

1285
1285

T.9
70 53
00829

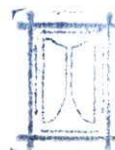
135

**TECNICA PARA LA IDENTIFICACION DE CADAVERES POR MEDIO DEL
ADN EN PULPA DENTARIA HUMANA REALIZADA EN EL LABORATORIO
DE GENÉTICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y
CIENCIAS FORENSES. SANTAFÉ DE BOGOTÁ, D. C.**

**FRANCY BARBOSA
SANDRA BERNAL
PAULA FONSECA
DIANA JUNCO
ESPERANZA MORENO
YAMEL TILAGUI**

**COLEGIO UNIVERSITARIO COLOMBIANO
COLEGIO ODONTOLÓGICO COLOMBIANO
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.**

2000



COLEGIO ODONTOLÓGICO COLOMBIANO
BIBLIOTECA SEDE NORTE

**TECNICA PARA LA IDENTIFICACION DE CADAVERES POR MEDIO DEL
ADN EN PULPA DENTARIA HUMANA REALIZADA EN EL LABORATORIO
DE GENÉTICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y
CIENCIAS FORENSES. SANTAFÉ DE BOGOTÁ, D. C.**

**FRANCY BARBOSA
SANDRA BERNAL
PAULA FONSECA
DIANA JUNCO
ESPERANZA MORENO
YAMEL TILAGUI**

DR. MANUEL PAREDES
Médico General Especialista en Genética Humana
Asesor Científico

Dra. INES AMPARO REVELO
Odontóloga, Magister en Administración en Salud

**COLEGIO UNIVERSITARIO COLOMBIANO
COLEGIO ODONTOLÓGICO COLOMBIANO
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.**

2000

El trabajo de Grado TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN DE CADÁVERES POR MEDIO DEL ADN EN PULPA DENTARIA HUMANA REALIZADA EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES SANTAFE DE BOGOTÁ D.C. elaborado por FRANCY BARBOSA, SANDRA BERNAL, PAULA FONSECA, DIANA JUNCO, ESPERANZA MORENO Y YAMEL TILAGUI ha sido aprobado como requisito parcial para optar el título de Odontólogo General.

Dr.:

**Manuel Paredes
Médico General Especialista en
Genética Humana
Asesor Científico**

Dra.:

**Inés Amparo Revelo
Odontóloga, Magister en Administración
de Salud
Asesor Metodológico**

**COLEGIO UNIVERSITARIO COLOMBIANO
COLEGIO ODONTOLÓGICO COLOMBIANO
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.**

2000

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos por el apoyo y colaboración brindados en el transcurso de elaboración y culminación de esta investigación a Dios, al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, al Colegio Odontológico Colombiano y a nuestros padres.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN	
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2. JUSTIFICACIÓN	3
1.3. PROPÓSITO	3
1.4. MARCO	3
1.4.1 Formas de identificación	3
1.4.2 Identificación dental	29
1.4.3 Reseña histórica del ADN	52
1.5. OBJETIVOS GENERALES	109
2. MÉTODO	110
2.1 TIPO DE ESTUDIO	110
2.2 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	110
3. RESULTADOS	112
4. CONCLUSIONES	118
5. RECOMENDACIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

Entre 1883 y 1889 Weismann, uno de los citólogos precursores de la teoría cromosómica de la herencia, emitió la continuidad del plasma germinal, en la cual el material hereditario pasaría intacto a través de la línea germinal de una generación a la siguiente.

Durante algún tiempo, aceptando que el núcleo era la sede de la herencia, se supo que las moléculas hereditarias no eran las proteínas sino los ácidos nucleicos con sede en el núcleo. Parece probable que la vida en sí empezara su evolución con los ácidos nucleicos que actúan como depositarios y transmisores de la información genética de cada célula, tejido y organismo. Existen dos tipos de ácido nucleicos: el ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN, esta molécula base de la vida, con capacidad de autorreplicarse está configurado por dos cadenas de nucleótidos que se enrollan sobre sí mismos, formando una especie de escalera en caracol. Este, como portador de la información genética, se transmite de padres a hijos, tiene una gran estabilidad en el medio ambiente y se encuentra en todos los núcleos celulares, es como una huella dactilar genética específica para cada persona.

La posibilidad de conseguir la identificación de una persona mediante el ADN, se basa en el estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica. Estos fragmentos

presentan una longitud variable que se debe a una mutación en la secuencia de bases o bien a una alteración de la longitud de la secuencia de ADN por un número determinado de pares de bases.

- La técnica de la huella genética consiste en la extracción de ADN de la muestra, la cual se encuentra en sangre, semen, tejido, hueso, pelos, saliva, orina y pulpa dentaria. La técnica de identificación del ADN en pulpa dental adquiere mayor valor en casos en que la integridad física de los cuerpos se encuentre muy afectada.

1. CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace mucho tiempo se ha trabajado en la identificación de cadáveres mediante diferentes técnicas y una de ellas es la identificación dental, mas específicamente la que se realiza por medio de la extracción de ADN del paquete vascular nervioso presente en los conductos radiculares dentales. Esta técnica es un procedimiento que requiere de personal especializado, en Colombia hasta hace pocos años se realiza y solamente para casos muy especiales por el alto costo.

El desconocimiento de la técnica de ADN en pulpa para la identificación de cadáveres es frecuente en estudiantes de pregrado y en odontólogos generales, por lo cual se encuentra en esta área un amplio vacío teórico-práctico sobre dicha técnica, por eso es válido plantear los siguientes interrogantes:

¿El odontólogo como tal tiene conocimientos acerca de la técnica del ADN en pulpa dentaria para la identificación de cadáveres?

¿Qué acceso posee a esta información? ¿Sabe que esta técnica existe? ¿Conoce hasta que momento es importante su participación en la identificación de cadáveres por este método?
¿Reconoce la importancia que tiene actualmente la técnica?

1.2. JUSTIFICACION

Este estudio es importante porque les servirá a los estudiantes de pregrado y a los odontólogos recién egresados como por ejemplo en adelantar procesos de peritazgo para la prestación del servicio social obligatorio o en el transcurso del ejercicio de la profesión.

1.3. PROPOSITO

La investigación pretende dar a conocer a docentes y estudiantes del Colegio Universitario Colombiano los métodos utilizados en el laboratorio de genética humana del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses para la identificación de cadáveres mediante el ADN en la pulpa dental humana.

1.4 MARCO TEORICO

1.4.1 FORMAS DE IDENTIFICACIÓN

- Comparativas: son aquellas que más frecuentemente se hacen y consisten en comparar antecedentes o reseñas bien sea por reconocimiento necrodactilias historias clínicas

odontológicas (carta dental) radiografías o modelos de estudio, así como también señales particulares o prendas de vestir. (Rodríguez V., 1995)

- Reconstructivas. A partir de cadáveres en reducción esquelética o con oblasiones en estructuras básicas para lograr la identidad. En esta área es importante la antropología forense para la reconstrucción facial, edad, talla y sexo.

Clases de identificación:

- Fehaciente: es aquella que da fe y se puede comparar entre evidencias dubitadas e indubitadas. Requisitos importantes para lograrla son las reseñas escritas (huellas digitales, carta dental antemortem) y los Rx. (Rodríguez V., 1995)
- Indiciaria o complementaria. Mediante la cual se complementa la fehaciente o simplemente se recopilan unos datos biográficos, de antecedentes médico-quirúrgicos, prendas de vestir o señales particulares, logrando también puntos de concordancia evidentes. (Rodríguez V., 1995)

Una de las aplicaciones entonces, en la que más interviene el odontólogo, es en la identificación de personas vivas u obitadas, apoyados en las estructuras dentales y sus anexos; ya que estas son las que más resisten la acción de fenómenos naturales cadavéricos como la putrefacción y el paso del tiempo. (Rodríguez V., 1995)

Examen del individuo vivo: El examen odontológico en el individuo vivo, consta de una parte intraoral y otra extraoral. El examen intraoral comprende el tamaño, características

morfológicas, forma y grado de atrición de los dientes, más el tamaño, posición, y grado de cualquier posible lesión, existencia y grado de caries, y ausencia y anomalías dentarias. Además son importantes la forma del arco dentario, el tipo de oclusión, la naturaleza de depósitos, cálculos dentarios y propiedades de la saliva. (Vargas E, 1983)

El examen extraoral trata especialmente con el daño hecho por los dientes en sustancias, que pueden usarse como pruebas judiciales (por ejemplo, marcas de dientes). En estos casos se anota la posición, grado y forma, y tamaño de la marca dentaría, y los caracteres, número y disposición de los dientes, que las produjeron. Si las mordeduras son en tejidos humanos, deben fotografiarse inmediatamente después de su descubrimiento para evitar la distorsión y el cambio de color. Conviene también hacer esquemas e impresiones en materiales plásticos.

Examen del individuo muerto: En el examen de un cadáver, es esencial comprobar si hay marcas de dientes o mordeduras. En casos de muerte violenta, si la identidad del cadáver es desconocida o esta reducido a un esqueleto, la identificación del individuo es uno de los primeros puntos que deben ser aclarados. (Vargas E, 1983)

Identificación Dactilar. De todos los métodos, el más idóneo es el dactilar, es decir la necrorreseña. Es el método más seguro, rápido y barato. Las impresiones se realizan sobre las tarjetas decadactilares directamente. Si la rigidez cadavérica ha aparecido es necesario vencer la resistencia de los miembros, será preciso tratar de volver los dedos uno a uno

dorsalmente hasta que se pierda tal rigidez. Cuanto más tiempo pase desde el fallecimiento, más aumentan las dificultades para la obtención de la necrorreseña.

La degeneración de la membrana celular empieza a las cuarenta y ocho horas de ocurrida la muerte, por lo que no debemos hablar de fenómenos osmóticos en la regeneración de tejidos una vez transcurrido ese tiempo. Los dedos pueden encontrarse en algunos estados: Momificación, que es la desecación rápida del cadáver por deshidratación de sus tejidos. Corificación, parecido al anterior pero en el que la piel tiene un aspecto de cuero viejo, aunque mantiene cierta flexibilidad. Saponificación, se produce cuando el cadáver permanece mucho tiempo sumergido en el agua o en zona húmedas y con poco aire. Maceración, se caracterizan por el desprendimiento de la epidermis, que se arruga y reblandece, volviéndose blanca.

Identificación serológica. Uno de los pasos que hay que dar, paralelos a la obtención de la necrorreseña, es la obtención de muestras para la realización de análisis para determinar el grupo sanguíneo. Los sistemas sanguíneos son características fijas de cada individuo. Casi siempre es posible la obtención de una muestra de sangre del cadáver, que nos va a proporcionar, al menos, el grupo sanguíneo del sistema ABO al que perteneció el sujeto, lo cual es una prueba de orientación valiosa.

Necroidentificación Radiológica. El descubrimiento de ROENTGEN, en 1895, que en un principio se utilizó para diagnosticar fracturas, luxaciones, enfermedades de los huesos,

localización de cuerpos extraños, etc., más tarde invadió todos los campos y, como es lógico, también el de la identificación.

El sistema óseo es inmutable, por lo tanto sirve para la identificación de cadáveres, ya que el tejido óseo se conserva durante meses e incluso años después de la muerte con todas sus características. Por ello en un cadáver se utilizarán los rayos X para obtener los datos post-mortem y después se realizará la búsqueda ante-mortem en el fichero.

Informe de Criminalística de la Fiscalía General de la Nación. Durante el período comprendido entre julio de 1997 y junio de 1.999 el Cuerpo Técnico de Investigación realizó 67.520 inspecciones a cadáveres, de las cuales 40.718 correspondientes al 60% fueron homicidios, de los cuales 28.886 fueron por arma de fuego equivalente al 43%. (Fiscalía General de la Nación, 1999)

De ese mismo total de inspecciones, el 18% fueron causadas en accidente de tránsito, el 3% por suicidio y el 29% en vía pública. Así mismo, se logró la identificación en 62.986 casos y 4.534 fueron cadáveres NN's. Para determinar la edad en las inspecciones de cadáveres, los porcentajes más altos se encuentran en la edad productiva del ser humano, es decir, entre los 20 y 49 años con el 56%. El cuerpo técnico de Investigación llevó a cabo 47.972 correspondiente al 71% de los casos, siendo la institución que más realizó esta diligencia, seguida de la SIJIN y el DAS. (Fiscalía General de la Nación, 1999)

Se implementó programas automatizados donde se manejan casos de occisos NN's. El archivo delictivo a nivel nacional, que tiene como base la reseña de población carcelaria que realiza cada unidad y dirección seccional, logró el apoyo de la Registraduría Nacional del Estado Civil para identificar a la población carcelaria. Paralelamente crearon el archivo de registro de los funcionarios de la institución en todo el territorio nacional, el cual contiene los datos sobre carta dental, huellas dactilares y fotografía, para posibles casos de identificación de los funcionarios. (Fiscalía General de la Nación, 1999)

En cuanto a la identificación especializada, el Cuerpo Técnico de Investigación realizó el análisis de restos óseos a nivel nacional, de los cuales se han llevado a cabo 104 estudios completos que equivalen a un 53,88% y 89 se encuentran en proceso, que equivalen a un 46,11% para un total de 193 casos.

De los 193 casos, 115 corresponden a análisis efectuados a restos exhumados en el Palacio de Justicia y 37 a estudios efectuados a los restos de los menores de Pereira. Los otros 41 casos corresponden a estudios sobre restos óseos encontrados en varias regiones del país. Se atendieron otras diligencias de identificación relacionadas con casos de connotación como el terremoto que afectó la Zona Cafetera, la avioneta hallada en Tame (Arauca), las masacres de San José de Guaviare, Mitú y Miraflores en el Urabá Antioqueño – Chocoano y, el holocausto del Palacio de Justicia y Guayabetal. (Fiscalía General de la Nación, 1999)

En Colombia la identificación de los actores del delito, entendidos éstos como víctimas y victimarios, se ha realizado hasta el momento a través del análisis de las huellas dactilares entre otros métodos científicos. La adquisición e implementación de tecnología avanzada en identificación de personas vivas o muertas, mediante la técnica del análisis sistemático de la molécula del ADN permitirá llegar al rastreo de la huella biológica (sudor, saliva, cabello, etc.) del ser humano que esté involucrado en un hecho punible. (Fiscalía General de la Nación, 1999)

Gracias al trabajo del grupo de Laboratorio del CTI, se han aplicado las técnicas de identificación con ADN nuclear y ADN mitocondrial, ésta última considerada como la técnica más especializada y precisa en identificación forense, la cual ya está al alcance de la Fiscalía General.

Mediante la técnica de ADN nuclear se identificaron plenamente dos restos de menores de edad en el caso de los niños desaparecidos en Pereira. Así mismo, se excluyeron tres restos óseos con todos y cada uno de los grupos familiares de los cuales hasta la fecha se han recibido muestras de sangre. Para los demás restos óseos se hizo necesario la aplicación de ADN mitocondrial debido a la contaminación que presentaban las muestras de ADN nuclear. (Fiscalía General de la Nación, 1999)

En el caso del avión de la Fuerza Aérea de Colombia, desaparecido hace 12 años en la zona Cerro Azul, Tame Arauca, a 12 mil pies de altura, se están realizando las pruebas de ADN

mitocondrial que establecerán la identidad de los restos de las personas que fueron encontradas en ese lugar. En el holocausto del Palacio de Justicia, la exhumación culminó en octubre de 1998. Se recuperaron 90 cadáveres de adultos, 50 infantiles, y 25 restos anatómicamente aislados. De estos se seleccionaron 29 restos con base en un estudio estratigráfico del terreno, a los cuales se les realizó un estudio médico, odontológico y antropológico que determinó sexo, rangos de edad, de estatura y patrón racial. Adicionalmente, se clasificaron las muestras y se iniciaron los procesos de aislamiento para ADN mitocondrial, debido al estado de degradación de las muestras óseas. (Fiscalía General de la Nación, 1999)

Fotografía judicial. La fotografía digital, como técnica en el estudio forense de los elementos de prueba, le ha permitido a la Fiscalía General de la Nación contar con una herramienta más económica, de mayor definición y más eficiente que la fotografía convencional así como de menor riesgo profesional. (Fiscalía General de la Nación, 1999)

Tecnologías para análisis balístico forense. Las armas de fuego son el elemento de mayor uso en la comisión de delitos como hurto, lesiones personales, homicidio, secuestro, extorsión y terrorismo, razón por la cual se necesita tener capacidad tecnológica en la investigación de estos elementos de prueba. Los Laboratorios de Balística de la Fiscalía General de la Nación se han dotado con la tecnología y equipos apropiados para implementar un sistema computarizado que permita la correlación de imágenes de

microscopia de evidencias balísticas en Santa Fe de Bogotá y otras ciudades. (Fiscalía General de la Nación, 1999)

IBIS ofrece un sistema computarizado y automatizado, compuesto por dos unidades: la primera recolecta la información, es decir, captura las imágenes de proyectil y vainilla; la segunda, procesa y correlaciona mediante algoritmos matemáticos la información recibida; además, presenta los candidatos de mayor similitud de acuerdo con la base de datos que se almacene en el sistema. También elaboró un banco de patrones de armas de fuego de dotación de la Fiscalía General y de armas de fuego comprometidas en los procesos, el cual se convertirá en la primera base de datos para este equipo. (Fiscalía General de la Nación, 1999)

La antropología forense es el estudio de asuntos medico-legales relacionados con una persona fallecida, por medio del examen y el estudio de los restos del esqueleto para, entre otras cosas, tratar de determinar la identidad de la persona, la forma y las causas de su muerte. (Admistía Internacional, 1994:147).

Por lo general, los amigos y familiares se dedican a la búsqueda de sus seres queridos cuando se han desaparecidos, la identificación de estos cuerpos es el trabajo de un equipo de médicos forenses, dividido en tres disciplinas: La antropología forense, la odontología forense y la patología forense. (Toribio L, 1992)

El trabajo de los médicos forenses es muy importante para los familiares de "desaparecidos" porque son ellos quienes finalizan el sufrimiento con la identificación de las víctimas ofreciéndoles la oportunidad de rendirles el último honor a las víctimas y darles el entierro que se merecen.

Además que sirve porque los resultados de sus investigaciones sirven como pruebas, que hacen posible el enjuiciamiento de los presuntos culpables. Cuando los cuerpos están irreconocibles o en condiciones que no se pueden presentar a los familiares para su identificación se recurre a un equipo de médicos forenses para la identificación de los cadáveres.

Este trabajo consiste en comparar los datos de ante-mortem con los post-mortem. Por ejemplo el sexo, edad, estatura, etc. Todo esto se obtiene de un trabajo en equipo constituido por dactiloscopista, odontólogos, patólogos, fotógrafos, antropólogos y expertos en ADN. Siendo sus actividades:

- Dactiloscopista: Compara las huellas digitales de los dedos de manos y pies. El patrón individual de una huella es único.
- Odontólogo: Compara los datos con respecto a la dentadura y la mandíbula, este método es muy confiable porque una dentadura es única, en segundo lugar porque la descomposición no influye sobre la durabilidad de la dentadura. Además, porque es mucho más resistente al fuego, agua, que los huesos y la piel.

- Patólogo: Realiza una identificación por medio de una inspección tanto interna como externa, donde la externa compara el lugar, tamaño de cicatrices, lunares, tatuajes, y la interna se hace comparación con respecto a las enfermedades y operaciones del desaparecido sobre todo las operaciones óseas y datos radiólogos.
- Antropólogo: Mide y compara datos sobre el esqueleto. Hay tablas establecidas para saber sexo, edad, raza y altura.
- Las fotografías sirven para comparar la cara del desaparecido con las del cráneo encontrado.
- El estudio del ADN es un método muy utilizado para identificar un cuerpo demostrando el parentesco con familiares allegados, se realiza por medio de la huella digital del ADN, en la que se hacen visibles las características individuales de una persona. Se utiliza la prueba del PCR "reacción en cadena de la polimerización". La técnica del PCR se puede aplicar a una cantidad mínima de material restante que contiene el ADN. Ejemplo la raíz de un cabello o la cavidad de un diente.

Desde 1977, las abuelas de la plaza de Mayo activamente están buscando a sus hijos desaparecidos y a sus nietos que posiblemente han sido adoptados. Para probar que ciertos niños son sus nietos en el transcurso de los años han podido comprobar que se han utilizado diferentes métodos para demostrar el parentesco. Una de estas técnicas es la del ADN desde 1987 las abuelas colaboran en la creación de un banco de huellas digitales del ADN para establecer el parentesco. De esta manera han identificado mas o menos 40

nietos que habían nacido durante el cautiverio de sus hijos "desaparecidos". (Toribio L, 1992)

El contenido de una descripción personal. Los datos suministrados por los familiares al grupo medico-forense son de demasiada importancia por lo tanto la descripción de una persona debe ser muy compleja y debe tener los siguientes datos:

- Sexo
- Edad
- Altura del cuerpo
- Peso
- Porte
- Raza
- Forma de la cara, nariz y orejas.
- Cabello
- Lugar y significado de tatuajes.
- Lugar y causa de cicatrices.
- Lugar de lunares.
- Grandes enfermedades.
- Operaciones.
- Anomalías óseas.
- Joyas.
- Gafas.
- Vestimenta.
- Lentillas.

Exámenes complementarios

- Huella digital.
- Cavidad del diente(pulpa)
- Fotos.
- Radiografías de huesos o dentadura.
- Saliva.
- Informes médicos.
- Sangre.
- Raíz capilar.

Muertes de Personas no Identificadas (Nns) en Colombia 1996. El Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses en cumplimiento de su misión, suministra conocimiento científico y técnico que soporta al sistema judicial colombiano. Los médicos forenses efectúan necropsias a las personas fallecidas por muerte violenta y se enfrentan cotidianamente a cadáveres no identificados, lo que conduce al abordaje de un proceso de identificación de estos cuerpos, como elementos indispensables para el esclarecimiento de estos hechos punibles. (Giraldo C., 1997)

En todos los puntos de atención de medicina legal, antes de realizar la necropsia de una persona no identificada se toman huellas dactilares, que se remiten a la Registraduría Nacional para la identificación del cadáver. Se llena una ficha con la descripción formocromática, señales particulares, tanto internas como externas, descripción de prendas de vestir, carta dental y fotografía de filiación; se registran también los datos de levantamiento y el destino final del cuerpo, de tal forma que pueda ser ubicado en caso de un cruce positivo con el universo de desaparecidos. (Giraldo C., 1997)

En cadáveres putrefactos, incinerados, restos óseos o mutilados, se cuenta con el apoyo de disciplinas como la antropología, radiología, biología, genética que aportan información para el esclarecimiento de cada caso.

El médico forense, ante un cadáver sin identificar después de ocho días, diligencia una ficha técnica, y la envía a la red nacional centralizada de información de cadáveres no

identificados y no reclamados, la cual alimenta una base de datos de orden nacional, y pretende garantizar a la familia, a la justicia y a la sociedad, que dentro de este grupo de cadáveres, no se encuentra la persona desaparecida. (Giraldo C., 1997)

En 1996, la Red Nacional Centralizada recibió información de 1.446 cadáveres sin identificar, se ingresó la información en una base de datos elaborada en Access 2.2, que se actualiza periódicamente con los datos suministrados por las oficinas que hacen parte de la Red. De 1.370 casos en los que se registró el estado del cuerpo, en el 88% el cadáver ingresó completo, 8% descompuesto, 2% restos óseos (completos e incompletos), 1% cuerpo incompleto (con mutilaciones y/o desmembraciones) y 1% calcinado. (Giraldo C., 1997)

De 1.311 casos en los que se pudo establecer el género, el 87% de los cadáveres sin identificar correspondían al género masculino. En el 70% (1.005) de los sucesos, se registró información acerca de la apariencia externa, vestuario e información suministrada por personas de la zona. De estos casos, el 35% presentaban buena apariencia, por evidencia de cuidado personal; el 26% aspecto de indigente, 23% lucía con escaso cuidado personal, 12% correspondía a posible guerrillero, 3% a campesino de la región y 1% a grupos tales como trabajadores sexuales, homosexuales, delincuentes etc. (Giraldo C., 1997)

En 79 casos, se encontraron señales compatibles con tortura. El 48% de estas personas se encontraban atados de pies y/o manos, 10% con surcos de presión en pies y/o manos (posiblemente por atadura), 6% con elementos atados al cuello, 5% amordazado, 5% quemado, 45% con bolsas en la cabeza y 21% con otros signos de tortura.

En 78 casos se observaron señales compatibles con el uso de estupefacientes, de los cuales el 85% correspondía a bazuco, 8% marihuana y 7% a otras drogas. Los cadáveres NNs correspondían en su gran mayoría a personas a personas de raza mestiza 87%, seguidas de la raza negra 68%, raza blanca 2%, mulata 1%, indígena 0.5% y sin rasgos característicos el 3%. (Giraldo C., 1997)

La red centralizada logró identificar 26% (378) de los cuerpos; de éstos, el 86% fue reconocido por sus familiares y confirmado por la Registraduría Nacional; el 10% se identificó exclusivamente por la registraduría nacional (algunos casos en estado de putrefacción o calcinados, se lograron identificar al realizar tratamiento químico a los pulpejos de los dedos), 2% por medio del análisis de ADN, 2% a través de testigos.

El 58% de los cadáveres NNs identificados, se enviaron a inhumación estatal, el 36% fue reclamado por familiares, 3% por amigos, 1% por juntas de acción comunal o beneficencia y el 2% restante se donó a universidades.

Personas desaparecidas en Santa Fe de Bogotá 1996. La oficina de identificación y personas desaparecidas de la regional Bogotá, atiende un promedio diario de 26 personas que buscan a sus familiares o amigos desaparecidos, de los cuales aparecen aproximadamente tres personas fallecidas, quienes después del proceso de identificación son entregadas a sus familiares. (Giraldo C., 1997)

Si la persona buscada no aparece en los registros de esta oficina, se orienta a los familiares hacia la búsqueda en otras instituciones, y se le solicita a éstos que reporten el hallazgo del desaparecido. En el caso de recibir información, se realizan llamadas telefónicas de seguimiento para determinar si la persona apareció y bajo qué circunstancias. Si el cuerpo de la persona buscada ingresó sin identificar (NN), se confirma su identidad con la Registraduría Nacional. (Giraldo C., 1997)

En los casos en los que fue hallada la persona, el familiar informó que el 95.2% había salido de fiesta o realizaba un corto viaje (relacionado principalmente con infidelidad conyugal, o salidas de fin de semana sin avisar a parientes o conocidos), 1.8% refiere que había sido robado y puesto bajo el influjo de psicofármacos, 1.4% se habían marchado de la casa para donde otro familiar, el 1% se encontraba detenido en inspecciones de policía, el 0.6% había sufrido un accidente o lesión, y se encontraba en un centro hospitalario.

Las localidades de Ciudad Bolívar, Rafael Uribe, San Cristóbal, Bosa, Usme, Kenedy y Suba son las que mayores desaparecidos reportan. En una alta proporción, las víctimas

habían sufrido herida por armas de fuego o por armas cortopunzantes en otras oportunidades. (Giraldo C., 1997)

La Desaparición Forzada de Personas. Los crímenes contra el derecho internacional son cometidos por personas, no por entidades abstractas, y solo mediante el castigo de los individuos que cometieron tales crímenes pueden ejecutarse las previsiones del derecho internacional "Tribunal de Nuremberg". (Gómez J., 1999)

Consideraciones históricas: La desaparición forzada de persona ha sido considerada un crimen de estado, una indebida práctica gubernamental o de agentes del estado con el fin de eliminar o deshacerse de disidentes políticos u opositores, cubrir toda la evidencia de los asesinatos y negar cualquier información sobre el paradero de las víctimas.

La desaparición se considera cuando una persona ha sido privada legal o ilegalmente de su libertad, se desconoce su paradero, o es ocultado por las autoridades, o no se informa por estas sobre el lugar en donde se encuentran; el desaparecido es una víctima, un mecanismo y un medio para castigar a ciertos sectores de la sociedad, los criminales atacan a la sociedad entera, esta actividad se viene presentando en cerca de 70 países, es un medio de ataque a los más fundamentales derechos del hombre y la humanidad, se constituye un medio infame de imposición y silenciamiento a la sociedad misma. (Gómez J., 1999)

Allana los derechos humanos, la dignidad humana, el derecho a vivir en paz, la existencia de la familia, el derecho a un debido proceso, la libertad y la vida, en fin, todo principio es vulnerado y socavado. Para FEDEFAM la desaparición es un secuestro realizado por organismos de seguridad del Estado, generalmente actuando en forma de grupos paramilitares, donde la víctima desaparece, las autoridades no aceptan ninguna responsabilidad del hecho ni dan cuenta de la víctima. (Gómez J., 1999)

Quienes privan de la libertad pueden ser agentes estatales, militares, agentes de seguridad del Estado, paramilitares que obran con la anuencia, la complacencia o aquiescencia de servidores públicos o con su complicidad, en este sentido la desaparición es un crimen de Estado y en tal razón, se desconoce su naturaleza cuando se pretende tipificar la desaparición como un delito que puede ser cometido por cualquier persona en forma autónoma.

La desaparición se extiende con mayor intensidad en los países en conflicto armado interno o con graves problemas sociales, se dice que en los últimos 8 años, el grupo de trabajo sobre desapariciones forzadas, ha recibido cerca de 15.000 denuncias por desapariciones referidas a más de 45 Estados. (Gómez J., 1999)

Casi siempre la desaparición forzada de personas aparece asociada a conflictos con el poder político y económico, a la lucha por el poder o a políticas de sometimiento de un régimen o un determinado gobierno, y que las desapariciones por otras razones constituyen

situaciones minoritarias. Las matanzas, las desapariciones y masacres vienen ocurriendo en países donde existe un crudo enfrentamiento por el control del gobierno o el control de una región.

En América latina: En Bolivia no se han denunciado casos de desaparición, y la gran mayoría de los 48 casos que se han informado al grupo de trabajo sobre desapariciones forzadas de Naciones Unidas, ocurrieron entre 1980 y 1982 durante gobiernos dictatoriales, habiéndose podido aclarar solo 20 casos. (Gómez J., 1999)

En Chile: se instaura con la dictadura militar una de las más deplorables historias de muerte, desaparición y violencia a los derechos humanos que recuerde la historia de latino América, con la dictadura de Pinochet. Posteriormente se creó la "Dirección de Inteligencia Nacional" Organismo con facultades para allanar y detener personas que estuvieron comprometidas en delitos contra el Estado en concurso con homicidio, lesiones o secuestro por cinco días (Plazo que se amplió a 20 días), de algunos no se volvió a saber nada. Las víctimas fueron autoridades o líderes el régimen depuesto y delincuentes comunes, estos últimos eran ejecutados. La situación continuó hasta el mes de marzo de 1990, según un informe de la "comisión verdad y reconciliación, comprobado un 45 % de los casos investigados, de 2.115 violaciones de derechos humanos, 257 fueron de "detenidos desaparecidos".

En Argentina: En marzo de 1976 con el golpe de estado del General Jorge Rafael Videla en contra del gobierno peronista, se dio comienzo al gobierno militar y se presenta represiones contra la subversión. Las fuerzas clandestinas estaban formadas por militares y operaban fuera de cualquier sistema legal, pero con la cobertura de la junta y el tácito aval de las instituciones, y así entre 1.976 y 1.979 desaparecieron 8960 personas. (Gómez J., 1999)

Para combatir la subversión, se crearon centros clandestinos de detención donde se llevaban a las personas y se les sometía a interrogatorios y torturas para obtener información y al mismo tiempo generar terror. El número de casos no esclarecidos de personas "desaparecidos" en la Argentina según el informe de la "Comisión Nacional sobre la desaparición de personas" de 1984, asciende a 8.960.

En Guatemala: Cuando el gobierno empezó secretamente a librarse de la oposición en 1996, comenzaron las desapariciones que continuaron por más de 20 años. Se señala también que en Guatemala tan solo con nueve millones de habitantes, en el periodo comprendido entre 1954 y 1993 registraba aproximadamente 100.000 ejecuciones extrajudiciales; más de 42.000 desaparecidos desde 1963; más de 500 masacres desde 1981 y unos 300.000 refugiados- exiliados desde 1981. (Gómez J., 1999)

Desapariciones forzadas en Colombia: La criminalidad contra los derechos humanos se "dispara" en Colombia aproximadamente a partir de 1975, 1977, de unas estadísticas

relativamente similares de los años anteriores, comienza del ascenso de las estadísticas de asesinatos, masacres, desapariciones, torturas, detenciones arbitrarias. (Gómez J, 1999)

Esto coincide con el incremento de la presencia de la guerrilla (FARC), y con la implementación de ciertos modelos económicos. La mayoría de los 970 casos de desaparición forzada denunciado al grupo de trabajos sobre desapariciones forzadas de Naciones Unidas, comenzaron a producirse en 1981, especialmente en Bogotá, zona para ésta época de mayor índice de violencia, situación que a 1997, se ha desplazado en especial a regiones rurales como consecuencia de la confrontación armada entre guerrilla y paramilitares. Los departamentos afectados en su mayoría son de Antioquia, Atlántico, Cesar, Chocó, Meta, Santander, Bogotá y cada vez se están extendiendo a nuevas regiones.

Pese a ellos los primeros casos reportados a la procuraduría delegada para la defensa de los derechos humanos, se remonta a 1983 y fueron la desaparición de Jairo Pareja Arévalo ocurrido en Puerto Boyacá, el 14 de julio, y el de Denise Leal Sánchez, hecho que se presentó el 12 de julio en Villavicencio. No pueden olvidarse las personas desaparecidas en los hechos del Palacio de Justicia durante la toma por el movimiento guerrillero M 19 en el mes de noviembre de 1985, hechos éstos que constituyen uno de los episodios más tristes y trágicos de nuestra historia. Los desaparecidos se incrementaron en 1987 a 1992 siendo frecuentes las desapariciones por violencia originada en el narcotráfico. (Gómez J., 1999)

En 1996 se recibieron ante la delegada para la defensa de los derechos humanos 137 quejas por desaparición forzada, constituyéndose en un 6.85% de las violaciones denunciadas y en 1997 según el informe de esa delegada, se recibieron 90 quejas por desaparición forzada de personas "la desaparición forzada o involuntaria es una conducta bárbara y atroz, que como un tumor maligno se está apoderando de la sociedad colombiana, que por temor o indiferencia, finge no tenerlo". A diferencia de las no menos abominables prácticas de secuestro, la desaparición cuenta con el silencio del conjunto social; y se piensa que esa conducta es patrimonio de otros países. (Gómez J., 1999)

Aunque las desapariciones continúan, el fenómeno ha ido mermando al menos en las que se imputan a servidores públicos, 1992, 199 casos, 1993, 135 quejas y 1994, 75 asuntos. Según datos de la comisión colombiana de juristas, contrastados con varias ONG y de Policía Nacional, y desde 1972 hasta septiembre de 1996 se presentaron 2340 casos en los últimos años cita ese informe en 1990 ocurrieron 217 casos, 1991 180 hechos, en 1992 el total de desapariciones fue de 191, para 1993 el total fue de 144 casos, en el año de 1994 ocurrieron 85 desapariciones, en 1996, cerca de 134; en 1995 más de 2500 personas fueron víctimas de homicidios de motivación política y más de 150 personas fueron víctimas de desaparición forzada, en tanto que en 1996 al menos un millar de personas fueron ejecutadas extrajudicialmente y desaparecieron más de 150 tras haber sido detenidas por las fuerzas armadas, la policía o los grupos paramilitares, y para 1997 más de 120 personas desaparecieron tras ser detenidas por las fuerzas de seguridad o grupos paramilitares, así

como más de 500 personas secuestradas y tomadas como rehenes especialmente por las FARC y el ELN. (Gómez J., 1999)

La desaparición ha pasado de ser individual par convertirse en colectiva, pues grupos armados han acudido a la inhumanidad modalidad de hacer incursión en comunidades rurales. La desaparición forzada nació en la lucha por el poder y se ha efectuado por lo general por quienes lo ostentaban en contra de los disidentes opositores al sistema, o contra formas de delincuencia, lo que da a la acción carácter de gubernamental.

En Colombia la mayoría de casos de desapariciones, no se ejecuta para ocultar a la persona, o para sustraerla de la actuación de los jueces, sino que se desaparece para torturar y matar, con lo cual el crimen aparece como más inhumano, al interior de la fuerza pública colombiana hay sectores antidemocráticos que han impulsado, permitido o utilizado, la desaparición como mecanismo de combate contra sectores tachados de violadores de la ley, subversivos o enemigos públicos.

La dinámica de la desaparición en Colombia aparece ligada al problema político de matar o desaparecer a aquel que sea auxiliador, simpatizante o colaborador material o intelectual de los grupos rebeldes. Esta actividad aparece incrementada con grupos de defensa privada, autodefensas y organizaciones paramilitares que en muchos casos son auxiliadas por fuerzas militares. (Gómez J., 1999)

La desaparición forzada de personas consiste en la privación legal o ilegal de la libertad de una persona, con la participación de un servidor público con el fin de ocultarla física y jurídicamente. En la investigación penal o disciplinaria de una desaparición forzada de personas deben establecerse elementos fundamentales: existencia e identificación plena del ofendido, su ámbito social, profesional e ideológico de movimiento, su vecindad, lugar de trabajo, últimos lugares que frecuentó, dónde fue visto, sus actividades políticas y sociales, y demás elementos de juicio que puedan determinar móviles para la desaparición. (Gómez J., 1999)

La identificación legal de la persona desaparecida con documentos y en especial con la cédula de ciudadanía o tarjeta de identidad, o certificado sobre existencia y vigencia de tales documentos, la correspondiente tarjeta dactilar, libreta militar, certificados de matrícula de establecimientos educativos, aficiones a organismos de seguridad social, etc., antecedentes judiciales o policiacos, inspección judicial de documentos públicos o privados.

Se puede requerir información en el Instituto de Medicina Legal, División de Asuntos Consulares del Ministerio de Relaciones Exteriores, División de Extranjería del Departamento Administrativo de Seguridad (DAS), Instituto Nacional Penitenciario y Carcelario (INPEC), y recepción de testimonios de quienes puedan contribuir al esclarecimiento de los hechos.

Durante 1999, el año de la paz y pese y a las gigantescas protestas nacionales en contra del secuestro, la extorsión y el asesinato que llegaron a movilizar a más de 11 millones de personas, la guerrilla secuestro 1688 ciudadanos indefensos, 41 de ellos extranjeros, y las auto-defensas 112, con lo que la subversión ratifica su ignominioso título de mayor secuestrador mundial, de acuerdo con las cifras que maneja el programa para la defensa de la libertad personal del ministerio de justicia. (Ejército Nacional, 2000)

De acuerdo con la información suministrada por los guerrilleros que han pedido la protección del ejército, se ha podido establecer que la guerrilla "ajustició" en 1999 a 30 de sus integrantes de los cuales ya se han identificado 37 y no pudo impedir la desertión de por lo menos 324 guerrilleros. En los primeros 30 días de enero de 1999, se han recuperado los cuerpos de 13 niños guerrilleros y 10 mujeres muertas en combates, pero la cifra puede ser del triple. Según el ejército, el 75% de los muertos de las FARC durante los intentos terroristas para cerrar la vía al Llano, eran menores de edad. (Ejército Nacional, 2000).

Las razones de la guerrilla para impedir que cada día más niños colombianos o de otros países disfruten de su niñez, durante los combates para defender Mitú en 1999, fueron capturados niños guerrilleros de nacionalidad venezolana, son el arrojo que los infantes demuestran en los combates y la necesidad de mantener su número de efectivos, dado que anualmente pierden cerca de 2500 por "ajusticiamiento", capturas y abatidos. (Ejército Nacional, 2000)

Desastres en Masa. La identificación de los cuerpos en los desastres en masa es fundamental. Esta consiste en la correlación de datos disponibles de una persona conocida (información que se obtendrá de familiares, empresas, instituciones, o registros previamente existentes), con los indicios y pruebas encontradas al examinar un cadáver. Dicha identificación se basa en la COMPARACION de datos conocidos y disponibles acerca de una persona, con los obtenidos de cuerpos en diferentes estados reconocibles a simple vista, no reconocibles pero con elementos que posteriormente permitirán su identificación (dedos intactos, tatuajes, anillos), o restos en forma de "amasijos" incinerados o fragmentados.

La identificación puede ser PRESUNTIVA (indiciaria o complementaria), con base en características morfológicas cromáticas o aspectos físicos en general, verificación de antecedentes médico-quirúrgicos, señales particulares y descripción de prendas de vestir o FEHACIENTE (positiva), como la lograda a través del cotejo de las huellas digitales, carta dental, ADN u otros métodos biológicos. Inicialmente deben aplicarse los recursos disponibles convencionales y solo acudir a los métodos más sofisticados y costosos, si no se logra la identificación positiva. (Toribio L., 1992)

El proceso de identificación requiere y genera un gran volumen de datos que puede manejarse de diversas maneras según la tecnología a que se tiene acceso. El empleo de FAX, facilitará la recolección de diferentes tipos de datos premortem, incluyendo fotografías, cartas dentales y huellas digitales; un sistema de software diseñados para

comparar datos postmortem con los premortem, adquiridos a una medida que llegan a ser disponibles, favorecerá la velocidad de comparación final. El uso de computadores es particularmente importante en la identificación dental y en la bibliografía. (Toribio L., 1992)

1.4.2 HISTORIA DE LA IDENTIFICACIÓN DENTAL. Desde tiempos antiguos la identificación personal por medio del sistema estomatognático ha sido utilizada en muy diversas formas y para variados fines. Con el fin de ilustrar en forma muy somera aspectos posiblemente no muy conocidos del valor que como medio de reconocimiento de las personas, tienen los dientes y todo el sistema estomatognático.

Tal vez la más antigua referencia la encontramos en la Biblia. Para muchos su valor religioso y moral es indiscutible; para otros tantos, lo es desde el punto de vista científico, como etapa o proceso del conocimiento y desarrollo del progreso del hombre, desde ambos puntos de vista no puede dejar de ser tenida en cuenta. (Rodríguez V., 1995).

Como sabemos, el Génesis es el primer libro de La Biblia, en el segundo relato de la creación se narra entonces que, desobedeciendo el mandato de Yahvé de "no comer los frutos del árbol de la ciencia del bien y de mal porque el día que comieres de él morirás sin remedio", -dice el texto de la mujer "engañada por la serpiente - y viendo que el árbol era bueno para comer, apetecible a la vista y excelente para lograr sabiduría, tomó de su fruto y comió, y dio también a su marido, quien igualmente comió".

No es tan descabellado pensar que luego cuando Yahvé regresó al Edén y vio huellas de que los frutos del árbol habían sido arrancados y probados y observara además las huellas especiales dejadas en los restos de los frutos que no podrían ser iguales a las de otros seres que habitaban allí, les exhibiera y les diera categoría de plena prueba acusadora y condenatoria que se vería confirmada más tarde por la confesión plena del hecho cuando Adán dice: "La mujer que me diste por compañera me dio el fruto del árbol y comí", siendo éste, por lo tanto, un hito en la identificación personal a partir de las huellas del sistema dental, parte del estomatognático, de muy antigua data. (Rodríguez V., 1995)

Mucho tiempo después de lo anterior existe otra identificación que tiene lugar en Roma en tiempos de Tiberio Claudio Druso Neo Germánico, Emperador Romano y también ilustrada por el mismo Claudio en su autobiografía. Según el autor inglés Robert Graves, dicha historia se refiere a la identificación post-mortem efectuada exclusivamente con base en la búsqueda y reconocimiento de características estomatognáticas dentales de Leila Paulina, hermosa y rica dama romana quien había sido enviada al suicidio por orden de Agripina, esposa de Claudio, la cual no estaba sino preparando el camino para la sucesión y por consiguiente ascensión al poder como emperador de su hijo Lucio Domicio, ya adoptado por Claudio y quien más tarde usaría el nombre de Nerón cuando fue declarado emperador romano.

La transcripción de acuerdo con Claudio: " El coronel enviado para cerciorarse de que Lelia se suicidara le informó (a Agripina) de la muerte de ésta, pero no se mostró satisfecha y le ordenó: "tráeme la cabeza". Le llevaron la cabeza a palacio. Agripina la tomó del cabello y llevándola hasta una ventana le abrió la boca. Sí, es ella, es la cabeza de Lelia Paulina, me dijo con complacencia, cuando entré en la habitación: "aquí están los dientes de oro que se hizo colocar por un dentista de Alejandría, para llenar un poco la mejilla izquierda hundida." (Rodríguez V., 1995)

Otra identificación de iguales características y con registros históricos fue la efectuada en la persona de Carlos El Temerario, príncipe francés de la Borgoña hijo de Felipe el Bueno, y quien encuadra perfectamente en el estereotipo del príncipe guerrero y conquistador, quien fue muerto en la batalla de Nancy en el año de 1474 y su cadáver vejado y desnudo fue posteriormente reconocido por sus allegados y ayudas de campo 3 días después, por la ausencia de unos incisivos inferiores perdidos unos pocos días antes de la mencionada batalla al caer, con todos sus atavíos de guerra, del caballo que montaba. (Rodríguez V., 1995)

En nuestro continente americano, tal vez la más documentada y posiblemente la primera identificación post-mortem, puramente forense, fue la realizada por un colega, quien también se distinguió como patriota en el movimiento de independencia de su patria y además cognotado orfebre, platero y grabador, Paul Revere quien luego de una prolífica y exitosa práctica privada como odontólogo en la cual efectuaba obturaciones, profilaxis y

prótesis identifico con base en sus prótesis fija de 2 unidades y con alambre de plata, al doctor Joseph Warren de Boston, un importante y revolucionario, profesional médico, quien con el grado de general mayor, solo inferior al de George Washington, fue muerto de un balazo en el cráneo en la batalla de Bunker Hill el día 18 de abril de 1775, inmediatamente inhumado y al otro día exhumado para ser exhibido como escarmiento. (Rodríguez V., 1995)

Posteriormente inhumado en una fosa común anónima la cual fue encontrada por los patriotas 10 meses más tarde y exhumado por éstos el 8 de abril de 1776, encontrándose que estaba completamente descompuesto y su identificación prácticamente imposible, para la época. Fue entonces cuando el Dr. Paul Revere famoso ya por su doble condición de independentista activísimo y odontólogo, examinó los cráneos de la tumba y sin lugar a dudas lo identificó por la prótesis dental antes descrita. (Rodríguez V., 1995)

Otro de los casos más apasionantes, entre los doctores Parkman y Webster, en la cual por primera vez en los Estados Unidos la evidencia dental fue aceptada en las cortes. El Dr. George Parkman, eminente y conocido médico bostoniano, fue muerto a puñaladas, en el Colegio Médico de Boston por un químico del mismo claustro, el Dr. J. W. Webster, quien para llevar a cabo su propósito de hacer desaparecer el cadáver y por ser el día de Acción de Gracias, noviembre 23 de 1849, alejó al celador del edificio regalándole un succulento pavo para que lo consumiera con su familia. (Rodríguez V., 1995)

El regalo, por lo inusual, dado el carácter conocido del Dr. Webster, hizo entrar en sospecha al celador quien luego de llevarlo a casa regresó y se percató de que la caldera de la calefacción estaba encendida. Al apagarla vio dentro de la misma algo extraño; al examinar con cuidado el contenido creyó reconocer partes de un cuerpo humano, lo cual fue comprobado más tarde por la policía presente en el Colegio por pedido del celador. La identificación del Dr. Parkman fue logrado por fragmentos carbonizados de dientes minerales fundidos en un trozo de oro, los cuales fueron inmediatamente reconocidos por el Dr. Nathan Coley Reeps, como perteneciente a una prótesis dental que él había hecho al Dr. Parkman; ésta evidencia fue suficiente para que el jurado la aceptara y diera un veredicto de culpabilidad por asesinato con alevosía y premeditación, delito por el cual el colega fue colgado el Dr. Webster. (Rodríguez V., 1995)

Para el desarrollo posterior y también como hito decisivo en la historia, la tragedia del bazar de la caridad significó el nacimiento de la odontología como ciencia forense. El suceso acaeció, en París en el año de 1897, cuando el establecimiento donde se desarrollaba el bazar, organizado por las damas parisienses, para recolectar fondos con fines caritativos, fue pasto de las llamas. Un gran número de personas murió, a las que no fue posible identificar por objetos personales, documentos o apariencia morfológica. El cónsul de Paraguay sugirió que se examinara por los odontólogos de París, puesto que observó en los cadáveres carbonizados, remanentes dentales y protésicos.

No se sabe aún con certeza si en el grupo de odontólogos que posteriormente, y basados en sus observaciones, identificaron a la mayoría de estas personas, se encontraba el autor del primer libro sobre odontología legal y forense, el Dr. Oscar Amoedo y Valdés, odontólogo cubano quien, impresionado grandemente por las técnicas y resultados de esta experiencia científica de identificación post-mortem, publicó al año siguiente de la tragedia su libro "El Arte Dental en Medicina Legal", que además tenía otras muy interesantes secciones y capítulos relacionados con la Medicina Legal, que le valieron posteriormente el título de padre de la odontología forense, honor que recae por derecho en la odontología latinoamericana. (Rodríguez V., 1995)

Otro caso de identificación post-mortem que es digno de mención por las características tanto odontológicas como circunstanciales que rodearon el hecho criminal. Sucedió en Inglaterra en 1949 y las crónicas judiciales y policíacas lo conocen como el caso Haigh. En un balneario de Chelsea, la desaparición de una joven llamada Olive Durand Deacon causó extrañeza a familiares y amigos entre quienes se encontraba la señorita Lane, quien alarmada por el hecho, decidió poner en conocimiento de las autoridades del lugar, su ausencia.

Dentro del círculo de conocidos de la señora Olive Durand - Deacon estaba un individuo de apellido Haigh, quien muy solicitadamente se ofreció a acompañarla en su notificación, rasgo que después se comprobó concordaba con su personalidad de paranoico y cuando estaban ante las autoridades, el comportamiento del señor Haigh llamó poderosamente la

atención del agente policial sargento Lambourne, quien mencionó sus sospechas y suspicacias al jefe inspector Symes, quien inició, por este hecho, averiguaciones con Scotland Yard, las cuales le impidieron descubrir que el sospechoso tenía antecedentes como estafador y falsificador. (Rodríguez V., 1995)

Por ésta razón fue llamado para interrogarlo y ante la insistencia del hecho y luego de varias vehementes protestas de su inocencia, intempestivamente reconoció orgulloso ante el inspector Webb: "la he disuelto en ácido". En una inspección de su hotel, llevados por el mismo, descubrieron dentro de bidones de ácido sulfúrico y de grasa la tapa de metal de un tubo de lápiz labial, el asa de un bolso de mano de plástico rojos, tres cálculos biliares de origen humano, la mayor parte de un pie izquierdo, dieciocho pedazos de hueso humano corroídos por el ácido, una horquilla metálica para el pelo y dos aparatos de prótesis dental intactos uno para el maxilar superior y otro para el maxilar inferior, los cuales fueron identificados por la Dra. Helen Mayo, odontóloga, como pertenecientes a la señora Olive Durand-Deacon, aumentando las pruebas aceptadas por las autoridades inglesas contra el señor Haigh a quien además lo involucraron en la desaparición de otras seis personas.

Ya para terminar ésta reducida reseña histórica nos referimos a la identificación post-mortem basada fundamentalmente en las características estomatognáticas de algunas personalidades de más alto rango del nazismo alemán luego de su desaparición política en las postrimerías de la primavera del año de 1945. Tal vez las más espectaculares de estas

identificaciones fue la de Adolfo Hitler, Martín Bormann y Eva Braun Hitler, y posteriormente, la del Dr. Joseph Mengele. (Rodríguez V., 1995)

Para el reconocimiento de Hitler la información obtenida fue sumariada de las más diferentes fuentes, como por ejemplo: Dr. Robert Wolfe de los archivos nacionales de los Estados Unidos, Dr. Albert Speer de Heidelberg, Sr. Johachim Richter, fiscal de Frankfurt y de entrevistas personales con la asistente dental del Dr. Hugo Johannes Blaschke, la señorita Kate Heusermann y del laboratorista dental del mismo Fritz Echmann, quien estuvo preso en Rusia luego de la terminación de la guerra y, finalmente, de la valiosa información obtenida por la publicación de los archivos rusos en los cuales figuran los protocolos de autopsia efectuadas por un grupo de patólogos rusos en Berlín los días 7 a 9 de Mayo de 1945. De los trece cadáveres encontrados dentro y en las cercanías de Bunker de Hitler en la cancillería alemana.

Los hallazgos dentales que permitieron la identificación del Fuejher Alemán, entre otros, fueron una prótesis fija superior anterior que tenía como cosa inusual un pilar en forma de corona fenestrada, una prótesis parcial fija en canto libre en la porción derecha posterior del maxilar inferior, obturaciones varias en distintos materiales como aluminio, oro porcelana, amalgama en ambos maxilares, tratamientos de endodoncia y evidencia de alteraciones periodontales en las raíces anteriores inferiores lo cual permitió elaborar, según el especialista Dr. Raidar F. Sognaes, un protocolo de autopsia dental que arrojó

como resultados definitivos la presencia de ventiseis concordancias divididas por mitad en ordinarias y extraordinarias. (Rodríguez V., 1995)

Respecto de la identificación de Martín Bormann, el mismo especialista concluyó con el reconocimiento de dieciséis concordancias igualmente divididas por mitad en ordinaria y extraordinaria. A raíz de la identificación de Hitler y por las declaraciones de los más cercanos colaboradores de su odontólogo particular, el Dr. Blaschke, la identificación de Eva Braun Hitler fue lograda además por la publicación de un reporte de la Academia de Ciencias Forenses rusa donde se observaba una obturación y una prótesis parcial fija inferior del lado derecho para reemplazar dos molares perdidos. Las obturaciones servían como apoyo a una prótesis parcial fija superior en el lado izquierdo que reemplazaba el primer molar perdido.

Según comunicación personal del Dr. Blaschke a su ayudante Echtmann, por motivos políticos no pudo colocar sino ésta obturación de toda la prótesis a Eva Braun en el otoño de 1994, lo cual también aparece mencionado en el libro de Lew Besymenski: "la muerte Adolfo Hitler y los documentos desconocidos del archivo ruso". Es de anotar que tanto la prótesis inferior descrita como la obturación ocluso distal en el segundo premolar superior izquierdo para apoyo de otra prótesis, fueron obtenidas del cadáver de Eva Braun (por los rusos) y reconocidas indudablemente por el señor Echtmann y elaboradas en oro y posiblemente porcelana aún en sus caras oclusales por pedido especial con fines estéticos por la usuaria. (Rodríguez V., 1995)

En mayo de 1985 y a raíz de revelaciones efectuadas por familiares y conocidos del Dr. Joseph Mengele, de que este había muerto 7 años atrás en una tranquila población costera del norte de Brasil durante un baño en el mar de la mañana y por causa de un infarto del miocardio, se dio comienzo a la investigación más concienzuda y exhaustiva acerca de la identidad de unos restos humanos de que tal vez se tenga noticia en los anales policíacos.

Delegados científicos de los países de Europa, Medio Oriente, Norte y Sur América examinaron los restos exhumados de una sencilla tumba de la población mencionada, para concluir, según palabras de la delegación norteamericana, encabezada por el Dr. Lawell J. Levine, odontólogo forense del departamento de justicia de los Estados Unidos, en que, sin el más leve asomo de duda, los restos y despojos mortales examinados correspondían a los de quien en vida se llamó Joseph Mengele.

Entre estos restos vale destacar una prótesis parcial fija y removible superior para reemplazar casi todos los dientes del maxilar correspondiente y otra parcial removible para reemplazar todos los molares inferiores, las cuales concordaban con otras que el mismo "Ángel de la muerte" usó durante la segunda guerra mundial y que estaban consignadas en los registros en poder de los aliados.

Para terminar esta reseña histórica, los dientes tienen con relación a los demás tejidos del organismo, una resistencia tan característica que aun la humedad por saturación, el calor o

el frío del medio ambiente, igual que el transcurso de los años, le son indiferentes para lograr su destrucción. (Rodríguez V., 1995)

Nada más desbastador que el paso de los siglos y sin embargo nuestra apreciación ante las momias y sepulcros indígenas, nos deja muy en claro el poder de conservación que los dientes pueden alcanzar. Sólo la acción química y el fuego pueden afectarlos, al recibir alto grado de calor.

Químicamente los dientes poseen más sustancias inorgánicas que orgánicas, en el hombre la cantidad de fosfato de calcio es mayor que en la mujer, no así en esta que el carbonato de calcio aparece en mayor proporción que en aquel, en todos los tejidos compuestos, el diente es el que más resiste a la acción del fuego, pues de 150 grados centígrados a 200, la dentina oscurece, hasta llegar al color marrón, seguido de un agrietamiento del esmalte en sentido longitudinal en incisivos y caninos, de 300 a 400 grados centígrados la pieza dental se torna de color negro, por carbonización de las fibras de Tomes. (Echeverry A., 1980)

A nivel estructural de los 250 a los 800 grados centígrados se presenta de generación a nivel de la unión amelo dentinal pudiendo presentarse desprendimiento del esmalte o estallido de la corona, no así en estructuras que presenten caries u obturaciones, a los 800 grados centígrados o un poco mas se presenta carbonización de toda la dentina y, disminución de volumen radicular, a más de 900 grados centígrados la estructura

carbonizada se puede desintegrar fácilmente a la vibración o manipulación. (Echeverry A., 1980)

El Dr. Longinoti afirma que a los 350 grados centígrados, el diente todavía resiste a la presión, pero puede llegar a pulverizarse al golpearlo con un objeto duro. De los 400 a los 800 grados centígrados se torna con un viso azulado, acompañándose por lo general de un estallido si la corona es sana, sucediendo luego una disminución del volumen de la raíz con carbonización de la dentina, cuando la temperatura fluctua entre los 900 y 1.200 grados centígrados el aspecto general es rosado y empieza a desintegrarse en su totalidad, hasta quedar reducido a cenizas, conservando así su forma, si la prueba se ha efectuado sin la actuación de la menor vibración o golpe. Sobre esta ultima parte hemos de traer, para complementar nuestra reseña, la cita del doctor Sein que divulgo en su trabajo el cual fue presentado al primer congreso Latinoamericano de Criminología, celebrado en Buenos Aires, en julio de 1938, titulado "Pruebas Legales Postumas Después de la Cremación" y que dice "...el diente se calcina, y, si bien conserva su forma, se vuelve tan frágil que se desmenuza como pan tostado si se le aprieta entre los dedos". (Echeverry A., 1980)

El anterior análisis corresponde a piezas dentales completamente sanas, no así cuando están obturadas con amalgama, en cuyo caso permiten dejar ver una masa de color pizarra. Las restauraciones con oro y con acrílico no dejan entrever ningún tinte diferente, solo con la porcelana acusan un ligero violáceo, seguramente por la reacción que provoca la unión

del preparado caolítico con los compuestos ortofosfóricos del líquido que interviene en la mezcla de la macilla restauratriz. (Echeverry A., 1980)

Sobre los dientes artificiales, éstos en su estructura metálica no sufren nada, ya que para su confección es necesario que el metal en bruto sea sometido a una excesiva temperatura con el acetileno u otro elemento superior en concentración calórica, por esta razón el fuego común es inoperante para conseguir su fundición. Si en estos puentes se tienen piezas de porcelana, según la calidad de esta, es aceptado su poder de concentración térmica, pues si ellas son de consistencia superior, el fuego es ajeno al cambio de su contextura, pero si resulta ser inferior, el rajado por estallido leve es inminente, aunque también es posible la división en pedazos, ya que por fuerte rechinar favorecería el total cambio de la forma dentinaria. (Echeverry A., 1980)

Cuando las restauraciones son en acrílico, ellas se consumen con cualquier calor, después de hacer su llamarada. Igual cosa sucede con las prótesis totales, en las que solo queda una pequeñísima parte, la misma que desaparece si la intensidad del fuego es continua, ya que el material quemado por si solo se apagaría dejando después un residuo con aspecto de laca. Debe tenerse en cuenta, para todo este proceso, que las estructuras dentales tratadas endodónticamente por estar desvitalizadas, van hacer mucho menos resistentes a estos fenómenos, y que los materiales restauradores como la prótesis fija en metal porcelana o los conectores mayores, empleados en el diseño de prostodoncia removible, pueden resistir

las anteriores temperaturas ya que su elaboración es compatible con las mismas.
(Echeverry A., 1980)

La Odontología Forense es la aplicación de los conocimientos propios del odontólogo a las cuestiones legales, entre ellas la identificación. Esta rama de la Medicina Legal fue iniciada como ciencia por el Dr. Oscar Amoedo. Nacido en Matanzas, Cuba, en 1.863, se doctoro en París en 1.898, con la tesis titulada “L’Art Dentaire en Medicine Legale” que sentó las bases de esta nueva disciplina forense. El Dr. Amoedo falleció en 1.945. (Vargas E., 1983)

Como una honrosa coincidencia, a tocado a la América Latina tener junto con el Dr. Amoedo a los principales gestores de esta Ciencia: Luis Silva, odontólogo brasileño; Armando López de León guatemalteco, creador de la Ficha Rugoscopica Palatina; Julio Peñalver, venezolano quien se destacó en este campo, al introducir un sistema de ficha odonto-legal y una clasificación para las rugosidades palatinas.

Otras figuras de mérito internacional son Gustafson, de Suecia, con su esquema de los seis cambios biológicos para la determinación de la edad; Furuhata y Yamamoto, del Japón con numerosos trabajos científicos y un texto de la materia; Scott, de los Estados Unidos de América, con profundos estudios sobre la superficie de los dientes y un completo capítulo de la obra “Legal Medicine” de Gradwohl, y sus compatriotas Lester L. Luntz, autor de un

manual de identificación dental, y en el último decenio, Sopher y Levine. (Vargas E., 1983)

La identificación de cadáveres, y sobre todo, en grandes catástrofes, ha dado en los últimos años un paso importante con la puesta en práctica de una manera definitiva de la identificación dental. Los dientes presentan para la identificación una serie de características muy importantes, como son la gran cantidad de particularidades anatómicas, patológicas o protésicas, además la resistencia a los fenómenos putrefactivos y otras agresiones como explosiones, incendios etc., es decir, la boca se comporta como una verdadera caja fuerte, los dientes soportan temperaturas de hasta 1.100 grados centígrados sin variaciones importantes. Las prótesis por si solas pueden indicar, en muchos casos, el país de procedencia por el tipo de material empleado, las técnicas de colocación, etc., aparte de que muchos estomatólogos colocan su propia marca o inscriben el número de identificación personal del interesado.

Por otra parte, la dentadura nos puede dar información sobre la edad, raza, sexo, al margen de marcas especiales, como los estigmas profesionales, traumatismos, tallas y mutilaciones de carácter ritual o estético de grupos étnicos definidos, como pueden ser las tinciones, generalmente de color marrón o negro, las incrustaciones, el limado o afilado, etc. las posibilidades de que dos dentaduras distintas coincidan es prácticamente imposible.

Responsabilidad profesional. Fundamentos de la prueba dental como medio de identificación:

- Las características dentarias son diferentes de un individuo a otro.
- El grado elevado de indestructibilidad del diente y del hueso es que está implantado, y de los materiales de restauración y de prótesis.

En las marcas de dientes y mordedura: el examen, debe, verificarse, ante todo, si la lesión fue vital o posmortem, y si fue producida por un ser humano o por un animal. En este segundo punto, debe apreciarse el tamaño de la marca y la forma de la arcada dentaria.

Cuando la marca fue hecha aparentemente por dientes humanos, debe anotarse y describirse con cuidado la forma de la arcada, ancho de los dientes, anormalidades en la dentición, dientes faltantes, dientes anormales, obturaciones y prótesis. La mordedura, con frecuencia, se presenta en la cara, hombros, mamas, abdomen, región femoral, brazos o manos de la víctima o del agresor. Cualquier marca hallada en estas regiones debe ser medida, calcada en papel transparente, y fotografiada. (Vargas E., 1983)

En cadáveres debe estudiarse la mordedura antes que la autopsia para evitar distorsión de la marca y eliminación de indicios de saliva. Además de la información disponible del aspecto general de esqueleto, el tamaño del cráneo, características sexuales, suturas craneales, longitud de las extremidades, condición de las articulaciones y tamaño y forma

de la pelvis, la inspección de los dientes, sus obturaciones y restauraciones protésicas, dan una información valiosa en la identificación cadavérica. (Vargas E., 1983)

Campo de aplicación de la odontología forense.

- Identificación de individuos vivos o muertos.
- Investigación sobre resistencia de dientes y materiales dentales en casos de incendios y otros desastres.
- Registro de grupos humanos, como tripulantes de aviones.
- Identificación de criminales por medio de marcas de dientes en piel humana o en alimentos sólidos. (Vargas E, 1983)

Diagnóstico de la especie. Los dientes y los huesos son usados para establecer el diagnóstico diferencial entre restos humanos y animales tanto por el examen morfológico como por el estudio microscópico. (Vargas E., 1983)

En los exámenes morfológicos los caracteres morfológicos de dientes y huesos, que permiten establecer que el diente es el tejido más duro del cuerpo y es capaz de mantener su forma original largo tiempo después de la muerte la forma del diente esta íntimamente relacionada con los hábitos dietéticos y la sustancia del esmalte nunca se reabsorberá o se regenerará una vez diferenciado del germen dentario. (Vargas E., 1983)

Comparado con otros tejidos del cuerpo, tales como los huesos, las uñas, y el pelo, el diente es el más duro. El esmalte tejido dentario más duro, está colocado entre 6° y 7° en la escala de dureza de Mohs, lo cual es equivalente a la dureza del cristal y del feldespato. Sin embargo, la dentina está catalogada del 4° y 5° de la misma escala. El cemento más suave que la dentina, tiene una dureza similar a la del hueso.

La elevada frecuencia de la caries dentaria, que ha menudo se ha considerado un padecimiento de la civilización a causa de su relación entre constitución y diente, especialmente del consumo de azúcar, varía en forma considerable de una raza a otra.

Además, en estos países el progreso de las caries, una vez que se presentan, es lento. Por lo contrario, en países civilizados la frecuencia es más alta y el progreso más rápido. De todos los pueblos del mundo, los esquimales son considerados los menos susceptibles a las caries dentales, lo que indicaría una relación entre la raza y la incidencia de este padecimiento. (Vargas E., 1983)

La superficie lingual de los incisivos superiores tiene forma de pala en la raza amarilla, y es plana en las razas blanca y negra. La superficie oclusal del primer molar inferior es de forma mamelonada en las razas blanca y amarilla, y estrellada en la raza negra.

El tercer molar o “muela cordal” hace erupción en proporción más elevada en los pueblos primitivos que en los más civilizados. La arcada dentaria es triangular en la raza blanca, en

forma de herradura en la raza amarilla y rectangular en la raza negra. Welcker y otros han reconocido la relación entre la diferencia racial y el tipo de oclusión. Este autor ha propuesto la siguiente clasificación de tipos de oclusión: Labidodoncia, Psalidodoncia, Estegodoncia, Opistodoncia y la Hiatodoncia. (Vargas E., 1983)

En la labidodoncia, los incisivos superiores o inferiores quedan en contacto por sus bordes incisales, como pinzas o tenazas. En la psalidodoncia, los incisivos inferiores cubren las superficies linguales de los superiores, pudiendo el ángulo interincisal ser de alrededor de 90°. En la estegodoncia o sobremordida, los incisivos se inclinan hacia delante sobre los inferiores a la manera de un tejado. En la opistodoncia, los incisivos inferiores quedan muy por detrás de los superiores, de modo que existe entre ellos un espacio vertical, debido a la retracción del maxilar inferior. En la hiatodoncia o mordida abierta, en el estado de completa oclusión, existe un espacio aparente entre los bordes de los dientes superiores e inferiores. (Vargas E., 1983)

Según Welker, la mayoría de los australianos exhiben labidodoncia, mientras que en los germanos es común la psalidodoncia, y en los asiáticos, en su mayoría, la estegodoncia. En la identificación de dientes humanos, un diente puede desprenderse y ser hallado aislado. En esta situación, identificarlo es de valor pericial.

Uno de los exámenes morfológicos es el rurograma, en donde las rugosidades palatinas son eminencias óseas de la región anterior de la bóveda palatina, que por su carácter

individual, perenne o inmutable se han aplicado a la dentición. Se da el nombre de rurograma a la reproducción de dichos relieves. Para su toma, se emplea la modelina en el caso del maxilar edéntulo, y alginatos en los demás, procediéndose luego a un vaciado con yeso, en el que marcan las rugosidades con lápiz, las cuales más tarde se fotografían. (Vargas E., 1983)

La Estomatología Forense en Situaciones de Desastres. El frecuente número de fallecidos y el estudio en que suelen encontrarse sus cuerpos (mutilados, carbonizados, esqueletizados, putrefactos, etc.) provocan un gran impacto en la comunidad así como dificultades para la identificación de las víctimas. (Toribio L., 1992)

Una situación particular ocurre en los desastres aéreos, a lo que comúnmente hay que añadir la presencia de cadáveres de individuos de diferentes ciudadanías.

La aplicación de los conocimientos de estomatología ha demostrado ser de gran utilidad en la identificación de cadáveres, pues se basan principalmente en aspectos fisiológicos y en las variaciones adquiridas del aparato estomatognático como reflejo de la actividad socio-económica del hombre. Los dientes ofrecen mucha información para la comparación de los datos ante-mortem con los post-mortem:

- Dientes: están formados por el tejido más duro del cuerpo humano (esmalte) por la protección física (raíz, ancladas en hueso maxilar y mandibular).

- Estabilidad evolutiva que poseen sus coronas. Ej.: Dientes con forma de pala en el grupo racial mongoloide.
- De todas las estructuras de origen meodérmico los dientes son los únicos que en el sujeto en vida se encuentran en contacto directo con el medio ambiente.

Las estimaciones de la estatura, el sexo, la edad, y el grupo racial constituyen los elementos básicos en la identificación humana. (Toribio L., 1992)

Estimación de la edad. Existe una gran correlación entre la edad cronológica y la edad biológica, por esta razón la segunda es utilizada para estimar a la primera que es definitiva la que se requiere como elemento de trabajo en la identificación medico legal. La maduración dentaria y el brote de los dientes son los recursos eficientes para estimar la edad en niños pequeños y en subadultos sirviéndonos también de ayuda el estado de calcificación de los terceros molares en individuos menores de 25 años. (Toribio L, 1992)

Determinación del sexo y la raza. Aunque existen regiones anatómicas capaces de brindar mayor información y por lo tanto, proporcionar técnicas más eficientes, los dientes y maxilares pueden usarse con estos fines, sobre todo, en cadáveres muy fragmentados y carbonizados. Para tales casos están las funciones discriminantes para determinar el sexo y la raza por odontometría en cubanos. (Toribio L, 1992)

Determinación de la nacionalidad. Los materiales usados en las reconstrucciones dentales, aparatos prótesis y ortodóncicos y en otros tratamientos propios de la estomatología, no siempre son los mismos en distintos países. Además pueden encontrarse técnicas o estilos en los diseños y procedimientos. (Toribio L., 1992)

La historia clínica dental. El método en identificación forense consiste en la comparación de los datos pre-mortem con los post-mortem, así será por medio de la historia clínica dental factible la recogida de la información necesaria del sujeto en vida, ofreciendo un excelente registro de los "trabajos dentales" presentes en un paciente. (Toribio L., 1992)

El dentigrama u odontograma. Se incluye en la historia de la operatoria dental, donde se registran los tratamientos y afecciones presentes en la dentadura del paciente. (Toribio L., 1992)

Alteraciones de los tejidos blandos. En ocasiones la presencia de los tatuajes en la mucosa oral u otras anomalías son suficientes para establecer la identificación.

Necropsia bucal. La aplicación de esta técnica posibilita no solo el no dañar a los dientes y restauraciones con manipulaciones forzadas, sino además, una mejor visualización para el examen forense. Para determinar la edad de los niños y subadultos la necropsia incluirá las extracciones de dientes y folículos para así analizar directamente el grado de clasificación en que se encuentra. (Toribio L., 1992)

El estudio radiográfico sirve para la detección de enfermedades dentomaxilares, caries proximal, tratamiento pulpo radiculares y dientes retenidos. El estudio fotográfico tiene gran importancia documental y testimonial. (Toribio L., 1992)

Procesamiento automatizado. El procesamiento automatizado por programas computarizados diseñados al respecto, se convierte en una magnífica herramienta para la gestión de datos por lo que se visualiza con fluidez y organización del proceso de identificación. CADMI programa en E.E.U.U. es el más ampliamente divulgado en el continente americano. (Toribio L., 1992)

El uso de los métodos especiales de identificación de la estomatología forense, es imprescindible dentro de las actuaciones medicolegales relacionadas con la identificación masiva de cadáveres en situaciones de desastres. Estas técnicas adquieren mayor valor en caso en que la integridad física de los cuerpos de los fallecidos se encuentre muy afectada. (Toribio L., 1992)

Diagnóstico del Sexo. Antiguamente era realizado en los elementos celulares de la pulpa dental. Utilizando el estudio de la presencia de los corpúsculos de barr, pero en la actualidad este método esta siendo sustituido tanto en hueso como en diente del ADN, presente en las células. Básicamente esa técnica puede ser aplicada al estudio de cualquier

tejido vivo, consiste en la extracción del material genético de las células, donde se encuentran, mediante lisis de las células sus núcleos. (Moya V, 1994)

Una vez obtenida esta extracción se realizara de una forma diferente dependiendo del tejido que se trate, se mide por técnicas de espectrofotometría o de espectrofluorometria la cantidad de que disponemos para pasar a amplificar la muestra mediante la técnica conocida como PCR (polymerase chain reaction) y después mediante electroforesis, detectar si se encuentran presentes los fragmentos específicos del cromosoma X o Y, con los que podemos conocer el sexo cromosómico de la persona a que pertenece la muestra. A pesar de que existen algunas veces dificultades sobre todo en lo que se refiere a medicina u odontología forense, a causa del estado en que se encuentran las muestras, tiempo en que ha transcurrido desde el fallecimiento o en su caso desde la extracción de la pieza, terreno donde se hallan y contaminantes que puedan estar presentes, ya existen estudios al respecto que tratan de dar solución a estos problemas. (Moya V., 1994)

Así, Hänni y Cols (1.990), Akane y Cols (1.991) Schwartz y Cols (1.991) y Gaensslen y Cols (1.992), en sus trabajos realizados a cerca de esta técnica describen los métodos más confiables de extracción de ADN, extraído mediante la técnica PCR, la identificación de los cromosomas X y Y mediante la detección de fragmentos específicos y el grado de influencia del medio ambiente en la aplicabilidad de esta técnica. (Moya V., 1994)

1.4.3 RESEÑA HISTORICA DEL ADN. Entre 1883 y 1889 Weismann, uno de los citólogos precursores de la teoría cromosómica de la herencia emitió de la continuidad del plasma germinal, según la cual el material hereditario pasaría intacto a través de la línea germinal de una generación a la siguiente, adelantando además que dicho material habría de tener una base química y una estructura molecular definida. (Mathews Ch.,1998)

Simultáneamente, hacia 1871, un bioquímico suizo llamado Miescher había conseguido aislar el ácido desoxirribonucleico(ADN) de núcleos de linfocitos humanos, huevos de aves y espermatozoides de diversas procedencias, aunque no llegó a conocer nunca la importancia biológica de la sustancia molecular aislada, a la que denominó nucleína. La nucleína resultó ser una sustancia gelatinosa, que en realidad era un ADN no purificado, Miescher se opuso a asignar un papel hereditario a la nucleína. (Mathews Ch.,1998)

El conocimiento del papel biológico de los ácidos nucleicos, experimentarían un nuevo avance tras el descubrimiento de un método de tinción específica para el ADN por Feulgen 1924. De esta forma quedó establecido que el ADN, componente principal de la nucleína de Miescher, era a su vez el componente más característico de los cromosomas y el soporte molecular de los factores hereditarios. (Mathews Ch., 1998)

Durante algún tiempo, aun aceptando que el núcleo era la sede de la herencia, se supo que las moléculas hereditarias eran las proteínas y no los ácidos nucleicos con sede en el núcleo. La razón que impulsó a los primeros genéticos a suponer esto habría que buscarla

en el escaso conocimiento de la estructura de los ácidos nucleicos que se suponía que eran polímeros de un tetranucleótido y por lo tanto, macromoléculas monótonas y uniformes. Las proteínas, de estructura mejor conocida por entonces, pueden mostrar gran variedad de formas específicas, por no existir ninguna restricción respecto a número y ordenación de los 20 aminoácidos que las componen. Pruebas experimentales demostrativas de que los ácidos nucleicos son las auténticas moléculas hereditarias. (Mathews Ch., 1998)

La comprobación del papel genético del ADN empezó cuando se consiguió purificar piezas de estas macromoléculas y demostrar su capacidad de transformar genéticamente a células bacterianas que las incluían por absorción del medio. El fenómeno fue descubierto por Griffith en 1928 y su significado biológico se comprendió 16 años más tarde. Griffith estudiaba la septicemia en el ratón, enfermedad causada por ciertas estirpes virulentas de *Diplococcus pneumoniae* causantes además de la Neumonía en el hombre. Las estirpes virulentas se caracterizan por desarrollar colonias de superficie brillante y lisa (S) cuando se cultivan en placas de petri sobre medios nutritivos. Esto se debe a la expresión macroscópica de la cápsula de polisacáridos que posee cada bacteria y que la inmuniza contra las defensas de los organismos que parasitiza. Existen otras estirpes, no virulentas, que se caracterizan por desarrollar colonias de superficie mate y rugosa (R) por carecer de dicha cápsula. (Mathews Ch., 1998)

Griffith inyectó ratones con bacteria R y los animales no morían. Inyectó ratones con bacterias S tratadas con calor y obtuvo el mismo resultado. Por último, inyectó los

animales con una mezcla de bacterias R y bacteria S tratadas con calor y los animales morían de septicemia, como se demostraba al extraer de su sangre bacterias S. La conclusión de Griffith fue que debía existir algún principio transformante que pasaría de las bacterias S tratadas con calor a las R, convirtiéndolas de no virulentas a virulentas. Y achacó ese papel a la cubierta proteica. (Mathews Ch., 1998).

Avery, MacLeod y McCarty en 1944 llevaron un proceso de transformación "in-vitro", en lugar de "in-vivo" como hiciera Griffith y consistió en separar por procedimientos bioquímicos, los tres componentes principales de las células S vivas: ADN, proteínas y cápsula polisacárida. Después eran añadidos por separados a una suspensión viva de bacterias R. El fenómeno de transformación de bacterias R a S solo tenía lugar con la mezcla de bacterias R con ADN procedentes de bacterias S. por lo que estos autores concluyeron que el principio transformante era el ADN. Dos investigadores americanos, Hershey y Chase, publicaron en 1952 una nueva prueba experimental del papel genético en virus. (Mathews Ch., 1998)

Existen además otras pruebas experimentales de que los ácidos nucleicos y fundamentalmente el ADN, constituyen la base molecular de la información genética. El espectro de absorción de luz ultravioleta del ADN presenta un máximo a los 260 nm, y el máximo de acción mutagénica de dicha radiación tiene lugar a 257.4 nm. Los mecanismos de la transferencia y transducción de las bacterias son igualmente demostrativos, pues asocian la aparición de ciertas características hereditarias en una cepa bacteriana con la

incorporación de un segmento mas o menos largo de ADN procedente de otra cepa de genotipo diferente. (Mathews Ch., 1998)

Naturaleza de los Acidos Nucleicos. El ADN es la molécula base de la vida, con capacidad de autoreplicarse. Unidades básicas: nucleótidos; cada uno formado por una base purica o pirimidica, un fosfato y un azúcar llamado desoxiribosa (pentosa). Bases: Adenina, Timina, Citocina y Guanina. Diversidad biológica dada por la secuencia de bases en cadena del ADN. Este está configurado por dos cadenas de nucleótidos que se enrollan sobre si mismos formando una especie de escalera en caracol. Peldaños formados por la unión de las bases de ambas cadenas, una frente a otra; siempre Adenina unida con Timina, y Citocina con Guanina. (Mathews Ch., 1998)

Parece probable que la vida en sí empezara su evolución con los ácidos nucleicos, puesto que estos son las únicas sustancias biológicas que poseen la notable propiedad de la autoduplicación. Hoy en día los ácidos nucleicos actúan como depositarios y transmisores de la información genética de cada célula, tejido y organismo. Los planos para la construcción de un organismo están codificados en su ácido nucleico en moléculas gigantescas. Gran parte del desarrollo físico de un organismo a lo largo de su vida está programado en estas moléculas. Las proteínas que elaboran sus células y las funciones que realizan están todas registradas en esta " cinta " molecular. (Mathews Ch., 1998)

Existen dos tipos de ácidos nucleico. El ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN). Cada uno de ellos es una cadena polimérica con unidades monoméricas similares conectadas por enlaces covalentes. En cada caso, la unidad monomérica, contiene un azúcar de cinco carbonos, la ribosa en el ARN y la 2'-desoxiribosa en el ADN. (Mathews Ch., 1998)

La diferencia entre los dos azúcares radica únicamente en el grupo 2' de la ribosa. La conexión entre las sucesivas unidades monoméricas en los ácidos nucleicos se realizan mediante un residuo fosfato unido al hidroxilo del carbono 5' de una unidad y al hidroxilo 3' de la siguiente. Esto forma un enlace fosfodiéster entre dos residuos de azúcar. De esta forma, se construyen cadenas largas de ácido nucleico, que a veces contienen centenares de millones de unidades. El grupo fosfato es un ácido fuerte, con un valor de pKa de aproximadamente uno, y esta es la razón por la que al ADN y el ARN se les denomina ácidos nucleicos. (Mathews Ch., 1998).

La principal importancia de la estructura primaria o secuencia, es que la información genética se almacena en la estructura primaria del ADN. Un gen no es más que una secuencia completa de ADN, que codifica la información mediante un lenguaje de cuatro letras, en el que cada "letra" es una de las bases. (Mathews Ch., 1998)

A finales de la primera década del siglo XIX, poco después de que el bioquímico Alemán Friedrich Miescher hubiera aislado por primera vez el ADN del espermatozoide de salmón,

algunos científicos sospecharon que el ADN podría ser el material genético. Pero los estudios posteriores indicaron que el ADN contenía tan solo 4 clases de monómeros parecieron descartar que pudiera desempeñar este complicado papel.

Los primeros investigadores pensaron que era más probable que los genes estuvieran formados por proteínas, ya que estaban empezando a observarse que estas eran moléculas mucho más complejas. Durante la mayor parte de la primera mitad del siglo XX, los ácidos nucleicos se consideraron simplemente como una clase de sustancia estructural del núcleo celular. (Mathews Ch., 1998)

Entre 1944 y 1952, una serie de experimentos cruciales apuntaron claramente al ADN como material genético. En 1944 Oswald Avery, Colin MacLeod encontraron que el ADN de cepas patógenas de la bacteria *Pneumococcus* podía transferirse a cepas no patógenas haciéndose patógenas. La transformación era genéticamente estable y las generaciones sucesivas de las bacterias conservaban las nuevas características. Sin embargo, fue un elegante experimento realizado por Alfred Hershey y Martha Chase el que convenció finalmente a muchos científicos. Mediante estos experimentos y otros similares, en 1952 se había aceptado ya en general que el ADN debía ser la sustancia genética y el 1953, James Watson y Francis Crick propusieron una estructura para el ADN que abrió todo el nuevo mundo de la biología molecular. (Mathews Ch., 1998)

Los ácidos nucleicos tienen un papel fundamental en el almacenamiento y transmisión de la información genética, como los ácidos nucleicos pasan de la célula progenitora a la célula hija (o de un organismo a sus descendientes), y la forma en que se dirigen los procesos bioquímicos producen moléculas complejas como las proteínas, a partir de ello, se podrá comprender algo sobre las relaciones entre las estructuras de los ácidos nucleicos y las proteínas, la evolución a nivel molecular, y nuestra capacidad para modificar los microbios, las plantas y los animales mediante la ingeniería genética.

Una secuencia polinucleótida definida es una sucesión codificada de información. El ADN que constituye el contenido total de información genética de un organismo se denomina genoma del organismo. En cada caso, una fracción considerable de este ADN puede ser transcrita, es decir, "leída" para permitir la expresión de su información y dirigir la síntesis de las moléculas de ARN y proteínas. Los segmentos que pueden transcribirse se denominan genes, el ADN de cada célula de todos los organismos contiene como mínimo una copia y a veces varias del gen que lleva la información necesaria para elaborar cada una de las proteínas que el organismo necesita. (Mathews Ch., 1998)

Transcripción: del ADN al ARN. La expresión de la información genética compone siempre un primer paso de transcripción de los genes en moléculas de ARN complementarias, ésta producción de moléculas de ARN específicas es fácil de visualizar. De la misma forma que una hebra de ADN puede dirigir la replicación - la síntesis de una

nueva hebra de ADN complementaria consigo misma - también puede dirigir la transcripción, la formación de una hebra de ARN complementaria. (Mathews Ch., 1998)

Naturalmente, los monómeros necesarios para la transcripción son diferentes de los que son precisos para la replicación. En lugar de desoxirribonucleosidos trifosfato, son necesarios ribonucleósidos trifosfato, ATP, GTP, CTP y UTP, para formar el ARN. Cada uno de estos procesos, la replicación del ADN y la transcripción, requieren un conjunto especial de enzimas catalizadoras que se denominan polimerazas. (Mathews Ch., 1998)

Traducción del ARN a la proteína. La transcripción por si sola es suficiente para la producción de las múltiples moléculas de ARN funcionales de la célula, como los TARN o los ARN ribosómicos. Sin embargo, las síntesis de proteínas específicas bajo la dirección de los genes específicos, es una cuestión mas o menos compleja. Las proteínas son polímeros formados por veinte clases distintas de aminoácidos monómeros. Dado que solo existen cuatro tipos distintos de nucleotidos monómeros en el ADN, no puede establecerse una relación de uno a uno entre la secuencia de nucleotidos en una molécula de ADN y la secuencia de aminoácidos de una proteína. En vez de ello, la información que codifica la proteína se "lee" por la célula en bloques de tres residuos nucleotidos, o codones cada uno de los cuales especifica un aminoácido diferente. (Mathews Ch., 1998)

Requisitos que Deben Cumplir las Moléculas Hereditarias. Las moléculas hereditarias habrán de poseer una estructura tal que permita los siguientes hechos:

- Contener información biológicamente útil y que se transmita de forma estable.
- Que su replicación permita el paso sin variación de célula a célula y de generación en generación.
- Que pueda ser capaz de expresarse de forma biológicamente más ahorrativa en la producción de las proteínas. Es decir, deben adaptarse a la existencia de mecanismos sencillos de traducción de su mensaje.
- Dichas moléculas deberán ser capaces de variación ocasional, lo cual, si bien parece un contrasentido con lo indicado en los primeros requisitos. Obedece a la necesidad biológica de la evolución orgánica, con la producción de nuevos genotipos sobre los que pueda actuar la selección natural. Es decir, es necesario que las moléculas hereditarias tengan una estructura que permita la mutación y la recombinación. En síntesis, las moléculas hereditarias habrán de ser informativas y estables, y adaptadas a la replicación, traducción, mutación y recombinación. (Mathews Ch., 1998)

Tecnología de ADN Recombinante. Se está desarrollando con rapidez una nueva área excitante de la ciencia entre los límites de la bioquímica, la microbiología y la genética. Este campo fue denominado de diferentes formas: Ingeniería genética, donación de genes y tecnología de ADN recombinante. Las técnicas desarrolladas se han difundido en fecha reciente con rapidez y amplitud a medida que se han hecho obvias sus aplicaciones a problemas de medicina, odontología, microbiología, virología, botánica, agricultura, etc.

Hoy día es posible llevar a cabo muchos experimentos que tan solo hace algunos años se hubieran considerado únicamente posibilidades remotas.

- Análisis de la secuencia de largas extensiones de ADN y también de ARN.
- Síntesis de oligonucleótidos en forma sistemática y de oligonucleótidos grandes hasta la longitud de genes completos en algunos laboratorios.
- Corte de ADN en muchos sitios precisos con diferentes endonucleasas de restricción.
- Unión específica de fragmentos de ADN para producir nuevas combinaciones genéticas.
- Uso de varias unidades de autoreplicación naturales y construidas de ADN (vectores) para introducir ADN recombinante con eficiencia en bacterias y células eucariotas huéspedes.
- Producción de enzimas, proteínas y hormonas pépticas en mayor escala en células huéspedes en cultivo.
- Producción de nuevas variantes de proteínas elaboradas específicamente en mutagenesis o recombinación in vitro.

La lista anterior sólo es parcial, pero indica la posibilidad de las metodologías que se han desarrollado y que continúan mejorando. (Sánchez E., 1989).

Las aplicaciones clínicas actuales de la ingeniería genética incluyen la producción de insulina humana (su uso evita la reacción alérgica ocasional de insulina no humana), y

hormona de crecimiento humana que no puede reproducirse en las cantidades necesarias a partir de la glándula hipófisis. Otras aplicaciones incluyen el uso de información genética viral modificada para producir vacunas eficaces, por ejemplo, contra la hepatitis B, y la producción de pequeñas sondas de oligonucleótidos para detectar la presencia o ausencia de genes específicos en fetos humanos in vitro para el diagnóstico prenatal.

Sondas de ADN. Una sonda es una banda corta del A.D.N. El desarrollo de una sonda de A.D.N. empieza con la digestión del A.D.N. por las resinas de restricción (endonucleasas) lo cual produce muchos fragmentos. A causa de que las sondas son copias de una secuencia de A.D.N., en ellas son bases complementarias de una base original. Este procedimiento es el que marca la base, para detectar diferencias del genoma humano. (Martínez J. 1994)

(RFLPS): Son variaciones en los tamaños de los fragmentos de A.D.N. producidos por la digestión del A.D.N. por enzimas de restricción (endonucleasas) para generar y detectar estos fragmentos en el A.D.N. de un individuo, el A.D.N. debe ser separado de líquidos corporales o tejidos. Generalmente esto puede hacerse por digestión del espécimen con enzimas proteolíticas en la presencia de un detergente, seguido por una o más extracciones orgánicas; para remover la proteína desnaturalizada, una vez separado y libre de proteína, el A.D.N. esta disponible para la fragmentación con las enzimas de restricción (que actúan como tijeras) después de la digestión con las enzimas de restricción, los fragmentos de A.D.N. son fraccionados con base en su tamaño a través de la electroforésis en Gel de

Agarosa. Los fragmentos más grandes, a causa de que la matriz del gel ejerce un efecto propio sobre las moléculas de A.D.N. durante la electroforesis. (Martínez J., 1994)

Los fragmentos de A.D.N. en el gel contienen bromuro de etidio, el cual se intercala con el A.D.N., bajo la fluorescencia de la luz ultravioleta. La forma como los fragmentos de A.D.N. se transfieren del gel a la membrana de nitrocelulosa o Nylon es por un proceso conocido como Southern Blotting, la membrana se coloca entre el gel y el papel de la electroforesis, los fragmentos de A.D.N. se colocan en la solución de transferencia y pasan del gel a la membrana donde ellos se unen prontamente. (Martínez J., 1994)

La membrana se coloca con sondas radioactivas, (las sondas radioactivas son consecuencias pequeñas de A.D.N. construidas por ingeniería genética), la sonda se une con los fragmentos de A.D.N. que son complementarios a ella.

Luego se lava la membrana bajo condiciones de baja astringencia (abundante sal y baja temperatura), la cual remueve sondas que se han unido débilmente. Una vez lavada la membrana, esta se coloca en íntimo contacto con una placa fotográfica, que es sensible a productos radioactivos de moléculas de fósforo. Después de un tiempo de exposición (horas o días) el filme muestra manchas o borrones que son analizados en un computador y comparados con otros para la identificación. (Martínez J., 1994)

Polimorfismos del A.D.N. Los sitios de restricción, son distribuidos ampliamente a través del genoma humano la digestión del A.D.N. con enzimas de restricción, resulta en la producción de miles de fragmentos de A.D.N., que difieren en longitud dependiendo sobre las distancias en los sitios de restricción. (Martínez J., 1994)

El orden de los fragmentos del A.D.N. producidos por una endonucleasa de restricción específica, es característico (pero no único) de un origen de A.D.N. debido a que la localización de los sitios de restricción varía grandemente entre los individuos. La variación en la localización de los sitios de restricción, se origina de eventos mutacionales (mutaciones puntuales, que guían a la creación o eliminación de estos sitios en el A.D.N. de las células germinales). La enzima de restricción reconoce esta secuencia para la hemoglobina normal.

5'-C-C-T-G-A-G-G-A-G-3

Pero cuando se cambia esta base A por I

5'-C-C-T-G-I-G-G-A-3

No la reconoce y esta es la secuencia en la anemia de las células falciformes. Considerablemente muchas variaciones individuales existen dentro de la secuencia de A.D.N. entre los sitios de restricción.

La posibilidad de conseguir la identificación de una persona mediante el ADN se basa en el estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica. Estos fragmentos presentan, una longitud variable, que se debe a una mutación en la secuencia de bases, o

bien a una alteración de la longitud de la secuencia de ADN por un número determinado de pares de bases. Los polimorfismos de longitud se asocian con frecuencia a regiones hipervariables que son zonas de ADN donde los pares de bases se repiten un número determinado a veces, las zonas de alta repetición se denomina minisatélites que son plenamente válidos para la identificación de un individuo.

El polimorfismo genético es el rasgo que existe en una determinada población, presentando como mínimo dos fenotipos, ambos con frecuencia superior al 1%. Por medio del uso de sondas específicas, que son fragmentos catenarios de ADN, se puede lograr, tras la hibridación, la identificación empleando un revelador adecuado. (Gistber J., 1992)

Aplicación del Acido Desoxirribonucleico (ADN) en Medicina Legal. Para que el ADN pueda aplicarse con fines forenses se ha de cumplir una serie de requisitos utilizado en la investigación de la paternidad y en el campo de la criminalística:

- El ADN como portador de la información genética, se transmite de padres a hijos. Por ello, en cualquier núcleo celular de cualquier persona, la mitad del ADN presente procede del padre y la otra mitad, de la madre.
- El ADN tiene una gran estabilidad en el medio ambiente, siendo posible aislarlo e identificarlo de células con días, semanas, meses e incluso años de antigüedad.

- Por su presencia en todos los núcleos celulares es posible obtener en el lugar en que ocurrió un hecho delictivo indicios en los que se hallen presentes células que contengan ADN. Sobre todo si medió violencia.
- Las largas cadenas de ADN, compuestas por decenas de miles de pares de bases, que en algunas zonas se repiten de una forma secuencial y determinada, específicas en longitud y localización, para cada persona. Por ello, el ADN es como una huella dactilar genética específica para cada persona. (Gisbert J., 1992)

Técnicas Analíticas. Para obtener información válida y aplicable en Medicina Legal se deben seguir los pasos señalados. Todos los procesos deben desarrollarse en condiciones de gran esterilidad (guantes y material de un solo uso), sin que sea necesaria la esterilidad absoluta. (Gisbert J., 1992)

Extracción. El ADN puede ser extraído de cualquier célula nucleada: Leucocitos, semen, raíz capilar o tejidos. Se introduce el material de partida en un buffer determinado, con lo que se consigue la lisis de la célula y de su núcleo, lugar éste donde se halla el ADN. Una vez conseguida la ruptura celular, se procede a hacer una extracción con fenol para eliminar contaminantes (proteínas, lípidos, RNA), y, finalmente con cloroformo para eliminar el fenol. El ADN disperso e invisible, se precipita con etanol y acetato sódico, con lo que todo el material genético aparece en suspensión, conformando lo que se llama "madeja" de ADN. Una vez que es visible, se recoge y se lleva a desecación a temperatura

ambiente, rehidratándose posteriormente en buffer y midiéndose la concentración que presente por técnicas de espectrofotometría. (Gisbert J., 1992)

Paralelamente debe hacerse un desarrollo Electroforética con una pequeña parte para comprobar que el ADN obtenido está en forma de largas cadenas. Si esto no fuese así, significaría que la cadena ha sido previamente cortada, probablemente por enzimas contaminantes, que no son conocidas y que no se sabe por dónde han cortado la cadena, lo que invalida cualquier estudio posterior. (Gisbert J., 1992)

Digestión del ADN. En este proceso se pone en contacto la cadena de ADN con una enzima restrictora la cual actúa cortando la doble cadena en puntos determinados. En medicina Legal tienen interés las enzimas denominadas de tipo II, que son capaces de reconocer una serie de 4 ó 6 nucleótidos y cortar en ese punto (Diana). De este modo, una cadena determinada es cortada tantas veces como secuencias específicas presente para una restrictasa determinada. (Gisbert J., 1992)

Separación Electroforética. Una vez cortado el ADN en múltiples fragmentos, se procede a separarlos mediante una electroforesis en gel de agarosa. Tras el desarrollo electroforético es necesario sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio, sustancia que se une a los puentes de hidrógeno que enlazan los nucleótidos de la doble cadena, lo que permite la visualización de las diversas bandas a la luz ultravioleta. (Gisbert J., 1992)

Desnaturalización. Cuando se tiene cortado el ADN y separado electroforéticamente según el número de pares de bases, se procede a romper la estructura de doble cadena que presenta el ADN, de modo que queden libres dos cadenas simples. Que estas pretendan originar cadenas que se puedan unir, total o parcialmente, a cualquier cadena que presente una secuencia exactamente complementaria. El objetivo perseguido es que se unan a la sonda. (Gisbert J., 1992)

Southern- blot. Se transfieren las cadenas simples de ADN a un soporte de trabajo más maleable y resistente: una membrana de nylon. Este nuevo soporte permite que las cadenas de ADN se adhieran permanentemente a él, evitando que aparezcan posteriormente fenómenos de difusión del ADN separado, lo que invalidaría la interpretación de los resultados. La técnica consiste en poner sobre el gel de acrilamida la membrana de nylon, y sobre ésta papel de filtro grueso. De este modo, el ADN se adhiere en el nylon abandonando el soporte del gel con ayuda de una corriente capilar ascendente. Una vez realizada la transferencia, se deja secar la membrana de nylon a la temperatura ambiente, para introducirla luego en un horno a 80 grados centígrados, con lo que se consigue la fijación definitiva del ADN a la membrana. (Gisbert J., 1992)

Prehibridación. En esta fase se bloquean los lugares de unión inespecíficos que pudiera haber en la membrana. La construcción de la cadena de ADN marcado se realiza por el proceso de nick-translation, consiste en añadir los cuatro diferentes nucleótidos (uno de ellos marcado), uno a uno de modo que con ayuda de una polimerasa se unen a la sonda

(que es el molde), separándose posteriormente por desnaturalización térmica. (Gisbert J., 1992)

Hibridación. En esta fase se pone en contacto la cadena de ADN construida sobre el molde de la sonda con los fragmentos de ADN que hay en el soporte de nylon. Una vez finalizado el período de hibridación en condiciones adecuadas de tiempo y temperatura, se lava la membrana, quedando tan sólo fijado el ADN hibridado.

Revelado. Pretende poner de manifiesto las zonas de unión de la sonda al ADN en las áreas que eran complementarias. El resultado aparece en un soporte adecuado, como lo es una placa radiográfica colocada encima de la membrana de nylon. Los resultados aparecen como bandas a diferentes alturas, el tamaño de los fragmentos se obtienen por comparación con los de un ADN patrón. Finalmente se estudia la identidad entre las muestras comparando la altura e intensidad de las diversas bandas de los ADN problema. (Gisbert J., 1992)

ADN e investigación de la paternidad. Para afrontar la investigación biológica de la paternidad se acepta el supuesto de que la mitad del genoma que una persona posee procede del padre y la otra de la madre, heredándose según los postulados mendelianos. El uso del ADN en estos supuestos pretende poner de manifiesto que aquellos minisatélites que sea específicos en localización y longitud para cada persona y no procedan de la madre, deben provenir del padre putativo. (Gisbert J., 1992)

Para analizar los resultados, en primer lugar hay que descartar en el hijo aquellas bandas que le pueden haber sido cedidas por la madre. Con las restantes hay que ver qué padre, si es que hay más de uno, tiene exactamente las mismas bandas que están presentes en el hijo, pero que no proceden de la madre.

La probabilidad de error en la confirmación de una paternidad, o sea, el riesgo de que debido al azar un individuo, que no sea el verdadero padre, pueda ser incriminado por tener las mismas bandas que el hijo, es de una entre un millón para una sonda multilocus con 20 bandas. De este modo la confirmación de la paternidad se hace con un 99.999 % de probabilidad. Cuando se emplean sondas monolocus, la confirmación de la paternidad se hace con un 98% de probabilidad. (Gisbert J., 1992)

La Huella Genética. El término huella digital genética fue acuñado por A.J. Jeffrys en Inglaterra, a fines de la década antepasada. Este investigador utilizó sondas multilocus y obtuvo un patrón de bandas de ADN (ácido desoxirribonucleico) semejante al patrón magnético que traen los productos comerciales. Como ese patrón es característico de cada persona se llamó huella digital genética en concordancia con la huella dactilar, que también es única. (Marín R., 1994)

Sin embargo, las sondas multilocus (MLP) cedieron pronto en lugar a las sondas unilocus (SLP) que dan solo un patrón de dos bandas por persona. Aunque las sondas múltiples

tienen una mayor capacidad de exclusión. Su producción e interpretación de los resultados presentan varias dificultades que no se dan con las sondas simples. Una mezcla de 2-4 de estas nos dan resultados más claros y equivalentes a una sonda múltiple.

La gran capacidad de exclusión e inclusive de inclusión de esta nueva tecnología se debe a que existen zonas (Locus) en el ADN que son muy variables. Esta se denomina, una vez cortadas enzimáticamente, RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism). Su longitud está dada por el mayor o menor número de veces que una unidad básica de ADN se repite dentro de ese locus: VNTR (Variable Number of Tandem Repeats). Cada uno de los tamaños de ese fragmento constituye un alelo de locus. (Marín R., 1994)

Para efectos forenses, el locus será más importante cuanto más alelos tenga. En la actualidad se trabajan algunos loci que tienen entre 20 y 30 alelos, tales como el MCT-118 (D1580) y el APO B. Recientemente, un locus relacionado con los antígenos H.L.A (DRB) se describió con 60 alelos. Como heredamos un gen materno y otro paterno, el número posible de patrones de dos bandas se hace enorme y cuando se combinan las capacidades de exclusión de dos o más locus podríamos tener una probabilidad tal que estadísticamente, no alcanzaría la población de un país o inclusive la población mundial, para encontrar otro individuo semejante. (Marin R., 1994)

Esta técnica se puede utilizar cotidianamente con muestras de sangre fresca (paternidades) y manchas de sangre, semen o cabellos foliculados generalmente hallados en homicidios y

violaciones. La técnica de la huella genética consiste en extraer el ADN de la muestra: sangre fresca, tejido, mancha de sangre, manchas de semen o folículo piloso. La extracción se realiza mediante un método orgánico o uno inorgánico. Después de extraído, el ADN se somete a la digestión con la encima de restricción.

Una vez realizada la digestión, los RFLPs se separan mediante electroforesis en agarosa, después de lo cual se realiza la transferencia a membranas de nylon. Ya en este soporte se lleva a cabo la hibridización con la sonda marcada para finalizar con el revelado y la fotografía. (Marín R., 1994).

Como podrá verse, la metodología es larga y bastante complicada por lo que se han diseñado técnicas alternativas a la huella genética. La más utilizada el PCR: reacción en cadena de la polimeraza. Mediante ella hacemos millones de copias del VNTR que nos interesa (con primers y polimeraza) y con esa cantidad podemos visualizar directamente la posición del fragmento del ADN, después de la electroforesis, sin necesidad de transferencia ni sondeo. Con ello la metodología se reduce a una etapa de extracción, a otra de copiado y a la separación por electroforesis. Por último, fotografiamos las posiciones relativas de los RFLPs directamente de la agarosa, mediante tinción directa.

Dada su ventaja, en cuanto a tiempo de trabajo y a que las sondas son muy difíciles de conseguir, porque están muy protegidas con patentes, se optó por utilizar PCR como técnica a aplicar en el trabajo forense rutinario.

El siguiente es un caso que ocurrió: Paciente de 49 años de edad, mujer blanca, asesinada y violada, es llevada al Instituto de Anatomía Forense. Los investigadores utilizan un rayo láser para detectar semen en las sábanas; al fin lo consiguen (cortan tela). Mediante marcadores inmunológicos y una observación al microscopio electrónico y de barrido, confirman hay esperma. Las huellas genéticas constituyen una auténtica revolución en lo que llamamos criminalística biológica.

Qué son las huellas genéticas? Estos diminutos detectives fueron descubiertos en 1.985 por el Doctor Alec J. Jeffreys del Departamento de Genética de la Universidad de Leicester en Gran Bretaña. Este las aplicó cuando el ministerio del interior británico tenía problemas con 2.000 inmigrantes de Paquistán y Bangladesh. (Martínez J., 1994)

En 1.987 fue condenado Robert M, por que había violado a una mujer de 32 años que padecía las secuelas del Polio. Este es el primer delincuente condenado de acuerdo a su huella genética. A los 15 días un segundo violador fue condenado gracias a su carne molecular. Somos el resultado de una combinación única e irrepetible. Se aplica a violadores, criminales para identificar cadáveres carbonizados catástrofes y accidentes. Mary Claire de la Universidad de California en Berkeley identificó 200 jóvenes que los entregó a las madres de la plaza de mayo, secuestrados durante la dictadura militar. También se utiliza para la búsqueda de personas, para las pruebas de paternidad para el

éxito de los trasplantes y para el genoma humano se esté utilizando esta técnica. (Martínez J., 1994)

La fiabilidad de la huella genética se basa en que ningún hombre es idéntico a otro: aun en los gemelos existe diferencia a nivel molecular, somos el resultado de la combinación única e irrepetible.

El ser humano posee 46 cromosomas de los cuales 23 proviene de la madre y 23 proviene del padre. El cromosoma es, en esencia, un paquete increíblemente compactado de A.D.N. la célula humana posee 3.100 millones de pares de bases. Aunque la mayor parte de A.D.N. presenta mínimas variaciones de un individuo a otro Jeffreys descubrió que existen unas regiones bautizadas con el nombre de minisatélites, extremadamente variables repartidos a lo largo de los cromosomas. En la obtención de una huella lo que realmente nos interesa son fragmentos de A.D.N. que sean muy distintos de una persona a otra, ya que en la variedad está la clave del éxito de la técnica. (Martínez J., 1994)

Los minisatélites no son otra cosa que pequeñas secuencias de bases que se repiten una y otra vez. Si se tiene esta secuencia en el A.D.N.:

AGGATGCTCAAT...

AGGACTCTCTCTATT...

Se aprecia que Citocina y Tinina son los pares de bases que se repiten a través de la molécula. Los microsátélites no sobrepasan los 5 pares de bases que se repiten. Se pueden presentar en diferente longitud en la molécula de A.D.N. (ahí la variación). A partir del conocimiento de éstos minisátélites se han sintetizado las sondas radioactivas.

En la huella genética del sujeto aparecen dos bandas individuales, una heredada del padre y otra heredada de la madre. Se utilizan generalmente 5 sondas radioactivas. Son sondas de locus único y múltiple. (Martínez J., 1994)

En 1983 se descubrió (PCR) la reacción en cadena de la polimerasa por la cual de una molécula de A.D.N. se pueden hacer 100 millones de copias en una tarde. Es una verdadera fotocopiadora biológica (miles o millones de agujas en el pajar).

Estas pruebas pueden ser medible y reproducibles en el laboratorio. La interpretación de estos resultados depende de la frecuencia de las bandas en la población, de los marcadores de la población, del tamaño de la banda (de los estudios de genética de población).

Los principios científicos de la genética de población deben aplicarse al análisis del A.D.N. Gran desacuerdo existe y además gran controversia porque son necesarios los Standard y estos no existen, para el análisis de alta calidad del A.D.N. en los casos forenses. Las muestras de sangre, semen, tejido, hueso, pelos, saliva, orina, dientes. (Martínez J., 1994)

Las fallas en las pruebas pueden ser: Digestión parcial del A.D.N., electroforesis difícil, errores en la carga, construcción de la sonda, separación incompleta de gel, no pasa la membrana, pérdida de fragmentos, falla en electroforesis, falsos negativos, falsos positivos, muchas bandas, trastornos en la degradación. Fallas en la toma de la muestra o contaminación por: sol, aceite, gasolina, detergentes, álcalis, ácidos, sustancias químicas etc. Y mala conservación de la muestra. (Martínez J., 1994)

La tecnología de ADN en Costa Rica. Para fines forenses se inició el desarrollo de esta tecnología hace unos tres años, poco tiempo después de que el Dr. Jeffys la aplicara para estos menesteres en Inglaterra. Se obtuvo una excelente acogida de los señores Magistrados y de los superiores inmediatos. Sin embargo, la escasez de recursos del Organismo de Investigación judicial impidió la adquisición de los materiales, reactivos y equipo de forma inmediata y hubo necesidad de programar su compra en varios años para concluir a fines de 1992. (Marín R., 1994)

A pesar de ello no se esperó todo ese tiempo para iniciar el desarrollo de esa tecnología. Mediante aporte personal se consiguieron libros, el material científico didáctico y algunos reactivos, lo cual facilitó el desarrollo de las etapas en forma secuencial. Ello permitió concluir la última etapa del proceso sólo 15 días después de poner a operar el último aparato que llegó en enero de 1993. (Marín R., 1994)

Se está aplicando rutinariamente esta técnica en los casos de paternidad discutida, aunque con el análisis de un solo locus. Un año después se pretende estudiar el número de locus necesarios para que la técnica tenga conclusión afirmativa, en cuanto a la paternidad y a los delitos. Para esto último es necesario una base de datos que permita establecer las frecuencias alélicas de los diferentes loci a utilizar, se pretende realizar este arduo estudio con un aporte del CONICIT para lo cual la Corte Plena ya dio su visto bueno. (Marin R., 1994)

El ADN en la Investigación Criminal. El asesinato del presidente de los Estados Unidos, John F. Kennedy, en 1963, presenta aún interrogantes. La comisión Warren, encargada de la investigación, concluyó que el proyectil que le quitó la vida al presidente fue el mismo que hirió al gobernador de Texas, John Connally, quien lo acompañaba. Sin embargo, esta conclusión actualmente despierta dudas, ya que pocos observadores fueron convencidos de que hubo un solo tirador. (Pareja J., 1992)

Si esto sucediera actualmente, sería fácil dilucidar esta clase de interrogantes, utilizando una técnica desarrollada por la doctora Mary Ann Seus en la Universidad de California del Sur y que denominó "Citología Balística", que consiste en el análisis de los restos de células orgánicas arrastradas por un proyectil. Si el proyectil atravesó ambos cuerpos, los microscópicos residuos de sangre, harían posible extraer muestras de células, identificar que parte del organismo perforaron, determinar el tipo de sangre y la clase de tejido como también analizar las "huellas digitales" del ADN. (Pareja J., 1992)

El nombre de "Huella digital" fue dado para la prueba del ADN (ácido desoxirribonucleico, componente de los cromosomas y portador del código genético), por el científico británico Hlec Jeffries, pionero en trabajos para el desarrollo de esta prueba, él escogió el término "huella digital", porque la prueba es comparable a la dactiloscopia.

La técnica del ADN es una herramienta científica que se utiliza para determinar la culpabilidad o inocencia de personas acusadas de determinados crímenes o violaciones, a través de internarse en las células vivas o muertas, extraer los genes y estudiarlos directamente. Esto permite identificar la procedencia biológica de sangre, semen, etc., recogida a la víctima y/o del sospechoso. En caso de no encontrarse con una cantidad suficiente de genes, se recurre a la técnica de expansión por cadena inducida por polimerasas, mediante la cual se multiplica la cantidad de ADN hasta la necesaria para el análisis. (Pareja J., 1992)

En un caso de homicidio la mancha de sangre del ADN encontrada en el sospechoso, se compararía con una muestra de sangre de ADN de la víctima. En caso de violación, las manchas ADN de semen tomadas de la vagina, se comparan con las muestras de sangre ADN tomadas del sospechoso. La comprobación se apoya en un hecho establecido firmemente por la genética: La cadena ADN es distinta en todas las personas, excepto en el caso de gemelos idénticos. (Pareja J., 1992)

La clave para la prueba del ADN está en la presencia de células contenidas en el ADN, en cuanto a líquidos, son buenas fuentes de células la sangre y el semen, otros cuerpos fluidos como lágrimas, saliva, orina no lo son. Cualesquiera tejidos del cuerpo son excelentes fuentes de ADN, como raíces de cabellos, huesos, pulpa dental, piel y demás órganos. (Pareja J., 1992)

Las muestras para el estudio del ADN se preservan mejor cuando se guardan frías y secas, pero el hecho de que un líquido esté mezclado con la muestra no le resta efectividad para la identificación, en ocasiones se ve contaminada por otras sustancias en la escena del crimen, lo que no afecta los resultados de la prueba del ADN, tampoco lo es cuando está mezclada con medicamentos o alcohol.

En el laboratorio, el estudio del ADN se realiza extrayéndolo de los restos celulares y cortado en fragmentos con la ayuda de enzimas que actúan como tijeras biológicas. Mediante electroforesis. Se separan esos fragmentos de acuerdo con su tamaño, el cual es determinado por la frecuencia de variaciones en las secuencias genéticas inscritas en el ADN. Una potente corriente eléctrica empuja los fragmentos a través de los delgados canales de un gel. Los trozos más cortos llegan más lejos y los más largos quedan cerca al punto de partida. (Pareja J., 1992).

Una vez repartidas las bandas sobre la película, se marcan radioactivamente las zonas de variaciones y se las fotografía con rayos X. La imagen resultante muestra señales oscuras

en las zonas de variaciones. Son las " Huellas digitales" cromosómicas halladas en el cuerpo de la víctima y que podrán ser comparadas con las extraídas del organismo sospechoso.

La prueba del ADN, además de ser costosa, es complicada, lo que conlleva mucho tiempo para lograr sus resultados, por lo tanto, es conveniente utilizar la serología, porque es una prueba económica, rápida y sus resultados también son lo suficientemente satisfactorios para las necesidades investigativas de la policía, y dejar el ADN sólo para casos en que la serología no reporte óptimos resultados.

Investigadores analizan el PCR rápido para la prueba de identidad empleando un ciclo termal en miniatura movido con batería en el cual se implementó un ciclo termal movido con batería y microfabricado para la clasificación de ADN basados en el PCR para la identificación humana. HLA DQ y un tríptico STR fueron amplificados en PCR empleando un dispositivo conocido como el Instrumento Cíclico Termal Analítico en Miniatura (MATCI). Las propiedades de calentamiento de extrema eficiencia del MATCI permitieron completar el ciclo termal en 21 minutos. Además, se demostró la posibilidad de usar el tiempo real del sistema de detección fluorescente de la MATCI. La aplicación exitosa de este dispositivo portátil a las pruebas de identidad forense, es un proceso significativo hacia el desarrollo eventual de un instrumento de pruebas de ADN completamente integrado que también incorporaría la preparación de muestras y la detección de un alelo. (Belgrader P., 1998)

El desarrollo de un instrumento integrado para la prueba de identidad de ADN para un rápido análisis de muestras requiere la aplicación de tecnologías de microfabricación con exámenes moleculares convencionales. Se ha demostrado que los dispositivos basados en microchip desarrollan varios aspectos de análisis de ADN incluyendo la preparación de muestras, la electroforesis capilar y se ordena la prueba de hibridación al oligonucleotido.

Más notable aún, se ha informado integración de procesos, tales como el PCR y la electroforesis capilar. Recientemente, el Laboratorio Nacional de Lawrence Livermore diseñó un instrumento cíclico termal analítico en miniatura (MATCI) que funciona con 13 baterías recargables NiCol y tiene detección fluorescente de dos colores al tiempo real. (Belgrader P., 1998)

El instrumento entero que consiste en un ciclo termal, ópticos en estado sólido y un computador laptop, se ajustan en un porta-papeles de mediano tamaño, pesando en total 35 libras. En este reporte, el MATCI se aplicó a la prueba de identidad humana. Se regeneraron rápidamente productos PCR para HLA- DQ y un tríptico STR. Los exitosos resultados demostraron claramente el importante papel que los instrumentos analíticos en miniatura tendrán en la rama forense. (Belgrader P., 1998)

Se evaluó la toma de HLA DQ usando el MATCI y el ciclo termal del sistema Gene Amp PCR 9600. (PE9600). Se llevó a cabo un procedimiento cíclico termal DQ común (94°C

para 30, 30 ciclos a 94°C para 30s, 60°C para 30s, y 72°C para 30s, y 72°C por 10 minutos).

Las tiras manchadas de tinta en un punto invertido preparadas de los productos generados por cada sistema fueron idénticas, desplegando las dos el genotipo 1.2, 2. La excepcional capacidad de calentamiento del MATCI permitió que el PCR se completara 25% más rápido que el PE 9.600. Saltar las temperaturas de 60°C a 72 °C y de 72°C a 94°C sólo requirió 2.9 y 2.7, respectivamente. (Belgrader P., 1998)

Estas propiedades de calentamiento rápido fueron adicionalmente aprovechadas mediante disminuir progresivamente los tiempos de absorción hasta lo más mínimo de 5s en cada temperatura. Se observaron excelentes resultados a pesar de reducir el tiempo total del PCR hasta sólo 21 minutos.

El sistema de detección de tiempo real sobre el MATCI se determinó mediante anular una mezcla $DQ \propto PCR$ con bromuro de etidio, y sometiendo la reacción a un ciclo termal doble y análisis fluorescente. Se hizo seguimiento a la acumulación del producto $DQ \propto PCR$ en el curso del ciclo termal mediante utilizar el sistema óptico en estado sólido, construido dentro del instrumento. (Belgrader P., 1998)

A medida que el bromuro de etidio se intercalaba con el producto PCR generado durante la reacción, la intensidad de la señal fluorescente emitida por el bromuro de etidio se

incrementaba. La fuerza de la señal fluorescente detectada por el fotodiodo fue directamente proporcional a la cantidad del producto PCR en la reacción. El perfil de emisión mostró una típica curva de detección sigmoidea.

Posteriormente se llevó a cabo la amplificación PCR del sistema STR azul AmpFISTR con el MATCI. Se sustituyó la polimerasa ADN dorada AmpliTaq por polimerasa ADN amplitaq. Trabajos preliminares con sistemas STR habían indicado que las condiciones de reacción requieren modificaciones para alcanzar exitosamente un PCR multiplex rápido. Por consiguiente, se emplearon 2 condiciones de reacción, la mezcla de reacción normal del fabricante y una mezcla de reacción modificada. Se utilizó una serie de entornos cíclicos termales rápidos y los productos PCR se analizaron en un sistema de electrofóresis de gel poliacrilamida ABI 373. (Belgrader P., 1998)

Basados en la uniformidad de la altura máxima y la ausencia de máximos, la mezcla 2 parece producir mejores resultados generales que la mezcla 1. La mezcla 1 tuvo como resultado

la pérdida del producto FGA en el panel C y virtualmente productos no detectables en el panel D. La mezcla 2 fue más sujeta a PCR rápido, ya que todos los productos aún estaban presentes en el panel C (base) y dos clases de productos se observaron en el panel D (base). Los resultados en el panel C (base) fueron muy encomiables, especialmente teniendo en cuenta que el tiempo total del PCR fue 60 minutos. (Belgrader P., 1998)

Hemos descrito la aplicación exitosa de un prototipo de instrumento movido por batería con el fin de llevar a cabo un PCR rápido para propósitos de pruebas de identificación forense. El valor de un MATCI múltiple en un laboratorio criminal sería enorme, y a pesar de que existe la posibilidad de usar tal instrumento en la escena del crimen, esta aplicación sería objeto de discusión.

En el estudio sobre ADN Locus D4s43 tomado en la población japonesa y aplicado a dientes con ADN degradado se investigó el polimorfismo VNTR en el locus D4S43, y se determinó la frecuencia de alelo en la población japonesa por la reacción en cadena de la polimeraza. Se observaron 11 diferentes alelos y 16 genotipos en 131 japoneses que no tenían relación entre sí. (Hanaoka Y., 1998)

El alelo más común fue una unidad repetida (60.3%), el índice de heterozigosidad del presente estudio fue 58.7% y la cantidad de polimórfico se calculó al 0.55. Además, se encontró cuatro nuevas variaciones de tamaño en el único alelo de unidad repetida, que fue el alelo más común entre la población japonesa. (Hanaoka Y., 1998)

Se concluyó que estas variaciones eran diferentes de las variaciones mediante repeticiones de la unidad básica de 14 -bp. El único alelo de unidad repetida en el locus D4S43, que viene en 4 tamaños, se detectó en todas las muestras, incluyendo las muestras de ADN degradado que se obtuvieron de tejido de diente duro. Por consiguiente, esta nueva

variación es útil en la identificación personal por el análisis de ADN empleando muestras forenses y científicas de ADN degradado. (Hanaoka Y., 1998)

En los materiales y métodos utilizados se recogieron un total de 131 muestras de sangre de individuos japoneses sin ninguna relación y dientes (n=20), se obtuvieron en clínicas dentales con el consentimiento de los pacientes. Se aisló el ADN de las células sanguíneas y del tejido dental duro mediante la absorción de proteinasa K y métodos de extracción de cloroformo-fenol, que han sido previamente descritos como métodos de extracción para dientes.

Se diluyó ADN aislado con ácido trisetylenediaminetetraacético con pH 7.6 (TE) pulidor y espectro fotométricamente cuantificado ($1 \text{ OD}_{260} = 50\mu\text{g/mLADN}$) antes de la amplificación PCR. Diez monogramas de ADN fueron usados para la amplificación de muestras ADN. (Hanaoka Y., 1998)

Comparado con el método de Horn et al (9), se usó menos ADN para análisis en el método de amplificación empleado en el presente estudio, pero la temperatura fijada fue 4°C más baja. Por consiguiente, a pesar de que la amplificación fue exitosa en todas las muestras examinadas, muchas bandas no específicas también aparecieron cerca de la banda central, particularmente cerca de los alelos 5 y 9 y cerca del lado de origen del alelo 11. (Hanaoka Y., 1998)

Como resultado de esto, la temperatura establecida se incrementó gradualmente de 51°C a 55°C. Mediante la elevación de la temperatura a 54°C, la banda clave se aclaró gradualmente y las bandas no específicas desaparecieron. Por lo tanto, durante el proceso de amplificación, las muestras con bandas no específicas que podrían confundir la toma del polimorfismo VNTR en el locus D4S43 fueron fijadas en 54°C y luego comparadas y analizadas. (Hanaoka Y., 1998)

En las frecuencias de alelo de los japoneses se investigó el polimorfismo VNTR en el locus D4S43 en 131 individuos japoneses que no tenían ninguna relación entre sí, y se encontraron 11 alelos y 16 genotipos. El producto de cada alelo oscila de aproximadamente 184 bp - 369 bp. Estos 11 alelos fueron numerados desde 1 hasta 11 desde el lado anódico, y se calculó la frecuencia de cada alelo.

Se concluyó que el polimorfismo VNTR, locus D4S43 entre la población japonesa. Se observaron 11 alelos y 16 genotipos. El alelo más común fue una unidad de repetición, y se sugirió una diferencia en la distribución de alelo con los Caucásicos. Adicionalmente, se encontraron cuatro nuevas variaciones en el alelo de una unidad de repetición. Ya que se detectó el alelo de repetición única en todas las muestras de ADN degradado examinadas que fueron obtenidas de tejido duro dental. Las cuatro nuevas variaciones en el alelo de unidad de repetición única fueron útiles para la identificación personal mediante el análisis de ADN, especialmente empleando muestras de ADN degradado. (Hanaoka Y., 1998)

En el aislamiento del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de la saliva se han dado ejemplos científicos forenses relacionados con saliva que fueron examinadas como fuentes potenciales del ácido desoxirribonucleico (ADN) para el análisis de ADN y pruebas de identificación. El autor demuestra en esta teoría que el ADN fue separado y los patrones marcados apropiados para la escritura de ADN fueron obtenidos de saliva fresca y varias manchas o residuos de saliva en sobres, enjuagues bucales y cigarrillos.

Es más, el ADN y los patrones marcados fueron obtenidos de ejemplos actuales de pruebas forenses, conteniendo una mezcla de saliva y semen. Los patrones marcados de ADN obtenidos de la saliva no se pueden distinguir de los patrones marcados obtenidos de la sangre o cabello del mismo individuo. Para este efecto, el ADN fue aislado y los patrones marcados fueron obtenidos de la saliva almacenada a menos 20°C y de manchas de saliva almacenadas bajo condiciones variables. Concluimos que la saliva y los materiales de mancha de saliva pueden ser un buen recurso del ADN para análisis y algunos casos forenses.

El ADN aislado de materiales biológicos pueden ser analizados por el perfil del ADN para ayudar a establecer la fuente del ácido desoxirribonucleico (ADN); se ha demostrado que la sangre, semen, cabello, toallas o pañuelos y huesos son buena fuente de ADN para pruebas de identificación.

Los usos más convencionales de saliva o materiales de manchas de saliva recuperadas de escenas de crímenes priman en la identificación del grupo sanguíneo y raramente en las proteínas polimórficas. Estas aproximaciones tienen limitaciones severas, especialmente por la baja concentración de antígeno, isoenzimas y proteínas en las muestras. Además, el secado, el tiempo y la contaminación asociadas con las manchas de saliva limitan el número de marcas que puedan ser descritas; sobretodo, el potencial de discriminación usando estas marcas es menos sensitivo que el análisis del ADN.

Se ha demostrado que el ADN puede ser aislado y que los patrones de ADN pueden ser obtenidos de saliva y materiales de manchas de saliva almacenados bajo diversas condiciones. Extracción de ADN: Colillas de cigarrillo fueron obtenidas de dos fuentes. Cigarrillos fumados por voluntarios, luego de doce horas de haber sido fumados. Colillas de cigarrillo untados de saliva probados por "Collaborative Testing Service Inc." como parte de un programa de prueba.

Estas colillas fueron untadas de saliva fresca brevemente, dejadas en aire seco toda la noche a 20°C y almacenados en un cuarto de temperatura hasta que fueron enviados cinco días después. Las colillas fueron recibidas once días después del envío. Para obtener el ADN de las colillas se removió la parte final del filtro cortada en pequeños pedazos e incubados con proteinasa K. Las estampas y tapa de cierre de los sobres fueron mojadas, selladas y se dejaron secando dos horas en un cuarto de temperatura y luego cortada en pedazos pequeños y transferidas a tubos de polipropileno de 15 ml.

Para simular un caso forense, dos voluntarios fueron vendados con algodón azul. Después de 15 minutos, la venda fue removida y se dejó secar a temperatura ambiente aproximadamente durante cuatro horas. La mancha de saliva del material fue cortada en pedazos pequeños y transferida a tubos de polipropileno de 15 ml. y proteinasa K. Las manchas de saliva proporcionadas por "Collaborative Testing Services Inc." fueron preparadas colocando de dos a tres gotas de saliva fresca en una tela de algodón limpia. Estos ejemplos fueron sacados, guardados y enviados como se describió anteriormente en las colillas de cigarrillo y fueron procesadas para extracción de ADN como en el ejemplo anterior.

El ADN fue aislado de evidencias de casos forenses que contenían salivas y manchas de semen como se describió previamente, tratando el material con lisis buffer y proteinasa K a 140/ml, concentración final. Para todos los estudios, los ejemplos fueron incubados toda la noche a 56°C. Después el ADN fue extraído de todos y cada uno de los ejemplos con un volumen igual de fenocloroformo (1:1) y con un volumen igual de cloroformo. Un microlitro de glucógeno (20mg/ml) fue adherido y el ADN fue precipitado con un volumen igual de isopropanol -20°C toda la noche.

Los resultados: el ADN fue aislado de un mililitro de saliva recolectada de varios individuos, entre 3 y 14 de ADN fueron obtenidos en todos los ejemplos de saliva. El ADN extraído de saliva de cuatro de los individuos (No. 1 hasta 4) fueron dirigidos con

Hinf 1. Los patrones marcados de ADN fueron obtenidos por cada individuo, es más, los patrones marcados de ADN mostraron poca o ninguna evidencia de degradación. Los estudios demuestran que cantidades suficientes de ADN para pruebas de identificación pueden ser obtenidas de muy pequeñas cantidades de saliva, más aún de saliva proveniente en copos de algodón.

Estabilidad del ADN en la saliva: Los resultados anteriores demuestran que la saliva fresca y aislada y las manchas de saliva son buenos puentes de ADN intacto para pruebas de identificación. Sin embargo, para su uso en las pruebas forenses, es importante determinar si los restos de ADN en la saliva están intactos bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

El ADN fue aislado a -20°C , los patrones marcados de ADN obtenidos después de dos o tres semanas de almacenamiento a -20°C o no fueron diferenciados de los patrones aislados obtenidos de saliva fresca. La degradación obtenida suele resultar de la pérdida de peso molecular de ADN y suele ser detectada como una pérdida preferencial de señales en el peso molecular alto de los patrones marcados de ADN relacionado con el peso molecular de los patrones bajos. Esto significa que no ha habido una degradación significativa de ADN con el almacenamiento y el significado de los patrones marcados de ADN obtenidos.

El PCR basado en la tipificación del ADN en saliva recuperada en piel humana es el método usado para el reconocimiento de una agresión por mordedura es el examen físico o

estudio de modelos del sospechoso que suelen ser subjetivas y dependen en gran medida de un odontólogo especializado y con buena experiencia. Pueden encontrarse casos en los que la saliva puede estar depositada en la piel de la víctima por una mordedura, succión de ésta, un golpe o beso. El protocolo a seguir para determinar el victimario está regido por odontólogos forenses americanos o ABFO que recomienda recolectar la saliva en la piel de la víctima por medio de una escobilla, esta puede estar impregnada de amilasa componente de la saliva, dando así un resultado positivo, confirmando la presencia de saliva y en la observación de la injuria que es un factor marcado. (Sweet D., 1997)

En situaciones donde la víctima no sobrevive al ataque, que muchas veces es un crimen motivado sexualmente, la evidencia depositada tarda cierto tiempo en ser descubierta y puede sufrir cambios tales como contaminación, degradación y putrefacción, estos métodos no son altamente sensitivos y limitados por la baja concentración de antígenos polimorfos, isoenzimas y proteínas encontradas.

Recobrar la saliva depositada en la piel de una víctima es difícil pues la prueba puede estar contaminada, disminuyendo así el número de células nucleadas contenidas en ADN, así la técnica de la doble escobilla, la cual usa una mota de algodón inicial, seguida de la escobilla en dirección de ésta se demostró para incrementar el conteo de ADN recuperado de la saliva en piel humana, esta técnica se denominó Chelex que es especializa en la extracción de ADN en piel. (Sweet D., 1997)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) da a conocer dos importantes beneficios para el análisis del ADN extraído de evidencias biológicas: a) la amplificación es posible de pequeñas sumas de ADN dando a conocer evidencias clave de muestras de cabello, manchas de semen invisibles y de muestras biológicas diminutas; b) la amplificación es posible con material parcialmente degradado de ADN. Otros métodos usados para la recolección de la evidencia fuera del PCR es el HLA-DQA1 que pueden ser amplificados en cualquier tipo de estampas, cubiertas y cigarrillos. (Sweet D., 1997)

Las muestras para el estudio fueron obtenidas de un varón voluntario en donde la boca del donador fue roseada vigorosamente con agua, después de cinco minutos éste expectoro la saliva en el tubo de polipropileno estéril 1.5 ml. aproximadamente, los tubos fueron colocados a 4° C y una muestra control fue usada para identificar el ADN del donador.

Se estudió 33 sitios experimentales de 27 cadáveres entre los 59.7 años (10 mujeres: 62.9 años; 17 hombres de 52.8 años) utilizaron un anillo metálico usando una fuerza moderada en la piel por aproximadamente 60 segundos, se dividió en cuadrantes el área de superficie de cada cuadrante, se calculó para ser aproximadamente 10.7 cm², 40µL de saliva se depositaron sobre la superficie de cada uno de los tres cuadrantes, el cuarto fue usado para control. En la segunda serie de experimentos se usó el mismo procedimiento en doce sitios de cuerpos de cinco cadáveres con una edad de 59.7 años (3 mujeres: 67.3 años y dos hombres de 48.0 años) 100µL de saliva fue distribuida, la técnica de la doble escobilla se

utilizó para recolección de la saliva en piel de los cadáveres y colocada a 2°C para análisis. (Sweet D., 1997)

El ADN fue extraído de las escobillas, usando el método modificado Chelex, luego las escobillas se incubaron en proteinasa K a 56°C por 60 min. y 100°C por 8 min. para mejorar la liberación del ADN y células nucleadas de la fibra de algodón, después las muestras son colocadas al 5% en el procedimiento de extracción Chelex y cuantificadas por Slot-blot (Waye y Col.).

El contenido extraído fue de 3ng. de ADN, y se amplificó con el método STR, seguida por HUNTH01 y HUNVWA, los productos de amplificación STR se visualizaron por electrofóresis seguido por un gel silver. La cuantificación del ADN presente en la muestra fue completa en todos los casos por el análisis PCR, se demostró que utilizando la técnica adecuadamente se optimizan los resultados y el potencial de uso se logra en una larga variedad de muestras biológicas incluyendo las que contienen diferentes cantidades de ADN. (Sweet D., 1997)

La cobertura del ADN recuperada en muchos casos y por más tiempo fue suficiente para realizar el PCR, las muestras que contenían 100µL el conteo fue más alto de ADN que para las de 40µL, el ADN fue de 13.03ng. después de cinco minutos, 7.42ng. a las 24 horas y 6.46ng. después de 48 horas. La variación estándar que presentan las muestras es alta, pero se tuvo en cuenta que son muestras biológicas y estuvieron en contacto con la piel del

cadáver por 24 horas, en donde se ve afectada por las condiciones post-mortem, como temperatura, humedad, cambios en la piel del cadáver, dolor, edad, además que el potencial para recuperar células nucleadas de saliva, disminuye a las 24 y 48 horas debido a la liberación de células de la epidermis que podrían producir falsos positivos sobre la amplificación. (Sweet D., 1997)

En situaciones en las que se involucra la vida de una persona y hay evidencias de una mordedura, el cuerpo podría no ser descubierto por algún tiempo, entonces el cadáver es depositado antes en un procedimiento operativo estándar que se desarrolló en el Centro Americano de Odontología Forense para recolectar datos, el proceso consta de un examen del sospechoso hecho por el odontólogo, documentación fotográfica del sitio, la saliva de las escobillas es recolectada ya que es de gran ayuda en casos de abrasiones o laceraciones de la piel donde se encuentran marcados los dientes. (Sweet D., 1997)

Los resultados muestran que la saliva es una evidencia que contiene significación forense utilizando el PCR obtenidos para HUMTH01 y HUMVWA depositada en la piel humana.

Amplificando el Loci del dinucleotido en los microsatélites de muestras de huesos y dientes en más de cinco mil años de edad se encontraron más inconsistencias que utilidades. Analizando la factibilidad de utilizar dinucleotidos repetidos en microsatélites de ADN en huesos y dientes antiguos. (Ramos M., 1995)

Se usaron tres microsatélites (IVS8CA, IVS17BTA, IVS17BCA) dentro del gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística en 28 muestras de ADN de huesos y dientes de más de 5.000 años de edad. La amplificación por PCR fue exitosa en el 71.4% de los casos, el análisis repetido en cada marcador produjo diferentes genotipos, en el 97% de las muestras y el mismo genotipo individual fue reproducido por lo menos una vez en el 45.5% de los casos. (Ramos M., 1995)

Se observó que los alelos diferían de los originales constando de adiciones o de lesiones de 1 a 39 dinucleotidos debido a la degradación en el marcado de ADN, con secuencias repetidas de diferentes longitudes interactuando con repeticiones parcialmente degradadas de loci amplificado. Con el análisis repetido de cada muestra se pudieron datos de interés antropológico. (Ramos M., 1995)

Se evaluó la efectividad del uso de microsatélites donde se utilizaron 28 muestras de ADN diferentes entre 200 y 5.000 años de antigüedad para tres marcadores de dinucleotidos repetidos, para los cuales existían datos genéticos de poblaciones y conocimiento de la tasa de mutación, el estudio demuestra que las repeticiones de dinucleotidos no son confiables para llevar a cabo el genotipo de muestras de ADN de huesos y dientes antiguos, pero los registros repetidos proveen información acerca de los alelos que pueden estar presentes en las muestras. (Ramos M., 1995)

En las características de los huesos y dientes utilizados se escogieron muestras de España, debido a las características demográficas y antropológicas especiales de este grupo de población según Calderón 1994. Los sitios estudiados incluyen Fuente Hoz (Araba, período neolítico 5.000 años A.C.) Atzuri (Bizkaia, período neolítico y calcolítico 5.000 a 3.000 años A.C.), Urdiola (Nafarroa, edad de bronce temprana 3.700 A.C.) y Amezaga (Araba, medieval 1.070 - 860 A.C.) Son real (Mallorca, 2.450 - 2.050 A.C.) otras muestras también utilizadas fueron las de aborígenes de Tierra del Fuego (Cueva del Lago Sofía 4.030 A.C.); Cueva del Estrecho Trinidad, del siglo XVIII y XIX) y de las Islas Orientales (el sitio Ahu Tepeu 1.100 - 1680 d.C.) de la expedición arqueológica Noruega de 1955 - 1956.

La extracción del ADN y la amplificación mt ADN fueron realizadas en el departamento de biología animal de la Universidad de Barcelona y en el Instituto de Investigación del Cáncer. El proceso de extracción del ADN se realizó dando inmersión en ácido acético por 15 min. a los dientes, para remover cualquier depósito que pudiera estar ligado a la superficie, se lavaron con etanol y agua destilada por 15 min. e irradiados con luz ultravioleta por 15 a 30 min. (Ginther y Col. en 1992). Para las muestras de huesos, los restos externos fueron removidos por una fresa odontológica. (Ramos M., 1995)

Las muestras se maceraron con un macerador de impacto criogénico con un tubo contenedor de nitrógeno líquido, el polvo del diente y hueso fueron lavados en centrifugación en 8mL. de EDTA 0.5 M pH 8 dos veces, se incubaron las muestras durante

la noche a 37°C en una solución buffer para lisis con proteinasa-K (0.5 M de EDTA, 50 mM TRIS 0.5 SDS, 50 µg/mL, proteinasa-K) con mezcla continua. Se realizó la extracción de cloroformo fenol que dio como resultado una fase acuosa que fue desnaturalizada y concentrada por centrifugación de diálisis usando el Centricon-30. El residuo fue lavado con 2 mL de agua estéril para dar un volumen final de aproximadamente 300 µL y quedaron listas para realizar PCR. (Ramos M., 1995)

En el análisis de microsatélite por el PCR fueron utilizados dos marcadores repetidos CA (IVS8CA y IVS17BCA) y la repetición TA (IVS17BTA) localizadas en las regiones sintrónicas del regulador de la conductancia transmembranal del gen de la fibrosis quística. Las secuencias iniciadoras para el análisis por PCR fueron sintetizadas en un Biosystems aplicado 391 PCR - Mate ADN Synthesizer y usado sin purificaciones para la reacción de PCR con ADN genómico.

El PCR asimétrico fue obtenido con un aislador termal perkin-elmer donde uno o dos primers para cada dinucleotido repetido fue marcado al final con g^{-32} P [ATP], la concentración del primer fue limitada a 1 pmol (AC17D2.2) 4 pmol (19D3) y 6 pmol (AT17D1.2) a 10 pmol de primer no marcado (AC17R2.19R4 o AT17R1.2) con 100 mM de HCL TRIS pH 8.3, 15 mM de MgCL₂, 500 mM de KCL, 0.1% de gelatina, 1.25% de mM cada dNTP, 50ng. de ADN humano, 0.5 U Taq de ADN polimeraza en 50-µL de volumen a 90°C por cinco minutos, la amplificación fue dada a 25 ciclos a 95°C por 20

seg. anillada por 30 seg. a 50°C extensión a 65°C por 45 seg. y una extensión final por 74°C por 5 min. (Ramos M., 1995)

Después de la denaturación por calor, los productos del PCR fueron analizados en geles de secuenciación de úrea poliamida al 6% y autoradiografías fueron visualizadas después de la exposición de 3 horas durante la noche a -80°C. Los alelos fueron designados por su número de repeticiones. Los alelos detectados para cada locus pudieron haber sido considerados como aquellos alelos que estuvieron presentes en el individual y no en el generado normalmente durante la amplificación, un genotipo simple fue obtenido por repetición independiente de amplificaciones únicamente por una muestra (muestra AT-6 por IVS17BTA). (Ramos M., 1995)

En otros casos los genotipos obtenidos por amplificaciones independientes por cada muestra resultaron en por lo menos un genotipo discrepante; las discrepancias fueron encontradas en el 97% de las muestras, para aquellas que fueron analizadas dos veces en el mismo genotipo fue obtenido en dos o más ocasiones en el 45.5% de las muestras. Entre las aplicaciones de marcadores de microsatélite para el análisis de muestras antiguas es el establecimiento entre los restos arqueológicos y la determinación del sexo, la utilidad para el análisis sistemático de dientes y huesos antiguos tiene que ser determinada, además la garantía de la estabilidad de los marcadores, la información existente de los alelos y de las fuentes haplotípicas en poblaciones europeas proveyó valor adicional para estudios antropológicos. (Ramos M., 1995)

El estudio demostró una amplificación exitosa de microsatélites de dinucleotidos repetidos en 20 muestras, 71.4% de los casos, pero genotipos discrepantes fueron obtenidos en el 97% de las muestras. Ninguno de los haplotipos generados no fue el comúnmente asociado en la mutación más común CF en la población. Parece que una de las causas de discrepancia de los genotipos identificados fue pequeñas contaminaciones de ADN, la gran variación de alelos identificados lo hace poco factible, debido a una hipótesis que plantea que este estudio utilizó alelos dinucleotidos mientras que en el estudio de Korosaki utilizó 4 y 5 generando así secuencias mayores. (Ramos M., 1995)

En cinco casos de tandem forense para la identificación, existen muestras de ADN que se toman en medicina legal, en algunos hay que hacer amplificación y replicación del ADN, el STRS se localiza en partes no codificadas de ADN. Para demostrar diversidad de materiales biológicos se describen cinco casos de ADN en tejido en decaimiento como: tejido de tumor, esperma, orina. (Schmitt C., 1998)

En trabajos se encuentra el ADN sacado de material biológico (sangre, tejido, pelo y huesos), este material se ha expuesto a fenómenos: luz ultravioleta, humedad, o años de almacenamiento en parafina. El ADN se degrada y se deja en cantidades cortas de manera que pueda procesarse, por esta razón requiere uso de tecnologías para detección de loci informativo. (Schmitt C., 1998)

Desde 1991, PCR se ha vuelto la herramienta mayor para análisis forense de material biológico debido a su alta sensibilidad y corta longitud. Los tandem pequeños y repetidos (STRs) son ahora la primera opción para análisis de PCR observándose sucesiones de ADN, el tandem pequeño es localizado en regiones codificadas encima del genoma entero. El ADN repetitivo tiende a ser ampliamente polimórfico y así puede ser usado para identificación personal, debido a su brevedad, el tandem corto repetido puede amplificarse bajamente a cantidades de ADN tan pequeñas como 50 pg. mientras que otros polimorfismos necesitan 1 ng. al menos para ser detectados por PCR. (Schmitt C., 1998)

De otro lado, muchos tandem cortos no muestran más de diez alelos repetidos en la población, lo que significa que la detección de un alelo en un corto repetido en una mancha biológica no es prueba concluyente de identificación. Se ha llegado a confrontar con diversidad de materiales biológicos de los cuales todos padecen predominantemente de mala cantidad de ADN y baja calidad. Este estudio desea ilustrar ventajas y desventajas de tandem corto repetido como la mejor herramienta de rutina típica diaria, entre las ventajas está la alta sensibilidad y detección y que es semiautomática; entre las desventajas el bajo poder de discriminación. (Schmitt C., 1998)

En el primer caso, se relata el disparo de un secuestrador ¿suicidio o no? En junio de 1995 en Colonia, se secuestró un autobus y se disparó a un chofer y a una turista; pocas horas después la policía averiguó en el coche donde el secuestrador estaba muerto en el piso. Un tiro en el pecho y otro en la cabeza fueron descubiertos, adheridos al cañón del revólver del

secuestrador un pelo y cantidades de sangre y tejidos fueron encontradas, la policía se pregunta si el secuestrador cometió un suicidio; respondiendo a esto, el laboratorio compara el perfil de ADN de sangre de los tres muertos con los tejidos adheridos a la boca del revólver. (Schmitt C., 1998)

El sistema de los tandem cortos repetitivos fueron amplificados y los productos de PCR separados electroforéticamente por el uso de una página vertical. La visualización también fue desarrollada por manchas de plata o por detección fluorescente semiautomáticamente, usando el secuenciador ALF.

Los tres tandem cortos repetitivos tomados de tejido, pelo, sangre pueden amplificarse considerando que el sistema más largo no puede ser amplificado. Se puede ver claramente que los tandem cortos repetidos son una de las mayores ventajas contra los largos. La más baja información contenida en el tandem corto repetido puede ser compensada por un elevamiento del número de las marcas evaluadas; en este caso, de tres tandem cortos repetidos fueron suficientes para excluir ambas víctimas, pero es una desventaja que el tandem corto tenga menos información que el largo. (Schmitt C., 1998)

Completa congruencia de datos típicos del ADN de sangre del secuestrador y de tejidos encontrados en el cañón sugieren que el secuestrador cometió un suicidio por un disparo de su pistola que él se dio en la cabeza, al mismo tiempo, un buen tirador pudo haber disparado el del pecho.

El segundo caso habla del decaimiento combinado con desmembramiento de un cadáver. Del año 1987 a 1994, varias partes de un cuerpo (pies, muslos, cráneo de un esqueleto con pelo, pelvis, pecho) se encuentran en situaciones diferentes de Colonia; debido a las condiciones de almacenamiento (bolsas de vinilo en un patio libre en barriles de plástico), el ADN típico de todas las partes del cuerpo, excepto de los muslos pudo ser amplificado. Con el examen morfológico de las partes del cuerpo, el laboratorio sugiere que las partes pertenecieron unidas, además una mancha de sangre que se encontró en 1994 en una almohada cerca al barril plástico, se pudo ver que correspondía al ADN de las partes del cuerpo. (Schmitt C., 1998)

El ADN tipificado del pelo se encontró sobre una hoja de sierra bajo un armario de la cocina, el encargado había guardado varios objetos que encontró en 1987 en un piso del apartamento, cosa que no llevó a un resultado, en este caso principalmente debido a la preservación de tejido almacenado alrededor de siete años en los barriles de plástico permite por parte del laboratorio exitosa amplificación.

El tercer caso habla del tumor en la piel desarrollado después de un trasplante de riñón aparentemente no tumoral donde unos pocos meses después del trasplante de riñón de un cadáver fresco ambos pacientes desarrollaron melanomas metastásicos malignos. Los receptores murieron (situación inexplicable); al laboratorio se le pide que responda si el tumor se originó del donador aparentemente sano y que había muerto de hemorragia

cerebral; el material que se examinó fue: tejido metastásico fresco del primer receptor, sangre del primer receptor, un tejido metastásico, tejido libre de tumor cercano al tejido tumoral; los últimos dos del segundo receptor. (Schmitt C., 1998)

Ningún tejido ni otro material fue disponible. La amplificación y separación electroforética del tandem repetido se sistematizó con procedimiento, mostrando que el ADN del primer paciente fue diferente al ADN de la metástasis; el ADN del tumor del segundo paciente fue mezcla de su ADN genuino y del fenotipo maligno, el cual se observó en el tumor del primer paciente, para la mutación de los tres locus individuales del receptor. Los alelos del donador no se han reconocido.

El cuarto caso en que se analizó una violación múltiple, en diciembre de 1993, una joven reporta que ha sido violada por tres hombres A, B y C sin el uso de condón cerca de Colonia; la mujer asumió que las personas A y C eyacularon y mancharon el interior de la mujer; se han descubierto cantidades mínimas de esperma microscópicamente. (Schmitt C., 1998)

Los interiores fueron guardados por un año a -70° hasta que la sangre de los tres sospechosos pudo ser extraída. El laboratorio adelanta diferentes licis del tejido vaginal para separa el esperma del hombre y las células epiteliales femeninas. El ADN resultante de la fase epitelial y la fase espermal fue amplificada con los cuatro tandem cortos repetidos y analizados por técnicos y por métodos de manchas de plata.

En el análisis el número de bandas en el ADN de la fracción espermática de la mancha mezclada indica que dos hombres estaban involucrados en la violación; en contraste con la impresión de la mujer, el sospechoso A mostró estar excluido desde el comienzo de ser uno de los agresores. En los dos tandem cortos repetidos, su ADN no se representó en la mancha de la mezcla. De otro lado, el sospechoso B que se pensaba que no había eyaculado tenía un ADN en concordancia con la mancha de los sistemas empleados en el laboratorio HUMLES, HUMUWA, HUMF 13 A1, pero excluido en HUMTHO1, debido a un alelo extraño en la mancha mezclada de los tandem cortos examinados en dos sistemas sólo uno de los alelos de C fueron encontrados. (Schmitt C., 1998)

De ningún sospechoso, todos los alelos pudieron ser encontrados en la mancha mixta; fuera de los alelos pudieron ser explicados por la diferencia en la cantidad de esperma eyaculada de cada uno de los sospechosos combinada con baja cantidad de células espermáticas; algo más sorprendente fue que la mancha mostraba cuatro alelos los cuales no correspondían al ADN de alguno de los tres agresores. Se pensó que más hombres estuvieron en la violación o que la versión de la mujer no fue completamente cierta o que algún remanente del esperma de amigos de la mujer estaba presente en los interiores. Debido a factores desconocidos, el laboratorio no cuenta con una evaluación estadística completa reportando a la Corte que no era posible una clara identificación; sin embargo, el laboratorio no puede negar que los acusados podrían ser los ofensores. (Schmitt C., 1998)

En el quinto caso se analizan muestras de orina en casos de dopping preguntándose ¿de quién es la orina? En donde 75 ml. de orina de atletas se recolectan en botellas cerradas y son colocadas para examinar en un laboratorio, en muchos casos se dedujo que el instructor de los atletas intercambia su orina sucia por orina limpia; al encontrar orina con sustancias nocivas, los atletas alegan que se les ha cambiado la orina limpia por otra.

El análisis de ADN ha hecho un acercamiento para individualizar la orina por proteína polimórfica o ADN tipificado, lo cual tiene limitaciones en el laboratorio. En muestras de orina para controlar a los atletas la baja cantidad de células y de ADN decrecen por estar en botellas que se han contaminado al dejarlas abiertas. Un almacenamiento de seis meses de 20 ml. de orina a 4°C lleva al decrecimiento de 20 a 40 ng. de ADN en hombres, 400 a 800 en mujeres, al principio caen a 1-2ng. en hombres y 10 a 20 en mujeres. (Schmitt C., 1998)

La variación es alta, la mayoría de mediciones muestras de 0 a 600 ng. de ADN que pueden extraerse fuera de 15 ml. de orina, el 43% de la escogencia aleatoria se encontró con un pH más bajo de 7 (pH de 5 a 6.9) lo cual hace suponer hidrólisis del ADN, además un contaminante desconocido inhibe la muestra de PCR. Esto tiene que ser manejado por adición de albumina de suero en PCR, las que se supone amortiguan la contaminación, permitiendo rápido y fiable el corrimiento del número alto de orina guardada. Ellos desarrollaron reacción múltiple de PCR e hicieron amplificación y detección de alelos fluorescentes después de electrofóresis vertical para permitir la individualización de orina

en un día, la posibilidad permite buena estimación si una muestra de orina viene de cierto donador o de otra persona en un número limitado o alternativo. (Schmitt C., 1998)

Como conclusiones de laboratorio, se tiene que en casos forenses y clínicos, las células y ADN son degradadas en mínima cantidad disponible; en la individualidad de muestras es necesario polimorfismos cortos de ADN, los cuales posiblemente están intactos sobre cadenas de ADN dañados; debido a su brevedad y al bajo límite de detección, es bueno para el ADN típico de especímenes forenses. Debido a su similitud estructural, la amplificación simultánea de locus permitidos por una detección semiautomática sobre una secuencia es posible y permite individualidad de materiales en un día, en contraste con los sistemas de tandem cortos y repetidos con bajo poder discriminativo.

Los sistemas utilizados en este laboratorio con muchos alelos llegan a demostrarse que pueden tener un sistema de información más alto y pueden tener el tipo de ADN polimórfico para usarse en el futuro. Sin embargo, por aumento en el número de alelos, los sistemas necesitan ser electrofonéticamente resueltos. En algunos sistemas de tandem cortos repetidos, pequeñas bandas aparecen como resultado de desprendimiento de polimeraza. Normalmente, en tandem cortos tetraméricos, estas bandas del desprendimiento tienen cuatro pares de bases más cortas que los alelos genuinos. (Schmitt C., 1998)

En la identificación de individuos por secuencia mitocondrial de los dientes, se analiza la mitocondria del ADN que fue extraída de dientes almacenados de 3 meses a 20 años, incluyendo dientes del semi-skeletonized restos de una víctima de asesinato del cual fue enterrado por 10 meses, donantes de dientes o sus parientes proporcionaron sangre o células bucales de las cuales también se extrajo ADN mitocondrial. (Ginther C., 1997)

Amplificaciones enzimáticas y secuencias directas de aproximadamente de 650 nucleótidos de dos regiones altamente polimórficas de mtADN que produjeron secuencias idénticas por cada comparación de ADN y fresco. En la investigación se utilizaron excelentes fuentes con dientes con alto peso molecular de mtADN mitocondrial en donde los restos humanos eran de cadáveres recientes y pueden ser genéticamente identificados.

Cuando la muerte es debido a guerras, homicidios, desastres la identificación de víctimas se hace complicada debido a los largos intervalos de tiempo entre la muerte y la examinación de los tejidos, la descomposición de éstos puede dejar sólo huesos y dientes disponibles para análisis que anteriormente fueron comparados con registros existentes, análisis antropométrico, fotográfico, y cuando no existen estos registros previos a la muerte o son demasiado limitados para una identificación positiva la prueba de ADN es muy efectiva. Recientemente, poderosos métodos han tenido desarrollo en la identificación genética de individuos con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuencia directa de ADN permite una rápida y fiable caracterización altamente polimórfica de ADN y secuencia de diferentes individuos. (Ginther C., 1997)

En principio estas técnicas permiten la identificación de personas; de muestras que contienen únicamente unas copias de secuencias de ADN de interés. Se reportó el aislamiento de alto peso molecular de mtADN de los dientes, independiente de muestras de sangre, células de las mejillas y dientes que fueron donados por los parientes.

Fueron examinados dientes de 11 individuos y los dientes de un bebé donde se hicieron análisis también muestras de sangre y de células epiteliales teniendo como similitud una sucesión de mtADN. (Ginther C., 1997)

1.5 OBJETIVO GENERAL

Describir la técnica para la identificación de cadáveres por medio del ADN en pulpa dentaria humana realizada en el laboratorio de genética del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses Santafé de Bogotá, D. C.

2. MÉTODO

2.1 TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo

2.2 OBJETO DE ESTUDIO

Identificación del ADN en pulpa dental humana

2.3 PROCEDIMIENTO

Previa aprobación del proyecto, por parte de medicina legal, se asistió al laboratorio de genética del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses donde el doctor Manuel Paredes, realizó el respectivo procedimiento. Los investigadores participaron siguiendo cada uno de los pasos con filmaciones y fotografías donde se explica en forma secuencial la técnica para la identificación de cadáveres por medio del ADN en la pulpa dental humana, realizando así un complemento para que la técnica pueda ser visualizada por el que la requiera.

Durante la práctica en el laboratorio de biología molecular se tomó una pieza dental correspondiente a un segundo molar inferior en donde se le realizó diferentes procedimientos de limpieza, pulverización, extracción orgánica de ADN, amplificación por

PCR, electroforesis, interpretación y control de la prueba. Se obtuvo la identificación del individuo, que luego fue llevado a la autoridad competente para la resolución del caso.

3. RESULTADOS

En este procedimiento de identificación de cadáveres por medio de pulpa dental, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

1. **Limpieza y pulverización:** Se somete la pieza dental con integridad coronal y radicular a una minuciosa desinfección en la que se utiliza un detergente no muy abrasivo, con el cual se retiran cálculos, materiales odontológicos u otras partículas contaminantes. Quien manipula la pieza dental debe estar continuamente aislando sus manos (guantes) con un aditamento de bioseguridad (alcohol) para evitar la contaminación con otro tipo de ADN (humano u otra especie). Seguidamente se trabajó con un micromotor que posee fresa, disco de diamante, lija; todo el material utilizado en esta técnica es irradiado con luz ultravioleta y esterilizado previamente.

El diente se colocó en un soporte metálico, se limpió con una lija montada en el micromotor, para lograr una perfecta esterilización entendiendo que la parte que más limpieza requiere es la raíz, eliminando así el posible contaminante externo (capa bacteriana o capa de residuos). Con un disco de diamante se hace un corte al nivel cervical del diente, guardando la corona para luego utilizarla, si es requerida. El hallazgo es una pulpa integral ubicada en la cámara

pulpar que se saca con una pinza; posteriormente, ésta es colocada en un tubo de ensayo para su análisis.

En este estudio se encontraron vestigios microscópicos de pulpa, en las cuales se aprovecha el conjunto de raíz y las posibles cantidades de pulpa que existen. Se pasa a la cabina de flujo laminar, la cual consta de un motor, un filtro que recoge el aire del ambiente, impulsándolo hacia el interior, resultando columnas de aire estéril y quedando el flujo en las láminas "flujo laminar" con el fin de colocar el diente en un ambiente estéril.

Posteriormente se coloca el diente dentro de unos tubos impactores (material de policarbonato estériles con tapas de acero) se lleva un pulverizador de nitrógeno líquido que consta de un campo magnético variable, el cual hace que el impacto metálico se mueva dentro de un campo magnético (que gira en sentido anteroposterior), pulverizándolo así sobre la superficie de acero del tubo. Este pulverizador es refrigerado y programable con diferentes ciclos, controlando el más adecuado con la pieza para pulverizarla.

El tubo se coloca en la cámara de impactor cargándolo con nitrógeno a menos de 130° o 140°. Al agitarse el impactor metálico aumenta en gran forma la temperatura, degradando las células (odontoblastos, odontoclastos, odontocitos) haciendo que el proceso se mantenga refrigerado, hasta que el diente quede completamente

pulverizado y tome un poco de temperatura ambiente, quedando lista para la segunda etapa.

- 2. Extracción orgánica de ADN:** Utilizando solventes orgánicos se hace la decalcificación con TRIS - EDTA agente quelante que atrapa por carga los iones metálicos: sales de calcio, magnesio, potasio e hidroxapatita que conforman la matriz mineral del diente. Se lava el polvo en un tubo de ensayo, agregándole el EDTA, luego por agitación se hace exposición del calcio, los cristales y los minerales que hay allí para que el EDTA los atrape y las células vayan quedando más libres. Se centrifuga, el resultado es un sobrenadante quedando libre de sales, agregando más EDTA para volver a realizar una nueva agitación que se repetirá de cuatro a cinco veces logrando así mayor libertad de sales de las células.

Luego se hace la DIGESTIÓN ENZIMÁTICA del nuevo material: con el TWIN 20 detergente fuerte que desestabiliza las membranas celulares, las rompe y coloca la enzima proteinasa K para inhibir en Dnazas (enzimas que degradan el ADN); al romperse la célula, el ADN de su interior puede degradarse por las mismas enzimas celulares, por eso es necesario inactivarlas con las proteinasa K. Con este proceso se garantiza que las células se han roto, quedando libre el ADN y otros componentes como las proteínas.

Se necesita liberar el ADN purificado de proteínas para lo cual se utilizan solventes orgánicos, como fenol, cloroformo, alcohol isoamílico. En el tubo de ensayo donde está la matriz digerida por la proteinasa K y por los detergentes se agrega un volumen de 300 μ L de fenol, se agita durante treinta segundos, se centrifuga por diez minutos a 12 revoluciones por minuto. Lo que hace el fenol es atrapar las proteínas, quedando una fase fenólica inferior de color amarillo y arriba una fase acuosa transparente; el ADN se disuelve en agua y las proteínas se disuelven en fenol, se agitan nuevamente, se centrifugan, y por diferencia de densidad, el fenol se decanta y el agua queda en la superficie. Este proceso se repite decantando el fenol y diluyéndolo para obtener una muestra más pura, luego se filtra el material en tubos que poseen una membrana de filtración, se centrifuga haciendo que el líquido pase a través de la membrana logrando la filtración, y se colecta en un tubo de desechos. El ADN queda limpio de sales, resultando sólo una pequeña gota sobre la membrana; se coloca el agua estéril para limpiarlo, el ADN queda allí, luego el tubo se invierte y es llevado a la centrifuga; durante este proceso, la gota de ADN cae y es recogida en el tubo (en forma de bala), quedando alrededor de 30, 50, 100 μ L que se llevan al laboratorio de PCR.

- 3. Amplificación por PCR:** Se lleva la muestra para amplificación por PCR al laboratorio debidamente esterilizado y se trabaja igualmente con flujo laminar. Al mismo tubo de ensayo en forma de bala se le agrega polimeraza, nucleotidos y el ADN que se extrajo, la cual da una molécula de ADN replicada en cien millones de

copias; se lleva al laboratorio de amplificadas que es de mayor aislamiento donde hay un extractor de aire que succiona aire de adentro hacia fuera, evitando que el ADN pase del laboratorio de amplificación al de amplificadas, luego se pasa al procesador automático de ADN.

En la PCR se trabajan con sistemas múltiples simultáneos amplificando cuatro, ocho y hasta diez genes en donde se amplifica al mismo tiempo todos los genes en el mismo tubo de reacción; el equipo es capaz de diferenciarlo para cada gen dando los valores de cada pico o cada alelo, facilitando el análisis.

- 4. Electroforesis:** Se utiliza el procesador automático de ADN, que da imágenes por computador. Una vez cortado el ADN en múltiples fragmentos, se separa mediante electroforesis en gel de agarosa; en esta técnica los fragmentos de menos longitud (menos número de bases) migran a mayor distancia que los más largos, apareciendo los resultados como bandas en gel de agarosa. Tras el desarrollo electroforético, se sumerge el gel en una solución de bromuro de etilio, sustancia que se une a los puentes de hidrógeno que enlazan a los nucleótidos de la doble cadena, lo que permite la visualización de las bandas a la luz ultravioleta; no se puede observar la molécula de ADN, se ven miles de moléculas agrupadas (manchas) que se detectan en electroforesis.

5. **Interpretación y control de resultados:** Cada gen que se estudia, cada marcador, cada microsatélite da un grupo de alelos posibles, a manera de una escalera de bandas; las muestras quedan dentro de unos marcadores de referencia que indican el tamaño de cada alelo. Un individuo puede ser homocigoto (los dos alelos iguales) y heterocigotos (con alelos diferentes); si es heterocigoto, se observan dos bandas, dos fragmentos. Cuando hay una afiliación comparten un mismo alelo a la misma distancia; cuando no comparten el mismo nivel o distancia existe la exclusión (se identifica que no son familia).

Los resultados se pueden obtener en forma de gráficas, en bandas o en picos: un pico es una banda, entendiendo que los homocigotos están representados por un pico y los heterocigotos por dos. Este estudio es el más completo para identificar cadáveres y paternidades o filiaciones por medio de ADN en pulpa. Esta tecnología está al nivel de los laboratorios de Estados Unidos o Europa y es la mejor instalada en Latinoamérica junto con Argentina y Brasil, de hecho se compiten con pruebas de calidad internacionales.

En cada caso se llevan listas del registro de cada reactivo utilizado, su costo, cada paso del procedimiento, lotes, cada paso intermedio se va fotografiando; los resultados parciales que obtiene los pone de un color diferente, los resultados definitivos son consignados por los peritos en un gráfico donde son analizados, y que

tienen por lo menos cinco puntos críticos para revisión y análisis; por último, se hace un dictamen para llevar a la autoridad.

CONCLUSIONES

- El proceso de limpieza y pulverización es imprescindible para evitar contaminación de al muestra.
- La extracción orgánica del ADN garantiza la separación de las cadenas de nucleotidos del ADN del resto de las proteínas.
- La amplificación establece la diferenciación de cada gel facilitando que se pueda realizar el análisis de mas genes en una sola reacción.
- La electroforesis permite la visualización de las bandas a la luz ultravioleta, detectando moléculas agrupadas.

Los resultados se pueden obtener en formas de gráficas, bandas o picos.

RECOMENDACIÓN

Los investigadores recomiendan que se continúe realizando estudios tendientes a desarrollar el conocimiento de la genética a nivel odontológico.

BIBLIOGRAFIA

BELGRADER P, SMITH JK, WEEDN VW, NORTHRUP M.A. Rapid PCR for identity testing using a battery-powered miniature thermal cycler. *J Forensic Sciences*. 1998;43(2): 315-319.

CENTRO DE REFERENCIA NACIONAL SOBRE VIOLENCIA, Muertes de personas no identificadas (NNs) en Colombia 1996. Volumen 2, Boletín 2 febrero de 1997. Colombia.

CHRISTOPHEERL, MATEUS K.E. VAN HOLDEN. *Bioquímica*. Mc Graw Hill. Interamericana, España, 1998.

ECHEVERRY, AQUILES. La odontoscopia como ciencia auxiliar de la justicia. Colección G.T. 617.61980. Pág. 138.

EJERCITO NACIONAL. *Guerrilla y Auto-defensas culpables de genocidio* 7,8,34,35,37. 2000.

FISCALIA GENERAL DE LA NACION, Informe de gestión fiscal general de la nación.1998-1999. Imprenta nacional Colombia.

GINTHER CHARLES, ISSEL-TARVER, LAURIE. KING, MARY-CLAIRE. Identifying individuals by sequencing mitochondrial ADN from teeth. Nature Genetics, Journal of Forense Science, Volumen 2, octubre de 1992.

GIRALDO C. A. Centro de Referencia Nacional sobre Violencia, 1997. Volumen II. Boletín II. Febrero, 1997.

GISBERT CALABRIG J.A, Medicina legal y toxicología. Masson-Salvat. Medicina, 4 Ed. Científicas y técnicas S. A.1992

GOMEZ J. Desaparición Forzada de Personas. Informe de la ESAP 1999.

HANAOKA Y, MINAGUCH K. D4S43 locus ADN typing in the Japanese population and application to teeth whith degraded ADN. J.Forensic Sciences 1998: 43(2):406-409.

MARIN ROJAS RAFAEL, La huella genética. VOL. 10 No 2, diciembre 1993-1994 Pag. 55-56.

MARTINEZ MEDINA JAVIER, Casos forenses en medicina legal. El ADN y sus aplicaciones forenses. No. 6. 1994

MOYA, PUEYO, VICENTE ROLDAN GARRIDO, BERNABE Y SANCHEZ JOSE ANTONIO. Odontología legal y forense. Barcelona. Editorial Mansson, 1994.

PAREJA CARDONA RUBEN DARIO, Revista Policía Nacional de Colombia. Bogotá El ADN en la investigación criminal. Volumen 218. Enero, Abril. Página 54 - 55 , de 1992 .

RAMOS, M.D. Amplifying dinucleotide microsatellite loci from bone and tooth samples of up to 5000 years of age: more inconsistency than usefulness. Journal of Forensic Science. January 13, 1995.

RODRIGUEZ, JOSE VICENTE. Odontología forense. Bogotá. Ecode Editores. 1995.

SANCHEZ, ENRIQUE, MONGE. NICOLAS, JOUVE. Genética. Ediciones Omega S.A. Barcelona, 1989.

SCHMITT, CORNELIA. Institute for forensic medicine, Universitat zu Köln, Melatengürted 60 – 62, D – 50823 Köln. Five cases of forensic short tandem repeat DNA typing, 1998.

SUAREZ, TORIBIO LUIS R. La estomatología forense en situaciones de desastres. Odontología legal. Habana, Cuba. Forensis Dentistry in Disasters.

SWEET, DAVID. PCR – Based DNA Typing of Saliva Stains Recovered from Human Skin. Journal of Forensic Science, 1997.

VARGAS, EDUARDO. Medicina Legal. Tercera Edición. Editorial Lehmann. San José de Costa Rica, 1983.

WILLIAMS. J.C. ELLIOT. Bioquímica dental básica y aplicada. Editorial el manual moderno S.A. México, 1990.