaparecidas, RNPED en el sig. Link: <https://drive.google.com/file/d/1eSP0pGzj3e9Q9kNo5d7IDpBmp2jWPM0x/view> ).

(México, 2018)

## VII. IMPACTO

Hoy en día la investigación forense es indispensable para la resolución de delitos, por esta razón, las ciencias forenses se conforman de una gran variedad de disciplinas científicas que en la actualidad han desempeñado un papel fundamental, ya que la generación de evidencia que emanan de las ya mencionadas, y que sirven como material probatorio durante el proceso jurídico y ante las instituciones que procuran y administran la justicia en nuestro país, nos otorgan certeza del proceso y análisis de cómo se llega a la resolutive de un caso.

En este sentido, la Genética Forense junto con el análisis Criminalístico destacan un gran impacto en los resultados de una investigación, esto por los aportes que generan en conjunto, pues por parte de la Criminalística, mediante un método de búsqueda, se proporcionan los indicios que son el material sensible significativo que pueden dar explicación a la dinámica, desarrollo de un hecho delictivo, esclareciendo los principios fundamentales de esta ciencia como lo son el uso, intercambio, producción, correspondencia, reconstrucción, probabilidad y hasta llegar al principio de certeza donde primordialmente entra la Genética Forense, al darle un sustento o respaldo al indicio de carácter estrictamente comprobable, pues ha sido analizado por parte del laboratorio con los respectivos protocolos y que garantiza un resultado veraz.

Es por esto último que la Genética Forense, como principio básico considera que por ningún motivo es posible alterar una secuencia de ADN, y con la toma de indicios odontológicos, es factible determinar la identificación de alguna víctima o incluso victimario.

Una vez comprendiendo el impacto de estas ciencias, se fortalece aún más el desarrollo de esta investigación planteada y en lo que puede influir, ya que si la aterrizamos en el campo de las problemáticas sociales actuales, como la identificación humana y en las deficiencias de resolutivas al delito en nuestro país, es decir que no se le ha dado una solución certera y factible, la investigación ofrece la posibilidad de la identificación de cadáveres en estado deteriorado y donde es imposible un reconocimiento por medio de los métodos convencionales, es decir,

en víctimas que están implicadas en fosas clandestinas, calcinados, putrefactos, o incluso, en casos como puede ser la desaparición por los llamados “pozoleros”, entre otros.

Por esta razón, el gran impacto que se obtiene a partir de esta investigación es que es pionera en el país, por consiguiente en el estado de Querétaro, pues no se han llevado a cabo investigaciones de este tema y mucho menos se ha dado implementación a un método de obtención de ADN de piezas dentales sometidas a condiciones extremas: cremación y corrosión.

La innovación planteada, es la estandarización de un método de aislamiento que permita obtener una buena cantidad y calidad suficiente de ADN.

Actualmente las dependencias gubernamentales y encargadas de dar solución a estas problemáticas, no cuentan con alternativas de esta índole, es por eso que no hay solución ante estas catástrofes y casos particulares de desaparecidos.

Considerando este proyecto la iniciativa que puede ayudar a resolver la problemática de la identificación humana en los casos y características ya mencionadas, es indispensable destacar que actualmente no existen datos estadísticos confiables en el país, acerca de las condiciones en las que se han detectado los cuerpos que en algún momento han sido reportados como desaparecidos y mucho menos se puede suponer de características o condiciones en las que están los catalogados como desaparecidos.

Sin embargo, considero una gran aportación el hecho de plantear este método de obtención de ADN, ya que propongo una resolutive que es factible probar como alternativa de solución ya en una dependencia encargada de impartir justicia y que ayudaría a reducir los casos que se obtienen por desaparición.

Por esta razón, esta iniciativa puede otorgar garantía de que es posible lograr la identificación o en su caso, la obtención de ADN de un cadáver cuándo los métodos convencionales arrojan un resultado de “no valorable”.

## BIBLIOGRAFÍA

Buckleton , J., Triggs , C., & Walsh , S. (2005). *Forensic DNA evidence interpretation*. Florida: CRC Press.

MESTRES NAVAL, F., & VIVES-REGO, J. (2009). Bancos y bases de datos genéticos para. *Revista del poder judicial N° 89*, 239-263.

Albarellos, L. (2009). Identificación Humana y Bases de Datos Genéticos. *Ponencia presentada por la autora en el Congreso de FIADI 2013* (p. 29). México: Ubijus-IFP.

Alia García, E., Parra Pecharrómán, D., Sánchez Díaz, A., Mendez, S., Royuela, A., Gil Alberdi, L., . . . Del Campo, R. (2015, Diciembre). Forensic identification in teeth with caries. *Forensic Science International*, 257, 236-241.

Barrio Caballero, P. A. (2013, Abril 01). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal*, 39(2), 54-62.

Bateson, W. (1902). *Mendel's Principles of Heredity: A Defence*. University Press: Cambridge.

Bowler, P. J. (1989). *The Mendelian Revolution. The Emergence of Hereditarian Concepts in Modern Science and Society*. London: The Athlone Press Ltd.

Brena Sesma, I. (2008). Privacidad y confidencialidad de los datos genéticos. *Boletín Mexicano de Derecho Comparado*, 1(123.5).

CEFEGEN. (2015). *Centro de Fertilidad y Genética. CEFEGEN*. Retrieved from Cefegen: <https://cefegen.es/>

Corte Real, A., Anjos, M., Vieira, D., & Gamero, J. (2012, Julio). The tooth for molecular analysis and identification: a forensic approach. *The Journal of forensic odonto-stomatology*, 30(1), 22-28.

Del Castillo Ruiz, V., Uranga Hernández, R., & Zafra de la Rosa , G. (2012). *Genética Clínica*. México, D.F.: El Manual Moderno.

- Dobberstein, R., Huppertz, J., Wurmb Schwark, N. V., & Ritz Timme, S. (2008, Agosto 6). Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *Forensic Science International*, 179, 181-191.
- Dutra Corrêa, H. S., Miranda Pedro, F. L., Ricci Volpato, L. E., Machado Pereira, T., Siebert Filho, G., & Henrique Borges, Á. (2017, Noviembre). Forensic DNA typing from teeth using demineralized root tips. *Forensic Science International*, 164-168.
- Estado Argentino. (2002). *Argentina.gob.ar. Portal Oficial del Estado Argentino*. Retrieved from Argentina.gob.ar: <https://www.argentina.gob.ar/ciencia/informacion-al-ciudadano/datosgeneticos>
- Gallori, E. (2012). *ATLAS ILUSTRADO DE GENETICA*. España: SUSAETA.
- Grandini González, J. (2009). *Medicina Forense. Aplicaciones teórico-prácticas*. México, D.F.: Manual Moderno.
- Hänni, C., Laudet, V., Sakka, M., Bègue, A., & Stéhelin, D. (1990). [Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences*, 365-370.
- Harris, J., Ponitz, P., & Ingalls, B. (1998). *Dental health in ancient Egypt*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Higgins, D., & Austin, J. J. (2013, Diciembre). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Science & Justice*, 53(4), 433-441.
- Higgins, D., Kaidonis, J., Townsend, G., & Austin, J. J. (2014, Marzo). Evaluation of carrier RNA and low volume demineralization for recovery of nuclear DNA from human teeth. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 10(1), 56-61.
- Hughes Stamm, S., Warnke, F., & Van Daal, A. (2016, Enero). An alternate method for extracting DNA from environmentally challenged teeth for improved DNA analysis. *Legal Medicine*, 18, 31-36.



- Karp, G. (2014). *Biología celular y molecular* (Séptima ed.). México, D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES.
- Klug, W., Cummings, M., Spencer, C., & Palladino, M. (2013). *Conceptos de genética* (Décima ed.). Madrid: PEARSON EDUCACIÓN.
- Krenzer, U. (2006). *Compendio de Metodos Antropologico Forenses*. Guatemala: Centro de Análisis Forense y Ciencias Aplicadas CAFCA.
- M, K., Ossowski, A., & Zielińska, G. (2016, March 1st). Comparison of three different DNA extraction methods from a highly degraded. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 24.
- Marín, L., & Moreno, F. (2004). Odontología Forense: Identificación odontológica de cadáveres quemados. Reporte de dos casos. *Revista Estomatología*, 12(2), 57-70.
- México, G. d. (2018, Abril). *Registro Nacional de Datos de Personas Extraviadas o Desaparecidas, RNPED*. Retrieved from <https://www.gob.mx/sesnsp/acciones-y-programas/registro-nacional-de-datos-de-personas-extraviadas-o-desaparecidas-rnped>
- Noriega, L. H. (2013). *El ADN de Locard Genética Forense y Criminalística*. Madrid: Reus, S.A.
- PR Newswire. (2018, Mayo 31). *CISION PR Newswire*. Retrieved from PR Newswire Association LLC. All Rights Reserved. A Cision company.: <https://www.prnewswire.com/es/comunicados-de-prensa/el-estudio-decode-demuestra-que-variantes-en-la-secuencia-del-genoma-ligados-con-alargar-la-formacion-educativa-estan-bajo-seleccion-negativa-611051285.html>
- Rodwell, V. W., A. Bender, D., M. Botham, K., Kennelly, P., & Weil, P. (2016). Harper. *Bioquímica ilustrada 30e*. México: Mc Graw Hill.
- Rubio, L., Sioli, J. M., Santos, I., Fonseca, G., & Martín de Las Heras, S. (2016, Junio). Alteraciones Morfológicas en Dientes Sometidos a Altas

Temperaturas con Interés Forense. *International Journal of Morphology*, 34(2), 719-728.

Sepúlveda, P. (2013, Agosto 19). *LA TERCERA*. Retrieved from <http://www2.latercera.com/noticia/chilenos-crean-nuevo-metodo-forense-para-extraer-adn-de-dientes/>

Tadeo Rangel, M. Á. (2013, Mayo). La genética forense en México su aplicación legal. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.

Vargas Alvarado, E. (2017). *Atlas de ciencias forenses*. México: Trillas.

Willems, G., Clement, J. G., & Sweet O.C., D. (2010, Septiembre). Meeting of the International Organization of Forensic Odonto-Stomatology. *Forensic Science International*, 201, 1-164.

## **ANEXOS**

Las palabras de Johannes Reiter escritas hace más de 20 años siguen teniendo vigencia. Javier Gafo, basándose en ellas, propuso un decálogo, en el cual nos basamos para realizar nuestra investigación en apego a las pautas éticas para la investigación biomédica en sujetos humanos y, en el caso específico de esta investigación, material biológico humano.

### **Decálogo de la manipulación genética**

1. Las investigaciones en la naturaleza están permitidas, pero han de realizarse con un gran sentido de responsabilidad y con una ponderación de sus posibles consecuencias para el presente y futuro de la humanidad.
2. La nueva genética nos lleva a ver a todos los seres vivos, incluido el hombre, de una forma más cohesionada, como formando parte de la misma biósfera y del

mismo destino común. La responsabilidad del hombre y de la ciencia sobre la biósfera constituye hoy una exigencia ética fundamental.

3. La libertad de investigación no es absoluta; tiene como límite el bien de la humanidad. Los principios éticos que regulan la investigación en este campo no son distintos de los de otras formas de investigación.

4. Los objetivos de la investigación genética deben tener una orientación terapéutica en sentido amplio: hay que pretender siempre un aumento en humanidad.

5. La ingeniería genética hace posible modificar los seres vivos y producir alteraciones cuya realización la naturaleza ha necesitado centenares de miles de años. Esta ingente posibilidad exige un alto sentido de responsabilidad y una continuada evaluación de sus consecuencias.

6. La biotecnología y la ingeniería genética constituyen un importante motivo de esperanza para la humanidad. Los temores iniciales se han disipado casi completamente, por lo que ahora se debe probar a priori que tales investigaciones son peligrosas.

7. Existen límites fundamentales en la experimentación genética del hombre. Los experimentos genéticos no pueden lesionar o poner en peligro la vida, la salud y la integridad personal del ser humano, incluido el no nacido. En la experimentación genética humana, el investigador tiene ante sí como "objeto" a un ser humano que, por su intrínseca dignidad, nunca puede convertirse en medio para lograr un fin.

8. El análisis del genoma puede realizarse con el presupuesto de la voluntariedad y el bien del individuo en cuestión y no para su eventual discriminación, en cualquiera de sus formas, tampoco simplemente para conocer la intimidad biológica del individuo.

9. La terapia genética de células somáticas está en principio éticamente permitida. Debe valorarse en forma similar al trasplante de órganos. Los riesgos no son insignificantes, por lo que deben preceder una ponderación de sus consecuencias. Ni siquiera cuando la experimentación genética se realiza con fines

terapéuticos está excluido el peligro de una abusiva disposición y manipulación de la vida humana.

10. Tomando como punto de partida el principio de la dignidad humana y lo que Jost Herbig llama “derecho a ser producto de una casualidad”, hay que excluir éticamente la utilización de la manipulación genética para la producción de “varones óptimos” ya que atentaría contra la indisponibilidad de la individualidad humana. La ingeniería genética no puede llevar al dominio del hombre sobre el hombre.

(Del Castillo, Uranga, y Zafra de la Rosa, 2012)

Dirección General de Bibliotecas UAQ