

0949

7
503
T.2

TECNICA PARA IDENTIFICAR CADAVERES POR MEDIO DEL ADN EN PULPA DENTARIA HUMANA REALIZADA EN EL LABORATORIO DE GENETICA DEL INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES, SANTAFE DE BOGOTA, D,C., COLOMBIA.

**COLEGIO UNIVERSITARIO COLOMBIANO
COLEGIO ODONTOLOGICO COLOMBIANO
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES**

Barbosa, F.,* Bernal, S.,* Fonseca, P.,* Junco, D.,* Moreno, E.,* Tilaguy, Y.,* Paredes, M., Revelo, I.,*****

RESUMEN

Entre 1883 y 1889 Weisman, uno de los citólogos precursores de la teoría cromosómica de la herencia emitió la continuidad del plasma, en el 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 ácidos nucleicos: el ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN, esta molécula base de la vida, con capacidad de autoreplicarse 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, un 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 extraer el ADN de la muestra. Cotidianamente el ADN se puede identificar en muestras de sangre, semen, tejido, hueso, pelos, saliva, orina y pulpa dentaria. Esta técnica adquiere mayor valor en casos en que la integridad física de los cuerpos se encuentre muy afectada.

ms-10-7-1

INTRODUCCION

Desde hace mucho tiempo se ha trabajado en la identificación de cadáveres mediante diferentes técnicas y una de ellas es la identificación dental, más específicamente la que se realiza por medio de la extracción del 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 esta técnica. Este estudio es importante porque le 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. La investigación pretende dar a conocer a docentes y estudiantes del Colegio Odontológico Colombiano la técnica empleada

actualmente en Colombia para identificación del ADN en pulpa dentaria humana.

Las formas de identificación pueden ser comparativas y reconstructivas, las clases de identificación son fehacientes y complementarias entre otras clases de identificación se encuentran examen del individuo vivo, examen del individuo muerto, marca de dientes y mordeduras, identificación dactilar, identificación serológica, necroidentificación radiológica. En el informe de criminalística de la Fiscalía General de la Nación en Junio de 1997 y Junio de 1999 se concluyó que la mayor causa de muerte era por homicidios. El cuerpo técnico de investigación (CTI) utiliza identificación por ADN nuclear y mitocondrial, también se utiliza fotografía judicial, tecnología para el análisis balístico forense. La medicina forense trabaja con Dactiloscopia, Odontología, Patología, Antropología, Fotografía, ADN.

Entre 1883 y 1889 Weismann, uno de los citólogos precursores de la teoría cromosómica de la herencia emitió la continuidad del plasma general, 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 eran las proteínas y no los ácidos nucleicos con sede en el núcleo. El ADN es la molécula base de la vida, con capacidad de autoreplicarse, éste está configurado por dos cadenas de nucleótidos que se enrollan sobre sí mismo formando una especie de escalera en caracol, parece probable que la vida en sí empezará 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 ácidos nucleicos, el ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN como portador de la información genética, se transmite de padres a hijos, tiene una gran estabilidad en el medio ambiente, se encuentra en todos los núcleos celulares y es como una huella dactilar genética específica para cada persona.

El objetivo general es describir la técnica para la identificación de cadáveres por medio del ADN en pulpa dentaria humana realizado en el laboratorio de genética del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Santafé de Bogotá, Colombia.

MATERIALES Y METODO

El tipo de estudio es descriptivo, el objeto de estudio es la técnica de identificación de cadáveres por medio del ADN de pulpa dental humana. Una vez aprobado el protocolo en el Instituto de Medicina Legal se programó el día para hacer el procedimiento de obtención del DNA. Se realizó en el laboratorio de genética del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. La demostración la hizo el asesor científico con la participación directa de los investigadores, la filmación la realizaron los investigadores y la fotografía la realizó un fotógrafo profesional.

RESULTADOS

- **Limpieza y pulverización.** La muestra se obtuvo de un molar inferior al que se le realizó limpieza

con un detergente no abrasivo, utilizando un cepillo de dientes y una lija. Se desinfectó con alcohol y con ayuda de un micromotor se hizo un corte dividiendo la corona de la raíz, colocada en un soporte metálico, se trabajó en una cabina de flujo laminar, posteriormente, la raíz se colocó dentro de un tubo impactador, luego se llevó la muestra dentro del pulverizador de nitrógeno líquido por unos minutos hasta que se pulverizó completamente, a una temperatura de 130°C a 140°C.

- **Extracción orgánica del ADN.** Se utilizan solventes orgánicos como el TRIS EDTA. Se lava el polvo en un tubo de ensayo agregándole el EDTA y se agita para hacer la exposición del calcio, cristales y minerales, se centrifuga y el sobrenadante se descarta. Se realizan cuatro a cinco lavados hasta que las células queden libres de sales. Con el nuevo material, se realiza la digestión enzimática con el detergente TWIN 20 que desestabiliza las membranas celulares, se le agrega proteinasa K para inhibir las ADNazas. Con este proceso se garantiza que las células se han roto quedando libres otros componentes como las proteínas. El ADN se va purificando a medida que las proteínas desaparecen de la matriz digerida, esto se logra a partir de solventes orgánicos, como el fenol, cloroformo, alcohol isomilico. Se le agrega un volumen de 300µL de fenol, se agita durante 30 seg., se centrifuga por 10 min. a 12.000 rpm. Da como resultado una fase fenólica inferior amarilla y arriba una fase acuosa transparente. El ADN que queda como fase acuosa se agita

nuevamente y se centrifuga y por diferencia de densidades se decanta. Este proceso se repite descartando el fenol y diluyendo cada vez más para obtener una muestra más pura, luego la muestra se pasa a tubos con forma de bala, los cuales tienen una membrana, se centrifugan, quedando una gota sobre la membrana. Se coloca agua estéril para limpiar, se invierte el tubo y se lleva a centrifugar. La gota cae y es recogida en el resto del tubo, quedando alrededor 30, 50 a 100µL de la muestra.

- **Amplificación por PCR.** Nuevamente se trabaja con flujo laminar donde se le agrega a la muestra polimerasa, nucleotidos. Allí ocurre la replicación de la muestra y se lleva al laboratorio de amplificadores donde se pasa al procesador automático del ADN que realiza la electroforesis. Una vez cortado el ADN en múltiples fragmentos, se separan en un gel de agarosa. Los fragmentos de menor longitud (menor número de bases) migran a mayor distancia que los más largos mediante un proceso eléctrico, apareciendo los resultados como bandas en gel de agarosa.
- **Electroforesis.** Se sumerge el gel en una solución de bromuro de etilo, sustancia que se une a los puentes de hidrógeno que enlazan los nucleotidos de la doble cadena, lo que permite la visualización de las bandas a la luz ultravioleta. Esta interpretación se logra en la base de datos del computador.

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 (un alelo) y heterocigoto (dos alelos); si es heterocigoto se observan dos bandas, cuando hay una filiación se comparte un mismo alelo a la misma distancia, cuando no lo comparten en el mismo nivel o a la misma distancia, existe la exclusión (se identifica que no son familiares).

- **Interpretación y control de resultados.** Los resultados se pueden obtener en forma de gráficas en bandas o en picos, así un homocigoto representa un sólo pico y un heterocigoto dos picos.

CONCLUSIONES

- El proceso de limpieza y pulverización es imprescindible para evitar contaminación de la muestra.
- La extracción orgánica del ADN garantiza la separación de las cadenas de nucleótidos del ADN del resto de las proteínas.
- La amplificación establece la diferenciación de cada gen facilitando que se pueda realizar el análisis de más 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, NORTHROP 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 Autodefensas culpables de genocidio*. Pág. 7,8,34,34,35,37. 2000.

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

GINTHER CHARLES, ISSELTARVER, LAURIE. KING, MARY-CLAIRE. Identifying individuals by sequencing mitochondrial ADN from teeth. *Nature Genetics, Journal of Forensic 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 with 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.

SHMITT, 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. Forensic 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.