

R. 3. 685

Fol. 01. 340. 6
COP

BIBLIOTECA UCM



5309143635

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

**IDENTIFICACION DE CADAVERES CALCINADOS Y EN
GRANDES CATASTROFES:
APLICACION DE METODOS ODONTOLOGICOS ACTUALES.
IMPORTANCIA DE MARCADORES GENETICOS EN TEJIDO
DENTAL**



TESIS DOCTORAL

Juan López Palafox.

Madrid 1996



FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Plaza de Ramón y Cajal, s/n.

Ciudad Universitaria

28040 MADRID

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DEPARTAMENTO DE PROFILAXIS,
ODONTOPEDIATRIA Y ORTODONCIA

PROF: DR. D. JUAN ANTONIO CERON VIVANCOS, TITULAR INTERINO DE ESCUELA UNIVERSITARIA. DEPARTAMENTO DE PROFILAXIS, ODONTOPEDIATRIA Y ORTODONCIA. FACULTAD DE ODONTOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID .

C E R T I F I C A : Que ha dirigido el trabajo realizado por D. Juan López Palafox, titulado " IDENTIFICACION DE CADAVERES CALCINADOS Y EN GRANDES CATASTROFES: APLICACION DE METODOS ODONTOLOGICOS ACTUALES. IMPORTANCIA DE MARCADORES GENETICOS EN TEJIDO DENTAL " y que reúne en mi opinión, méritos suficientes para optar al grado de Doctor en Odontología por la Universidad Complutense de Madrid .

Y para que así conste y surta los efectos oportunos , firmo el presente certificado en madrid, dos de febrero de mil novecientos noventa y seis .

Fdo.- Prof. Dr. Juan A. Gerón Vivancos
Director de la Tesis Doctoral

*A mi mujer y mis hijas:
Su estímulo y paciencia han hecho posible este trabajo.*

*A mi sobrino Alberto:
Médico vocacional y "Gran Chaman" de la familia.*

AGRADECIMIENTOS:

A mi Director de Tesis por su ayuda .

*A Lourdes y Eduardo, mis grandes
colaboradores en las investigaciones realizadas.*



**A todos aquellos, y especialmente mis compañeros,
que dedican su tiempo a la difícil tarea de restituir a los
muertos su identidad.**

INDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	3
2. JUSTIFICACION	10
3. OBJETIVOS	18
4. FUNDAMENTOS	20
4.1. NO ODONTOLOGICOS	24
4.1.1 Reconocimiento Directo.	24
4.1.2. Documentos, prendas y objetos.	25
4.1.3. Estudios antropométricos, tatuajes..	25
4.1.4. Dactiloscopia.	26
4.1.5. Estudio Interno del cadáver	27
4.1.6. Estudios analíticos.	27
4.1.7. Radiología.	31
4.2. ODONTOLOGICOS	31
4.2.1. Odontograma	31
4.2.2. Extracción de maxilares.	33
4.2.3. Prótesis	35
4.2.4. Radiología oral.	37
4.2.5. Craneometría y Dentometría.	41
4.2.6. Fotografía oral.	48
4.2.7. Superposición de imágenes	49
4.2.8. Marcadores genéticos en el diente.	55
4.2.9. Estudio del ADN en diente	60
Tipos de muestras.	64
Técnicas de análisis	69
Análisis por PCR	70
Investigación de muestras críticas	74
5. MATERIAL Y METODO	84
5.1. MUESTRAS	85
5.1.1. Grupos experimentales	85

5.1.2. Casos forenses aislados	85
5.2. INSTRUMENTAL	88
5.3. METODO	90
5.3.1. Grupos experimentales.	90
Obtención de la muestra	91
Extracción del ADN.	91
5.3.2. Grupo de casos forenses	95
5.3.3. Método estadístico	98
6. RESULTADOS	101
7. DISCUSION	111
8. CONCLUSIONES	117
9. RESUMEN	120
10. BIBLIOGRAFIA	123
11. ANEXOS:	141
(Tablas y gráficos)	

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION.

En los grandes siniestros, fundamentalmente en los accidentes aéreos además de los grandes destrozos que presentan los cuerpos, habitualmente se produce una calcinación total o parcial, por los incendios que siguen al siniestro, o que son consecuencia del mismo.

Los investigadores tienen problemas para identificar los cadáveres calcinados, que aparecen en casos aislados o en desastres en masa. La destrucción corporal puede ser tan grande que únicamente las piezas dentarias sirven para la investigación de la identidad.

La identificación de víctimas en estas circunstancias se hace principalmente por métodos odontológicos (López, 1992). En el accidente aéreo ocurrido en las proximidades de Mejorada del Campo (Madrid) el día 27 de Noviembre del 83 fallecieron 184 personas. De las 160 identificadas, 74 lo fueron por métodos odontológicos, al constituir las piezas dentarias los elementos mejor conservados y con mejores condiciones para su estudio comparativo con datos ante-mortem.

Las 24 víctimas no identificadas entonces, quedaron definitivamente como cadáveres anónimos.

En los desastres en masa es habitual comprobar que no todos los cuerpos se pueden identificar por los procedimientos habitualmente empleados. En Tenerife, en 1972, tras el accidente ocurrido a un avión de Spantax en las pistas del aeropuerto de Los Rodeos, de 165 víctimas, 49 no se pudieron identificar. También en Tenerife, el resultado de otro accidente ocurrido en 1980 a un boeing de la compañía británica Dan Air, fue de 146 muertos, de los cuales 28 no se identificaron. Bilbao 1985: de 146 víctimas, registradas tras el siniestro de un avión de Iberia, 6 permanecen sin identificar. Sobre la localidad escocesa de Lockerby, en Diciembre de 1988, un aparato de la Compañía Pan Am sufrió un atentado en pleno vuelo. Fallecieron 270 personas, de las que no fue posible identificar a 11, pese a los métodos avanzados que se emplearon (Gilchrist, 1992). En Septiembre de 1989 un avión de la Compañía UTA se estrelló en el desierto del

Teneré. Del total de 159 víctimas, 42 quedaron sin identificar (Lecomte, 1992).

La aplicación sistemática de métodos odontológicos en las identificaciones permiten alcanzar los mejores resultados. Solheim (1992), compara las investigaciones realizadas en los siniestros de dos navíos, donde la característica fundamental fue la destrucción por el fuego, dependiendo de la participación de odontólogos, y demuestra cómo los métodos dentarios mejoran los resultados positivos, que pueden alcanzar el cien por cien de resultados positivos.

En la identificación de cuerpos calcinados cobra especial relevancia el método odonto-estomatológico. En trabajos publicados anteriormente sobre cadáveres calcinados (Cerón, 1993) ya describíamos la utilidad de los elementos dentarios, aunque no existan datos ante-mortem procedentes de profesionales. Las condiciones de resistencia del macizo maxilo-craneal permite estudios complementarios, que incluyen la radiografía oral y posterior superposición de imágenes.

Todos los autores coinciden en la necesidad del equipo multidisciplinario, para los trabajos de identificación de víctimas después de un siniestro, donde los resultados son la fragmentación y la calcinación. Incluyendo de forma sistemática al radiólogo (Hazebroucq, 1991)

La necroidentificación se realiza de acuerdo con un plan perfectamente diseñado, mediante técnicas **No Odontológicas**, y por técnicas **Odontológicas** (Rioboo, 1985) incluyen la totalidad de las especialidades de la odonto-estomatología. Los procedimientos odontológicos habitualmente, comprenden una comparación de datos obtenidos post-mortem con los recogidos en las historias clínicas del odonto-estomatólogo.

Sin embargo, existen numerosos casos en los cuales, a pesar de obtener elementos suficientes para el análisis odontológico post-mortem, la ausencia de antecedentes ante-mortem, dificultan el éxito de la investigación. Esta puede ser la causa de alguno de los

cadáveres no identificados que hemos comprobado en los siniestros y hallazgos aislados analizados (López, 1992).

Cuando esto ocurre, podemos recurrir a otros procedimientos complementarios. La comparación de imágenes obtenidas de los restos cadavéricos con fotografías ante-mortem, en las que aparecen los dientes del sector anterior, aplicando procedimientos de superposición de imágenes, constituye una técnica efectiva. McKenna (1984), sostiene la necesidad de observar los dientes en las imágenes comparativas para disponer de un elemento fácil de medir en condiciones ante y post-mortem. Bastian (1986), defiende el mismo método para evitar los errores de magnificación que se dan en otras técnicas de superposición.

EVOLUCION HISTORICA DE LA ODONTOLOGIA FORENSE

La utilidad de la Odontología como ciencia forense está reconocida desde el Primer Congreso de Medicina Legal celebrado en La Habana en 1946 (Luntz, 1977).

La identificación dental aparece en casos aislados a través de la historia escrita y pueden haberse usado en tiempos prehistóricos formas primitivas de identificación dental. El interés en la Odontología Forense aparentemente se elevó en la última parte del siglo XIX.

Posiblemente, el primer caso formalmente recogido en la historia es el narrado por el escritor romano Dion Casio, que cita como Agripina, madre de Nerón reconoció la cabeza de una mujer muerta por orden suya, mediante la observación de su dentición.

Se consideró al americano Paul Revere, como el precursor de la Odontología Forense, ya que habiendo realizado un puente fijo al Dr. Joseph Warren, que murió durante la guerra de Independencia americana, lo identificó un año más tarde, mediante los trabajos por él mismo realizados (Luntz, 1977).

Según describen Raffa y Evenot (1989), una fecha trascendental para la Odontología Forense es el año 1897. El 4 de Mayo, se reunían en el "Bazar de la Caridad" lo más destacado de la

sociedad parisina de la época. Lo hacían cada año para coleccionar fondos que destinarían a obras de caridad. Aquel día se habían reunido alrededor de 1500 personas. En uno de los recintos se iba a proyectar unas escenas de cinematógrafo, principal atracción del año. En la cabina el operador se disponía a poner en funcionamiento su máquina. Tenía una bombona de eter, que en un momento y de forma inesperada se incendió, propagándose de forma vertiginosa por la sala. El pánico cundió entre los asistentes. Todo ardía a los veinte minutos. El resultado final del siniestro fueron 126 víctimas mortales.

Los cuerpos de las personas muertas fueron llevadas para su identificación al Palacio de Industria. La identificación resultó muy difícil, por las mutilaciones y quemaduras que presentaban.

Algunos cuerpos fueron identificados por sus vestimentas o joyas de las que eran portadores, pero otros no pudieron ser identificados. Entre los cadáveres sin identificar se encontraba la Duquesa de Alençon, hermana de la Emperatriz de Austria. Los médicos forenses no podían concretar las identificaciones por las destrucciones corporales que presentaban. Sin embargo, los maxilares y dientes permanecían intactos y con perfectas condiciones identificativas. El Doctor Davenont, dentista de la duquesa fue llamado para realizar su identificación dentaria, cosa que logró mediante la comparación con sus fichas de registro clínico (Raffa, 1989).

Raffa, . y Evenot , señalan en el mismo trabajo, que , con anterioridad a este suceso, únicamente se consideraba de valor legal, para la identificación forense, la certificación de los médicos forenses. El Procurador de la República, autorizó la exhumación de cadáveres y por primera vez en la historia de Francia, una identificación a través de los elementos dentarios era reconocida como de valor Legal.

Aunque estas identificaciones fueron realizadas por los Doctores franceses Davenont y Braut, fueron revisadas y analizadas por Oscar Amoedo. Entre las conclusiones que alcanzó, estaban la necesidad de un sistema internacional para la señalización de datos dentarios, con una unificación de la nomenclatura.

Amoedo ha sido llamado "El padre de la Odontología Forense", incorporando muchos de los conceptos de identificación dental empleados actualmente. Es autor del libro "L'art Dentaire en Médecine Forense", publicado en francés en 1898 y alemán en 1899.

El presente de la necroidentificación en general, y de la investigación odontológica en particular, lo constituye el estudio del ADN. El descubrimiento de los marcadores genéticos polimórficos constituye el inicio de una nueva etapa en la biología forense. La Sociedad Internacional de Hemogenética Forense publicaba en 1991 normas y consejos para el análisis de polimorfismos del ADN (Carroll, 1992).

En Enero de 1992 se estrelló un airbus en las proximidades de Estrasburgo. De las 89 víctimas, fueron identificadas 87 plenamente. La aplicación de técnicas de PCR para la amplificación genética de los loci HLA DQalfa y D1S80, permitió identificar a 17 personas. Sin embargo, según describe en su trabajo Bertrand Ludes (Ludes, 1992), dos cuerpos no pudieron ser investigados, atribuyendo el resultado negativo al estado de carbonización que presentaban.

La investigación de marcadores genéticos obtenidos del interior de los conductos radiculares abre nuevas vías de investigación de la identidad de cadáveres con grandes destrucciones o quemados. Brion C. Smith, (1993) muestra las posibilidades que presentan las muestras procedentes del interior de tejidos dentarios para el análisis de DNA genómico o mitocondrial.

En los cadáveres calcinados, o cuando la falta de elementos ante-mortem dificulta otros procedimientos tradicionales, la investigación de marcadores genéticos y en última instancia el estudio de ADN permite alcanzar un resultado óptimo. En casos extremos, a pesar del hallazgo de restauraciones suficientes para realizar un estudio comparativo completo en un cadáver calcinado, no es posible por la ausencia de esos datos ante-mortem, que deberían proceder de un odonto-estomatólogo, siendo necesario recurrir a estudios

complementarios, como se indicaba anteriormente.

El futuro de la odontología forense se apoya en la investigación del ADN mitocondrial y nuevas técnicas del ADN genómico en general.

Lorente y colaboradores (Lorente, 1994) señalan que el futuro de la identificación médico-forense se apoyará en el análisis de ADN mitocondrial procedente de pulpa dentaria, lugar de especial interés, según manifiestan los autores en su trabajo, por ser una cavidad cerrada que conserva perfectamente su contenido.

Las técnicas más avanzadas pasan por la determinación de los cromosomas **X e Y** para determinación de sexo en casos extremos como describen Angel Carracedo y Carmela Pestoni (Carracedo, 1995). En el mismo trabajo los autores citan la utilidad del ADN mitocondrial, pero señalan el aspecto negativo de que al ser heredado unidamente de la madre, limita las posibilidades de investigación positiva, aunque por el contrario recuerdan que en cada célula hay una gran cantidad de copias idénticas de ADN mitocondrial (ADNmt) y hay más posibilidades de que algunas de ellas estén conservadas en muestras degradadas.

2. JUSTIFICACION

2. JUSTIFICACION

En muchos casos aislados y de forma generalizada, en los desastres en masa, los cadáveres sufren grandes destrucciones, por el efecto mecánico del impacto causante de las lesiones y por la acción del fuego que acompaña a estos sucesos.

En los accidentes aéreos, tras el impacto, se produce la explosión de los depósitos de combustible del aparato. Las lesiones en los casos de explosión son provocadas por tres mecanismos diferentes, que frecuentemente se asocian (Albi, 1983):

A) Fenómeno de pulverización, a nivel de las interfases líquido-gas y, sobre todo, a nivel de la pared alveolar.

B) Fenómenos de explosión a nivel de los órganos huecos, debido a un aumento de presión de los volúmenes gaseosos.

C) Fenómenos mecánicos de transmisión de la onda de choque, a través de las paredes torácica y abdominal.

Además aparecen lesiones asociadas: traumáticas, secundarias a la proyección de materiales diversos, lesiones tóxicas y lo más importante en nuestro caso concreto, carbonización.

Los cuerpos carbonizados presentan entre otras las siguientes características de interés para nuestro trabajo (Basauri, 1961):

.- La piel se endurece y puede estallar en forma de hendiduras irregulares, luego se pone negra, seca y quebradiza.

.- Cuando la carbonización es muy avanzada se produce la abertura de la cavidad torácica, de la craneana y algunas veces hasta de la abdominal.

.- Los huesos se separan a nivel de las articulaciones, hallándose frecuentemente fracturados y carbonizados.

.- Los miembros y manos se acortan, de dos a tres veces con respecto a su tamaño natural.

.- La cabeza de un adulto llega a revestir la apariencia de la

de un niño de 7 a 12 años.

Cuando la intensidad del fuego es alta, al intentar examinar los restos, éstos se pueden convertir en cenizas. Además en estos casos, datos de información, como son ropa, documentación y otros objetos desaparecen.

Cuanto más grande es el daño producido por el fuego, más importante se hace el papel de la Odontología Forense. En situaciones extremas, los métodos habitualmente utilizados para necroidentificación son insuficientes, debiendo recurrir a técnicas analíticas más avanzadas.

Justificamos nuestro trabajo porque:

1.-Las propiedades físico-químicas de los dientes, les permiten resistir temperaturas muy elevadas antes de su destrucción.

Según describe Basauri (1961), a los 175° C. comienzan a aparecer algunas lesiones longitudinales en incisivos y caninos. A los 400° C. puede haber estallido de coronas de forma espontánea. A los 800° aparece disminución de volumen en las raíces. A los 1100° C. el esmalte puede presentar algunos túbulos ensanchados, pero visibles con técnicas especiales.

El cemento se destruye alrededor de los 500° C. El esmalte puede soportar temperaturas entre 700° C. y 900° C. antes de su destrucción, dependiendo de la pieza dental de que se trate. La dentina preservada en las proximidades de estructuras canaliculares internas puede soportar temperaturas superiores. Entre los 1000°C. y 1300°C. grados, las estructuras dentales se transforman en una sustancia atípica, con formación de aspecto globular. Sin embargo observados los residuos, mediante el empleo de un microscopio electrónico, todavía pueden guardar elementos de interés en las investigaciones forenses (Harsanyi, 1975) .

En los grandes quemados, la cámara pulpar se conserva perfectamente aislada del exterior, pudiendo soportar temperaturas

externas superiores a los 1000° C. antes de su destrucción. Nuestra experiencia nos ha permitido manipular restos dentarios de cadáveres que habían sido rociados con gasolina, quedando reducidos a cenizas en su casi totalidad, alcanzando resultados positivos en la identificación (Cerón, 1993; López, 1995).

2.- Resistencia de los dientes a los agentes químicos.

Ubelaker y Sperber describen la identificación gracias a técnicas radiológicas en un cadáver perteneciente a una persona que fue asesinada 9 años atrás y cuyo cuerpo fue sometido a la acción de un fuerte corrosivo con el fin de eliminar cualquier indicio, resistiendo los dientes a su acción destructora (Ubelaker, 1989).

3.- Propiedades mecánicas, que les hace resistir fuertes impactos, sin sufrir destrucción, o permitiendo su fácil reconstrucción y estudio.-

Elida Briñón dice, respecto al comportamiento de los tejidos orales, que los dientes conservan generalmente sus posiciones originales en sus alveolos, aunque algunas veces se aflojen.

Señala, que aunque en ocasiones, ante un fuerte impacto, el maxilar pueda partirse por su línea media, no dificulta su estudio. (Briñón, 1984)

4 - Los restos dentarios permiten su fácil manipulación y conservación, soportando la acción destructora del tiempo.

Furnes cita el hallazgo de dos molares en una tumba de Giza, con una antigüedad de 2.500 años a.C., que aparecían unidos por un hilo de oro, conservados correctamente (López, 1992).

5.- Los materiales de obturación y prótesis, también resisten temperaturas muy elevadas.

Los materiales empleados en Odontología restauradora, deben presentar la conveniente fortaleza, rigidez, dureza y resistencia a los agentes externos, para ser utilizables en boca (Combe, 1990).

Las puntas de gutapercha, al igual que otros materiales empleados en obturaciones, aunque tienen puntos de fusión relativamente bajos, al estar protegidos en la cavidad oral, resisten temperaturas que pueden sobrepasar los 1000°C. producidos por la combustión de gasolinas (López, 1995). (Ilustración núm. 1).

6.- El estudio del macizo cráneo-maxilar permite determinar con bastante aproximación la edad, el sexo y la raza del individuo.

Alvarez Losa y Cerón, en su trabajo sobre el tamaño dentario como discriminante racial concluyen que los individuos perteneciente al mismo grupo racial, tienden a presentar características, tanto métricas como descriptivas similares, estando condicionado el tamaño, más por el grupo, que por la talla del individuo en particular.

Otras particularidades dentarias individualizadoras, determinantes de una raza como puede ser el tubérculo de Carabell, pueden ser elementos determinantes de un grupo (Alvarez, 1991; Cerón, 1991.)

7.- La pulpa dentaria constituye un reservorio de proteínas plasmáticas con polimorfismo genético, fáciles de extraer.

La pulpa dentaria es una zona muy vascularizada, recibiendo vasos y nervios a través del orificio apical, aunque en algunos casos lo hacen también por agujeros accesorios (conductos colaterales), que clínicamente pueden participar en la etiología de lesiones endodónticas y periodónticas combinadas. Este plexo es el encargado de la nutrición de los odontoblastos. La mayoría de los investigadores apuntan un diámetro capilar de aproximadamente 7 micrometros(Davis, 1986).

En esta región se pueden localizar proteínas séricas con polimorfismo genético, que las hace útiles para su aplicación en técnicas identificativas. La extracción de muestras desde la pulpa, se puede realizar mediante procedimientos tan simples, como es la fracturación y molturación de la zona radicular del diente, o apertura longitudinal, y posterior de análisis de proteínas como la A2HS (López , 1994).

La fragmentación de la zona radicular para extracción de muestras y posterior extracción de proteínas o estudio de grupos sanguíneos presenta resultados totalmente positivos (Cerón, 1991)

Smith, B. y cols. (1993) analizan cuatro métodos diferentes de apertura de los dientes para investigación del ADN contenido en su interior: Describen la forma de aplastamiento de las piezas, que pese a la simplicidad del método ignora las localizaciones específicas del ADN dental.

El siguiente método se basa en la aplicación de técnicas convencionales de endodoncia. Su aprovechamiento depende de la morfología cameral, que puede resultar totalmente desbrida en el tratamiento.

El tercer método que describen consiste en una incisión longitudinal. Las formas irregulares de los conductos radiculares pueden ser negativas en este procedimiento.

Para estos autores el mejor procedimiento es el corte horizontal por la zona cervical, aprovechando la unión amelo-cementaria. Coincidiendo con otros autores, como Duffy et al. (1991) señala que este procedimiento es el menos agresivo para la morfología y estructura dentaria, pudiendo extraer las muestras en las mejores condiciones para su estudio. Sus estudios se realizan sobre dientes incluidos en al maxilar, no extraídos.(Duffy y Smith, 1993).

8.- Las muestras obtenidas de los conductos pulpo-radicales permiten la extracción y amplificación de ADN.

El material procedente de pulpa dentaria presenta ventajas

sobre otras muestras, por ser una cavidad cerrada que conserva perfectamente su contenido, rico en células con ADN genómico y mitocondrial, suficiente para su análisis (Lorente, 1994)

La pulpa dental esta protegida en la cavidad y fijada firmemente al hueso (Pöstch, 1992) Cuando el diente es extraído y sometido a temperatura ambiente se aprecia una rápida deshidratación de los tejidos pulpares. Esta desecación puede ser la explicación de las perfectas condiciones que presentan las muestras para la recuperación de ADN en muchos procesos de necrosis o putrefacción.

Potsch y col. (Pöstch, 1992) analizaron dientes sometidos a distintas condiciones de temperatura y posible degradación por el tiempo, a los cuales procedió a extraer ADN pulpar. Las cantidades obtenidas fueron válidas para sus investigaciones, pudiendo variar el procedimiento de amplificación dependiendo del volumen de la muestra. Estos autores describen el resultado positivo en tejido pulpar procedente de dientes en mandíbula fragmentada y una antigüedad de 15 años.

El mismo autor investigó muestras dentarias en distintas condiciones y obtuvo en sus resultados cantidades de ADN que variaban de los 6 a 50 microgramos. Estas cantidades son suficientes para la amplificación de VNTRs y por supuesto para el análisis mediante técnicas de PCR, donde la cantidad necesaria es menor. (Pötsch,1992).

Smith (1993) con una muestra de diez pares de dientes obtenidos de ambos sectores maxilares, procedentes de pacientes de distintas edades y sometidos a temperatura ambiente en diferentes espacios de tiempo, obtuvo cantidades que variaban de los 0,67 a los 38,54 microgramos de ADN absoluto humano.

En nuestras investigaciones sobre restos cadavéricos que fueron expuestas en el Congreso de Ciencias Forenses de Querétaro (Méjico) en 1994, con excepción de los restos que habían sido sometidos a temperaturas muy elevadas durante largo tiempo, alcanzando la destrucción externa de la corona, o algunos restos cadavéricos que habían permanecido enterrados, se obtuvieron

cantidades superiores a los cinco microgramos. En muestras recientes las cantidades superaron los treinta microgramos, incluyendo dientes cariados.



Ilustración num. 1. Las raíces que se muestran sirvieron para identificar a un cadáver totalmente carbonizado, gracias a las puntas de gutapercha que aparecieron en algunas piezas y que fueron radiografiadas posteriormente.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS.

1.- Comprobar que la aplicación de sosa caustica en ebullición sobre restos cadavéricos, procedentes de un siniestro, o en casos aislados, no dificulta la extracción de ADN pulpar.

2.- Probar la posibilidad de extraer ADN de tejido radicular, en dientes sometidos a temperatura de 200°C. durante 15 minutos.

3.- Confirmar la investigación positiva de ADN en dientes extraídos a cadáveres carbonizados, o con grandes traumatismos en cadáveres recientes.

4.- Evidenciar la importancia de procedimientos odontostomatológicos habituales, como son el estudio radiológico y las prótesis, para la necroidentificación en cadáveres calcinados o con grandes destrucciones corporales.

4. FUNDAMENTOS

4. FUNDAMENTOS.

El resultado final de las grandes catástrofes son los daños humanos. Una característica de las víctimas resultantes es la fragmentación y frecuentemente la calcinación.

La calcinación se viene haciendo rutinaria en muchos cadáveres que se investigan de forma aislada.

La aplicación de las tecnologías más avanzadas a los fines destructores que se persiguen en los conflictos bélicos o en casos de atentados terroristas aislados, cobra importancia en la investigación de los cuerpos quemados.

El caso más extremo al que se puede llegar es la explosión de una bomba atómica. La explosión de las Bombas de Hiroshima y Nagasaki, originó una esfera de fuego que, una diezmilésima de segundo después de estallar alcanzó una temperatura de 300.000°K . Una décima de segundo después, alcanza una temperatura de 2.000 ; tres décimas de segundo después sube cerca de 7.000°K . y un segundo después la temperatura es de 6.000°K . (Mirabet, 1979).

Respecto a incendios no provocados, debemos recordar el accidente de Los Alfaques en la provincia de Castellón, que describe Mirabet en su tratado sobre quemados. El 11 de Junio de 1977 explotó accidentalmente una cisterna que transportaba 43.000 litros de propano licuado. El incendio súbito que envolvió un camping en una nube burbujeante de 2.054 grados centígrados, causó 260 quemados, de los que la mitad murieron instantáneamente, totalmente carbonizados.

La necroidentificación tiende a resolver problemas de distinto tipo:

- 1.- Humanos, como es la propia identificación personal, permitiendo al hombre morir con la misma identidad que vivió.
- 2.- Legales, al resolver posibles conflictos de herencias o

situaciones familiares.

3.- Económicos, derivados de indemnizaciones, seguros, salarios,...

La identificación personal tiene bases fisiológicas y un fin jurídico. Para Muñoz Tuero existen cuatro formas de identificación (Muñoz, 1982):

1. Identificación judicial.
2. Identificación civil.
3. Identificación médico-legal.
4. Identificación odonto-legal.

El Código Civil Español establece un periodo de tiempo de diez años para decretarse el fallecimiento de una persona desaparecida. Este tiempo, no obstante, puede reducirse al mínimo de dos años, cuando existe certeza de la presencia de la víctima en el lugar del suceso antes de ocurrir el mismo.

La Ley de Enjuiciamiento Criminal, recoge en sus artículos 340 al 342 los procedimientos legales para realizar la identificación de cadáveres, que según lo articulado van del reconocimiento directo al estudio de objetos y documentos.

No obstante, lo descrito en la Ley es habitualmente insuficiente para obtener resultados positivos, debiendo recurrirse a análisis complementarios que permiten alcanzar los objetivos y que nos obligan a dividir los procedimientos de Necroidentificación, según el esquema que se describe más adelante.

La identificación de los restos cadavéricos en situaciones críticas, hace necesaria la existencia de un equipo multidisciplinario donde ha de figurar siempre un odonto-estomatólogo, experto en Odontología forense.

Así vemos como los países más modernos incorporan en sus estructuras la figura del profesional de la odonto-estomatología:

En Noruega, el Departamento de Justicia, estableció en 1975 la constitución de un equipo de Investigación de Catástrofes, dirigido por cuatro profesionales perfectamente tipificados: Dos oficiales de

Policía, expertos en necroidentificación. Un especialista en medicina forense y el cuarto miembro directivo, un odontólogo forense. La responsabilidad de este equipo es organizar y controlar todos los trabajos de necroidentificación de víctimas de desastres, con potestad para reclamar de los profesionales de la odonto-estomatología, cualquier dato de archivo ante-mortem, que sirva para lograr un resultado positivo, como pudieran ser originales de radiografías, odontogramas, etc.. (Solheim, 1977)



Ilustración núm. 2. La fotografía nos permite comprender los daños materiales y humanos que resultaron en el accidente ocurrido en Mejorada del Campo (Madrid), en Diciembre de 1983, con un saldo de 184 cadáveres.

METODOS GENERALES DE NECROIDENTIFICACION:

4. 1. NO ODONTOLOGICOS:

- 4.1.1 Reconocimiento Directo.
- 4.1.2. Documentos, prendas y objetos personales.
- 4.1.3. Estudios antropométricos, tatuajes..
- 4.1.4. Dactiloscopia.
- 4.1.5. Estudio interno del cadáver
- 4.1.6. Estudios analíticos.
- 4.1.7. Radiología.

4.2. ODONTOLOGICOS:

- 4.2.1. Odontograma
- 4.2.2. Extracción de maxilares.
- 4.2.3. Prótesis
- 4.2.4. Radiología oral.
- 4.2.5. Craneometría y Dentometría.
- 4.2.6. Fotografía oral.
- 4.2.7. Superposición de imágenes
- 4.2.8. Marcadores genéticos en el diente.
- 4.2.9. Estudio del ADN en diente

4.1.1.- RECONOCIMIENTO DIRECTO

Como decíamos en trabajos anteriores (López, 1992), el reconocimiento por familiares o conocidos es la forma más antigua y simple de las conocidas. No obstante, es fácil cometer errores de identificación de forma accidentada o intencional, por lo que el investigador debe corroborar fielmente los datos aportados por testigos. La identificación visual está cargada de errores, asociados normalmente al estado de nervios de los afectados (Busutil, 1990).

En este mismo sentido se expresa la Organización Internacional de Policía Criminal (Interpol, 1984), que en su punto 2.2

señala el riesgo de utilizar sistemáticamente este método.

4.1.2.-DOCUMENTOS, PRENDAS Y OBJETOS PERSONALES.

Este procedimiento lo cita la Ley de Enjuiciamiento Criminal en su artículo 342.

Antes de retirar las ropas del cuerpo deben examinarse detenidamente, buscando fragmentos de vidrio, pintura, cabellos, o cualquier otro material que se considere de interés (Besant-Matthews, 1977). Este procedimiento también está sujeto a continuos errores por intercambios de objetos , o confusiones en el reconocimiento.

4.1.3.-ESTUDIOS ANTROPOMETRICOS, TATUAJES.

La antropometría constituye una ciencia conocida desde las épocas más remotas de la humanidad.

La craneometría nos facilita mediciones y estudios craneales, que determinan la edad aproximada, sexo, raza, caracteres de su civilización (Comas, 1983).

La antropometría permite dos tipos de análisis:

Rasgos generales: sexo, grupo étnico, edad aparente, estatura, constitución física, etc.

Rasgos específicos: son individualizadores, como verrugas, cicatrices, tatuajes, etc..

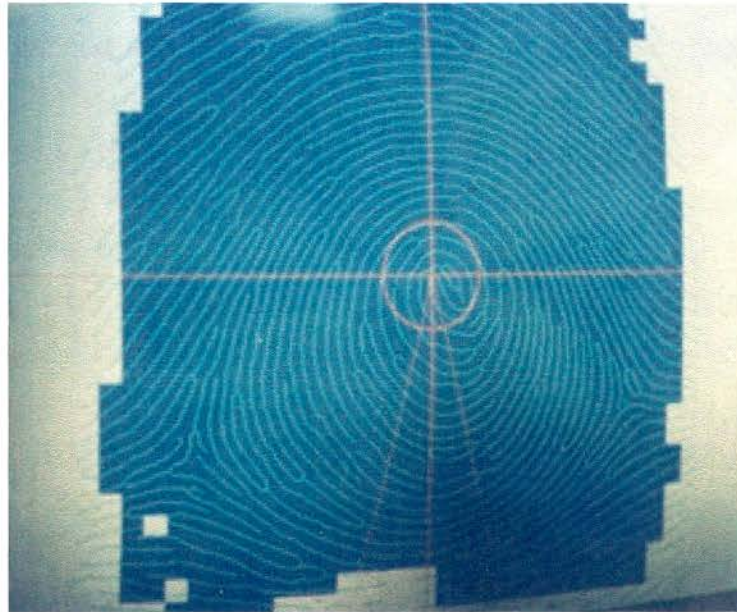
Los restos calcinados, deben analizarse con detalle, recordando que, durante la combustión, los elementos óseos sufren un acortamiento que llega en los huesos largos a un décimo de su longitud total (Sandoval, 1990).

Los tatuajes, desde el aspecto legal, son verdaderas cicatrices parlantes, resultado de pinturas hechas con agujas finas , que aportan datos de valor individualizador y porque proporcionan indicios sobre costumbres, o incluso profesión de los individuos (Gisber Calabuig, 1991).

1.4.- DACTILOSCOPIA

La dactiloscopia, está considerada como una técnica identificativa por excelencia.

La identificación se apoya, en que los dibujos formados por las crestas digitales, palmares y plantares son genéricas, perennes, inmutables, diversiformes, clasificables e imprimibles. (Lubian, 1975 y Antón , 1993).



Ilustracion núm. 3.- Los sistemas informáticos para la búsqueda automática de dactilares ha mejorado los resultados, pero el método es negativo en los cadáveres carbonizados.

La perennidad y la inmutabilidad del dibujo papilar fueron demostradas prácticamente por Herschel estudiando dibujos de un mismo dedo, obtenidos en diferentes épocas de la vida del individuo. Estos atributos fueron corroborados por científicos como Galton, Welcker, Henry y otros muchos. Las papilas dermicas se configuran entre los 100 y 200 días de vida intrauterina, alcanzando nitidez al sexto mes y perduran hasta muy avanzada la etapa de putrefacción, tras la muerte (Villanueva, 1991).

Sin embargo, en los cadáveres calcinados, este método resulta habitualmente infructuoso por las grandes destrucciones que se observan, que llegan a destruir totalmente los dibujos papilares.

4.1.5.- ESTUDIO INTERNO DEL CADAVER.

El estudio completo de las cavidades del cadáver debe ser una norma habitual, no solamente para determinar la causa de la muerte, sino para buscar particularidades que faciliten la identidad (Besant-Matthews, 1977).

4.1.6.- ESTUDIOS ANALITICOS. MARCADORES GENETICOS.

Es interesante la recogida sistemática de muestras corporales para su estudio.

Las muestras recogidas deben protegerse de acuerdo con las normas que dicta el Instituto Nacional de Toxicología (1987).

Aunque el análisis de DNA constituye el método definitivo para alcanzar la total identificación, puede ser interesante conocer otras técnicas más simples. Procedimientos sencillos que permiten la rápida exclusión son la determinación de grupo sanguíneo y el análisis de marcadores genéticos en general.

Clásicamente se han venido realizando estudios sobre muestras sanguíneas para determinación de grupo sanguíneo, mediante procedimientos de absorción-inhibición, absorción-elución, test de Lattes, test de acetato de celulosa de Howard-Martin (Robert,

1990). Las técnicas de aglutinación directa usando antisueros dan resultados erróneos porque las células sanguíneas están dañadas, y los cambios postmortem introducen numerosos artefactos.

El método de grupos sanguíneos, conocido desde comienzos de siglo, tras su descripción por Landsteiner, hasta nuestra época, ha evolucionado con el descubrimiento de nuevos sistemas, pero el ABO constituye el más investigado y el más utilizado como marcador genético en hemogenética forense (Cerón, 1991)

La presencia de antígenos del sistema ABO no está limitado a los eritrocitos, sino que puede encontrarse en la mayor parte de los tejidos y secreciones (Hartmann, 1941). Ha sido estudiado serológicamente en saliva, semen, leche, sudor, líquido amniótico y cerumen. La actividad del sistema ABO ha podido ser demostrada mediante laboriosas técnicas en pelos y uñas (Yada, 1969). También ha sido descrita en diferentes tejidos, como el muscular y el óseo.

La técnica de absorción elución en placa es de gran utilidad para estudiar el grupo sanguíneo en pulpa dental en cadáveres calcinados, por constituir los dientes un gran reservorio, fácilmente manipulable (Cerón, 1990).

En el plasma humano, también se pueden identificar las diferentes proteínas y enzimas con polimorfismo genético conocidas (Burtin, 1968), como son la proteína transportadora Gc. Asimismo, es posible separar y fenotipar la proteína plasmática alfa₂H_S, (también presente en zonas radiculares y tejidos dentinarios) y que junto a otras determinaciones puede servir para la individualización del cadáver (Lopez -Abadía, 1993).

Yuasa y Umetsu en 1988 pusieron de manifiesto la aplicación de los conocimientos de la A₂H_SG en el campo de la medicina forense. Encontraron un total de 15 posibles variantes genéticas. Su trabajo, constatado con los de otros investigadores, demuestra la importancia de la aplicación del polimorfismo de la A₂H_SG en el campo de la hemogenética forense. En sus investigaciones queda demostrada con la marcada variabilidad de los loci de la A₂H_SG, la formalidad del

fenotipado y la estabilidad en manchas de sangre, que garantizan resultados idóneos (Yuasa, 1988).

Los marcadores genéticos que se emplean actualmente para alcanzar la identificación personal los podemos agrupar según lo hacen Huguet Ramia y Carracedo Alvarez (Huguet, 1991):

1.- Sistema HLA. Forman parte del sistema mayor de histocompatibilidad descrito en el hombre y localizado en el cromosoma 6. Se estudian actualmente sus loci A, B y C. Se determinan mediante pruebas inmunológicas de microlinfotoxicidad.

2.- Antígenos eritrocitarios. Se encuentran en la superficie del hematíe. Fueron los primeros en describirse y se determinan mediante reacciones de aglutinación en presencia de antisueros conocidos. (MNSs, Rh, ABO, Kidd, Duffy, Kell, Lutheran,).

3.- Proteínas plasmáticas que cumplen funciones fisiológicas muy diversas. Actualmente se estudian fundamentalmente mediante técnicas de isoelectroenfoque. (Inmunoglobulinas- Locus Gm. Alfa-1-antitripsina, Proteínas Gc, Factor XIII, Orosomucoide, Haptoglobinas, Alfa 2 HS, glicoproteína, transferrina, Complementos C6 y C4..)

Estas proteínas tienen polimorfismo genético., como Globulina Gc:

Las globulinas Gc son glucoproteínas de la fracción electroforética, en la cual se sitúan también las haptoglobinas, ceruloplasminas y macroglobulinas. Su misión, aunque no bien conocida, se supone que es la de transportadora de vitamina D-3.

Para nosotros es importante porque presenta polimorfismo genético, con tres fenotipos denominados 1, 2 y 1-2, que corresponden a la combinación de dos alelos autosómicos Gc.1 y Gc.2. Estudios más selectivos demuestran que a su vez el alelo Gc.1, puede ser subtipado en otros dos: Gc. 1S y Gc. 1F (Las denominaciones S y F, vienen del inglés Slow-lento y Fast-rápido).

La técnica de isoelectroenfoque (IEF), permitió obtener la resolución necesaria en la banda 1, desdoblándose en estos dos tipos, que fueron visualizados con mayor nitidez al aumentar la separación

entre las dos bandas con la introducción de distintos espaciadores. La marca Pharmacia introdujo un equipo integrado de electroforesis, que utiliza microgeles y una distancia de electrodos muy pequeñas, para mejorar la distinción entre bandas (Alonso, 1987, Carracedo, 1988).

Así encontramos que podemos obtener al final seis fenotipos diferentes, resultantes de las combinaciones de los citados:

1S-1S	1F-1F
1F-1S	1S-2
1F-2	2-2.

4.- Otros marcadores enzimáticos eritrocitarios y leucocitarios:

Está formados por enzimas existentes en hematíes y leucocitos. Por su poca concentración precisa un tipo de revelado en el que interviene su actividad enzimática: Fosfoglucomutasa (PGM), Fosfatasa ácida (ACP), Transaminasa glutámica (GPT), etc..

La fosfoglucomutasa (PGM) es una enzima (fosfotransferasa), que cataliza la interconversión de la glucosa-1-fosfato a glucosa-6-fosfato, requiriendo la Glucosa-1,6- difosfato como factor junto con iones Mg^{++} . Transfiere el radical fosfato de la posición 1 a la posición 6.

Tiene especial relevancia en el metabolismo de los carbohidratos, haciendo que las moléculas de glucosa provenientes del almidón o glucógeno, entren en la vía glucolítica. Se encuentra presente en la mayor parte de los tejidos y fluidos corporales, incluyendo los glóbulos rojos, semen y secreciones vaginales.

Las enzimas PGM son polimórficas genéticamente y están determinadas por 3 loci autosómicos.

El locus 1 (PGM 1) está determinado por 4 alelos (1+; 1-; 2+; 2-), cuya combinación puede determinar 10 fenotipos. Este locus es el de mayor variabilidad genética y por lo tanto el más importante para nuestros estudios.

El locus 2 está determinado por un alelo muy común, para el cual somos homocigotos. Posee menor variabilidad.

El locus 3 está determinado por dos alelos y carece de importancia para nuestros estudios, puesto que no se detecta en células sanguíneas.

4.1.7.- RADIOLOGIA.

Desde el descubrimiento de las radiaciones de Roentgen en 1895, la técnica ha avanzado, hasta situarse en primera fila entre las ciencias forenses.

La superposición de imágenes radiológicas, siempre que sea posible encontrar imágenes ante-mortem, constituye una técnica individualizadora fundamental.

La importancia de la radiología se demuestra continuamente en los siniestros que se investigan.

Algunos investigadores han propuesto implantar sistemas de clasificación de las imágenes radiológicas de los senos frontales, por la individualidad absoluta que presentan (Asherson, 1965).

El profesor Ortega Lechuga, en su tesis doctoral de 1933, ya señalaba que no existen dos senos frontales que sean confundibles por la igualdad de sus características anatómicas.

4.2. ODONTOLOGICOS

4.2.1.- ODONTOGRAMA

Constituye el procedimiento más elemental de identificación por medio de los elementos dentarios.

El odontograma debe realizarse de acuerdo con las normas establecidas por la FDI, (Federación Dental Internacional) en evitación de errores derivados de la mala interpretación de datos (Griffiths, 1988).

La no observancia de estas normas puede provocar graves errores. En 1993, se recuperaron los restos esqueletizados de un supuesto excursionista encontrado en un bosque cercano a Knysna-Ciudad del Cabo (Sud-Africa). No había elementos que facilitaran su reconocimiento, salvo restauraciones dentales. El uso del FAX, como

medio de comunicación rápido, demostró sus limitaciones, por la mala calidad de la transmisión de unos datos, o la aparente repetición de otros. Sin embargo estos errores serían subsanables, empleando un sistema de dígitos, siempre observando las normas dictadas por la FDI (Phillips , 1993).

Un complemento de utilidad para la comparación de datos dentarios obtenidos de cadáveres es la ayuda de un sistema de archivo Ante-Mortem informatizado, que facilite la búsqueda inmediata. En Estados Unidos se ha ensayado con éxito la utilización en situaciones de catástrofes el sistema CAPMI, que permite recoger la totalidad de circunstancias dentarias, de una forma muy sencilla. (Lorton, 1989)

La ficha odontológica debe recoger la totalidad de los datos respecto al paciente y patologías de partes blandas y duras, así como todo lo relacionado con circunstancias relacionadas con la oclusión si se conoce, dientes fracturados tras el accidente, hallazgos radiológicos de cualquier tipo, y se debe hacer extensivo a otras partes de la cara y cabeza.

Con frecuencia se descubre la ausencia de datos ante-mortem en cadáveres con numerosos tratamientos restauradores. En otras ocasiones aparecen odontogramas procedentes de la clínica, que solamente registran parcialmente los tratamientos realizados.

Por tanto la historia clínica debe contener todos los tratamientos continuados que realiza el profesional.

El Departamento de Medicina Legal, del Nihon University School of Dentistry de Tokyo-Japón, realizó una experiencia con sus alumnos, en un lapso de 5 años, para comprobar las variaciones que sufrían los distintos dientes en los tratamientos continuados, que se deben tener en consideración en la investigación de cadáveres.

Se realizaron 6000 registros (una hemiarcada), correspondientes a 1000 estudiantes (740 varones y 260 hembras), anotando las variaciones sobre dientes intactos, cariados, tratados y dientes artificiales.

Los dientes de sector anterior, tendían a permanecer intactos.

El primer premolar, variaba considerablemente, de intacto a extraído, mientras que el segundo premolar, pasaba de intacto a tratado. Los primeros molares variaban de intactos a ausentes. Los segundos molares sufrían cambios muy diferentes (Kawakami ,1994).

Este autor, demuestra en su investigación que el estudio comparativo entre los hallazgos en el cadáver y los datos del odontograma, puede estar destinado al fracaso, cuando no se han anotado en el odontograma todas las incidencias existentes, fundamentalmente cuando varios profesionales realizan tratamientos en diferentes momentos de la vida del paciente. Es incesario buscar la última historia clínica actualizada.

Es importante la determinación de tratamientos restauradores que puedan ayudar a la identificación, mediante comparación con historia clínica antemorte. En casos extremos técnicas de laboratorio insospechadas, pueden servir para obtener el resultado positivo. El Departamento de Antropología de Ontario, explica sus trabajos, realizados sobre coronas y fragmentos radiculares, recogidas entre restos cadavéricos, reducidos a cenizas, que después de ser analizados mediante un microscopio electrónico, confirmaron la presencia de estriaciones paralelas en el esmalte dental y dentina, como medio para identificar una restauración antigua, coincidente con los datos obtenidos ante-mortem de la persona desaparecida, reflejados en el odontograma realizado en la clínica dental (Fairgrieve , 1994).

4.2.2.- EXTRACCION DE MAXILARES.

La extracción de maxilares puede ser necesaria para estudios posteriores. Aunque algunos autores defienden la extracción sistemática, no siempre será necesaria esta práctica, que realizará un médico forense, con la anuencia de la Autoridad Judicial.

Existen distintos métodos para lograr la extracción. Luntz, (1973) describe una forma, realizando incisiones en forma de "V" desde las comisuras labiales. Luego se retrae el tejido blando y se cortan las ramas ascendentes de la mandíbula. Después de retirar la mandíbula,

se libera el maxilar superior, mediante una sierra eléctrica o con cincel. Stimson o Whittaker, lo hacen cortando la mandíbula por las ramas ascendentes con lo cual facilitan las maniobras de extracción. (Ver ilustración número 4).



Ilustración número 4.- Los maxilares, una vez extraído deben ser fotografiados correctamente, para su estudio.

Variaciones de este método son las descritas por el equipo de Carr en la identificación de víctimas del vuelo 759 de Pan Am el 9 de Julio de 1982 en Nueva Orleans, realizando un corte desde las ramas paralelo a la línea de oclusión y no extrayendo el maxilar superior, que

fue fotografiado directamente (Robert, 1985)

Jakobsen y cols.(1974), describen otro método que realiza un corte en forma de herradura por debajo de la base mandibular, levantando el colgajo que se obtiene hasta la articulación, liberando las partes duras y posibilitando la posterior reconstrucción facial del cadáver. Este método también lo describe Moya en su tratado de Odontología Forense.

En los cadáveres carbonizados, la extracción es más difícil, porque se dificulta la visión de la boca, llegando en ocasiones a ser imposible la visión directa, encontrando la boca totalmente cerrada. Sin embargo, el interior de la cavidad bucal puede aparecer intacto, gracias a que la lengua y tejidos blandos próximos han protegido los dientes.

En este tipo de cadáveres se hace casi imprescindible la extracción total o parcial de los dientes. (Moya, 1994)

4.2.3.- PROTESIS

En los cadáveres calcinados o con grandes traumatismos, las prótesis mantienen perfectas condiciones para su estudio identificativo, puesto que por las condiciones de resistencia de la cavidad oral y sus materiales, descritas en apartados anteriores, soportan los impactos mecánicos y la agresión de agentes químicos. (Ilustración núm. 5).

Después de las posibles extracciones de maxilares, por tanto, se han de estudiar minuciosamente los dientes remanentes y brechas en desdentados parciales, o totales, para determinar la posible existencia de una prótesis removible. Igualmente se hace necesaria la búsqueda de prótesis en las proximidades de los cadáveres encontrados tras el suceso.

En las estadísticas de cadáveres identificados en accidente aéreo ocurrido en las proximidades de Madrid en Diciembre de 1983, encontramos que de los 160 cuerpos identificados, 63 lo fueron por métodos odontológicos. De estos, 26 lo fueron gracias a las prótesis dentales que portaban (Araujo, 1984 y López, 1992).

Resultados similares alcanzan otros autores consultados. Así vemos que Haines (1991) realizó un estudio de 380 víctimas de un desastre aéreo, comprobando que 50 de las víctimas (13,2%) eran portadores de prótesis total removible y 47 tenían una prótesis parcial removible. En sus estudios determina que aproximadamente un 25% de las víctimas de un desastre puede llevar prótesis total o parcial. Por tanto los aparatos protésicos constituyen una significativa evidencia en la identificación después de la catástrofe.

Jensen (1991), haciendo referencia en su trabajo a la traumatología, en la identificación de cadáveres, describe la identificación de un cuerpo esqueletizado, que presentaba unas marcas claras de una artrosis y los cambios típicos motivados por una enfermedad de Scheuermann. Pero concluye su trabajo, señalando que la identificación fue completada gracias a la presencia de una prótesis dental que apareció en el cuerpo, desdentado total. (Jensen, 1991).

El marcado sistemático de prótesis podría constituir un medio simple en la identificación cadavérica.

Muhlemann, (1979) describe el uso de un microprocesador electrónico, unido a un grabador mecánico de 13 caracteres alfanuméricos, que imprime los datos de identificación en un disco de oro de 2 mm. de diámetro y 0,25 de espesor. Este microdisco puede ser introducido tras la preparación de una cavidad, o en el interior de una prótesis y es capaz de resistir temperaturas muy elevadas en caso de un incendio, pudiendo ser empleado posteriormente para la identificación, gracias al microprocesador que identifica la inscripción. (Muhlemann, 1979).

El laser YAG aplicado a técnicas informáticas puede aportar nuevos métodos de grabado de prótesis. La técnica consiste en la utilización de micro-discos grabados con laser YAG. La grabación se realiza sobre plástico o metal, con una superficie de 2,5 a 5 mm. cuadrados, que se unen a la superficie del esmalte, cubierto por composite y que una vez descubierto en el cadáver, mediante radiografía oral, puede ser leído nuevamente con la ayuda de un

microprocesador. (Roland, 1991).

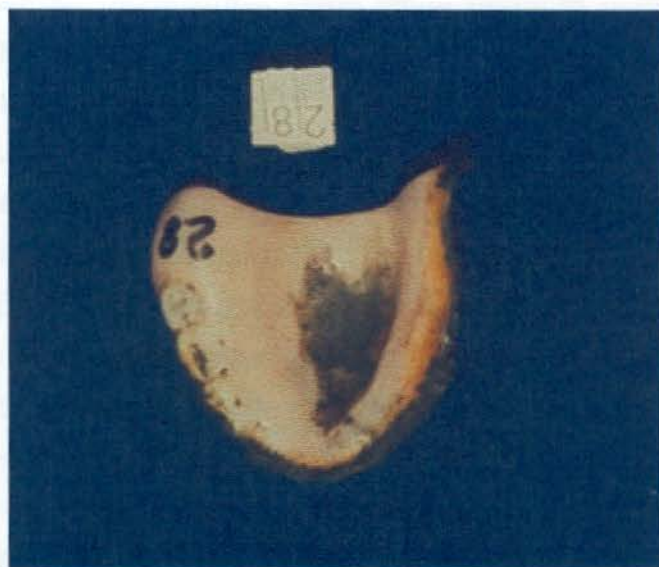


Ilustración num. 5. Las prótesis resisten altas temperaturas antes de su destrucción gracias a las condiciones de la boca donde se sitúan.

2.4.- RADIOGRAFIA ORAL

Algunos autores defienden la importancia capital de las técnicas radiológicas en la identificación odontológica, comparable en sus posibilidades con la dactiloscopia. (Cerón, 1991).

El mismo autor describe la importancia del método en la investigación de un cadáver, rescatado del mar después de permanecer varios días en el agua, con daños tan importantes en el cuerpo, que únicamente pudo ser identificado tras el estudio comparativo de radiografías intraorales.

La intensidad de los rayos debe ser menor que en el sujeto vivo, ya que las piezas cadavéricas carecen de partes blandas que puedan absorber radiaciones. Debe llegar hasta la mitad o dos tercios de la intensidad en condiciones normales de la práctica clínica, o incluso menor (De Vore, 1977).

La práctica forense registra numerosos casos reales, en los cuales la radiografía oral es el único método válido para alcanzar la identificación de víctimas calcinadas (Laborier, 1989).

En situaciones extremas de destrucción por el calor, cuando incluso las piezas dentarias alcanzan su casi total destrucción se pueden recuperar imágenes radiológicas que permiten realizar una superposición con resultados muy positivos. En nuestras experiencias anteriores, descritas en la bibliografía hemos podido comprobar la fiabilidad del método.

El empleo de la radiografía es un medio de identificación de restos de utilidad para antropólogos. En los cuerpos calcinados, mutilados o descompuestos, constituye un elemento de gran valor. (Martin, 1991).

La validez del método radiológico ha sido comprobada repetidamente por los expertos en necroidentificación. Incluso realizándose ensayos con muestras debidamente preparadas y con cierto grado de dificultad, desarrollado por estudiantes y profesionales con distinto grado de preparación, utilizando como elementos ante-mortem radiografías con una variación en el tiempo desde uno a quince años, los resultados positivos alcanzan un 93%. (Mac Lean, 1994).

La radiografía oral es de gran utilidad para determinar la edad del individuo. El procedimiento fue empleado por especialistas del ejército estadounidense durante la Batalla "Tormenta del Desierto" en

1991, para determinar la edad de los soldados enemigos muertos en la batalla (Morse , 1994).

Estudios realizados en la Universidad de Oslo demuestran la utilidad de obtener radiografías periapicales para determinación de la edad, mediante la medición de longitud y anchuras de sectores radicales y pulpares de dientes unirradicales, tanto del maxilar superior, como de la mandíbula (Kvaal, 1995).

La utilización de los procedimientos radiológicos en la superposición alcanzan el mismo nivel individualizador que puedan tener la dactiloscopia, o la determinación de ADN, por citar algunas de las más exactas.

La superposición radiológica de los dientes, junto con otras estructuras del cráneo, cuando existen datos ante-mortem, aporta resultados probabilísticos del cien por cien. Owsley (1993), apunta la combinación de técnicas radiológicas con el conocimiento de la antropología en la determinación de los restos cadavéricos en el mismo lugar del suceso. Describe en su trabajo la identificación de dos periodistas desaparecidos en Guatemala en 1985, mediante la superposición de imágenes de piezas dentarias, en las que se midieron secciones entre el cuello y ápices radicales y de particularidades observadas en uno de ellos en un seno frontal.

La radiografía es de utilidad para identificar patologías conocidas en el desaparecido, que pueden ser identificadas en el cadáver(Ilustración núm. 6). Kondo (1993) explica la identificación de dos cadáveres. Uno de ellos de un hombre de 49 años, gracias a la identificación radiológica de una prótesis metálica en una clavícula. El segundo cadáver identificado lo fue con otro hombre de 55 años. En este caso, se logró la identidad gracias a la localización de un conducto radicular tratado, con existencia de un quiste antiguo, que se comprobó mediante superposición con las imágenes radiológicas ante-mortem.

La superposición radiológica ofrece múltiples posibilidades. El empleo de sistemas de radiografía axial computarizada fue experimentado "In Vitro" por Wood (1994) en un total de 39 restos

mandibulares. Utilizan la técnica analizando imágenes de estructuras radiculares y de hemimandíbulas post-mortem a las que dan cortes axiales horizontales, con resultados positivos en la superposición radiológica con muestras ante-mortem.

En ocasiones, incluso la comparación de radiografías panorámicas con el resultado de una visión directa de la boca, puede ser suficiente para alcanzar la identificación. Pashinian, et al (1992) describen que el estudio de las superficies radiculares, en un total de 28 superficies maxilares y 22 mandibulares, le permite alcanzar un total de 210 signos de diagnóstico de individualidad. Empleando radiografías panorámicas, los autores detectan factores específicos en la cavidad dental, canales radiculares, estructura periodontal, presencia de caries y otras complicaciones, procesos inflamatorios, daños en mandíbula y dientes, suficientes para identificar con un odontograma A.M. obtenido correctamente.

Otros tipos de radiografías también pueden ser de utilidad en la identificación dental, no solamente las panorámicas o las periapicales. Borrmann (1992) realizó un estudio, auxiliado por diferentes especialistas, radiólogos, dentistas generales, y estudiantes, utilizando radiografías oclusales para su análisis. Los resultados fueron diferentes dependiendo del grado de preparación, lo cual evidencia la necesidad de que los equipos estén conformados por especialistas en estas técnicas forenses.

Los resultados en los estudios comparativos por métodos radiológicos son mejores dependiendo de la preparación profesional de los especialistas, lo cual puede hacer necesaria la presencia de un radiólogo experimentado para este tipo de análisis en situaciones difíciles (Hogge, 1994).

Incluso algunos de los autores consultados, determinan que la totalidad de los estudios radiológicos del macizo craneo facial, deberían ser realizados por un odonto-estomatólogo experto en esta práctica (Ubelaker, 1989).

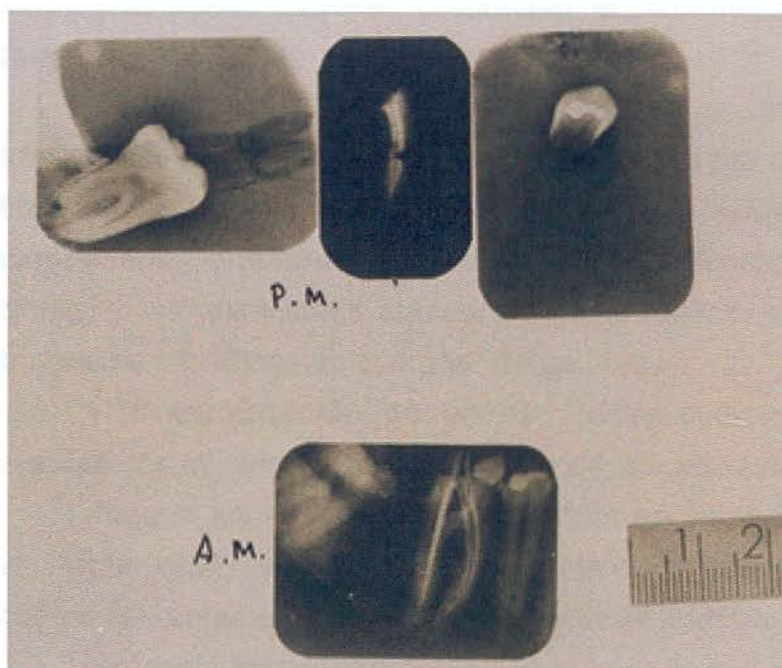


Ilustración núm. 6. Estas imágenes muestran dientes endodonciados, que soportaron temperaturas superiores a los 1200 grados y sirvieron para identificar el cadáver mediante la comparación de radiografías obtenidas.

2.5.- CRANEOMETRIA Y DENTOMETRIA.

Las determinaciones craneométricas, fundamentalmente las referentes a la zona maxilo-facial son de gran utilidad para obtener un diagnóstico determinante de la edad, raza y sexo del individuo.

Es importante la intervención del odonto-estomatólogo con profundos conocimientos en antropología en general y craneometría en particular. No es infrecuente encontrar restos en los que el análisis de las estructuras óseas permiten determinar la personalidad, o cuanto menos sirven para separar unos cuerpos de otros.

Trabajos de la Universidad de Sapporo, en Japón, explican su investigación sobre restos esqueléticos, formados por un cráneo, un maxilar superior, dos mandíbulas inferiores y otros restos esqueléticos de extremidades inferiores. El estudio de la articulación temporo-mandibular y las mediciones craneométricas sirvieron para separar y posteriormente identificar los cuerpos (Haga, 1994).

1. Determinación de sexo.- Existen numerosas fórmulas, que acercan los cálculos matemáticos a la identificación personal.

Aunque las cifras son poco exactas en su manejo rutinario, Morant, ya en 1936, llegó a determinar que la mandíbula presentaba 16 parámetros diferentes que permitían diferenciar el hombre de la mujer.

Nageshkumar (1989) determinó la importancia de los caninos mandibulares para identificar el sexo. La distancia mesio-distal del canino mandibular, por cien, y dividido entre el ancho intercanino mandibular, se aproxima a 0,296 ($\pm 0,016$) en el hombre y a 0,254 ($\pm 0,014$) en la mujer.

El análisis de la altura de la rama ascendente, índices y ángulos relacionados con la misma y la longitud del cóndilo son factores determinantes del sexo (Comas, 1983)

Coincidiendo con otros estudios realizados, sobre el análisis métrico de diferentes dientes, la pieza más fiable como discriminante sexual es el canino (Roldan, 1989).

En general el cráneo masculino es fácil de diferenciar del femenino, por presentar aquel sus puntos estructurales mucho más marcados y ser de mayor peso. Son numerosos los autores que han señalado las diferencias sexuales, mediante su estudio, pero frecuentemente debemos recurrir a otros análisis complementarios, ante las situaciones de ambigüedad que presentan las muestras.

Iskan, M. y Helmer, R. (1993), establecen los parámetros diferenciadores en el cráneo, que permiten clasificar las características en hiperfemeninos, femeninos, indiferentes, masculinos e hipermasculinos, aplicando valores que van de -2 hasta +2 según el grado de aproximación al sexo correspondiente en cada punto. (Iskan, 1993)

2. Determinación de la raza.- Se puede realizar mediante el estudio del cráneo en general y del macizo maxilo-facial en particular.

Flowers estableció una clasificación racial, tomando como base de sus análisis las coronas de premolares y molares superiores. Establece una línea llamada largo dentario (D), que una vez multiplicada por 100 y dividida entre la distancia de Nasion a Basion (NA-BA), da como resultado unas cifras que permiten hacer la clasificación dental (Nossintchouk, 1991). Los resultados entre 40 a 48 son como se citan:

Microdentes: Por debajo de 42: Caucasianos- blancos.

Mesodentes: 42- 44: Mongoloides y raza amarilla.

Macroentes; Mayores de 44: Razas negra y australiana.

Cada fragmento craneal ha servido para realizar estudios de la raza. Así vemos como Brues (1990) estudió el área nasal para establecer las características raciales. Observó tres tipos de formas alrededor de la sutura naso-maxilar: La primera forma que denominó "Quonset-hut", baja y redonda, que corresponde al grupo negroide. Al segundo grupo que llamó "Tented" y correspondía a los mongoloides presentaba una forma de depresión y sus caras rectas. El tercer grupo, correspondiente a la raza caucasoide, lo denominó "church with steeple", presenta una forma más alta y afilada.

El índice palatino, que relaciona la anchura interna del paladar entre los segundos molares y la longitud palatina, entre el punto oral y Estafilion, permite establecer tres grupos raciales:

Menos de 80: Leptoestafilino.- Alargado, europeo.

80-84,9: Mesoestafilino.- Tipo intermedio.

Mas de 85: Braquiestafilino. Ancho. Negroides.

3. Determinación de la edad.- El análisis craneométrico permite aproximarse bastante en los resultados, dependiendo de los elementos existentes.

Las suturas craneales, aisladamente no aportan muchas posibilidades de éxito por las variaciones tan grandes en el tiempo de cierre. Sin embargo, la conjunción de todas las suturas puede servir para determinar la edad con aproximación. Masset (1989) establece una fórmula que combina los números cero al cuatro aplicables a cada fragmento de las suturas coronal, sagital y lambdaidea, dependiendo del grado de cierre (abierta y visible, parcialmente borrada y dentada, bastante cortada, quedan pequeños vestigios y el 4 cuando no existe sutura).

Su resultado lo multiplica por unas cifras determinadas, dependiendo del sexo y aproxima los resultados con una variación de \pm 14,76 a 15,50 años.

Fórmula de masset:

$$S = \frac{C1 + C2 + C3 + S1 + S2 + S3 + S4 + L1 + L2 + L3}{10}$$

Sutura Exocraneal:

$$\text{Hombres: } 4,44 S^2 + 22,87 S + 30,44 = \text{edad } (\pm 14,76)$$

$$\text{Mujeres: } 2,85 S^2 + 16,33 S + 39,08 = \text{edad } (\pm 15,50)$$

El establecimiento de valores arbitrarios del cero al tres, como factores multiplicadores dependiendo del grado de cierre es un procedimiento bastante fiable para determinar la edad (Novotny,1993). No obstante, siempre aparecen rangos de aproximación que varían de los 21- 42 años hasta los 49-65, lo cual hace que estos procedimientos por sí sólo puedan resultar insuficientes para concretar la edad del

individuo.

Las técnicas más actuales, fijan la atención en el análisis de las suturas maxilares, pudiendo establecer tres grupos de edad: subadulto, cuando no existe obliteración de la sutura incisiva. Adulto, mayor de 18 años, cuando aparece la sutura incisiva cerrada en más de su mitad y únicamente quedan vestigios de la sutura interpalatina. A partir de los cincuenta años aparecen ambas suturas cerradas totalmente.

Debemos recordar que el proceso eruptivo de los dientes, son factores determinantes para concretar la edad hasta que esta erupción se ha completado.

Frecuentemente se plantea el problema de determinar la mayoría de edad. La erupción completa del tercer molar, parece estar relacionada con esta edad.

Investigaciones realizadas en Turin (Italia), en 1980, han tratado de resolver las dudas respecto a la edad concreta en que el tercer molar termina su formación radicular. Utilizando una muestra poblacional urbana y mediante técnicas de radiografías panorámicas seriadas en el tiempo, fueron anotando las fases de mineralización del cordal. Establecieron 12 fases. La muestra fue de 93 personas (43 varones y 50 mujeres).

El resultado de sus investigaciones, demostró que el grupo de los varones, completó la fase 12 entre los 18 años, 10 meses y los 25 años, 9 meses. Las mujeres lo hicieron entre los 18 años, 4 meses y 25 años, 5 meses. Las conclusiones sirvieron para determinar que la mineralización completa del cordal se realizaba en estos márgenes, después de los 18 años hasta los 25 (Robetti, 1995).

En los adultos, una vez sobrepasado el tiempo de erupción de los cordales, se han establecido diferentes métodos para determinar la edad, pero posiblemente el que aglutina todos los conocimientos de la odontología clínica para determinar la edad, es el método de Gustafson (1950), que emplea seis parámetros:

Atrición (A).
Periodontitis (P).
Dentina secundaria (D).
Aposición de Cemento (C).
Reabsorción radicular (R)
Transparencia de la raíz (T).

Establece una fórmula:

$$11,43 + 4,56 X$$

X es un valor desde cero hasta tres, para cada uno de los índices citados (A+P+D+C+R+T).

Los cálculos de la fórmula determinan un error de \pm 4-6 años.

El método de Gustafson ha sido aplicado y revisado continuamente desde su aparición por diferentes autores, para alcanzar cifras más exactas (Nkhumeleni, 1989).

Desde su enunciación descubrimos en la bibliografía numerosos casos forenses con resultado positivo tras su aplicación:

Lampe y Roetzscher, aplicaron el método de Gustafson para establecer la edad mediante el estudio de una muestra de 350 dientes, de hombres o mujeres en la población de Heidelberg-Alemania, con resultados positivos (Lampe, 1994)

El análisis de las piezas dentarias, con la particularidad de ausencia de incisivos izquierdos inferiores, permitió la identificación de una víctima de homicidio en La India. La determinación de la edad, se realizó utilizando el método de Gustafson. (Sivaram, 1976)

Vicek,(1977) describe la aplicación del método de Gustafson para investigación de restos prehistóricos. Realizando un análisis del grosor en una línea sagital, y utilizando cuatro parámetros (Grado de abrasión, dentina secundaria, aposición de cemento y reabsorción radicular), empleando rangos de 0 a 3, logró identificar a tres príncipes Checos, encontrados en un castillo de Praga, con una antigüedad de 9 a 10 siglos. En sus conclusiones pudo determinar que tenían edades de 30 a 35 años, el primero de ellos, 40-45 años el segundo de los restos

descubiertos y unos 60 años el tercero. En sus estudios manejó dientes unirradiculares.

Otros autores como Maples (1979), han investigado los métodos de Gustafson, determinando fórmulas de regresión múltiple, que permita alcanzar una mayor precisión en la determinación de la edad, pero siempre manteniendo los factores utilizados por Gustafson para determinar la edad.

Estos procedimientos están siendo revisados continuamente, buscando la obtención de fórmulas definitivas y exactas. Solheim (1993), analiza grupos de dientes, excluyendo los molares y explica la utilidad de un programa estadístico, con fórmulas determinantes de correlación de Pearson que varían de 0,76 en segundos premolares inferiores hasta 0,91 para incisivos maxilares centrales.

El grado de atricción se ha estudiado continuamente, tratando de establecer su relación con la edad. El diente que puede ofrecer mayores garantías para establecer una correlación entre el desgaste masticatorio y la edad, es el primer molar (Akpata, 1975). Los estudios realizados con una población nigeriana, utilizando 352 piezas, primeros molares, pertenecientes a un total de 88 individuos, demostró una gran diferencia entre éste y los segundo o tercer molar, menos significativos para estos análisis.

El análisis de los dientes para determinación de la edad, puede ser muy variado. La dentina peritubular constituye un depósito mineralizado que se constituye centrípetamente y que avanza con la edad, de modo que el diámetro tubular es menor en dientes de personas más viejas. Kvaal, Koppang y Solheim (1994) trataron de analizar las variaciones progresivas, para determinar la edad, pero sus investigaciones sobre 50 dientes incisivos centrales mandibulares, comprobaron variaciones en los depósitos peritubulares, pero no encontraron resultados concluyentes para establecer la fórmula ideal.

Las técnicas más avanzadas para determinar la edad mediante el estudio dentario se fundamentan en modificaciones sobre el método de Gustafson. Mörnstad, (1994) describe un procedimiento

basado en la determinación del grado de racemización del ácido aspártico en esmalte y dentina mediante la ayuda de técnicas de cromatografía de líquidos .

La determinación de la edad a través de las imágenes de los dientes ha llevado a desarrollar técnicas sofisticadas, como es el empleo de analizadores de imágenes, con errores máximos de 4,8 a 5,4 años(Zhu , 1994).

Como compendio de todo lo descrito en este apartado, debemos recordar que Novotny (1993) señala la importancia de todos los métodos craneométricos para la identificación, pero puntualiza que requieren una técnica precisa, una gran experiencia, alta especialización y mucho tiempo de aplicación a su investigación. En este mismo sentido se apunta el trabajo de Biggerstaff (1977), cuando dice que el odontólogo forense puede estimar la edad de un individuo observando los cambios en la dentición con facilidad, quien puede determinar la edad, con más o menos precisión dependiendo del criterio empleado y de la experiencia y entrenamiento. Anatómica, histológica y radiológicamente pueden ser evaluados los dientes. Algunos de los métodos requieren un tiempo prolongado de formación. Existen métodos alternativos más rápidos que pueden ser requeridos en su aplicación. Este autor también señala que es responsabilidad del dentista determinar la edad exacta. Cualquier material evaluable es un buen recurso. Los datos cuidadosamente tratados reducen los errores en la edad estimada. (Biggerstaff, 1993).

4.2.6.- FOTOGRAFIA ORAL.

Siempre que se realiza una extracción de maxilares, debe obtenerse una fotografía detallada de los mismos. Debe hacerse desde cada lateral, luego desde su norma frontal y por último en necesario obtener una de conjunto de ambos maxilares. Igualmente se deben fotografiar todas las particularidades de cada pieza dental.

Es conveniente el empleo de cámara tipo reflex, con iluminación por lámpara de destello en anillo, para evitar sombras (De

Vore, 1977). Se hace imprescindible un testigo métrico y en caso necesario la fotografía ultravioleta para la visión de posibles detalles invisibles con luz normal.

En el reconocimiento de los restos cadavéricos por familiares y amigos, se debe evitar la visión directa del cuerpo en el mismo depósito donde pudieran encontrarse otras víctimas. Debe emplearse la fotografía de los rostros intentando lograr imágenes naturales (Busutil, 1990).

4.2.7.- SUPERPOSICION DE IMAGENES.

Un cráneo sin identificar precisa un examen visual y radiográfico completo, buscando establecer el sexo y la edad de la víctima.

La técnica de superposición fotográfica de los restos no identificados con imágenes gráficas obtenidas en condiciones ante-mortem, requiere adaptación de dimensiones y del ángulo de obtención de las fotografías.

La técnica es relativamente moderna. En 1867 Welcker realizó las primeras comparaciones del cráneo recogido de la sepultura de Dante con una máscara mortuoria supuestamente atribuida al mismo, pero no fue hasta 1935 cuando se empleó como prueba pericial en un juicio defendido por los británicos Glaister y Branch (Marín, 1992).

Desde entonces la técnica ha sido empleada por distintos científicos. En 1955 Webster la utilizó en el caso Plumber Pit. Basauri describió la utilidad del método para la identificación de las víctimas del llamado "Crimen del campo de maíz". En 1975 Chowdhuri y Majander identificaron a un individuo mediante la superposición de un arco alveolar. En 1985 fueron hallados en Brasil los restos de Josef Mengele ("El Angel de la Muerte"), Jefe Médico del campo de concentración de Auschwitz. La Técnica de superposición ayudó a la identificación del cadáver (Basauri, 1967).

La técnica se fundamenta en tres características craneométricas:

- 1.- Individualidad del cráneo
- 2.- Proporción entre las medidas del cráneo y las de la cara.
- 3.- Simetría proyectiva en las fotografías del rostro.

Las fotografías obtenidas con fines identificativos mediante superposición, (Marín, 1992), deben reunir las condiciones que se describen:

A.- Obtención de las reproducciones fotográficas de acuerdo con los principios de proyección central.

El resultado óptimo se obtiene si la distancia entre la cámara y la cabeza o el cráneo se aproxima lo más posible a la distancia a la que fue obtenida la fotografía Ante-Mortem.

B.- Posición del cráneo que corresponda con el retrato original.

C.- Magnificación de la reproducción coincidente con la obtenida Ante-Mortem.

Según este mismo autor, los procedimientos actuales son:

1. Métodos estáticos.
2. Métodos dinámicos.
3. Métodos digitalizados.

.-Métodos estáticos

El método de Glaister y Bash (Simpson, 1979), utiliza una fotografía de la superposición del negativo del cráneo y la positiva del ante-mortem. La fotografía ante-mortem debe ser ampliada al tamaño real, pudiendo emplear algún objeto conocido, como la altura de una puerta.

Basauri (1967), utiliza una cámara de 4x4, aunque recomienda el empleo de otra de mayor visión. El negativo de la fotografía ante-mortem lo sitúa sobre un cristal esmerilado del visor, donde marca los puntos craneométricos que le servirán de referencia.

Luego coloca el cráneo sobre un trípode con cabeza giratoria

y lo desplaza hasta conseguir que coincidan los puntos y líneas referidos.

Por último hace coincidir los negativos obtenidos y analiza la reproducción final.

El procedimiento de Sekharan, según describe en su trabajo Simpson (1979), sitúa cualquier objeto que aparezca en la fotografía ante-mortem: gafas, camisa que apareciera, etc.. Deben ser objetos que puedan aparecer enfocados en un mismo plano que la cara del individuo.

Cuando no se encuentran los objetos ante-mortem, utiliza la distancia interpupilar standar. Este método puede inducir a errores, puesto que esta distancia estimada en seis centímetros puede no ser correcta. Además, es difícil localizar la pupila en la fotografía.

Dorion (1983), emplea espejos que reflejan las imágenes ante-mortem situadas en un negatoscopio sobre las que se obtienen del cráneo.

Mac Kenna, (1984) utiliza fotografías ante-mortem en las cuales aparecen los dientes del individuo, con lo que logra solucionar los problemas de la magnificación.

Señala que la medida standar resultante de la distancia interpupilar es inaceptable por la inseguridad de su localización en la fotografía. Estas conclusiones las alcanzó después de medir una población de 75 individuos, comprobando que las medidas variaban desde los 57 a 71 milímetros.

También rechaza los márgenes laterales de la órbita como punto de referencia en las mediciones.

Sin embargo los dientes son válidos para sus estudios, por la permanencia de las medidas en condiciones Ante y Post-mortem.

Este método de McKenna no es efectivo en sujetos desdentados o edentados parciales en los que las piezas que les falten sean del sector anterior de la boca.

La utilización de dimensiones pequeñas como es el caso de los incisivos laterales de forma aislada, también podría ser errónea.

La obtención de líneas de referencia a partir de puntos cefalométricos permiten la angulación correcta del cráneo para la obtención de la fotografía Post-Mortem (Chai , 1989).

.- Métodos dinámicos.

El cráneo se va moviendo sobre su soporte hasta conseguir que coincida con la fotografía Ante-Mortem.

Los métodos posibles son con una o dos videocámaras.

METODOS CON UNA SOLA VIDEOCAMARA.

Dorion (1983), en su método dinámico, coloca una transparencia de la fotografía Ante-Mortem. Detrás suyo sitúa el cráneo que ilumina con cuatro focos situados en un cuadrado teórico en cuyo centro está el cráneo. Se visualiza la imagen superpuesta a través de un monitor que facilita las rotaciones necesarias hasta alcanzar la angulación deseada.

El método de Loh (1989), es parecido al anterior. Utiliza la medida interpupilar, sirviéndose de una tercera persona que aparezca en la fotografía. Se mide la distancia interpupilar real de esta persona, se determina su dimensión en la fotografía y se puede calcular el factor de magnificación que permite la situación correcta del cráneo.

METODOS CON DOS VIDEOCAMARAS

Bastian (1986), realiza un procedimiento similar al de McKenna. Monta el cráneo en un soporte con movimiento en los tres planos del espacio. Interesa localizar fotografías Ante-Mortem con visión de los dientes.

Se alinea esta fotografía con la primera videocámara. Luego se coloca el cráneo alineándolo con una segunda cámara de video, similar a la anterior. Se ajustan ambas cámaras en blanco según la fuente de iluminación. Se deben evitar los reflejos .

Ambas cámaras deben ser compatibles y con posibilidades de mezclar imágenes.

Cuando hay dientes presentes la mezcla se hace de forma que se solapen los de la fotografía ante-mortem y del cráneo.

Cuando no existen dientes se hace emparejando las marcas anatómicas más importantes: Conducto auditivo externo, órbitas, espinal nasal anterior, mentón, ángulos mandibulares y procesos cigomáticos.

En el laboratorio de Criminalística de Zurich se realizan identificaciones empleando tres monitores de televisión (Iten, 1987). Con una de las cámaras filma el cráneo y lo reproduce en un monitor. Con la segunda cámara hace lo mismo respecto a la fotografía ante-mortem. Se sirve de un mezclador de imágenes para crear secciones horizontales y verticales al nivel deseado. Las secciones y la mezcla de imágenes las presenta en el tercer monitor.

El problema de la superposición de una imagen tridimensional del cráneo con la fotografía bidimensional lo soluciona fácilmente. Para facilitar la inclinación del cráneo, se basa en la distancia que existe entre los ejes interpupilar y el que une los conductos auditivos, que estarán más o menos alejados dependiendo de la inclinación.

Para determinar la orientación del cráneo combina con estas distancias la obtenida entre los ojos.

Mac Kenna en su método dinámico realiza mediciones comparativas, superponiendo las denticiones respectivas del cráneo y de la fotografía. La posición correcta del cráneo respecto a la fotografía se logra rotando la cámara mientras está focalizada en el punto anatómico de referencia elegido.

Su sistema permite obtener transparencias a partir de los negativos fotográficos para que se presenten ante un tribunal si fuera necesario (Mc Kenna, 1984 y 1988)

En el Departamento de Ciencias Forenses de Madras (India), realizaron primeramente investigaciones con métodos estáticos en 1971. Más tarde, en 1989 diseñaron un procedimiento dinámico (Sekharan, 1989), llamado EISD (Electronic skull identification device). El método es similar a los anteriores, utilizando dos videocámaras.

Incorpora escalas al lado de la fotografía ante-mortem y del cráneo en evitación de magnificaciones.

.- Métodos digitalizados

Estos métodos digitalizan la fotografía ante-mortem y el cráneo, bien de modo directo o haciéndolo sobre fotografías obtenidas de los restos cadavéricos.

El laboratorio de Ciencias Forenses de Calcuta (India), diseñó en 1989 un programa informático que combina las imágenes de una videocámara con un microprocesador adaptado con un digitalizador (Majundar, 1989). Se obtiene previamente una fotografía del cráneo con una angulación similar a la de la fotografía ante-mortem. Posteriormente aparecen las imágenes en un monitor, donde se seleccionan varios puntos de referencia, que deben ser al menos cuatro, de los cuales, tres no deben ser colineales y susceptibles de ser localizados con facilidad. Se recomiendan entre otros los cantos internos y externos de los ojos, comisuras labiales y punto subnasal.

Luego el ordenador crea una imagen compuesta tomando puntos alternativos de la cara y del cráneo, disponiéndolos como cuadros blancos y negros de ajedrez, de forma que las individualidades de cada fotografía están presentes en la imagen superpuesta. El ordenador construye las superposiciones en bloques o en franjas del ancho deseado, para hacer las más precisas comparaciones.

Nickerson (1991), realiza una transformación por computadora:

- 1.- Digitalización bidimensional de la fotografía ante-mortem.
- 2.- Digitalización tridimensional del cráneo.
- 3.- Filtración de los modelos para reducir errores.
- 4.- Selección de cuatro puntos sobre las imágenes.
- 5.- Transformaciones necesarias para reducir a dos dimensiones la superficie trabecular del cráneo.
- 6.- Combinar los resultados obtenidos.

Cualquiera de los métodos descritos presenta ciertas limitaciones, que según pudo demostrar ampliamente Mc Kenna, no se presentan cuando las piezas dentarias están visibles en las fotografías ante-mortem.

La resistencia a la destrucción de los elementos dentarios, les permiten permanecer sin variaciones visibles tras el fallecimiento del individuo.

La simple superposición de las imágenes morfológicas dentarias permite hallar puntos de referencia suficientes para determinar la plena identidad del cadáver.

En nuestras experiencias hemos obtenido buenos resultados de una forma muy simple, con la ayuda de una cámara técnica de formato 9x12, siempre que se puedan determinar puntos coincidentes entre el cráneo post-mortem y las fotografías ante-mortem.

La medición de los dientes anteriores que aparecen en las fotografías familiares y en los restos cadavéricos, permiten hacer una superposición perfecta de los datos ante-mortem con los obtenidos al cadáver (Mac Kenna, 1984).

La identificación personal mediante dentaduras es uno de los métodos utilizados en el campo de la Odontología Forense.

La superposición fotográfica entre restos de prótesis y las imágenes de restos fragmentados óseos, mediante el empleo de tomografía computarizada es efectiva para establecer la identidad. Minaguchi y sus colaboradores (1994), describen la superposición de fotografías obtenidas de modelos de prótesis e impresas sobre papel transparente, con las obtenidas de radiografías de la cresta alveolar, identificando las zonas de sustentación de dientes artificiales sobre el hueso maxilar. (Minaguchi, 1994)

4.2.8.- MARCADORES GENETICOS EN EL DIENTE.

El análisis de grupos sanguíneos, seguido de las determinaciones de proteínas plasmáticas con polimorfismo genético, han dado paso al análisis de ADN, mediante "huella genética" o

técnicas de PCR.

El estudio de muestras biológicas comprende tres objetivos claramente tipificados (Lee, 1985):

1. Diagnóstico genérico, determinante de la naturaleza de la sustancia
2. Diagnóstico específico o de especie, mediante el cual se establece la especie del animal del que procede esa muestra (prueba de origen).
3. Diagnóstico de la individualidad biológica, por el que se intenta, una vez establecido el origen humano, determinar a qué individuo pertenece.

A partir de vestigios biológicos se pueden determinar caracteres hereditarios que pueden ponerse en relación y ser coincidentes o no con muestras indubitadas. Esto viene motivado por la existencia en la sangre y/o en otros fluidos y sustancias biológicas, de factores polimórficos genético-moleculares. Se trata de sistemas genéticos cuya herencia puede analizarse a través de generaciones cumpliendo las leyes de transmisión de Mendel.

En los primeros estudios realizados para determinación de grupo sanguíneo a partir de diente, las muestras se extrajeron de forma tosca y los extractos fueron sometidos al grupo ABO mediante técnicas de absorción-inhibición y la inhibición de la hemoaglutinación. En su trabajo Cerón y García Poveda (Cerón, 1991), describen el método realizado por Shimura, que descalcificaba primeramente el diente, mediante HCL 1% o solución 20 % EDTA-4 Na. y luego extraía las sustancias del grupo sanguíneo mediante extracción en etanol o métodos electrolíticos, largos y costosos.

Las técnicas de aglutinación y absorción-elución desarrolladas para extracción de grupo sanguíneo han sido investigadas en diferentes tejidos biológicos. Akaishi aplicó estas técnicas en tejido dental y demostró las ventajas del método.

Anderson (1977) y Cerón (1991), describen en sus trabajos procedimientos fiables para determinación de grupo sanguíneo aplicando el método de absorción-elución, en la cámara pulpar, donde se pueden extraer y analizar sus componentes.

El método de absorción elución es el más es utilizado en medicina forense para determinar con facilidad los grupos sanguíneos para los antígenos ABO, a partir de muestras de tejidos humanos. Al igual que muchos autores, Shcmechta, indica que este sistema ofrece una gran fiabilidad cuando se emplean tejidos dentarios, por las ventajas que ofrecen estas muestras para su mantenimiento en condiciones adversas. (Schmechta, 1975)

Xingzhi, (1993), comprobó la fiabilidad del procedimiento, mediante molturación y reducción a polvo de restos dentarios. Analizó 25 dientes permanentes de los cuales 8 eran cariados y uno con exposición de su cavidad pulpar. Fueron investigados después de 3-5 meses de su extracción. Se estudió el grupo sanguíneo para el sistema ABO, mediante sistema de absorción-elución, empleando testigos de manchas de sangre y fragmentando los dientes que luego fueron reducidos a polvo. Se obtuvieron resultados positivos en 24 sobre 25 muestras.

El grupo sanguíneo ABO fue investigado en pulpa, dentina y esmalte de 35 dientes, mediante técnica de absorción-elución, por el grupo de trabajo de la Univesidad católica de Leuven-Bélgica. Utilizaron como referencia de su trabajo manchas de sangre retenidas en gasas impregnadas durante la exodoncia de las piezas dentales. Veinte dientes fueron examinados 6 semanas después de la extracción y 15 dientes, fueron examinados en un intervalo de 6 a 10 meses después. En pulpa se obtuvieron resultados perfectos. Algo más limitados fueron los resultados en dentina y más discutibles los resultados en esmalte. En los distintos grupos de dientes se obtuvieron resultados similares.(Smeets,1991).

En este sentido, se expresa también Neiders (1977), que señala la identificación de los grupos sanguíneos como una

herramienta de utilidad en los exámenes forenses. Dice que el grupo sanguíneo se puede obtener de muestras biológicas muy diversas, tejidos blandos, o huesos, pero es de mayor interés el conocimiento de que estos grupos sanguíneos se pueden extraer de piezas dentales. Los dientes ofrecen la gran ventaja de que a pesar de su posible antigüedad, resisten perfectamente a la putrefacción, cuando otros elementos humanos no lo resisten. (Neiders, 1977).

Son muchas las experiencias de autores que apuntan la posibilidad de obtener el grupo sanguíneo de elementos situados en la cavidad oral, que no son las propias piezas dentarias. Así podemos obtenerlo en cálculos dentarios, o incluso en dentaduras. Cerón y García Poveda, (1991), explican los trabajos de Sakni y cols. que investigaron el efecto de los materiales de resina en dentaduras, con anticuerpos Anti-A y anti-B activados, mediante técnica de absorción inhibición. Citan que Marsuoka logró obtener grupo sanguíneo a partir de muestra en polvo de resina acrílica de una prótesis removible utilizada durante dos meses. Según estos autores, las sustancias de grupo sanguíneo en dentaduras y cálculos dentarios proceden de la saliva depositada en la zona analizada.

Barsegiants (1979), destaca la importancia de una prótesis dental para lograr la identificación de un cadáver, mediante el estudio de restos de saliva depositados en la misma. (Barsegiants, 1979.)

Kimura se refiere a la importancia de la proteína Gc. en la necroidentificación dental y describe los trabajos realizados en el Departamento de Medicina Legal de la Universidad de Yamanashi-Japón. Se realizaron investigaciones para fenotipar la proteína transportadora Gc, utilizando como muestra pulpa dental, empleando procedimientos de inmunoelectroforesis, con un mínimo de muestra. Se estimaron entre 0,02 microgramos en 10 microlitros de muestra. Los resultados obtenidos fueron comparados con los de otras muestras de los mismos individuos. Fueron positivos en dientes que habían permanecido almacenados durante 4 semanas a temperatura ambiente (Kido, 1994).

Asimismo es posible separar y fenotipar la proteína plasmática **A2HS**, presente en la cámara pulpar y tejidos dentinarios y que junto a otras determinaciones puede servir para la individualización del cadáver (López Abadía, 1993).

Aunque la función biológica de esta proteína no se conoce con exactitud, tiene interés como elemento de identificación humano, por presentar un claro polimorfismo genético. El locus de la A2HS está localizado en el cromosoma 3, y tiene tres alelos perfectamente identificados.

La técnica de isoelectroenfoque con empleo de gel de poliacrilamida, es adecuada para visualizar los fenotipos obtenidos del análisis de muestras obtenidas de la cámara pulpar de dientes humanos (López, 1994). Así podemos fenotipar además de las proteínas citadas, la enzima fosfoglucomutasa (PGM).

Otras proteínas procedentes de tejido dental son descritas por diversos autores. Así vemos la posible extracción de la Pi (alfa -1-Antitripsina), desde pulpa dental de dientes que habían permanecido a temperatura ambiente durante 4 semanas (Kido, 1995).

En nuestros trabajos hemos analizado las proteínas plasmáticas y enzimas que con más frecuencia se manejan en los laboratorios de analítica forense para la identificación de restos cadavéricos, pero se pueden utilizar otras más como puede ser haptoglobina, o transferrina sérica.

En el Departamento de Medicina Legal de Tamaho-Japón, lograron subtipar transferrina sérica utilizando muestras de pulpa dental, mediante procedimientos de isoelectroenfoque-inmunoblotting. Las muestras fueron dientes procedentes de exodoncia, conservados en condiciones ambientales durante cuatro semanas, antes de la investigación experimental. Los autores del trabajo demuestran la utilidad de los dientes para la obtención de diversos marcadores genéticos, que permiten la identificación. (Kido, 1993)

Whittaker y Rawle (Whittaker, 1994) analizaron 75 muestras obtenidas de dientes sometidos a distintas condiciones de temperatura y

humedad, con resultados idóneos para los marcadores de la proteína plasmática haptoglobina. En su investigación mantuvieron muestras a temperaturas de 4 a 22°C., con distinto grado de humedad y en tiempos distintos entre uno y tres meses. Salvo en ocho casos, los restantes ensayos fueron fructíferos.

4.2.9. ESTUDIO DEL ADN EN EL DIENTE

Generalidades.

La identificación positiva de restos humanos ha sido siempre una de las mayores preocupaciones de las Ciencias Forenses. La huella dactilar y los datos dentales o esqueléticos han sido hasta ahora buenas herramientas para este propósito. Sin embargo, la aplicación de la Biología Molecular en los laboratorios forenses abre nuevas perspectivas para la identificación directa y resuelve casos donde la cantidad de muestra disponible es mínima. La comparación del ADN extraído de restos humanos con el ADN extraído de sus presuntos progenitores u otros familiares facilita enormemente dicha identificación.

El descubrimiento de los "polimorfismos ADN" (Martínez-Jarreta, 1992) y sus aplicaciones en la biología forense, marca el inicio de una nueva etapa en este área de las ciencias Forenses. Su importancia nace del enorme poder discriminativo y de la escasa cantidad de muestra que se precisa para los análisis.

Cuando resultan negativos los procedimientos odontológicos generales, por las destrucciones que presentan los dientes o por la ausencia de datos ante-mortem, la investigación de marcadores genéticos y el estudio de ADN dentario o de hueso mandibular permite alcanzar un resultado óptimo (Lorente, 1994).

La simple comparación con muestras obtenidas de familiares de primer orden facilita la necroidentificación.

El futuro de la identificación médico-forense se apoyará en el análisis de DNA mitocondrial procedente de pulpa dentaria, lugar de especial interés, por ser una cavidad cerrada que conserva

perfectamente su contenido. La investigación del ADN mitocondrial puede ser definitiva, puesto que presenta una elevada resistencia a la degradación. En una muestra mínima en la que logramos estudiar uno o dos loci para estudio de ADN genómico podemos encontrar decenas de mitocondrias, cada una de las cuales puede ofrecer gran cantidad de ADNmt.

Los ensayos que se van haciendo con ADN mt. ofrecen buenos resultados. Así, vemos en la bibliografía consultada las experiencias que tienen en el Departamento de Biología molecular y celular de la Universidad de California, donde han realizado investigaciones sobre ADN mitocondrial, procedente de dientes mantenidos entre 3 meses y 20 años, incluyendo dientes semiesqueletizados y restos de una víctima de un incendio con una antigüedad de 10 meses. Los resultados comparados entre las muestras de dientes y ADN fresco, demuestra la posible aplicación de estos procedimientos para la identificación genética (Ginther ,1992).

Polimorfismo del ADN.

El ADN ha de cumplir unos requisitos concretos para ser utilizado en investigaciones forenses (Villanueva, 1991) :

1. El ADN se transmite de padres a hijos, de acuerdo con los postulados mendelianos. Por tanto, en cualquier núcleo celular de cualquier persona, la mitad del ADN presente procede del padre y la otra mitad de la madre.
2. El ADN tiene una gran estabilidad en el medio ambiente, siendo posible aislarlo e identificarlo en células con días, semanas, meses e incluso años de antigüedad. Se ha descrito la identificación de ADN en momias con varios miles de años.
3. Por su presencia en todos los núcleos celulares es posible obtener en el lugar del suceso muestras de valor identificativos, sobre todo cuando hubo algún tipo de violencia.
4. Las largas cadenas de ADN, compuestas por decenas de miles de pares de bases, presentan zonas en las que los pares de

bases se repiten de una forma secuencial y determinada, específica en longitud y localización para cada persona. Por ello el ADN es como una huella dactilar genética, específica para cada persona.

La última de las condiciones expuestas fue enunciada por Jeffreys en 1985, afirmando que "las regiones minisatélites hipervariables que están dispersas en el genoma humano muestran fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), debido a diferencias alélicas en el número de repeticiones en series contenidas en el núcleo de una determinada región o fragmento de ADN.

Hay un ADN codificante, que se expresa a proteínas, y un ADN no codificante, que no se expresa a proteínas, y que supone la mayor parte del genoma humano. El ADN expresivo o codificante es, generalmente, poco polimórfico, suele ser más conservador.

Es mucho más interesante para las investigaciones medico-forenses el ADN no expresivo que cuantitativamente supone la mayor parte del genoma humano. Dentro de este ADN repetido en tandem, el ADN minisatélite y microsatélite son fundamentales para nuestras investigaciones. Estos fragmentos de restricción (RFLPs) presentan, como su nombre indica, una longitud variable. Pueden ser causados por mutaciones puntuales, deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos o adiciones o deleciones de secuencias de ADN repetidas en tandem. Este último tipo de variaciones es el conocido como VNTR (Variable Number of tandem repeats). Los VNTRs se encuentran en las regiones denominadas Minisatélite, que describe secuencias cortas de oligonucleótidos repetidas en tandem y repartidas en todo el genoma.

Con el empleo de sondas específicas, que no son sino fragmentos catenarios de ADN, cuya secuencia nucleotídica conocemos y es complementaria para un minisatélite determinado, se puede lograr, tras la hibridación la identificación, mediante un revelador adecuado.(Villanueva, 1991).

Esta unión puede ser detectada marcando la sonda con

métodos isotópicos (32p), o métodos no isotópicos (enzimáticos).

Desde que Wyman y White (1980) descubrieron el primer locus hipervariable en el ADN humano con una sonda específica, se tuvo el convencimiento de que se revolucionaría por completo la hemogenética forense. Los últimos avances junto con la facilidad para adquirir sondas ADN que detecten loci altamente polimórficos, han puesto al alcance de numerosos laboratorios la posibilidad de aplicar la metodología en casos de identificación personal.

La utilidad de las sondas ADN está en que detectan variaciones de secuencia de distintos individuos, lo que se traduce en las diferencias en longitud de fragmentos y consecuentemente en la migración de bandas. Polimorfismo ya definido anteriormente como RFLP (Polimorfismos basados en la longitud de los fragmentos de restricción).

Con el descubrimiento del ADN minisatélite se revolucionó totalmente la investigación personal en medicina forense (Jeffreys, 1985).

La importancia de estos polimorfismos es tal, que se habla habitualmente del término "Huella genética" al citar sus propiedades individualizadoras (Jeffreys, 1985).

Hasta ahora hemos visto qué regiones del ADN nuclear son más interesantes a la hora de hacer estudios sobre muestras muy antiguas, pero también existe la posibilidad de estudiar otro tipo de ADN no nuclear como es el mitocondrial, citado anteriormente. Las mitocondrias son orgánulos celulares con su propio material hereditario que, además, presenta las siguientes particularidades (Prieto, 1995):

- 1.- Se trata de un ADN del que hay **numerosas copias por célula**, en contraste con el ADN nuclear del que tan solo hay una copia materna y otra paterna.
- 2.- Es un **ADN haploide**; es decir, no hay una dotación por cada progenitor, sino que el descendiente sólo hereda el de la madre. Su herencia es, por tanto, **matrilineal**. Esto hace que

un individuo comparta la misma secuencia con su descendencia, madre, tíos y tías maternos, abuela materna, etc. De esta manera, a la hora de identificar un cadáver, si sus padres y cuatro abuelos han desaparecido, se podrá comparar con otros parientes maternos para su identificación.

- 3.- Al ser haploide **no hay fenómenos de recombinación**, por lo que es útil en estudios de genética de poblaciones.
- 4.- Contiene **secuencias altamente polimórficas**.

Estas características han llevado a popularizar el ADN mitocondrial como fuente de información frente al ADN nuclear, mucho más difícil de amplificar. Su uso, sin embargo, equivale a una pérdida de información pues sólo puede establecer relaciones matrilineales entre individuos.

TIPOS DE MUESTRAS

En general, inmediatamente después de la muerte se pone en marcha la autólisis del cadáver; es decir, las propias enzimas del organismo comienzan a destruir la sustancia orgánica del cuerpo. La autólisis necesita la presencia de agua, por lo que si el entorno es lo suficientemente seco como para evaporar el agua antes de que comience el proceso degradativo, el ADN se conservará en muy buen estado. Esto explica porqué a veces resulta tan problemático estudiar restos recientes como otros más antiguos; las condiciones medioambientales son más determinantes que la edad. A la autólisis se suma la acción de hongos y de microorganismos e incluso insectos e invertebrados. Todos ellos, en conjunto, contribuyen a destruir las partes blandas y, finalmente, solo queda la parte inorgánica del endoesqueleto junto a los apéndices queratinizados como las uñas. Estos restos no pierden por completo su materia orgánica: al revés que las partes blandas, en condiciones de enterramiento normales se conserva la estructura orgánica de huesos y dientes. Esta conservación se explica por la menor concentración de agua y enzimas que hay en este tipo de

tejidos. Cada osteocito o cementoblasto parece sufrir un proceso de momificación individual, a lo que sin duda ayuda la protección de la que gozan, en razón de su situación rodeada por una dura barrera mineral, frente a la agresión física y bioquímica de microorganismos. Otra forma de momificación celular individual es la que se da en fluidos corporales secos y un fenómeno parecido, pero a escala mucho mayor, sucede en la momificación de cadáveres debida a una rápida pérdida de humedad.

En estas condiciones es posible que un ADN se conserve durante cientos o quizás miles de años. Golenberg y colaboradores (Golenberg,1990) llegaron incluso a describir secuencias de ADN de una planta fósil de magnolia de hace 20 millones de años. En organismos superiores como el hombre no se dan situaciones tan extremas pero sí puede preservarse el ADN por espacio de algunos miles de años (Hagelberg y Sykes, 1989).

Pueden presentarse los mismos problemas en la amplificación de un ADN de hace cuatro años, como los de hace trece mil. Esto se debe a que la fragmentación ocurre, en su mayor parte, inmediatamente después de la muerte, antes de que el tejido llegue a secarse. Otros tipos de daño se deben a los radicales de oxígeno que reaccionan con las bases o con el esqueleto de azúcar del ADN. Estas reacciones causan modificaciones y pérdidas de bases, provocan roturas de cadenas e instan a enlaces anómalos entre diferentes moléculas de ADN. Son cambios que degradan ADN y destruyen información genética. Sin embargo, la técnica de PCR, a pesar de sus errores, alcanza una notable precisión, amplificando docenas o cientos de fragmentos de ADN, lo que le convierte en un método eficaz en la investigación de restos antiguos.(Lassen, 1994)

En los laboratorios de analítica forense se investigan rutinariamente muestras procedentes de

-SANGRE: El ADN se encuentra en el núcleo de todas las células del cuerpo humano (no existen por tanto en los glóbulos rojos maduros, al ser anucleadas).

En la sangre, donde la mayoría de sus componentes son hematíes, el núcleo con el ADN es expulsado en la última fase de maduración. Por tanto el análisis se efectúa desde glóbulos blancos.

La sangre fresca o líquida, debe ser conservada con EDTA (nunca con heparina), y almacenada a 4°C. No obstante, si transcurren más de dos semanas, debe ser congelada a -20°C. Se debe disponer al menos de 5 c.c.

La manchas de sangre, se debe dejar secar al aire y temperatura ambiente. Sin exposición directa al sol y almacenada en un recipiente resistente a la humedad.

— HUESOS: Pueden estar mejor o peor conservados. Cuando hablamos de "conservación" no nos referimos a su estado macroscópico, sino a su estado de cara al análisis del ADN contenido en ellos. Quizá porque el ADN se adhiere a los minerales que componen los huesos, los restos de esqueletos son un excelente depósito de ADN. Es muy importante recalcar que el estado del ADN de un hueso no depende del tiempo transcurrido desde la muerte sino más bien de factores como el grado de acidez del suelo, la humedad, etc. De entre todos los huesos hay unos que interesan más que otros: aquellos en los que durante la vida del individuo ha habido una mayor actividad celular, son más ricos en ADN. Este es el caso de los huesos largos, en los que se da la hematopoyesis o generación de células sanguíneas. Por eso, un fémur, una tibia o un esternón son preferibles a una falange o a una costilla. En la toma de muestras se procurará manipularlo lo menos posible, llevar siempre guantes y empaquetarlo lo más próximo a la esterilidad. Hay que tener presente que, ya que la contaminación del medio está en la superficie del hueso, para la obtención de ADN manejaremos probablemente la parte interior.

Los estudios realizados por distintos autores, demuestran que el material esquelético o dental es preferible a tejidos blandos para el análisis por técnicas de PCR, si las muestras están severamente degradadas. Los tejidos blandos antiguos, incluso en estado de

momificación, contienen más sustancias inhibitorias por la degradación durante el proceso de momificación que sufren. La inhibición se puede producir por la reducción de azúcares o por exceso de ADN microbacteriano. Esa posible contaminación se evita en los tejidos duros, mediante la exposición a la luz U.V. (longitud de 254 nm.) durante 5 minutos, para inactivar la posible contaminación con ADN extraño, reciente. (Lassen, 1994).

Otras técnicas que evitan la contaminación, reducen y mejoran los procesos son los sistemas de extracción automatizados, que evitan riesgos de contaminación con ADN contemporáneo por manipulación (Lassen, 1994).

- TEJIDOS MOMIFICADOS: frente a huesos y dientes, el tejido momificado tiene el inconveniente de conservar, junto al ADN celular, la estructura proteica de la célula en mejor o peor estado. Las muestras de ADN así obtenidas deben depurarse lo más posible de proteínas, por interferir éstas en los análisis ulteriores. La calidad del ADN extraído de tejidos momificados es menor que la del ADN extraído de hueso y diente pues contiene más contaminantes o impurezas inhibitorias y requiere una mayor purificación (Lassen, 1994).

El estudio de las muestras en general, puede complicarse debido a los largos intervalos de tiempo entre el momento de la muerte y el examen del material disponible. La descomposición acelerada suele conllevar a que tan sólo queden huesos y dientes para el análisis que, gracias a su estructura inorgánica, actúan a modo de barrera frente a la agresión que sobre el ADN ejercen diversos tipos de factores medio-ambientales.

Importancia de los dientes en el estudio de ADN.

Además de las características morfológicas de los dientes, que los convierten en el mejor reservorio para análisis identificativos habituales, las condiciones estructurales y su resistencia conocida ante las agresiones externas físicas o químicas lo hacen idóneo para realizar estudios de ADN (Gaillard, 1994).

La matriz inorgánica del diente presenta una buena protección de la pulpa dentaria, rica en células y, por tanto, en ADN. Uno de los componentes mayoritarios del diente, la hidroxiapatita se une al ADN y lo estabiliza químicamente. Si bien puede haber contaminantes en la superficie del diente, una vez limpia, la trituración a baja temperatura (-173°C) puede aportar ADN suficiente como para realizar un análisis en condiciones. De nuevo, como en el caso del hueso, el estado de conservación del ADN contenido en el diente no depende de su datación sino del entorno en el que se encuentre.

Andres Gotherstrom (1995) de la Universidad de Goteborg, detalla en su trabajo que el ADN va siendo absorbido por la hidroxiapatita, de donde se puede obtener, en dientes con mucha antigüedad. En sus trabajos describen la extracción de ADN de hidroxiapatita pura, que luego se compara en sus resultados con el ADN obtenido de dientes modernos. (Gotherstrom, 1995).

Aunque la sangre, pelos y el esperma son los tejidos actualmente usados en la ciencia forense, todos los autores coinciden en que la obtención de perfil genético utilizando pulpa dental puede ser un procedimiento habitual en la práctica forense por su eficacia. (Gaillard, 1994).

El Departamento de Antropología de la Universidad de Tokyo, realizó extracción de ADN procedente de huesos y raíces de molares, procedentes de restos arqueológicos. Obtuvieron resultados positivos, tratando estas raíces con 10 ml. de EDTA 0,5M, para proceder a su descalcificación y después continuar con el procedimiento similar al empleado en manchas de sangre, aplicación de 5 mgrs. de proteinasa K y 5 mgrs. de colagenasa. Después incubación a 37° durante 10 horas y posterior extracción con fenol-cloroformo. (Kurosaki, 1993)

TECNICAS DE ANALISIS DE ADN

El descubrimiento de los marcadores genéticos polimórficos constituye el inicio de una nueva etapa en la biología forense.

La evolución de las técnicas de ADN han proporcionado nuevas metas en la investigación forense. Podemos realizar identificaciones, mediante el estudio de paternidades. Desde el estudio de la huella genética, mediante el análisis de SLPs, hasta el análisis por PCR, usando STRs, y el estudio de ADN mitocondrial, es de aplicación para la investigación de manchas de sangre, esqueletos y dientes. También podemos determinar el sexo, mediante la hibridación con sondas específicas para los cromosomas "Y". Podremos llegar a concretar incluso las características de la raza humana. (Misawa , 1994)

Existen numerosas técnicas de análisis de ADN, cada una de las cuales es aplicable en virtud del estado de conservación del mismo. Básicamente hay cuatro técnicas de análisis de ADN:

- 1.- Técnicas basadas en el polimorfismo de fragmentos de restricción o **RFLP's** ("Restriction Fragment Length Polymorphism").
- 2.- Técnicas basadas en la amplificación de fragmentos polimórficos específicos. Se conocen como **PCR** ("Polymerase Chain Reaction").
- 3.- Técnicas basadas en la combinación de las dos anteriores. Es lo que se llama **PCR-RFLP** ("Polymerase Chain Reaction - Fragment Length Polymorphism").
- 4.- Secuenciación. Consiste en conocer la secuencia de bases de un determinado ADN. Se utiliza para cotejar las diferencias en sustituciones de nucleótidos entre las secuencias estudiadas y aporta el máximo polimorfismo a la investigación (Ginther , 1992). La técnica de secuenciación se emplea de manera

usual en el análisis de fragmentos de ADN mitocondrial que son comparados con una secuencia consenso empleada como patrón y publicada por Anderson y colaboradores en 1981.

ANALISIS DEL ADN POR PCR.

Un marcador debe ser altamente polimórfico para ser analizado en PCR. Quiere decir esto, que el gen a estudiar debe contar con varias formas alternativas, o lo que es lo mismo, varios alelos. Esta variación alélica debe ser fácilmente detectable en los análisis para definir las frecuencias genotípicas de la población. A partir de estos datos se puede hallar el poder de Discriminación del marcador.

Es por tanto necesario incluir más de un sistema de marcadores genéticos en análisis de ADN, mediante la técnica de PCR para tener mayor poder de discriminación, puesto que la no exclusión apoyada en el tipado de un solo marcador no es suficiente para decir que una persona es la donante de una muestra biológica.

Un obstáculo que frecuentemente aparece en las investigaciones es lo insuficiente de la muestra obtenida. Otro problema añadido es la degradación.

Estos problemas iniciales han sido resueltos, mediante la aplicación de técnicas de PCR (Polimerasa Chain Reaction), que permiten obtener los loci que se describen:

ADN codificante: HLA-DQA1, "Polymarker o PM" (Perkin Elmer-Cetus. USA).

ADN repetitivo (MLPs): 3'HVR, 33.15, 33.16, etc.

Minisatélites: D1S80, D17S5, 3'ApoB, Col2A1

Microsatélites ("Short Tandem Repeats" o STR): HUMTH01, F13A01, vWF, FES/FPS, etc.

Bucle D mitocondrial ("D-loop") (Vigilant et al., 1989), región V, citocromo b (Hagelberg, 1991).

Secuencias específicas de diagnóstico de sexo (cromosomas X e Y): DYZ1, DSX424 (Pfitzinger et al., 1993).

La PCR es un procedimiento "in vitro" para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN, usando dos oligonucleótidos iniciadores o "primers", que hibridan en hebras opuestas y flanquean la región de interés en el ADN diana.

La estrategia a seguir en el estudio de ADN procedente de restos cadavéricos consiste en extraer el material genético y posteriormente someterlo a una amplificación mediante la técnica de PCR. (Mullis , 1986; Mullis , 1987).

La serie repetitiva de ciclos que incluyen desnaturalización, hibridación de los primers y extensión de los mismos unidos mediante una DNA-polimerasa, dan como resultado una acumulación exponencial de un fragmento específico cuyos términos están definidos por el extremo 5' de los primers. Cada ciclo produce dos moléculas de cada una de ADN de partida (2^n), siendo n el nº de ciclos.

Cada ciclo comienza con la separación de las dos cadenas de ADN molde, gracias al cual los dos cebadores se sitúan en sus respectivas secuencias diana complementarias, una de cada cadena. La DNA-polimerasa termoestable (Taq polimerasa) que no se altera a elevadas temperaturas, agrega entonces bases en los extremos de los cebadores, alargando las dobles hélices que el cebador había iniciado (Saiki , 1986). Como cada cadena produce una nueva hélice doble, se duplica en cada ciclo la secuencia de ADN deseada.

La técnica de PCR se realiza en un termociclador. Se trata de un aparato compacto, con una cámara en su interior que es donde se depositan las muestras. El aparato está provisto de un termostato que produce oscilaciones constantes y cíclicas de la temperatura. Cada ciclo transcurre con los siguientes cambios:

- 1.- La doble hélice de ADN, muestra el fragmento que nos interesa amplificar.
- 2.- Al forzar la "desnaturalización", elevando la temperatura a

94°C, se produce la separación de las hebras de nuestro ADN molde.

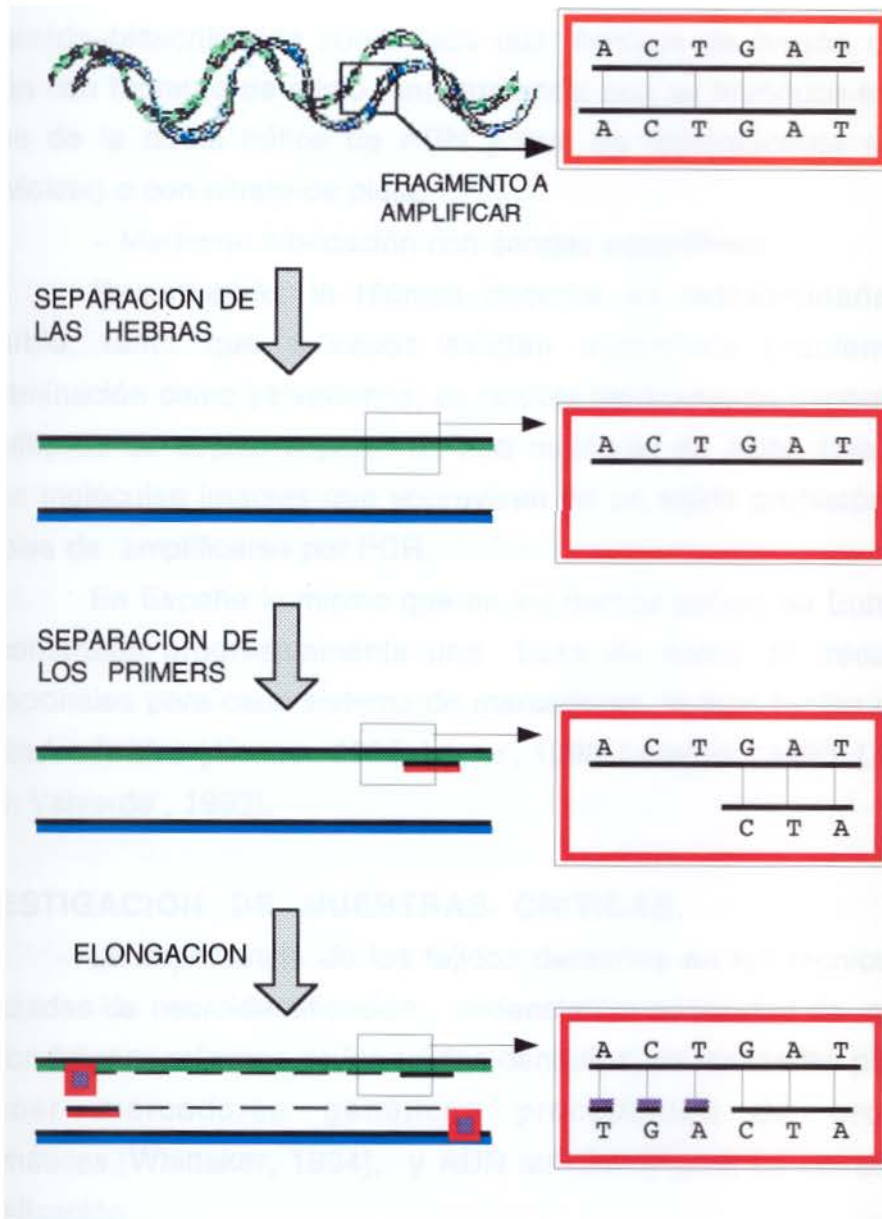
- 3.- Aprovechando la separación de las hebras se introducen los "Primers" (oligonucleótidos iniciadores específicos), que reconocen su secuencia complementaria en la cadena de ADN y se unen a ella, manteniéndose en esta fase una temperatura de 40-60°C. Es lo que llamamos "Hibridación o Anillamiento" ("annealing"). Sin este apareamiento inicial de los cebadores no puede comenzar a trabajar la polimerasa. La temperatura a la que transcurre el "annealing" (40 a 60°C) , es específica de la secuencia del cebador y se determina experimentalmente.
- 4.- Fase de "elongación o extensión" a 72°C: con los cebadores apareados, la polimerasa comienza a sintetizar la hebra complementaria mediante la adición al extremo 3'OH de desoxinucleótidos libres disponibles en la mezcla de reacción.

El tiempo durante el que transcurre cada una de estas fases, lo mismo que el número de ciclos de PCR, se determina de manera empírica y oscilan entre 30 segundos y varios minutos en el primer caso y entre 20 y 40 ciclos para el segundo parámetro.

Por tanto, para realizar este tipo de reacciones se necesita:

- .- Un ADN de partida que es el que vamos a copiar,
- .- Los cebadores para señalar la zona concreta a multiplicar.
- .- Nucleótidos sueltos que formarán las nuevas cadenas de ADN
- .- Una enzima ADN polimerasa en este caso termoestable que lleve a cabo todo el proceso.

El resultado es la amplificación de un producto génico un número determinado de veces. Así pues, después de 20 ciclos, la PCR rinde 2^{20} el número de copias. (Ver esquema en pág. 73)



Esquema representativo de la técnica de PCR, en el cual se aumenta el ADN existente en 2^n veces.

Una vez obtenido este número de copias, los productos PCR se pueden identificar por varios métodos:

-Mediante electroforesis convencional en geles de agarosa o acrilamida-bisacrilamida combinada con técnicas de tinción como la tinción con bromuro de etidio (una sustancia que se introduce entre las bases de la doble hélice de ADN y que es fosforescente a la luz ultravioleta) o con nitrato de plata.

- Mediante hibridación con sondas específicas.

Resumiendo, la técnica descrita es extraordinariamente sensible, tanto que a veces existen auténticos problemas de contaminación como ya veremos; es posible teóricamente generar miles de millones de copias a partir de una molécula de ADN. Una o muy pocas moléculas intactas que sobrevivan en un tejido prehistórico son posibles de amplificarse por PCR.

En España lo mismo que en los demás países de Europa, se ha construido progresivamente una base de datos de frecuencias poblacionales para cada sistema de marcadores, lo cual facilita obtener resultados fiables (Alonso , 1993; Lareu , 1993; Lorente ., 1993; Lorente , 1994; Valverde , 1993).

INVESTIGACION DE MUESTRAS CRITICAS.

La importancia de los tejidos dentarios en las técnicas más avanzadas de necroidentificación, evidencian la necesidad de conocer las condiciones mínimas de los tejidos dentarios, en las cuales podemos obtener marcadores genéticos procedentes de proteínas plasmáticas,(Whittaker, 1994), y ADN suficiente para su extracción e identificación.

La técnica de PCR para determinación de fragmentos mínimos de ADN con fines identificativos permite resultados positivos en casos en los que los restos hallados están degradados o son muy antiguos, según explica Sajantila (Sajantila, 1991), sin embargo, en cadáveres con algún grado de destrucción y degradación por la acción del fuego y el tiempo, incluso esta técnica puede ser insuficiente.

Llegados a esta situación límite, la investigación del ADN mitocondrial puede ser definitiva, puesto que como dicen Lorente y col.(1994), este material presenta una elevada resistencia a la degradación. El ejemplo que citan estos autores señala que en una muestra mínima en que encontramos uno o dos loci para estudio de ADN genómico podemos encontrar decenas de mitocondrias, cada una de las cuales puede tener decenas idénticas de ADNmt.

La extracción de ácidos nucleicos sobre muestras biológicas recientes o en condiciones óptimas (como por ejemplo la sangre líquida) sigue un protocolo estándar (Sambrook , 1989), que resulta bastante alterado cuando la muestra está muy deteriorada. El procedimiento más usual se conoce como "fenol-cloroformo", y se basa en la digestión de las proteínas de la muestra con una proteinasa (proteínasa K) y el ulterior lavado con una dilución de fenol-cloroformo que, en su fase fenólica, retiene las proteínas, mientras que en su fase acuosa retiene ácidos nucleicos. Con cada lavado, se retiran proteínas provenientes de la lisis con proteinasa K, ya que estas disminuyen la pureza del ADN.

El tratamiento de muestras forenses resulta algo más complicado porque, en última instancia, se obtienen cantidades de ADN muy reducidas, y hay que evitar llevarse parte de la fase fenólica al retirarla. Existen numerosos procedimientos de extracción publicados en estudios que manejan muestras del origen más variado: restos óseos antiguos, manchas de sangre, vellosidades coriales, pelo, etc (Arroyo 1993; Golenberg , 1990; Higuchi , 1988; Hagelberg , 1991; Pfitzinger, 1993). Algunos de ellos emplean resinas, pero recientemente aparecen cada vez más preparados comerciales que reducen los tiempos y el trabajo, con lo que el manejo de muestras forenses se ha vuelto más fácil y lo será aún más en el futuro.

La importancia que tiene el tejido dental en estas investigaciones y la sencillez de su extracción, queda ampliamente demostrada por los resultados presentados por numerosos investigadores:

En general, la extracción de ADN en restos óseos o dentarios

en condiciones de difícil identificación, presenta dos variantes básicas respecto a la rutina del ADN fresco: se trata con agentes quelantes (agentes capaces de capturar iones libres en una dilución) que inhiben la actividad de las enzimas y se concentra y purifica con tubos de centrifuga especiales ("Centricones"), a fin de obtener una dilución final más pura.

La cantidad de ADN puede ser muy baja en casos extremos, como máximo, un par de cientos de nanogramos (a veces se trabaja con 1-2 nanogramos por estudio). En esta situación, se busca multiplicar el número de copias de una región polimórfica conocida.

El acceso hasta el tejido pulpar puede realizarse de diversas formas. Un procedimiento eficaz es realizar un corte horizontal en la zona cervical. Así se evitan las posibles restauraciones y provee una visión directa de las zonas radicular y cámara pulpar. Este sistema es mejor que el acceso convencional que se realiza en las endodoncias (Smith, 1993). Con este procedimiento se preserva la morfología.

Un procedimiento similar es el que describe Duffy en su trabajo sobre determinación de sexo en pulpa dental (Duffy, 1991)

El diente humano tiene un papel importante en los análisis de ADN. La dentina y el esmalte ofrecen un sistema protector para el ADN genómico y mitocondrial. En los trabajos realizados por Smith (1993), demuestra la estabilidad de los elementos dentarios para el estudio de ADN. Emplea diez pares de maxilares, donde centra el análisis sobre molares que fueron almacenados durante 18 semanas con humedad y temperatura ambiental. Los molares derechos se aplastaron, mientras que los izquierdos fueron seccionados y se conservó el ADN con anterioridad al ensayo. La calidad y cantidad de ADN obtenido fue comparado entre los dientes derecho e izquierdo de cada maxilar, demostrando la fiabilidad de cualquiera de los procedimientos.

Gaillard (1994), realizó estudios de muestras sanguíneas y tejido pulpar, sin ningún tratamiento especial. Describe la investigación de 8 personas, experimentalmente, mediante sondas MS43A, utilizando

tejido pulpar del tercer molar y muestras de sangre obtenida durante las extracciones de estos dientes. El perfil genético se obtuvo perfectamente en las distintas muestras manejadas.

El tejido de pulpa dental se puede obtener en condiciones experimentales que pueden ser similares a las muestras obtenidas en casos forenses (los accidentes de aire, quemados y cuerpos en putrefacción). En la Universidad de Mainz- Alemania, realizaron investigaciones sobre estas situaciones. Experimentalmente, se trataron dientes extraídos durante tratamientos clínicos (30) que se almacenaron entre 6 semanas y 4 años a la temperatura ambiente. También se investigaron otros dientes (10) extraídos de fragmentos de mandíbula que habían permanecido almacenados durante 15 años a temperatura ambiente. Un tercer grupo fue constituido por dientes (8) de los casos reales de necroidentificación.

El ADN extraído de tejido dental, se midió mediante fluorimetría para determinar su concentración.

La cantidad de ADN obtenido de tejido pulpar de un diente único variaba desde 6 microgramos a 50 microgramos de ADN. En la mayoría de los casos el ADN de alto peso molecular estaba todavía presente aunque la porción importante consistió de ADN degradado. (Pösth, 1992).

Las técnicas de PCR aplicadas sobre las muestras investigadas, aportaron resultados tan fiables como los proporcionados por manchas de sangre.

En el Instituto de medicina Legal de Santiago de Compostela, se estudiaron diversas muestras procedentes de dientes, sometidos a diferentes condiciones medio-ambientales y de antigüedad para comprobar la eficacia de los diversos métodos de extracción de ADN. Se analizaron dientes con una antigüedad desde la extracción, de 15 días, 1, 3, 6, 12, 24 y 36 meses. Se analizaron series sometidas a diversas temperaturas ambientales: 4, 20, 40° C.

También se analizaron series de dientes enterrados y sumergidos en agua (mar y río). Como complemento se analizaron dos

series de altas temperaturas (75, 100, 200, 300, 400 y 500 ° C) y algunos dientes viejos (12-15 años).

Se analizaron los loci: DQA1, D1S80, dos STRs (HUMTHO1 y Humfes/fps/ y X-Y; todos ellos mediante secuencias específicas de PCR. (Se extrajo la muestra pulpar, mediante distintos procedimientos: fragmentación, sección horizontal y acceso endodóntico.)

En general los mejores resultados se obtuvieron utilizando STRs y los más pobres para el marcador D1S80. Se obtuvo el 100 % de resultados positivos por STRs en las series de dientes viejos. Se obtuvieron resultados totalmente negativos a 500°C.

Los dientes sumergidos en agua dieron resultados muy pobres, con un promedio de solo el 25% de resultados positivos en los dientes de 6 meses de antigüedad. (Alvarez-García, 1995)

En los casos extremos de cadáveres antiguos, o restos calcinados, el estudio de ADN ofrece posibilidades de éxito que en otros procedimientos tradicionales sería imposible alcanzar.

El Departamento de Medicina Legal, de Tokyo, coincide en sus resultados con otros autores, cuando investiga restos esqueléticos antiguos. En sus trabajos, señalan la identificación de restos, muy descompuestos, en los que lograron extraer ADN muy contaminado y degradado, amplificando la región hipervariable COL2A1 3', mediante técnicas de PCR (Honda, 1994)

Otros estudios forenses, como son las paternidades, también son posibles de realizar con muestras dentales.

El Instituto Nacional de Toxicología de Sevilla, describe los resultados obtenidos en dos casos. Los restos cadavéricos antiguos, procedentes de un incendio fueron exhumados, y después de obtener las piezas dentales, fueron tratadas, mediante limpieza, aplicación de nitrógeno líquido, pulverizados y descalcificados totalmente mediante EDTA 0,5 M. Luego fueron incubados en presencia de proteinasa K. El ADN fue extraído mediante fenol-cloroformo y tratado con Centricón. Se obtuvieron resultados para los loci DQA1, D1S80, PM y diferentes STRs, con resultado totalmente satisfactorio, logrando su

identificación (Sanz, 1995).

El laboratorio de Biología de la Comisaría General de Policía Científica, de España, analizó entre otros muchos casos forenses, unos maxilares, procedentes de la Comisaría de Policía de Almería (España) relacionados con presunto suicidio mediante incendio provocado tras el cual apareció carbonizado el cuerpo de una persona. De igual manera que en otros casos similares, se solicitaron 5 c.c. de sangre líquida de cada uno de los presuntos progenitores. Tras los estudios morfológicos se procedió a la extracción de ADN de los restos óseos y a su comparación con el ADN de los familiares. En el trabajo presentado en el Congreso Internacional de Hemogenética de Santiago de Compostela, exponen los resultados positivos obtenidos en esta investigación, mediante aplicación de técnica de PCR, para los loci HLADQA1, D1S80, Polimarker y cuatro diferentes STRs (THO1, FESFPS, F13A01 y vWF) (Andradas, 1995).

La identificación del sexo es importante en la práctica forense.

En el trabajo realizado por Chen , se reflejan la afectación del medio ambiente y los factores físico-químicos para la determinación de ADN desde pulpa dental, mediante técnicas de PCR. Se extrajeron dientes y se sometieron a diferentes niveles de pH. Se sometieron a una solución de formalina al 10%, etanol al 75%. A diferentes temperaturas (-20grados centígrados, 4, 25, 37, ebullición y cremación.), distintos grados de humedad (20%, 65%, sumersión en agua), temperatura ambiente, durante 1.5; 3.5 y 8 años. El ADN fue extraído, con el propósito de determinar la determinación de la cantidad. Se emplearon los primers Y1.1 y el Y1.2 .para determinación de sexo (Chen, 1994).

Los resultados fueron los siguientes: Se obtuvieron fragmentos de 154 pares de bases en todos los dientes recientes de hombres, como era de esperar. No se encontraron en dientes recientes de mujeres. No se observaron en los dientes a la intemperie durante más de 10 semanas, sumergidos en agua, en solución de pH 2 durante este tiempo y combustión 10 minutos. Solo se vieron unos fragmentos

de ADN en dientes con humedad del 66% y solución de pH 10 durante 10 semanas y combustión 5 minutos. En los restantes casos no se apreciaron bien las bandas. La calidad de ADN analizado mediante procedimientos de PCR, resultó afectada.

Entre las investigaciones más actuales para la determinación del sexo, mediante técnicas de PCR debemos citar las realizadas por Gremo (1995), que resume los estudios realizados sobre 532 piezas dentales. En su muestra utilizó dientes con 20 años de antigüedad, formando grupos de 0 a 2; 2 a 5; 5 a 10; 10 a 15 y 15 a 20 años.

También estudió muestras sobre otros parámetros: diferentes medios de conservación; temperatura, inmersión en suero salino, intermedia y alta incineración.

Estudió diferentes tipos de dientes, uni o multirradiculares. Realizó la extracción por el método de fenol-cloroformo con modificaciones. Para la amplificación observó el protocolo de Pfitzinger (1993).

Los fragmentos amplificados fueron visualizados por electroforesis en minigel de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los resultados fueron satisfactorios en los casos estudiados.

El departamento de patología oral de la Universidad de Sheffield, realizó investigaciones sobre dientes muy antiguos. En sus trabajos determinativos del sexo, utilizaron 56 dientes modernos, 14 de casos forenses y 46 restos arqueológicos. Mediante el método de fenol-cloroformo realizaron la extracción de ADN que se midió por técnicas de U.V.-espectroscopia y electroforesis. Todos los dientes recientes, los casos forenses y los casos arqueológicos fueron medibles por U.V. espectroscopia. Los dientes recientes proporcionaron rangos de 25,5 a 70 microgramos, en dientes permanentes hasta 69-118 microgramos. En los casos forenses extremos se obtuvieron cantidades de 35,3 a 65,6 microgramos (Gibbs, 1995).

Cattaneo (1995) destaca la importancia que tiene la extracción de ADN en restos esqueléticos, que sin embargo encierra

grandes dificultades. Este autor señala que el método frecuentemente utilizado de fenol/cloroformo no es siempre satisfactorio. Compara en su investigación los resultados de este método con otro procedimiento que describe, utilizando un precipitado de acetato sódico saturado.

Dice en sus conclusiones que mientras que el método del fenol/cloroformo, fue positivo en 7 de los 11 ensayos que realizó, el otro procedimiento proporcionó buenos resultados en todas las muestras.

Las técnicas de PCR son los procedimientos más simples para el estudio de restos esqueléticos y dentales. Honda et al (1990 y 1995) explican los buenos resultados obtenidos en la investigación del polimorfismo para el locus D1S80 (pMCT118), utilizando el procedimiento "semi-anidación" PCR en restos esqueléticos. La extracción la realiza secando previamente las muestras de dientes y huesos y posterior tratamiento con nitrógeno líquido. Luego procede a pulverizar las muestras para continuar con la extracción siguiendo las pautas del método de fenol-cloroformo. isoamílico. (Honda, 1990 y 1995)

Utilizando muestras dentales, las técnicas habitualmente empleadas aportan buenos resultados. Autores como Grenhalgh (1995), defienden la técnica de Chelex para extracción de ADN por PCR, por la simplicidad y economía del procedimiento.

Las técnicas de PCR pueden ser de utilidad también para determinar los genotipos ABO. El estudio de los grupos sanguíneos ha evolucionado de una forma vertiginosa desde que Landsteiner descubrió dichos grupos sanguíneos en 1902 (Schacker, 1995)

En los siniestros, los cuerpos aparecen en difíciles situaciones para su estudio, como hemos explicado en apartados anteriores. Sin embargo, la extracción y amplificación de ADN, puede mejorar los resultados, como reflejan los trabajos recientes que se realizan en estos casos.

Así encontramos, que en accidente ocurrido al avión de la compañía Air Inter, en Enero de 1992, en las proximidades de Estrasburgo, fueron identificadas 17 personas mediante amplificación

de los loci HLA DQ A1 y D1S80 (Ludes, 1992).

El 28 de Septiembre de 1992 ocurrió un accidente aéreo en las proximidades de Khatmandu. El avión Airbus PK268 de las líneas pakistaníes PIA se estrelló con 164 pasajeros que resultaron muertos, a consecuencia del impacto y subsiguiente incendio del aparato.

La identificación de los cadáveres se realizó en principio mediante estudio de documentos, objetos y ropas, otros efectos personales y métodos odontológicos. Después de tres meses de investigación, se decidió aplicar técnicas de ADN para el análisis de 85 restos no identificados.

Se analizó ADN en 57 muestras obtenidas de los restos. Se lograron identificar un total de 13 cuerpos, mediante el estudio comparativo con otras obtenidas de familiares de las víctimas.

Entre los cuerpos identificados por este procedimiento estaban los cuatro miembros de una misma familia de españoles (en este siniestro fallecieron 30 españoles, de los cuales se identificaron plenamente 8) (Maguire, 1994)

En la investigación del accidente ocurrido al airbus A310 de las líneas aéreas rumanas, el 31 de Marzo de 1995 en Bucarest, se analizaron 53 dientes, que después de ser radiografiados fueron analizados por técnicas de ADN. Se lograron extraer aproximadamente 5 microgramos de ADN algo degradado, útil para su amplificación en 17 dientes y cantidades entre 2 y 500 nanogramos en los restantes (Marcotte, 1995)

En otras investigaciones sobre grupos de personas desaparecidas en otros tipos de masacres, también es de utilidad la técnica de ADN genómico o mitocondrial. En la aldea de San Jose Pachoa Lemoa, en Guatemala, fueron masacradas 12 personas en 1982. Diez años después de su muerte y enterramiento, fueron exhumados.

El estudio realizado por un grupo de expertos, formado por antropólogos forenses y arqueólogos de Chile y Estados Unidos, auxiliados por expertos de Guatemala, permitió la identificación de los

cuerpos.

Como complemento a estudios antropométricos, se investigaron algunas piezas dentarias (molares, premolares e incisivos), con resultados altamente positivos.

Se emplearon dientes que habían permanecido enterrados durante esos 10 años, que presentaban condiciones adecuadas para análisis de ADN mitocondrial.

El tratamiento de los dientes para la obtención de la muestra, se efectuó, mediante lavados previos con agua desionizada, aplicación de fosfato sódico 1M. (pH 7,2) y soluciones de lavado en agitación continua, con centrifugado en tubo "Falcon" y posteriormente, eran abiertos mediante la presión de una prensa, hasta dejar expuesta la cámara pulpar.

Citan los autores que consideran aceptable el método descrito por Smith et al, separando la cámara pulpar y dentina seccionando la corona. Siguiendo el mismo procedimiento, citan los resultados positivos sobre 25 restos que habían permanecido enterrados durante 80 años, de los cuales, únicamente uno les dió resultado negativo, atribuible a la humedad del lugar del enterramiento. (Scwartz, 1991; Smith, 1993; Ginther, 1992; Boles, 1995).

También atentados terroristas, en los que las destrucciones corporales son grandes, se demuestra la importancia de los métodos descritos. En la mañana del 19 de Abril 1995, sucedió un atentado en un edificio de Oklahoma. Entre esa fecha y el 5 de Mayo fueron identificadas 163 cuerpos. Cuatro restantes fueron analizados mediante técnicas de ADN, en espera de comparación con muestras de familiares. El equipo de odontólogos trabajó en la identificación positiva de 127, de los 163 cadáveres (Warnick,1995)

5. MATERIAL Y METODO

5. MATERIAL Y METODO

5.1. MUESTRAS:

5.1.1. GRUPOS EXPERIMENTALES.

GRUPO NUMERO 1.

Un primer grupo está constituido por 62 dientes, procedentes de cadáveres parcialmente quemados en un siniestro, ocurrido hace 12 años, que fueron limpiados en los primeros momentos de la identificación, mediante la acción de la sosa al 6%, en ebullición durante 20 minutos, cuyo efecto queremos comprobar, respecto a la cantidad de ADN que se puede extraer.

Estos dientes han permanecido durante este tiempo, perfectamente resguardados en laboratorio, sin ninguna afectación por el aire o humedad.

En este siniestro del que hemos guardado en depósito restos dentarios, se identificó en 1983, a 160 cadáveres, de los 184 fallecidos. De los identificados, 44 lo fueron exclusivamente por métodos odontostomatológicos. y otros 30 por la conjunción de procedimientos dentarios con otros distintos. La suma de ambas cifras representa el 46.25% del total de los identificados, según la distribución de métodos.

GRUPO NUMERO 2.

El segundo grupo se constituye por otros 66 dientes, procedentes de exodoncias, de los cuales, 20 presentaban caries y los restantes son piezas sanas, extraídas por motivos periodontales.

En este grupo hemos querido comprobar la afectación del ADN pulpar, al mantener los dientes a temperaturas elevadas, durante 15 minutos.

GRUPO DE CASOS FORENSES AISLADOS.

El tercer grupo se constituye con 14 casos forenses aislados, de diferente etiología, considerados críticos, algunos de ellos calcinados y otros, con destrucciones, que consideramos identificativos

de las situaciones que se recogen en los cadáveres después de siniestros o casos aislados de difícil resolución y en los cuales se investigó su identidad mediante procedimientos Odontostomatológicos habituales complementados con el estudio de ADN.

Caso número 1.

Se trata del cuerpo de un hombre semidestruido por la acción de las aguas, aparecido en Santander en Noviembre de 1989, presumiblemente identificado como un joven desaparecido en aquella zona tres días antes.

Caso número 2.

Corresponde a un cadáver carbonizado, incluyendo la destrucción parcial de los maxilares, por el fuego cuyo cuerpo es encontrado en Barcelona, en Septiembre de 1991. La muerte, de etiología homicida, se había producido mediante el incendio con gasolina.

Caso número 3.

Abril 1991. Aparece una rulotte totalmente destruida, en la ciudad de Almería, tras haber sido incendiada con gasolina. En su interior se encuentra el cuerpo carbonizado de un hombre.

Caso número 4.

Julio 1992. Este caso corresponde a los restos totalmente esqueletizados de un hombre, que aparecen en un pozo abandonado, en el término municipal de Marbella.

Caso número 5.

Diciembre de 1992. Se investiga la identidad de una mujer, cuyo cuerpo carbonizado aparece en las proximidades de Estepona.

Caso número 6.

Septiembre 1993. Aparece en Valencia un cadáver, totalmente carbonizado, tras ser quemado con gasolina, presumiblemente identificado como un hombre joven. Únicamente se recuperan con valor identificativo los maxilares.

Caso número 7.

Septiembre 1994. Tras la explosión de gas y posterior incendio de una vivienda en Almería, aparece el cuerpo de un hombre totalmente carbonizado, al que se le extraen los maxilares, que a pesar de sufrir alguna alteración, conserva las piezas dentales en condiciones adecuadas para su estudio. No presenta tratamientos dentales, que permitan una individualización.

Caso número 8.

Octubre 1994. Se analizan restos esqueléticos que habían permanecido guardados en el depósito de cadáveres de Estepona desde hace cinco años, y que fueron encontrados semienterrados, sin lograrse su identificación desde entonces.

Caso número 9.

Noviembre 1994. Se analiza un cráneo, encontrado en las aguas del puerto de Valencia, sin ningún otro elemento de identificación que estos restos óseos, sin mandíbula. El maxilar superior presenta las piezas dentales laterales (13-18 y 23-28).

Caso número 10.

En la localidad catalana de Cerdanyola, aparece un cadáver, en Septiembre de 1994, totalmente carbonizado en el interior de un coche, que había sido rociado con gasolina, quedando reducido casi a cenizas todo el cuerpo, incluidas las piezas dentales.

Caso número 11.

Se investiga un cráneo, procedente de la ciudad catalana de Badalona, encontrado en un monte, a la intemperie en 1994, que presenta orificios de entrada y salida, aparentemente de bala, procedente de una ciudad catalana. Se supone que ha soportado durante más de tres años los efectos de los agentes atmosféricos.

Caso número 12.

Julio de 1995. Desde una ciudad alicantina son remitidos para su estudio ambos maxilares extraídos durante la autopsia, de un cadáver, totalmente desfigurado, que apareció sujeto al casco de un barco. (Aparece casi esqueletizado).

Caso número 13.

Octubre 1995. Desde una población de la provincia de Málaga se remiten restos dentarios y esqueléticos del cadáver de una mujer joven, en avanzado estado de descomposición y con grandes destrozos corporales, suponiéndose la causa de la muerte, de etiología homicida.

Caso número 14.

Noviembre 1995. Se investigan los restos dentarios de un cadáver de mujer encontrados en estado de semiesqueletización en una localidad de la provincia de Santa Cruz de Tenerife.

5.2. INSTRUMENTAL:

En el apartado correspondiente al método se indica, en los paréntesis, el equipo utilizado, pero aunque sea una repetición hemos querido agrupar todos los instrumentos en el siguiente esquema:

A. Investigación de ADN en dientes:

Mufla de calor seco, hasta 350 grados centígrados.

Cubetas para minigeles (Farmacia, LKB).

Agitador de tubos (VF.2)
Centricon (Amicon, USA)
Tubos Eppendorf
Microcentrífugas(ORTO y HERMLE, Z-230 MR)
Baños (SELECTA-P)
Campana de Seguridad Biológica (Telstar)
Estufas de secado (Heraeus)
Neveras
Autoclave
Equipo de Espectrofotometría de luz U.V. (Camag-Reprostar II)
Equipo de electroforesis vertical (Hoeffer).
Termociclador (Perkin Elmer. Mod. 480)
Fuente de alimentación (Pharmacia LKB-GPS,200/400).
Placa vitrocerámica con aplicador magnético (IKAMAG)
Micropipetas
Instrumental fungible y reactivos diversos.

B. Para los análisis odontológicos generales:

Compás de Broca
Pie de Rey
Compás de espesor para medición de dientes
Cámara fotográfica Nikon FM2, objetivo AF.Micro Nikkor. 60 mm.
Cámara fotográfica 9x12 Sinar obj. Nikkor 135 mm. 1:56.
Papel de acetato
Papel fotográfico
Equipo de radiología intraoral
Placas de radiografía intraoral (Kodak)
Reveladores y fijador fotográfico

5.3. METODO

5.3.1. GRUPOS EXPERIMENTALES:

Grupo número 1.-

El primer grupo de dientes, como se indica anteriormente, es una muestra obtenida de un siniestro ocurrido hace doce años. Los dientes habían sido sometidos a la acción de la sosa cáustica al 6%, mediante ebullición durante 20 minutos.

La aplicación de la sosa cáustica es una práctica rutinaria en nuestros laboratorios para la limpieza de las partes blandas que están adheridas a los maxilares.

Los maxilares fueron extraídos de los restos cadavéricos destruidos y semicalcinados, de acuerdo con las normas descritas por Luntz (1973), haciendo una incisión lineal desde la comisura labial hasta la ATM, para después desprender las partes blandas. El maxilar se corta, siguiendo una línea paralela a la oclusión, por encima de los ápices dentarios, utilizando una sierra eléctrica de autopsias, o simplemente con un escoplo y martillo.

Una vez lograda la extracción, debemos limpiar los tejidos blandos, mediante un bisturí para después terminar realizando una ebullición en Hidróxido sódico 1,5 M., para facilitar la posible manipulación durante largo tiempo.

Grupo número 2.-

Los dientes pertenecientes al segundo grupo experimental son procedentes de exodoncias recientes, en los cuales se trataba de comprobar la acción del calor sobre el ADN existente en los conductos radiculares.

Se utilizó una mufla de calor seco (Heraeus), en la que se elevó la temperatura interior hasta 200°C. Cuando se alcanzó dicha temperatura, se introdujeron los dientes, debidamente limpios, y se mantuvieron a esta temperatura durante 15 minutos.

Seguidamente fueron enfriados, mediante la aplicación de agua corriente.

En 22 casos, en los que por motivos periodontales, se había obtenido del mismo paciente más de un diente, uno de ellos fue analizado, sin someter a la acción del calor, para comprobar la extracción de ADN en situaciones idóneas. Este conjunto de dientes sirvió como grupo control.

Paralelamente, se investigó una muestra de 10 dientes molares, que se mantuvieron en mufla de calor seco a 250° C., durante 15 minutos.

Obtención del tejido radicular.

Todos los dientes de los dos grupos experimentales fueron manipulados en la forma que se describe:

1.- Eliminación de posible ADN exógeno.

Se colocan en el interior de un equipo de luz U.V. (Heraeus), a una longitud de onda de 254 nm, durante 10 minutos.

2.-Separación de tejido radicular.

Se realiza la extracción del contenido radicular, mediante apertura longitudinal de la zona de la raíz.

Para la extracción, se golpeaba de forma seca con un mazo metálico, suficientemente limpio, en la zona radicular, protegiendo las muestras de posibles contaminaciones externas.

Obtención de la muestra.

Después de fracturar las raíces, mediante pinzas de puntas finas, se extrae el tejido pulpar, raspando las paredes internas del conducto radicular con una hoja de bisturí para extraer posible tejido adherido.

Extracción del ADN.

Las extracciones se realizaron en grupos de cinco muestras con otra más de agua, como control negativo, por siguiente

procedimiento.

1.- Maceración con sustancia tampón:

A las pulpas extraídas y depositadas en tubos Eppendorf, se les añadieron 400 µl. de una sustancia tampón de lisis (Tris 10mM., EDTA disódica 10 mM., ClNa 0,1 M., SDS al 20%, pH 8,0).

2.- Rotura de las paredes celulares:

Aplicación de una solución de 20 µl. de DTT (ditiotreitól) 1M (agente reductor) y otra parte igual de proteinasa K.(10 mgr/ml).

3.- Incubación de la mezcla.

Se mantienen en incubación durante 10 horas a 37 ° C. en estufa (Selecta-P).

4.-Extracción.

Se realiza extracción con fenol/cloroformo del ADN genómico y purificación mediante centrifugación:

A.- Se traspasa el contenido de los tubos Eppendorf a otros, mediante centrifugado.

B.- Se añaden 200 µl de fenol/cloroformo/isoamilico (25:24:1) a cada tubo, se agita y se centrifuga durante 3 minutos a 13.000 r.p.m. en una microcentrífuga. (Hermle, Z-230 MR).

C.- Se retira la fase acuosa (superior) que es donde se encuentra dicho ADN y se pasa a otro tubo repitiéndose la operación anterior con el F/C/I.

D.- Después se procede a la purificación del ADN mediante tubos Centricón-100 (Amicón, USA) por centrifugado, según el siguiente protocolo:

A un tubo de Centricón 100, se añaden:

- 1,5 ml. de TE (Tris 0,01 mM. y EDTA disódica 1 mM.- pH

8.0).

- .- La fase acuosa del punto anterior.
- .-Se Centrifuga durante 20 minutos a 1500 r.p.m. (Microcentrífuga ORTO).
- .- Se añaden 2 ml. de TE y se centrifuga 20 minutos a 1500 r.p.m.
- .-Se repite la operación anterior.
- .-Se tapa, se invierte el tubo Centricón y se centrifuga 2 minutos a 500 r.p.m.

Se obtienen 40-50 μ l que se pueden cuantificar.

Cuantificación del producto obtenido.

El ADN extraído y purificado se cuantificó mediante electroforesis submarina (Pharmacía LKB) en gel de agarosa tipo I al 0.1 % , en cubeta y tinción con Bromuro de Etidio.

Se compararon las muestras con patrones de concentración de ADN conocida y se visualizó, con un equipo de espectrofotometría de luz ultravioleta (Camag-Reprostar II).

Amplificación de algunas de las muestras.

La amplificación de las muestras se aparta de nuestro objetivo principal, que era simplemente comprobar la posible extracción de ADN determinando la concentración.

Sin embargo, aleatoriamente fueron amplificadas algunas muestras, (fundamentalmente aquellas que presentaban una degradación elevada), mediante el uso de kits comerciales de la marca "Perkin Elmer-Cetus" para los marcadores DQA1 y D1S80, siguiendo las pautas marcadas por el fabricante, obteniendo resultados totalmente positivos.



Ilustración num. 7. Detalle de las zonas radicales, una vez abiertas para extraer el tejido pulpar.

5.3.2. GRUPO DE CASOS FORENSES.

En todos estos casos forenses, se procedió de la forma que se describe.

1. Inspección de los restos y extracción de maxilares.

Después de realizar la inspección general a los restos cadavéricos, se realiza una serie completa de fotografías, generales y de detalle de aquellas zonas de interés para la investigación.

Ante la destrucción que presentan los cuerpos investigados y por ser los elementos dentarios los únicos que pueden servir para la identificación, con excepción de los casos números 8, 9 y 11, que se trataba de cráneos limpios, y el número 10, que la muestra era un fragmento de maxilar y fragmentos sueltos de dientes maxilares; en los restantes casos se realizó extracción de los maxilares, según se describe:

Se efectuó un corte longitudinal, mediante el empleo de un bisturí desde la comisura labial hasta la zona de la ATM. Con una hoja de bisturí se separan las partes blandas y se cortan los ligamentos de la articulación.

El maxilar superior se corta mediante una sierra eléctrica de disección, siguiendo una línea paralela a la oclusión, sobre los ápices dentarios.

Los maxilares, después de ser retirados de los restos cadavéricos, fueron limpiados, manualmente en principio y después con la aplicación de Hidróxido sódico 1,5 M. en ebullición.

2. Radiografía oral.

La limpieza de los maxilares, facilita su manipulación y obtención de radiografías seriadas.

Se realizaron radiografías en todas las muestras con excepción de los casos números 9 y 11, que son cráneos con ausencia del maxilar inferior y sin patologías visibles. Tampoco se obtuvo

radiografía en el caso núm. 5, el cráneo carbonizado de una mujer, que se investigó la posible existencia de una prótesis total.

Estas radiografías, se obtuvieron con equipos de radiografía oral, con un tiempo de exposición de 0,20 segundos y 60 Kv.

Se prestó especial atención a la existencia de patologías, obturaciones y prótesis removibles, fácilmente identificables.

3. Estudio de prótesis

El caso número 3, corresponde a los restos carbonizados de un hombre. En las proximidades del cuerpo se encontraron los restos metálicos de una prótesis parcial removible construido en metal-resina, de la que se había destruido este último material.

El cadáver número 5, se identificó como de una mujer joven, del que después de separar los tejidos carbonizados que cerraban la boca casi herméticamente, se logró extraer una prótesis total superior fabricada con resina, que a pesar del fuego estaba perfectamente conservada para su identificación.

4. Superposición de Imágenes.

En los cuerpos números 6 y 8 se realizó un estudio de superposición de imágenes, comparando los resultados obtenidos del cadáver con fotografías familiares.

Nuestro procedimiento fue totalmente manual: Primeramente se obtuvo una reproducción de la fotografía familiar, hasta alcanzar una medida aproximadamente natural, empleando los dientes delanteros como referencia comparativa.

El negativo obtenido se colocó sobre el visor de la cámara profesional 9x12 (Sinar). A través del visor y el negativo de la fotografía ante-mortem se iluminaba la imagen del cráneo colocado ante el objetivo de la cámara. De esta forma se acomodaron las dimensiones de la fotografía del cadáver, con la anterior, para lograr la perfecta superposición.

En el primero de los dos casos citados, aparecían

malposiciones y ausencia de un incisivo central, que facilitaba la superposición. En el segundo, se veían unas estriaciones verticales en la cara vestibular de los incisivos que también mejoraba los resultados.

Ambos casos fueron complementados con otros métodos. En el primero de ellos, se realizó un estudio dactilar un mes después y el citado con el número 8, se completó con el análisis de ADN.

5. Estudio de ADN.

En todos los casos investigados a partir de 1994, se realizó análisis de ADN.

En el caso número 7, perteneciente a un cadáver totalmente calcinado, se fragmentaron las raíces de los dientes 33 a 36, de donde se extrajo muestra suficiente para estudio de ADN, según el método descrito en los casos experimentales.

En los casos números 8 y 14, además de obtenerse muestra pulpar, ante la posible insuficiencia de la misma, se extrajo ADN procedente de un hueso largo. Para ello, se redujo el contorno exterior de la zona central de un fémur, con una anchura de un centímetro. Esto se hizo, utilizando una fresa de diamante de tallado, acoplado a turbina de alta velocidad y refrigeración por agua. (Kavo). Después de cortar este anillo óseo, se aplicó la fresa de tallado, en la zona medular del hueso. Esto se hizo para retirar las capas con posible contaminación externa.

La masa obtenida, se pulverizó hasta reducirlo a polvo, con un molinillo de laboratorio. Después se trató con EDTA disódica 0,5M., durante un mes, hasta quedar totalmente descalcificado y proceder a la extracción de ADN con fenol/cloroformo/isoamílico, según el método descrito anteriormente.

En los restos fragmentados del caso número 10 que habían sido radiografiados anteriormente, no se pudo obtener muestras de ADN debido a la destrucción que presentaban por el fuego.

En los casos con los números 9 y 11, previamente a la extracción de piezas dentales para estudio de ADN, se realizó un

análisis craneométrico completo, con determinación de índices cefálicos, que permitieran determinar datos referidos a raza, edad aproximada y sexo.

5.3.3. METODO ESTADISTICO

Estudiamos los resultados estadísticos de las muestras experimentales.

Con los procedimientos estadísticos empleados pretendemos analizar el efecto de tres factores diferentes sobre la concentración de ADN extraída, medida en ngr/ μ l.

El análisis estadístico del presente trabajo se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS/PC+ versión 4.0. El planteamiento comprende un grupo control de 22 muestras no sometidas a tratamiento alguno, y dos grupos tratados de dos maneras distintas: exposición de la muestra a 200°C y tratamiento con hidróxido sódico. Dentro de cada uno de los tratamientos, así como en las muestras control, tenemos otra información relativa al tipo de diente (molar, premolar, incisivo y canino) y a su ubicación maxilar (superior o inferior). Tanto el tratamiento (tres clases diferentes si tenemos en cuenta el control) como el tipo de diente (cuatro clases) como la pertenencia a uno u otro maxilar, determinan K grupos distintos según las combinaciones de factores.

Pretendemos conocer si hay o no diferencias entre:

- Las muestras del control con respecto a cada uno de los tratamientos (200°C y NaOH).

- Dentro de los tratamientos, si influye por un lado el maxilar donde se encuentra el diente y por otro lado el tipo de diente sobre el que se realiza la extracción.

- Las posibles interacciones que, dentro de los tratamientos, hay entre la pertenencia a uno u otro maxilar y el tipo de diente.

Este estudio, más general, se ve restringido por la ausencia de

información relativa al maxilar en el caso de las muestras tratadas con NaOH.

Una vez determinada la amplitud de nuestro estudio, queda por determinar cual es el procedimiento estadístico idóneo. En principio, vamos a emplear el análisis de la varianza de clasificación doble o simple según corresponda. Este análisis es una técnica que nos permite, entre otras cosas, comparar las medias de dos o más grupos de manera simultánea (para un estudio detallado de los fundamentos del análisis de la varianza véase Sokal y Rohlf, 1986) y por ello, es una herramienta adecuada para nuestros fines. Previamente serán estudiados los supuestos teóricos de dicho tipo de análisis, a saber:

– Que las K muestras de n individuos, que forman los K grupos que constituyen el análisis sean representativas de la población de referencia.

– Que la media muestral de cada grupo, correspondiente a la variable dependiente, se distribuya normalmente. Esto suele ocurrir cuando el número de individuos por grupo es mayor de 30 ($n > 30$) o cuando es menor de 30 pero la variable dependiente se distribuye conforme a una normal en la población de referencia. Como nuestros grupos no son todos mayores de 30 habrá que hacer antes las comprobaciones de normalidad oportunas.

– Que las varianzas de todos los grupos sean homogéneas. Esto es lo que se conoce como **homocedasticidad**.

En vista de que la muestra ha sido elegida al azar, vamos a suponer la representatividad de la muestra, por lo que sólo tendremos en cuenta los criterios de normalidad y de homocedasticidad.

Para estudiar la normalidad, vamos a estudiar los parámetros correspondientes a asimetría y kurtosis propios de la distribución normal. Ya que la asimetría y la kurtosis (grado de "aplastamiento" de la curva con respecto al eje de las X) de una distribución normal perfecta son 0, en otra distribución cualquiera, dichos parámetros fluctuarán en torno a 0 debido únicamente a errores de muestreo. Consideraremos que la curva es normal si se cumple esta condición. Así mismo, el criterio

de homocedasticidad lo evaluaremos mediante una F de Bartlett–Box que contrasta la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre las varianzas (Norusis, 1988; Alvarez, 1994).

En caso de fallar alguno de los dos criterios, desecharemos el análisis de la varianza y las comparaciones las estudiaremos mediante pruebas no paramétricas, en concreto comparando simultáneamente las distribuciones de K variables continuas mediante una prueba de Kruskal–Wallis (Alvarez, 1994).

En los casos en que se cumplan los supuestos teóricos se procederá a un análisis de la varianza.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Primer grupo experimental:

Para el primer grupo, correspondiente a los 62 dientes antiguos, procedentes de un accidente aéreo, que habían sido sometidos a la acción de la sosa, para limpiarlos de tejidos blandos, se obtuvieron los siguientes resultados, que se detectaron con lámpara de luz ultravioleta (Ver ilustración núm. 6 con algunos ejemplos):

- En 6 casos no se pudo extraer tejido pulpar para realizar los estudios, porque aparecieron los conductos radiculares totalmente vacíos y resultó infructuoso el intento de raspar las paredes internas.

- En otros 4 casos se obtuvo una cantidad mínima de tejido blando de las paredes internas del conducto radicular, mediante raspadura, pero no se logró extraer cantidad alguna de ADN.

- En 4 muestras se extrajo ADN muy degradado, en cantidad menor a los 5 ngr./ μ l. de concentración.

- En los restantes 48 dientes, se alcanzaron cifras de ADN mayores a los 5 ngr./ μ l, encontrando 10 de las muestras muy degradadas, 30 poco degradadas y 8 sin degradar nada. (Ver tabla)

cantidad	sin degradar	algo degrad.	muy degrad.	TOTAL
nada	0	0	0	10
menor de 5	0	0	4	4
mayor de 5	8	30	10	48
TOTALES				62

Esquema núm. 1. Número de muestras del 1º grupo experimental, con detalle del ADN extraído, expresado en ngr./ μ l. de concentración.

6. 3. Casos forenses.

La comparación de imágenes radiológicas obtenidas de los cadáveres con otras procedentes de tratamientos conservadores, permitió la identificación positiva de los casos números 1, 2, 4, 10, 12, 13 y 14.

Los descritos con los números 2 y 10, lo fueron principalmente por la persistencia del material de endodoncia en los conductos, a pesar de la casi total calcinación de los restos.

En el caso número 2, que correspondía a un cadáver carbonizado, se descubrieron conductos endodonciados en la pieza 46, pero no se recuperó la radiografía Ante-mortem, realizada durante el tratamiento, por no conservarla el facultativo que lo había hecho. Sin embargo se logró obtener una radiografía lateral de craneo, procedente de un hospital, que sirvió para comparar con las imágenes post-mortem, con resultado positivo.

En el caso número 14 se presentaron divergencias entre la historia clínica aportada por el facultativo que había realizado tratamientos y nuestras observaciones. En la historia clínica figuraba endodonciado el 46. En los restos cadavéricos aparecía una prótesis fija de metal porcelana entre el 45 y 47, con ausencia de 46.

La recuperación de las radiografías realizadas durante el tratamiento, permitieron la plena identificación, al coincidir las imágenes de las restantes piezas existentes, suponiendo que se había omitido en la historia clínica la extracción de ese molar endodonciado y su posterior restauración con el puente fijo.

Los casos números 3 y 5 fueron identificados mediante el estudio de prótesis removibles. Ninguna de ellas presentaba ninguna marca especial que individualizara al portador o su fabricante.

El caso número 6 se investigó positivamente mediante superposición de imágenes. Después de dos meses se lograron regenerar los dibujos papilares de los dedos y fue ratificada la identificación por dactiloscopia.

Los casos 7 y 8 fueron resueltos mediante estudios de ADN

en tejido dentario el primero de ellos y dentario y óseo el segundo de los citados.

En los casos números 13 y 14 se extrajo ADN (en el 13 dentario y en el 14 dentario y óseo), con resultado positivo, pero sirvió para confirmar el método radiológico que resolvió la investigación de forma rápida y precisa.

Por último, los casos 9 y 11 no fueron identificados. La extracción de ADN en estos dos cadáveres resultó infructuosa por degradación de la muestra.(ver tabla).

	ADN.	RX.	SUPER.	PROT.	DACT.	IDENT	NO IDEN
num.1		X				X	
num.2		X				X	
num.3				X		X	
num.4		X				X	
num.5				X		X	
num.6			X		2º met.	X	
num.7	X					X	
num.8	X		2º met.			X	
num.9							X
num.10		X				X	
num.11							X
num.12		X				X	
num. 13	2º met.	X				X	
num. 14	2º met.	X				X	
TOTALES	2 (2)	7	1(1)	2	1	12	2

Esquema núm. 3. Cuadro representativo de los procedimientos empleados en los casos forenses analizados. Las letras "X" representan el procedimiento empleado. Cuando se han identificado mediante dos sistemas diferentes, aparece encerrado en paréntesis el segundo método, que siempre sirvió para ratificar el anterior.

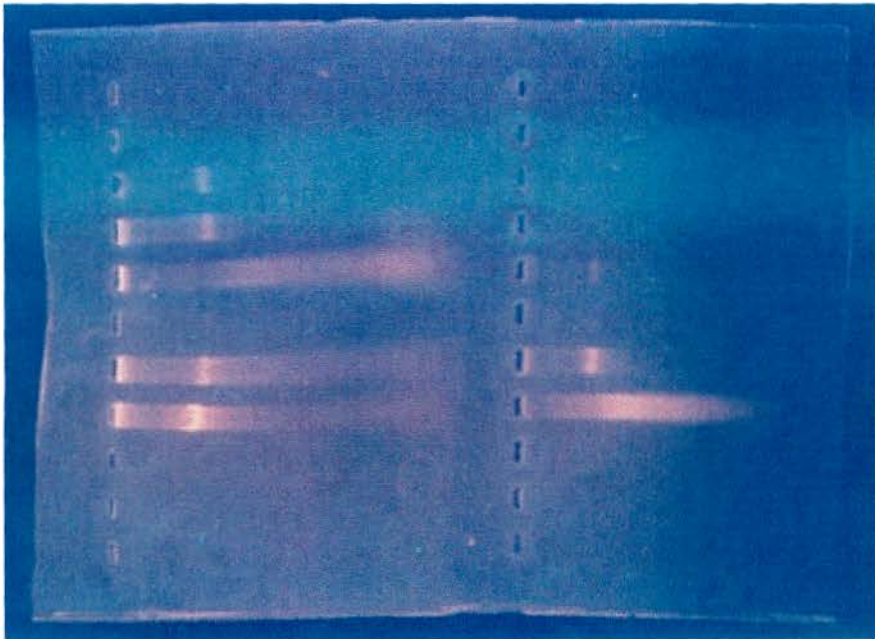


Ilustración num. 8. La cantidad de ADN extraído lo hemos cuantificado con lámpara de luz Ultravioleta, observando la concentración y en algunos casos las las colas de degradación que aparecen.

Resultados estadísticos.

En primer lugar se ha llevado a cabo la comprobación de los supuestos teóricos del análisis de la varianza. En la tabla 1.1 pueden verse los resultados del "test" de Bartlett-Box (valor del estadístico F y su probabilidad) para estimar la homocedasticidad entre los grupos determinados en cada comparación:

Tabla 1.1

ESTUDIO	F	P	Rechazo Ho
Muestras control frente a muestras expuestas a 200°C.	134.099	0.000	SI
Muestras control frente a muestras tratadas con NaOH	57.723	0.000	SI
Muestras expuestas a 200 °C. frente a muestras tratadas con NaOH	26.282	0.000	SI
Dentro del grupo expuesto a 200°C., variación entre maxilar sup. e inf.	1.689	0.000	NO
Dentro del grupo expuesto a 200°C., variación respecto del tipo de diente	2.114	0.009	SI
Dentro del grupo tratado con NaOH, variación respecto del tipo de diente.	0.846	0.469	NO

Sólo dos de los seis análisis propuestos cumplen el supuesto de homocedasticidad. A continuación, en la tabla 1.2, vamos a ver los parámetros de simetría y kurtosis de la distribución de la variable dependiente para las poblaciones determinadas para cada factor y para la población completa.

Tabla 1.2

Factor	Niveles del factor	Asimetría	Kurtosis
<u>Tratamiento:</u>	Control	1.767	2.397
	200°C.	1.286	2.439
	NaOH	1.585	2.469
<u>Tipo de diente:</u>	Molar	3.269	11.089
	Premolar	1.900	3.340
	Incisivo	1.455	1.439
	Canino	1.599	3.413
<u>Maxilar:</u>	Superior	3.450	12.116
	Inferior	3.625	17.176
<u>Muestra total:</u>		4.044	20.395

La mayor parte de los valores de la tabla están próximos al 0 (valores entre 1 y 3.5). Sin embargo hay valores elevados de kurtosis en cuatro casos. Esto quiere decir que la curva se aleja de la forma ideal de la distribución normal para hacerse "picuda". Además, los valores obtenidos para la muestra global son más elevados de lo que cabría esperar. En estas condiciones, y teniendo en cuenta los valores de F de la tabla 1.1, debe desecharse la estadística paramétrica, optando mejor por una prueba de Kruskal-Wallis. En la tabla 1.3 se observan los valores del estadístico χ^2 y de P para dicha prueba en los mismos tipos de análisis de la tabla 1.1:

Tabla 1.3

Estudio	χ^2	P	Rechazo H_0
Muestras control frente a muestras expuestas a 200°C.	40.082	0.000	SI
Muestras control frente a muestras tratadas con NaOH	27.905	0.000	SI
Muestras expuestas a 200°C. frente a muestras tratadas con NaOH	2.723	0.098	NO
Dentro del grupo expuesto a 200°C., variación entre maxilares	0.000	0.9896	NO
Dentro del grupo expuesto a 200°C., variación respecto del tipo de diente	1.780	0.619	NO
Dentro del grupo tratado con NaOH, variación respecto del tipo de diente	4.213	0.237	NO

Después de estos seis análisis, restaría comparar, dentro del conjunto de muestras expuestas a 200°C (carecemos de datos al respecto en el caso del NaOH), la posible interacción del tipo de diente con la pertenencia a uno u otro maxilar. Esto es un análisis de la varianza de doble vía (hay dos factores que interaccionan) que hemos realizado a sabiendas de que, aunque los supuestos del análisis de la varianza se han de cumplir también para cualquier estudio multifactorial, no es recomendable hacerlo a la vista de los resultados de las tablas 1.1 y 1.2. En este caso, el estadístico F que evalúa la interacción entre los dos tipos de efecto (maxilar y tipo de diente) vale 1.173 que implica una

probabilidad P de 0.328 (ver tabla 1.4). El resultado indica que no hay interacción y que, en consecuencia, los dos factores no influyen conjuntamente sobre la concentración de ADN.

Tabla 1.4

* * * A N A L Y S I S O F V A R I A N C E * * *

GRAMOS
BY DIENTE
MANDIB (PARA CADA TIPO DE DIENTE - MAXILAR SUP. O INF.)

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	198.135	4	49.534	.780	.542
DIENTE	187.992	3	62.664	.987	.405
MANDIB	.131	1	.131	.002	.964
2-way Interactions	223.427	3	74.476	1.173	.328
DIENTE MAXILAR	223.427	3	74.476	1.173	.328
Explained	421.563	7	60.223	.949	.477
Residual	3681.058	58	63.467		
Total	4102.621	65	63.117		

7. DISCUSSION

7. DISCUSION

Los resultados obtenidos en los dientes procedentes del accidente aéreo, nos han permitido comprobar que los procedimientos habitualmente empleados en la limpieza de los restos cadavéricos, para liberar los maxilares de partes blandas adheridas, como es la aplicación de sosa al 6% en ebullición, no dificulta la extracción de ADN con fines identificativos, lo cual facilitará la reducción de esas cifras de cadáveres no identificados que recogemos en la bibliografía consultada y en nuestra propia experiencia en los siniestros investigados.

Los resultados negativos obtenidos en 10 muestras del siniestro, no invalidan nuestros objetivos, puesto que desconocemos con exactitud la procedencia de cada diente y el grado de carbonización del cuerpo al que perteneció, suponiendo ésta la causa de los malos resultados en esos 10 casos.

En los dientes sometidos a la acción del calor, disminuye la cantidad de ADN considerablemente, respecto a lo obtenido de muestras recientes, pero solamente el 8,25% de las muestras presentó cantidad insuficiente o nula de ADN para el estudio.

Los resultados negativos obtenidos en 8 dientes, corresponden con piezas cariadas, donde supuestamente el calor ha afectado directamente al tejido pulpar, que ya se encontraba degradado por la patología existente.

Los autores consultados, señalan que a partir de los 175 grados, comienzan a aparecer algunas lesiones en dientes unirradiculares (Basauri, 1977). En los dientes aislados que tuvimos a 250 °C., durante 15 minutos, hemos comprobado la afectación de su tejido pulpar. Por este motivo hemos centrado la investigación en los 200 °C., durante 15 minutos.

A esos 250°C. pudimos observar algunas variaciones de color.

Respecto a los casos forenses analizados, debemos señalar, que los hemos escogido, por considerar que tienen todas las

características generales que resultan en siniestros con grandes traumatismos y cadáveres calcinados.

En estos cadáveres, la investigación de ADN fue positiva en los carbonizados, siempre que los dientes se rescataron en buenas condiciones de análisis. En el caso número 10, ya descrito, fue infructuoso. Esto demuestra que la temperatura muy elevada imposibilita el estudio de ADN.

Hemos observado claramente la evolución de los métodos forenses, investigando el ADN en los casos más recientes, paralelamente a su aplicación en otros campos de la analítica forense.

Hemos tratado de comparar nuestros resultados con los obtenidos por autores descritos en la bibliografía, y con alguna similitud en las muestras y métodos, pero las condiciones no son exactas, por lo cual no podemos utilizar sus resultados como patrones comparativos.

Así, por ejemplo vemos que Gill y Jefreys, citados anteriormente, realizaron un ensayo con dientes supuestamente quemados, pero en su trabajo, hablan de incineración, manteniendo las piezas dentarias a 2,5 cm. de la llama de un mechero bunsen y solamente durante 2 minutos. Nosotros tuvimos la muestra durante 15 minutos.

Los investigadores citados en nuestra bibliografía, coinciden casi plenamente con nosotros en la utilidad del procedimiento de extracción de ADN con fenol/cloroformo/isoamílico.

En los casos forenses aislados, hemos podido comprobar la afectación de los agentes atmosféricos sobre el ADN. En los restos sumergidos en agua de mar, se pierde totalmente y en restos afectados por el aire, lluvia y calor, también se encuentra totalmente degradado.

En estos resultados coincidimos con los autores que han manejado muestras similares. Así, por ejemplo, en los grupos investigados por Alvarez (1995), también señala que los sumergidos en agua dieron resultados muy pobres, con solamente un 25 % positivo tras 6 meses de antigüedad.

Tampoco Chen (1994) obtiene buenos resultados en

condiciones de sumersión durante 10 semanas.

En el caso forense descrito con el número 11, se logró fenotipar la muestra, pero los resultados, no fueron aceptados como positivos, ante la sospecha de una contaminación con ADN externo.

Los investigadores consultados, insisten en la necesaria protección de las muestras y citan que en técnicas tan sensibles como la PCR, pueden presentarse falsos positivos por esta causa (Kwok y Higuchi, 1989).

La contaminación externa puede suceder en el primer momento de la manipulación, al obtener la muestra pulpar. El procedimiento que hemos seguido, lo consideramos bastante efectivo, sin peligro de contaminación externa, puesto que al golpear la zona radicular, producimos un estallido, sin contactar nuestro mazo con el interior de la raíz, que luego es abierto, mediante instrumentos punzantes, debidamente esterilizados.

Consideramos que nuestro procedimiento es más fiable que el señalado por algunos autores descritos en el apartado de Fundamentos, que señalan adecuado el cortar horizontalmente el diente en la zona cervical. Creemos que en ese procedimiento, el instrumento de corte, una vez que se ha contaminado con las paredes externas de la pieza dental si no está debidamente limpia, puede arrastrar la contaminación externa al interior, con la misma cuchilla de corte.

Igualmente consideramos nuestro procedimiento más seguro que el descrito por Cerón, García y Martín, (1991) en sus trabajos sobre grupo sanguíneo, mediante molturación de la pieza dental.

La craneometría y dentometría como procedimiento orientativo, permite el primer paso en las investigaciones sobre personas desaparecidas, haciendo grupos de estudio en los casos no resueltos.

En situaciones difíciles, donde el ADN genómico ha quedado destruido totalmente, el material de endodoncia y otros tipos de restauración, persisten y permiten completar la identificación.

La radiografía oral debe mantenerse como procedimiento

habitual en la identificación de cadáveres, puesto que es sencillo, rápido y efectivo, sustituyendo incluso al análisis de ADN, siempre que se tengan elementos comparables Ante-Mortem.

Los conductos tratados endodónticamente encierran un gran interés para la identificación de cadáveres, como lo evidencia el caso forense descrito con el número 10, en el que la muestra dental quedó reducida a cenizas, manteniendo perfectamente cerrados y visibles radiológicamente la gutapercha utilizada en la restauración.

Esto evidencia la necesidad de mantener los archivos radiológicos en la historia clínica del profesional, cuya ausencia, pudo haber dificultado la identificación de los restos cadavéricos descritos en el caso forense número 2, que se compararon positivamente con una radiografía lateral de cráneo existente en un hospital, al faltar las realizadas durante un tratamiento de endodoncia.

La superposición de imágenes fotográficas puede ser una técnica de utilidad, siempre que se visualicen los dientes del sector anterior, pero consideramos que tiene algunas limitaciones respecto a su efectividad.

En los dos casos aislados, en los que hemos empleado la técnica de superposición, hemos apoyado las conclusiones positivas por la existencia de algunas patologías o alteraciones morfológicas de los dientes que se veían directamente.

Consideramos que de no existir estas particularidades habríamos tenido dificultades para la identificación, que en nuestros casos, ha sido complementada además por otros métodos mucho más individualizadores.

Discusión de resultados estadísticos:

La conclusión que se desprende de todo esto es que existen diferencias entre el ADN obtenido en las muestras control con respecto a los dos tratamientos considerados (200°C y NaOH), no difiriendo dichos tratamientos cuando se comparan entre sí.

Según el análisis de la varianza de doble vía, y vistas las salvedades que hemos apuntado, ni el estar en uno u otro maxilar ni el

trabajar con uno u otro tipo de diente tiene que ver con la concentración de ADN. Falta, dentro de los dientes expuestos al tratamiento con sosa, la información relativa a si pertenecen a uno u otro maxilar. Si se tuviera esta información podrían estudiarse los tratamientos frente a la situación en la mandíbula, aunque el resultado que cabría esperar es que no hubiera interacción entre los dos factores (maxilar y tratamiento), influyendo sólo el tratamiento.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. En los restos dentarios, procedentes de un siniestro ocurrido hace 12 años, se ha logrado extraer ADN en suficiente número de casos y cantidades, para concluir que el estudio resultó positivo.

2.- En los dientes sometidos a la acción del calor, a 200 °C., durante 15 minutos, se obtuvieron cantidades de ADN suficientes para el análisis. (Fue positivo en el 87,87% de los casos).

3.- La conclusión que se desprende de los resultados estadísticos es que existen diferencias entre el ADN obtenido en las muestras control con respecto a los dos tratamientos considerados (200°C y NaOH), no difiriendo dichos tratamientos cuando se comparan entre sí.

4.-De los resultados estadísticos se deduce lo siguiente:

– Por un lado, es importante seleccionar una muestra adecuada, apta para el análisis de la varianza, a fin de poder hacer interaccionar variables simultáneamente. Esto solo puede lograrse aumentando la muestra hasta que se cumplan los supuestos teóricos.

– Finalmente, hasta los 200°C, la cantidad de ADN obtenida es la misma, estadísticamente hablando, que la obtenida en el caso del NaOH, no influyendo ningún otro factor (ni el tipo de diente ni su situación en el maxilar).

5. La obtención de la muestra pulpar a partir de la fragmentación de la raíz, constituye un procedimiento simple y fiable.

6.- Estos resultados evidencian la importancia del análisis de ADN en cadáveres calcinados y con grandes traumatismos, y su evolución actual, pero debe mantenerse como alternativa para los

casos que no pudieran ser resueltos por procedimientos odonto-estomatológicos más simples y rápidos, como son la radiografía oral y el estudio de prótesis .

7.- Los equipos de investigación de Grandes Catástrofes, deben contar con la figura del Odonto-estomatólogo experimentado en estas técnicas analíticas.

8.- Las historias clínicas deben contener la totalidad de los datos referentes a sus pacientes, conservando las radiografías el mayor tiempo posible.

9. RESUMEN

9. RESUMEN

La investigación de víctimas de siniestros, presenta aspectos particulares, por las grandes destrucciones o calcinación de los cadáveres, que dificultan su identificación por métodos habituales.

Igualmente en los cadáveres que aisladamente aparecen en la práctica forense, aparece destrucción o carbonización, que hacen muy difícil la investigación.

En los numerosos casos de etiología criminal que habitualmente se investigan, los autores del hecho, tratan de imposibilitar la identificación de su víctima, al ser el eslabón que les une a ellos. Es frecuente la aplicación de sustancias combustibles, como la gasolina, y posterior incendio del cuerpo, para hacer desaparecer todo vestigio de identidad positiva.

La boca es una cámara cerrada y bañada por el medio líquido que proporciona la saliva y permite rescatar los dientes en condiciones adecuadas para su estudio, a pesar de estar el resto del cráneo totalmente destruido por el fuego.

Esa humedad de la cavidad oral, permite rescatar prótesis fabricadas en resina acrílica, que en otras condiciones resultarían totalmente destruidas.

Incluso en situaciones más extremas, el armazón metálico de prótesis removibles, soporta temperaturas tan elevadas que permite su análisis correcto.

La persistencia en estas situaciones extremas, de restauraciones cavitarias y tratamientos endodónticos, hace necesaria la realización de radiografías intraorales de forma sistemática en todos los cadáveres.

La incorporación de nuevas técnicas, como es la investigación del ADN genómico o mitocondrial, será un complemento de los restantes métodos de identificación odontológica, imprescindible para situaciones extremas, en los siniestros y en cadáveres calcinados o muy destruidos de casos aislados.

Las muestras que hemos analizado, pueden ser modelo claro

de las situaciones extremas que generalmente encontramos en la práctica forense.

El primer grupo de dientes analizados, pertenece a cadáveres ya identificados, en un accidente aéreo, donde los cuerpos sufrieron grandes traumatismos y quemaduras. En esta muestra, conservada durante 12 años, en condiciones adecuadas de protección, hemos comprobado la eficacia de la extracción de ADN, a pesar de que los dientes estuvieron sometidos a la acción de la sosa cáustica en ebullición.

El segundo grupo, trata de simular las condiciones reales que presentan los dientes después de sufrir el cadáver una carbonización. También hemos demostrado la posible extracción de ADN en esta situación extrema.

En el tercer grupo, constituido por 14 casos forenses, diferentes, en los que predomina la calcinación, demostramos la utilidad de los procedimientos odontológicos en general, destacando la radiografía oral, con la evolución progresiva de las técnicas de ADN obtenido de muestras dentales.

Nuestros resultados, demuestran claramente la necesaria presencia del odonto-estomatólogo forense en los grupos de trabajo de necroidentificación.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Albi, M.; Albillos, A.; Arroyo, G.: Lesiones por efecto explosivo. *Tiempos Médicos*. No. 231. 1983. 69-80.
2. Akpata, E.S.; Molar Tooth attrition in a selected group of Nigerians. *Community Dent Oral epidemiol*. May. 1975.3. 132-135.
3. Alonso, A. Gasco, P: The use of separator isoelectric. focusing in micro-ultrathin polyacrylamide gels in the characterization of some polymorphic proteins of forensic sciences significance. *J. Forensic Sci*. Nov. 1989. Vol. 32. 1558-64.
4. Alonso A., Martín P., Albarrán C., Sancho M. : "Amplified fragment length polymorphism analysis of the VNTR locus D1S80 in central Spain". *Int. J. Leg. Med.*1993. 105. 311-314.
5. Alvarez R. :Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS. Aplicación a las ciencias de la salud. Ed. Díaz de Santos. Madrid. 1994.
6. Alvarez-García, A.; Muñoz, I.; Pestoni, C., Lareu, M.V.; Rodríguez-Calvo, M.S.; Barros, F.; Carracedo, A.: DNA Polymorphisms in dental pulp: effect of environmental factors. Comunicación. 16 Th. International Congress ISFH . Santiago de Compostela. Sept. 1995. EP1: 93.
7. Alvarez, L. Cerón, J.A., López, J., González, A.: Tamaño dentario como discriminante racial. *Revista vasca de Odonto-estomatología*. May. 1991. num. 3.
8. Anderson N. & Anderson Ng.: High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 1977. 74. 5421-5425.
9. Andradas, J., López Palafox, J., García, E., Cámara, T. Prieto, L.: Identification of human remains using DNA amplification (PCR).Comunicación. 16 Th. International Congress ISFH . Santiago de Compostela. Sept. 1995. EP2. 94.
10. Antón Barberá, F.; De Luis y Turégano, J.V. : Cualidades de los dibujos digitales. *Policía Científica*. Edit. Tirant lo Blanch.1993. 109-145.

11. Araujo, J.I.; Juez, P.: Identificación de víctimas de siniestros. Rev. Pol. Esp. Feb. 1984. 13-24.
12. Asherson, N.: Identification by frontal sinus prints. London. H.K.Lewis. 1965.
13. Austin-Smith, D.; Maples, W.R. : The reliability of skull/photograph superimposition in individual identification. Journal of Forensic Sc. vol 39. No. 2. mar. 1994. 446-455.
14. Bär, W, Kratzer, A; Mäxhler M.; Schmid, W. : Postmortem Stability of DNA. Forensic Science Intern. vol. 39. 1988.59-70
15. Barsegiants, L.O.; Ionesli, A.G.: Possibilities of detecting ABH system antigens in teeth, dental calculi and the deposits on dental prostheses. Sud Med. Ekspert. 1979 jan-feb. 22. 19-21.
16. Basauri, Ch., C.: La odontología Legal en la identificación humana. R.I.P.C. . 1961.45-5.
17. Basauri, C.: Determinación de la identidad mediante las pericias odontológicas aplicando la técnica de superposición fotográfica. Paris. Rev. Int. de Pol. Crim. Vol. 205. 1967. 37-45.
18. Bastian, R.J.: Video superposition of skulls and photographic portraits. A new aid to identification. Journal of forensic Sci. Vol. 31. 4. 1986. 1373-1379.
19. Besant-Matthews, P. : Aspectos médicos de la medicina y la odontología forenses. Clínicas odontológicas americanas. Ene. 1977.33-45.
20. Biggerstaff, R.H.: Forensic dentistry and the human dentition in individual age estimations. Dent. Clin. North Am. 1977. Jan.21 (1). 167-74.
21. Boles, T.C.; Snow, C.C.; Sotver, E.: Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. Journ. For. Sci. Vol. 40. No. 3. May 1995. 349-355.
22. Borrman, H.; Grondahl, H.G.: Accuracy in establishing identity in edentulous individuals by means of intraoral radiographs. J. Forensic Odontostomatol. Jun. 1992. 10. 1-6.

23. Briñón, E.: *Odontología Legal y Forense*. Edit. Purinzon. 1984. 284-285.
24. Burtin, P. : *Proteínas del Plasma humano normal*. Inmuno-electroforesis. 1968. Toray-Mason.
25. Busuttill, A. : *Deaths in Major Dissaster*. Edit. The Royal College of pathologists. July. 1990.
26. Carracedo, A.: *Fast Isoelectric focusing of some polymorphic proteins and enzymes in miniaturized gels using an automated system*. J. Forensic Sci. Nov. 1988. 33. 1364-79.
27. Carracedo, A; Pestoni, C.: *La Huella genética. Aplicaciones de los polimorfismos del ADN a la Investigación criminal*. Ciencia Policial. num. 29 1995. 89-100.
28. Carroll, L.: . *Report concerning recommendations of the DNA commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of DNA*. For. Sc. Inter.. No.52.1992. 125-130.
29. Cattaneo, C.; Smilie, D.M.; Gelsthorpe, K.; Piccinini, A., Gelsthorpe, A.R.; Sokol, R.J.: *A simple method for extracting DNA from old skeletal material*. Forensic Sci. Intern. 74. 1995. 167-174.
30. Cerón, J.A., Alvarez, L.; López, J. González, A.: *Tubérculo de Carabelli*. Revista Vasca de Odonto-estomatología. Vol. 1. 1991, num. 5.
31. Cerón , J.A., García E., Martín , J. : *Determinación de grupo sanguíneo ABO a partir de la pulpa de diente*. Acta Estomatológica valenciana. 4-7.1991. 45-47.
32. Cerón , J.A.; López , J.: *Identificación mediante radiografía intraoral*. Revista de Actualidad Odonto-estomatológica. num. 407. Octubre 1991. 45-47.
33. Cerón , J.A.; López , J.: *Identificación de cadáveres calcinados. Importancia de los métodos odontológicos*. Tribuna Médica. Abr. 1993.núm. 1413. 14-17.
34. Código Civil Español: *De la Ausencia*. Libro I, Til. VIII. Art. 193-195. B.O.E.

35. Comas, J., : Antropología Física. Inst. Investigaciones antropológicas. México.1983.
36. Combe, E.C.: Materiales dentales. Ed. Labor. 1990. 13-15.
37. Comey, C.T.; Budowle, B. Validation studies on the analysis of the HLA-DQalpha locus using the polymerase chain reaction. Journal of forensic Sc. vol.36. no.6. nov. 1991. 1633-1648.
38. Chai, D.S.; Lan, Y.M.; Tao, Ch.; Gul, R.J.; Mu, Y.Ch.; Feng, J.H.: A Study on the identification of skull-image superimposition. J- Forensic Sci. 1989. 34. 1343-56.
39. Chen L; Sun G; Wu M: Influence exerted by environmental and physicochemical factors on the results of sex identification of human dental pulp by polymerase chain reaction.Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao. 1994 Sep. 25(3). P 253-8.
40. Davis, W.L.: Células de la pulpa normal. Histología y Embriología bucal. 1986. Interamericana.
41. Dorion, R.B.J.: Photographic superimposition. J. Forensic. Sci. 1983. 28. 724-734.
42. De Vore, D.T. Radiología y fotografía en Odontología forense. Clínicas Odontológicas americanas. 1977. 69-83
43. Duffy, J.B.; Waterfield, J.D.; Skinner, M.F.: Isolation of tooth pulp cells for sex chromatin studies in experimental dehydrated and cremated remains. For. Sci. Intern.: Vol. 49. 1991. 127-141.
44. Dusset, J.: Iso-leuco-anticorps. Acta. Haemat, 1985, 20: 156-166.
45. Fairgrieve S.I.: SEM analysis of incinerated teeth as an aid to positive identification.J Forensic Sci. 1994 Mar. 39(2). 557-65.
46. Gaillard, F.; Ludes, B.; Kaess, B.; Mangin, P.: The use of the teeth in genetic fingerprinting. Bull Group Int Rech Sci. Stomatol.Odontol. Sep.Dec. 1994. 65-70.
47. Gibbs, L.; Craig, G.; Chamberlain, A.T.: Dental DNA in the molecular determination of sex. Comunicación. International Congres . Ancient DNA III. Oxford 22-22 July 1995.. W. 11.
48. Gilchrist, J.: La Catastrophe aérienne de Lockerbie, ou le jour le plus

- cort. R.I.P.C. 1992. núm.437-438. 23-28.
49. Gill, P; Jeffrey, A.C. : Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *Journal of forensic Sciences*. vol. 36 N. 4 July 1991. 979-990.
 50. Ginther C., Issel-Tarver L., King M. C. : "Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth". *Nature genetics*. 1992.2. 135-138.
 51. Gisbert Calabuig. : *Tratado de Medicina Legal*. Edit. Salvat.1991.
 52. Golenberg E. M. et al. : *Nature* 1990. num.344. 656-658.
 53. Gotherstrom, A.; Persson, P.: DNA extracted from hydroxiapatite and teeth. *Comunicación. Ancient DNA III*. Oxford. 20-22 July. 1995.16.
 54. Gremo, A; Martínez, MA.; Sánchez, J.; Landete, C.: Determination of sex in dental pulp using PCR: *Comunicación. 16 Th. International Congress ISFH* . Santiago de Compostela. Sept. 1995. EP11. 103
 55. Grenhalgh, M.J. : A modification to the chelex DNA extraction method for casework samples. *Comunicación. 16 Th. International Congress ISFH* . Santiago de Compostela. Sept. 1995. FP6.141
 56. Griffiths, C.J.; Parker, D. Middleton, A.: *Forensic Dental Training in Australia*. *Forensic Sci. International*. Vol. 36. Febrero 1988. 279-282.
 57. Gustafson, G: Age determinations on teeth. *J. Am. Dent. Assoc.* 41. 1950. 45-54.
 58. Haga K; Mikami H; Tsukamoto T; Irie K; Terazawa K.: A case of examination of skeletal remains--how many bodies did they come from? *Hokkaido Igaku Zasshi*. 1994 May. 69(3). 641-53.
 59. Hagelberg E., Sykes B. : "Ancient bone DNA amplified". *Nature* 1989. 342- 485
 60. Hagelberg E., Bell L. S., Allen T. Boyde A. Jones S., Clegg J. B. . "Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications". *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*(1991). 333. 399-407.
 61. Hansen R.W.: Intraoral micro-identification discs. *J Forensic Odontostomatol.* 1991 Dec. 9(2). 76-85.

62. Harsanyi, L.: Scanning electron microscopic investigation of thermal damage of the teeth. *Acta Morphol Acad. Hung.* 1975. 23. 271-281.
63. Hazebroucq, V; Bonnin, A; Kammappell, F; Piedelievre, C; Lecomte, D.: Role du radiologiste dans l'enquête Medico-légale apres una catastrophe aérienne. *Medecine aéronautique et spatiale.* Vol. 119. No.30. 1991. 372-380.
64. Hochmeister, M.N.; Budowle, B.; Borer, U.V.; Eggmann, U.; Comey, C.T.; Dirnhofer, R.: Typing of Deoxiribonucleic acid (DNA) extracted compact bone from human remains. *Journal of forensic Sciences.* vol. 36. No 6. Nov. 1991.1649-1661.
65. Hogge, J.P.; Messmer, J.M.; Doan Q.N. : Radiographic Identification of Unknown Human remains and interpreter experience level. *Journal of Forensic Sc.* Vol. 39. No.2. mar.1994. 373-377.
66. Honda, K.; Harihara, S., Nakamura, T.; Hirai, M.; Misawa, S.: Identification of a dead by extradtet from a fragment of bone or a single tooth. *Proceedings of the first international Symposium advances in legal medecina.* Kanazawa. Oct. 1990. 492-494.
67. Honda K; Suglyama E; Tsuchikane A; Katsuyama Y; Harashima N; Ota M; Fukushima H: Nested amplification of COL2A1 3' variable region in skeletal remains.Nippon Hoigaku Zasshi. 1994 Jun. 48(3). 156-60.
68. Honda, K.; Nakatome, M.; Nasimul, M.; Bai, H.; Ogura, Y.; Kurosi, H.; Yamazaki, M.; Terada, M.; Misawa, S.; Wakasugi, Ch.: Detection of D1S80(pMCT118) Locus polymorphism using semi-nested polymerase chan reaction in skeletal remains.. *Journ. For. Sci.* Vol. 40. no.4. july 1995. 637-640.
69. Huguet Ramia, E; Carracedo Álvarez, A.: Investigación de la Paternidad. *Tratado de Medicina Legal y Toxicología.* J.A. Gisbert Calabuig. Ed. Salvat. 1991.1033-1043.
70. Interpol, : Normas de actuación. *Manual de actuación en Catástrofes.*1984.
71. Iscan, M.Y.; Helmer R.P.: Sex Determination. *Forensic Analysis of the*

- Skull. 1993. edit. Wiley-Liss. 80-87.
72. Iten, P.X.: Identification of skulls by video superimposition. *J. Forensic Sci.* 1987. 31: 203-30.
73. Jakobsen, G.F.: A hotel fier-dental identification aspects. *S. Afr. Assoc. J.* 29. 1974. 419.
74. Jeffreys, A.J., Wilson, V.: Trein S.L. : Hipervariable minisatélite regions in human DNA. *Nature.* 314. 1985. 67-73.
75. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. : Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316. 1985: 76-79.
76. Jeffreys A. J., MacLeod A., Tamaki K., Neil D. L., Monckton D. G. "Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing". *Nature* (1991).354. 204-209.
77. Jensen, S. : Identification of human remains lacking skull and teeth. A case report with some methodological considerations. *J. Forensic Pathol.* 1991. Jun. 12(2). 93-97.
78. Kawakami T: Examination of the degree of agreement among dental findings used for personal identification (Part 4)--Lapse of time between features of dentition at time of death and those in the last dental record. *Nippon Hoigaku Zasshi.* 1994 Jun. 48(3). 169-84.
79. Kido A; Kimura Y; Oya M: Transferrin subtyping in dental pulps. *J Forensic Sci.* 1993 Sep. 38(5). 1063-7.
80. Kido, A.; Kimura, Y.; Nishizono, T.; Inoue, T, Oya, M.: GC Subtyping in dental pulps. *Nippon Hoigaku Zasshi.* Aug. 1994. 48 (4). 263-6.
81. Kido, A.; Oya, M.: PI subtyping in dental pulps. *Comunicación. 16 Th. International Congres ISFH . Santiago de Compostela. Sept. 1995. GP7. 165*
82. Kondo, T. , Ohshima, T., Lin, Z.Q.; Takayasu, T.; Nagano, T.: Two cases of personal identification based on characteristic finding in hard tissue of human remains. *Nippon Hoigaku Zashi.* 1993. Aug. 47(4). 345-50.
83. Kurosaki, K.; Matsushita, T.; Ueda, S.: Individual DNA identification from ancient human remains. *Am. J. Hum.Genet.* 1993. 53.638-643.

84. Kvaal S.I.; Koppang, H.S.; Solheim, T.: Relationship between age and deposit of peritubular dentine. *Gerodontology*. Dec. 1994. 11(2). 93-98.
85. Kvaal, S.I. Kollteit, K.M.; Thomsen, O.; Solheim, T.: Age estimation of adults from dental radiographs. *For. Sci. Intern.* Apr. 1995. num. 74. 175-185.
86. Kwok S., Higuchi R. : Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 1989. 339. 237-238.
87. Laborier, C; Gisselmann, A.; Thomas, B.: Problemes posès par l'accident de l'autoroute de Beaune (Intéret de la radiologie dentaire). *Journal de médecine légale-Droit médical*. 1989. T. 32: 13-15.
88. Lampe, H.; Roetzscher, K.: Forensic odontology: Age determination from adult human teeth. *Med. Law*. 1994. 13.(7-8)- 623-8.
89. Lareu M. V., Muñoz I., Pestoni C., Rodriguez M. S., Vide C., Carracedo A. :. "The distribution of HLA DQA1 and D1S80 (pMCT118) alleles and genotypes in the population of Galicia and Central Portugal". *Int. J. Legal Med.*1993. 106. 124-128.
90. Lassen, C.; Hummet, S.; Herrmann, B.: Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft tissue. *Leg. Med.* 1994. 107. 152-155.
91. Lecomte, D. ; Mercier, J.F.; Pledelièvre, C.; Campana, J.P.: L'expérience de l'accident du DC10 au Niger. *R.I.P.C.* 1992. 437-438. 33-37.
92. Lee, H.C.: *Advances in Forensic Science*. Foster City (California). Ed. Biomedical Publications. 1985. 135-159.
93. Lee, H.C., Gaensslen, R.E. Carver, H.W., Pagliaro, E.M. Carroll-Reho, J. : ABH antigen typing in bone tissue. *Journal of forensic scienc.* vol. 34. 1.jan.1989.7-14
94. Legislación. :Ley de Enjuiciamiento Criminal. Art. 340-342. B.O.E.(1980)
95. Legislación. : Normas de actuación. Instituto Nacional de

- Toxicología. 30 de Junio 1987.
96. Loh, F; Chao, T.; Path, D.: Skull and photographic superimposition, A new approach using a second party's interpupil distance to extrapolate the magnification factor. *J. Forensic Sci.* 1989. 34. 708-13.
 97. López, J. Aportaciones de la Odontología en la identificación de víctimas de Grandes Catástrofes. Tesina. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Odontología. 1992. 95-113.
 98. López, J.; Cerón, J.A.: Identificación de cadáveres calcinados: importancia de los métodos odontológicos. *Tribuna médica.* 1993.1413. 14-17.
 99. López, J. Prieto Solla L., Cerón Vivancos J.A. - Técnicas de Laboratorio en necroidentificación odontológica. Identificación de la proteína Alfa 2 HS. *Gaceta Det.* 1994. núm. 50.
 100. López, J.: Métodos actuales de necroidentificación dentaria. Comunicación. Congreso Internacional de Ciencias Forenses. México. Oct.1994.
 101. López, J.; Cerón, J.A.; Prieto, L.: Métodos actuales de necroidentificación dentaria: Extracción de ADN en pulpa. *Gaceta Den.* Mayo 1995. num. 58. 70-78.
 102. López, J.; Arimany, J.; Prieto, L.; Fontaret, J.; Martínez, M.: Importancia de la endodoncia en la identificación de cadáveres carbonizados: A propósito de un caso. Comunicación. III Jornadas Catalanas de Actualización en Medicina Forense. Barcelona. Noviembre 1995.
 103. Lopez-Abadía, J.- Martínez, M.A., Gremo, A. Ruiz de la Cuesta, J.M.: Serum protein detection in old dental pulp.- Comunicación. 15 th. International Congress. International. Soc. of. For. Haemogenetic. Venecia. oct. 1993.
 104. Lorente J. A., Lorente M., Budowle B., Wilson M. R., Villanueva E. : "Analysis of the HUMTH01 Allele Frequencies in the Spanish Population". *J. Forensic Sci.* 39. 1994. (5). 1270-1274.

105. Lorente M., Lorente J. A., Wilson M. R., Budowle B., Villanueva E. .
"Composite PAGE: an alternate method for increased separation of amplified short tandem repeat alleles". *Int. J. Legal Med.* 1993. 106: 69-73.
106. Lorente, J.A.; Wilson, M.R.; Lorente, M; Holland, M.; Sensabaugh, G.F.; Budowle, B ; Villanueva, E.: Identificación médico-forense con ADN mitocondrial. *Jano.* 1994. num. 1070. 57-61.
107. Lorton, L.: CAPMI, The computer assisted post-mortem identification. *Journal For. Sci.* 1989. V. 34. 996-1002.
108. Lubian, R.: *Dactiloscopia.* Edt. Reus. 81-82. 1975.
109. Ludes, B.: La Catastrophe aérienne de L'airbus A320: R.I.P.C. 1992.No.437-438. 38-42.
110. Ludes, B.; Tracqui; A; Pfitzinger, H; Kintz, P; Levy, F; Disteldorf, M; Hutt, M; Kaess, B; Haag, R; Memheld, B; Kaempf, C; Friederich, F; Evenot, E; Mangin, P. : Medico-legal investigations of the airbus A320 crash upon mount Ste-Odile, France. *Journal of forensic Sc.* vol.39. No.5 Sept.1994. 1147-1152.
111. Luntz, L.: *Techniques In Forensic dentistry. Hanbook for dental identification.* Philadelphia, J.B. Lippincott Co. 1973. pag. 163.
112. Luntz, L: *Historia de la Odontología Forense. Clínicas Odontológicas americanas.* 1977. 7-14.
113. Mac Lean, D.F.; Kogon, S.L.; Stitt, L.W.: Validation of dental radiographs for human identification. *Journal of Forensic Sci.* Sept. 1994.Vol. 39. No. 5, 1195-1200.
114. Mc. Kenna, N.G. et Al.: A method of matching skulls with photographic portraits using landmarks and measurements of the dentition. *J. Forensic Sci.* 1984. 29. 787-797.
115. Mc. Kenna, J.J.: A method of orientation of skull and camara for use in forensic photographic investigation. *J. Forensic. Sci.* 1988. 33. 751-755.
116. Maguire, D.N. 1: The use profiling In the identification of victims of an aircrash.*Forensic Science Service.* 1994. 282-285.

117. Majumdar, T.; Sinha, P.: Photographs of the human face and broken projective symmetry. *J. Forensic Sci.* 1989. 29: 387-395.
118. Maples, W.R., Rice, P.M.: Some difficulties in the Gustafson dental age estimations. *J. Forensic Sci.* 1979. Jan. 24. 168-72.
119. Marcotte, A.; Hoste, B.; Fays, M., De Valck, E; Leriche, A.: Disaster victims identification by the DNA technology on dental pulp. *Comunicación. 16 Th. International Congres ISFH . Santiago de Compostela. Sept. 1995. EP33. pag. 124.*
120. Marín García, F: La necroidentificación por superposición de imágenes radiográficas y fotográficas. *Tesina de Licenciatura. Facultad de Odontología de la U.C.M. 1992.*
121. Martin, D.C., Clark, M.A.; Standish, S.M., : Identification of Human Remains by Comparison of Frontal Sinus Radiographs. *Journal of Forensic Sc. nov.1991Vol. 36. 1765-1772.*
122. Martínez Jarreta, B.: Diagnóstico de la individualidad biológica por polimorfismos DNA. *Ciencia Policial. 1992. num. 19. 103-117*
123. Masset, C.: Age estimation on the basis of cranial sutures. *IM Iscan1989. (editors).*
124. Minaguchi, K; Hanaoka, Y; Kiriya, T; Yamamoto, K; Kuroyanagi, K.: Personal identification of a skull by a complete denture-application of superimposition and X-ray computed tomography analysis. *Nippon Hoigaku Zasshi. 1994. Aug. 48. 282-288.*
125. Mirabet Ippolito, V. : Quemados. *Manual práctico. 1979. 20-25. Ed. Quiles.*
126. Misawa S: Application of DNA polymorphism to forensic medicine. 1994. *Rinsho Byori. Jun. 42(6). P 636-42.*
127. Morse, D.R.; Esposito, J.V.; Kessler, H.P.; Gorin , R.: Age estimation using dental periapical radiographic parameters. A review and comparative study of clinically based and regression models with the Operation Desert Storm victims. *Am. J. Forensic Med. Pathol. 1994. Dec. 15(4). 303-318.*
128. Moya Pueyo, V.: Autopsia, extracción y esqueletización de los

- maxilares. *Odontología Forense*.1994. Masson. 263-268.
129. Morant, G.: A biometric study of the human mandible. *Biometrika*.1936. Vol. 28. 84-122.
130. Mörnstad, H; Pfeiffer, H; Teivens, A: Estimation of dental age using HPLC-technique to determine the degree of aspartic acid racemization. *Journal of Forensic Sci.* 1994. Vol. 39. No. 6. November 1425-1431.
131. Muhlemann, H.R.; Steiner, E. Brandestini, M.: Identification of mass disaster victims: The Swiss identification system. *J.Forensic Sci.* 1979.Jan. 24(1) 173-181.
132. Muñoz Tuero, Fernández Fariñas; Fariñas Fernández. : La Odonto Estomatología en la Identificación. *Revista Ciclo*. Nov.-Dic.1982. núm 38.
133. Nageshkumar, G. et al.: Mandibular canine index. A clue for establishing sex identity. *Forensic Sc. International*. 42. 1989. 249-254.
134. Neiders, M.E.; Standish, S.M.: Blood group determinations in forensic dentistry. *Dent. Clin North Am.* Jan 1977. 21. 99-111.
135. Nickerson, B.A.; Patrick, A.F.; Koch, S.K.; Charney, M.: A methodology for near-optimal computational superimposition of two-dimensional digital facial phoyographs and three-dimensional cranial surface meshes. *J. Foren. Sci.* 1991. 36: 480-500.
136. Nkhumeleni, F.S.; Raubenheimer, E.J.; Monteith, B.D.: Gustafson's method for age determination revised. 1982. *J. Forensic odonto-stomatol.* 7 (1). 1989.
137. Normas de remisión de muestras: Circular. Instituto Nacional de Toxicología. Jun. 1987.
138. Norusis M. J. :*SPSS/PC+ User's Guide*. SPSS Inc. Chicago, USA. 1988.
139. Nossintchouk, R.M.: *Manuel d'Odontologie Médico-legale*. Masson. 1991.
140. Novotny, V.. Iscan M.I., Loth, S.R.: Morphologic and osteometric

- assessment of Age, Sex, and Race from the Skull. Forensic Analysis of the Skull. Mi Iscan (editors).1993. 71-88.
141. Pashinian, G.A.; Ayub, F: The use of odontograms and panoramic roentgenography in personal identification. Sud Med. Ekspert. Oct-Dec. 1992. 35. 23-24.
142. Perry, W.L.; Bass, W.M., Riggsby, W.S. Sirotkin, K. 1988: The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. Journal of forensic sc. vol.33. num. 1. jan. 1988.144-153.
143. Phillips VM; Nel JP: Identification of an American hiker.J Forensic Odontostomatol. 1993 Dec. 11(2). P 53-61.
144. Postch, L.; Meyer, U.; Rothschild, S; Schneider, P.M.; Rittner, Ch.: Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. Int. J. Legal medicine. 105. 1992.: 139-143.
145. Pötsch L; Penzes L.: Bloodtyping in human dental pulp by inmunoenzyme techniques. In: Mayr W. (Ed) Advances in for. haemogenetics. 2. SpringerHeidelberg.Berlin New York. 1992. 517-519.
146. Pötsch, L; Meyer, U, Rothschild, S, Schneider, P.M.; Rittner, Ch. : Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA- Legal Medecina. October.1992: 139-143.
147. Prieto Solla, L.; Arroyo Pardo, E.; López Palafox, J.: Aplicaciones del análisis de ADN antiguo a la antropología. Curso de Introducción a la Antropología Forense. Fac. CC. Biológica Alcalá de Henares. 1995.
148. Prieto, L.; Arroyo, E.; Pérez-Pérez. A., Arenal, I.; Asperilla, C., Turbón, D.: Simultaneous Typing of five loci in ancient DNA of three basque populations. Communication. Congreso. Ancient DNA III Oxford. 1995.July, 21. W. 3.
149. Raffa, F.; Evenot, M.: 4 Mai 1897, L'avènement de l'odontologie légale. L'incendie du Bazar de la Charité. J. deMèdecine légale-Droit Méd. 1989.:3-5.

150. Rioboo García, R.: La identificación en estomatología. *Revista de Actualidadestomatológica española*. 1985. 344. 31-43.
151. Robert, E. B.: Identification via dental remains: Pan American flight 759. *Jornal of Forensic Sci.* vol 30. 1985. 128-136.
152. Robert, R. : Aircraft accident, survival, and rescue. *Operacional Aerospace medicine*. 1990. 762-814. Charper. 27.
153. Robetti, I.; Lorio, M.; Dalle Molle, M.: Orthopantomography and the determination of majority age. *Manminerva Med.* 1995. Sep. 35 (3). 170-2.
154. Rogan P.K. ; Salvo J. : Study of nucleic acid isolated from ancient remains. *Yearbook of phisical anthropology*. Vol. 33. 1990. 195-214.
155. Roland, W.; Hansen, D.: Intraoral micro-identification discs. *Jour. For. Odonto-estomatol.* Dec. 1991, vol. 9. 76-90.
156. Roldan Garrido, B.: Aspectos médico-legales del análisis morfológico de los dientes. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina U.C.M. 1989.
157. Sajantila, A.; Ström, M.; Budowle, B.; Karhunen P.J.; Peltonen L.:The Polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing: aplication of amplified D1S80 and HLA-DQ α loci to the identification of fire victims. *For. Sci. Int.*. 51.1991: 23-24.
158. Sambrook S., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). "Molecular cloning". A Laboratory Manual. 2nd. ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
159. Sandoval Smart, L. : Trabajos científico-técnicos: Identificación de restos oseos. *Revista institucional*. Chile. num. 75. Oct. Dic.1990. 11-14.
160. Sanz, P.; Prieto, V. Andres, M. PCR Genotyping in dental pulp from old human skeletal remains and fire victims. *Comunicación*. 16 Th. International Congres ISFH . Santiago de Compostela. Sept. 1995. EP25. pag. 9117.
161. Sekharan, P.Ch.: The problems of positioning skulls for video superimposition technique. *Can. Soc. Foren. Sci. J.* 1989. 22: 21-25.
162. Schacker, U.; Zapata, M.: ABO Genotyping with PCR.:*Comunicación*. 16 Th. International Congres ISFH . Santiago de Compostela. Sept.

1995. GO5. pag. 158
163. Schmechta, U.; Lieske, W.: Demonstration of blood group antigens of ABO system in human teeth . Zahn. Mund. Kieferheilkd Zentralbl. 1975. 63,(2). 142-5.
164. Swartz, T.R.; Schatz, E.A. Mieszerski, L.; Mc Nally, L.;Kobillinsky, L.: Characterization of Deoxyribonucleic Acid. (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. Journ. For. Sci. Vol 36. No. 4. July 1991. Pg. 979-990.
165. Sivaram, S.: Forensic odontology in identification of a murder victim in India. Forensic Sci. 1976. Jan-Feb. 7. 67-69.
166. Simpson, K.: Identification of live and dead human remains, en Forensic Medicine. 8 Edición. Ed. Edward Arnold. Londres. 1979. 38-41.
167. Smeets B; van de Voorde H; Hooft P: ABO bloodgrouping on tooth material. Forensic Sci Int. 1991 Sep. 50(2). P 277-84.
168. Smith B. C.; Fisher, D.L; Weedn, V. W; Warnock, G. R.; Holland M.: A systematic approach to the sampling of Dental DNA: Journal of For. Sc.Vol. 38. No.5. 1993. 1194-1209.
169. Sokal R.R., Rohlf F. J. :Introducción a la bioestadística. Ed. Reverté. Barcelona.1986.
170. Solheim, T.: Permanent identification team of the central criminal police bureau and its requirements for dentists. Nor Tannlaegeforen Tid. Jan. 1977. 87. 19-23
171. Solheim, T.: The Scandinavian Star ferry disaster 1990. A challenge to forensic odontology. Int. J. Legal medicine. 1992. 1-7.
172. Solheim T: A new method for dental age estimation in adults.Forensic Sci Int. 1993 May. 59(2). P 137-47.
173. Ubelaker, D.H.; Sperber, N.D.: Alterations in human bones and teeth as a result of restrited sun exposure and contact with corrosive agents. Jour. of For. Sc. Vol. 33. no. 2. 1988.: 540-548.
174. Ubelaker, D.H.: Human Skeletal Remains. 1989. Smithsonian Institution.

175. Ubelaker, D.H.; Bubniak, E; O'Donnell, G.: Computer-Assisted Photographic superimposition. *Journal of forensic sc.* vol 37. No.3 May 1992. 750-762.
176. Valverde E., Cabrero C., Cao R., Rodríguez Calvo M. S., Díez A., Barros F., Alemany J., Carracedo A. : "Population genetics of three VNTR polymorphism in two different spanish populations". *Int. J. Legal Med.* 1993. num.105: 251-256.
177. Vicek, E.: Use of the modified Gustafson technic for the determination of age by teeth from paleoanthropological material of Czech ruling princes at the turn of the 9th abd 10 th centuries. *Cesk Patol.* 1977. nov. 13 (4). 49-55.
178. Villanueva, E. : *Identidad. Criminalística, Med. legal y toxicología.* 1991: 600-619. Ed.Salvat.
179. Villanueva, E.; Lorente, J.A.: *Aplicaciones del ácido desoxirribonucleico (DNA) en Medicina legal. Med. legal y toxicología.* Ed. Salvat. 1991: 1044-1050.
180. Warnick, A.J. : *Academy.News: Oklahoma city bombing.* april 19,1995. *Forensic odontologist aid in the identification of victims.* Academy News.American Academy of Forensic Sciences. Vol.25. July.1995.
181. Whittaker, D. K.; Rawle, L.: The effects of putrefaction on haptoglobin phenotyping from tooth fragments. *Forensic Sci. Int.:* 64. 1994.: 151-157.
182. Whittaker, D.K.; Rawle, L.: The effects of putrefaction on haptoglobin phenotyping from tooth fragments. *Forensic Sci. Inter.* 64. 1994: 151-157.
183. Wood, R.E.; Tai, C.C.; Blenkinsop, B.; Johnston, D.: Digitized slice interposition in forensic dental radiographic identification. An In vitro study. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 1994. Mar. 15. 70-78.
184. Wyman , A.R.: White R. : . A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1980: 6754- 6758.
185. Xingzhi, Ji L; Hao F; Ming L; Zhuyao L: ABO blood grouping on

- dental tissue. *J Forensic Sci.* 1993 Jul. 38(4). P 956-60.
186. Xu X.; Zhu, J; Philipsen H.P.; Pang K.M.: Age estimation by chinese permanent teeth with image analysis. *Med. Sci. Law.* Oct. 1994. 34. 284-288
187. Yuasa I. and Umetsu K. : Genetic polymorphism of human 2 HD glycoprotein. Characterization and application to forensic hemogenetics.- *Electrophoresis.* 1988. num. 9: 404-410.

11.TABLAS Y GRAFICOS

tablas descriptivas.

GRUPOS EXPERIMENTALES:GRUPO NUMERO UNO.
ACCION DE LA SOSA CAUSTICA.

Nº	TIPO DIENTE	CANTIDAD ADN	DEGRADADO
1	Canino	15 ngr./microl.	poco degra.
2	Prem.	No aparece ADN	
3	Prem.	3 ngr./microl.	muy degrad.
4	Canino	20 ngr./microl.	poco degrad.
5	1 Molar	10 ngr./microl.	muy degrad.
6	1 Molar	10 ngr./microl.	muy degrad.
7	2 Molar	20 ngr./microl.	poco degrad.
8	Canino	10 ngr./microl.	sin degrad.
9	Canino	30 ngr./microl	poco degrad.
10	2 Molar	4 ngr./microl.	muy degrad.
11	1 Molar	30 ngr./microl	muy degrad.
12	Inc.lat.	No aparece ADN	
13	Inc. Centr	10 ngr./microl	poco degrad.
14	Canino	15 ngr./microl.	muy degrad.
15	2 premol.	sin muestra	
16	1 Molar	40 ngr./microl.	poco degrad.
17	Inc. Centr	20 ngr./microl.	poco degrad.
18	Canino	60 ngr./microl.	poco degrad.
19	Inc. lat.	10 ngr./microl.	poco degrad.
20	Inc. lat.	5 ngra./microl.	sin degrad.

Nº	TIPO DIENTE	CANTIDAD ADN	DEGRADADO
21	inc. lat.	sin muestra	
22	inc. central	15 ngr./microl.	poco degrad.
23	1 premolar	25 ngr./microl.	poco degrad.
24	canino	2 ngr./microl.	muy degrad.
25	inc. lat.	10 ngr./microl.	muy degrad.
26	inc. lat.	10 ngr./microl.	poco degrad.
27	1 mol.	No aparece ADN	
28	2 molar	20 ngr./microl.	poco degrad.
29	inc. central	30 ngr./microl.	poco degrad.
30	inc. central	10 ngr./microl.	poco degrad.
31	inc. central	sin muestra	
32	1 premolar	30 ngr./microl.	poco degrad.
33	2 premolar	10 ngr./microl.	sin degrad.
34	3 molar	10 ngr./microl.	poco degrad.
35	inc. lat.	sin muestra	
36	canino	15 ngr./microl.	poco degrad.
37	2 molar	5 ngr./microl.	sin degrad.
38	2 premol.	5 ngr./microl.	poco degrad.
39	canino	10 ngr./microl.	poco degrad.
40	inc. central	25 ngr./microl.	poco degrad.
41	inc. central	10 ngr./microl.	poco degrad.

Nº	TIPO DIENTE	CANTIDAD ADN	DEGRADADO
42	inc. central	40 ngr./microl.	poco degrad.
43	inc. lat.	sin muestra	
44	inc. lat.	5 ngr./microl.	muy degrad.
45	1 premol.	10 ngr./microl.	poco degrad.
46	inc. lat.	5 ngr./microl.	sin degrad.
47	1 molar.	10 ngr./microl.	muy degrad.
48	2 molar	50 ngr./microl.	poco degrad.
49	2 molar	5 ngr./microl.	sin degrad.
50	inc. central	70 ngr./microl.	poco degrad.
51	inc. lat.	No aparece ADN	
52	inc. lat.	10 ngr./microl.	sin degrad.
53	2 premol.	sin muestra	
54	3 molar	5 ngr./microl.	muy degrad.
55	1 molar	35 ngr./microl.	poco degrad.
56	inc. lat.	10 ngr./microl.	muy degrad.
57	inc. central	2 ngr./microl.	muy degrad.
58	inc. central	45 ngr./microl.	poco degrad.
59	inc. central	35 ngr./microl.	poco degrad.
60	1 premol.	10 ngr./microl.	sin degrad.
61	2 molar	5 ngr./microl.	sin degrad.
62	inc. central	10 ngr./microl.	poco degrad.

GRUPOS EXPERIMENTALES: GRUPO NÚMERO 2:
TEMPERATURA 200°C.

Nº	TIPO DIENTE	CANTIDAD ADN	DEGRADADO	ADN en mancha
1	2 molar.inf.	10 ngr./microl.	sin degrad.	40 ngr./microl.
2	2 molar sup.	8 ngr./microl.	muy degrad.	55 ngr./microl.
3	1 mol.sup.(caries)	no aparece ADN		20 ngr./microl.
4	3 molar inf.	15 ngr./microl.	poco degrad.	30 ngr./microl.
5	1 premolar sup.	5 ngr./microl.	muy degrad.	15 ngr./microl.
6	inc. lat. inf.	5 ngr./microl.	poco degrad.	70 ngr./microl.
7	2 molar inf.	10 ngr./microl.	sin degrad.	20 ngr./microl.
8	2 mol.sup.(caries)	no aparece ADN		40 ngr./microl.
9	1 molar sup.	15 ngr./microl.	poco degrad.	30 ngr./microl.
10	2 premolar inf.	20 ngr./microl.	muy degrad.	20 ngr./microl.
11	inc. lat. inf.	5 ngr./microl.	poco degrad.	50 ngr./microl.
12	3 mol.inf.(caries)	2 ngr./microl.	muy degrad.	70 ngr./microl.
13	2 premolar sup.	15 ngr./microl.	sin degrad.	70 ngr./microl.
14	3 molar inf.	10 ngr./microl.	poco degrad.	80 ngr./microl.
15	3 molar inf.	5 ngr./microl.	muy degrad.	70 ngr./microl.
16	1 molar sup.	15 ngr./microl.	poco degrad.	40 ngr./microl.
17	1 molar inf.	30 ngr./microl.	sin degrad.	70 ngr./microl.
18	inc. central inf.	20 ngr./microl.	poco degrad.	100 ngr./microl.
19	inc. lat. inf.(caries)	no aparece ADN		90 ngr./microl.
20	2 mol. inf.(caries.)	8 ngr./microl.	muy degrad.	20 ngr./microl.

Nº	TIPO DIENTE	CANTIDAD ADN	DEGRADADO	ADN en mancha
21	1 mol.inf.(caries)	4 ngr./microl.	muy degrad.	80 ngr./microl.
22	2º premolar inf.	10 ngr./microl.	sin degrad.	50 ngr./microl.
23	inc. lat. inf.	5 ngr./microl.	poco degrad.	40 ngr./microl.
24	3 mol. inf.	10 ngr./microl.	poco degrad.	60 ngr./microl.
25	1 mol. inf.(caries)	2 ngr/microl.	muy degrad.	70 ngr./microl.
26	2 mol.sup.(caries)	no aparece ADN		80 ngr./microl.
27	3 molar sup.	15 ngr./microl.	muy degrad.	50 ngr./microl.
28	canino sup.	10 ngr./microl.	muy degrad.	60 ngr./microl.
29	inc. lat. sup.	2 ngr/microl.	muy degrad.	200ngr./microl.
30	2 prem.sup.(caries)	no aparece ADN		40 ngr./microl.
31	1 mol. sup.(caries)	2 ngr/microl.	muy degrad.	90 ngr./microl.
32	2 molar sup	15 ngr./microl.	poco degrad.	70 ngr./microl.
33	1 prem.inf.(caries)	no aparece ADN		
34	2 premol. inf.	10 ngr./microl.	muy degrad.	90ngr./microl.
35	canln.inf.	25 ngr./microl.	poco degrad.	60 ngr./microl.
36	inc.lat. inf.	5 ngr./microl.	muy degrad.	150 ngr./microl.
37	inc.lat. inf.	15 ngr./microl.	poco degrad.	80 ngr./microl.
38	inc. central inf.	10 ngr./microl.	muy degrad.	60 ngr./microl.
39	2 premol.sup	4 ngr/microl.	muy degrad.	200 ngr./microl.
40	1 mol. sup.(caries)	3 ngr/microl.	muy degrad.	125 ngr./microl.

Nº	TIPO DIENTE	CANTIDAD ADN	DEGRADADO	ADN en mancha
41	1 molar sup.	15 ngr./microl.	poco degrad.	85 ngr./microl.
42	1 mol. Inf.(caries)	1-2 ngr/microl.	muy degrad.	225 ngr./microl.
43	2 molar sup.	20 ngr./microl.	poco degrad.	70 ngr./microl.
44	3 molar Inf.	15 ngr./microl.	muy degrad.	50 ngr./microl.
45	2 mol. Inf.(caries)	no aparece ADN		40 ngr./microl.
46	canin. sup.(caries)	2 ngr/microl.	muy degrad.	70 ngr./microl.
47	1 premol. Inf.	5 ngr./microl.	poco degrad.	80 ngr./microl.
48	2 molar sup.	40 ngr./microl.	sin degrad.	95 ngr./microl.
49	2 premol. Inf.	3 ngr/microl.	muy degrad.	55 ngr./microl.
50	3 molar. Inf.	10 ngr./microl.	poco degrad.	85 ngr./microl.
51	1 mol. sup.(caries)	4 ngr/microl.	muy degrad.	135 ngr./microl.
52	3 molar sup.	15 ngr./microl.	poco degrad.	150 ngr./microl.
53	1 premol. Inf.	10 ngr./microl.	muy degrad.	60 ngr./microl.
54	1 premol. Inf.	8 ngr./microl.	poco degrad.	80 ngr./microl.
55	inc. lat. sup.	3 ngr/microl.	muy degrad.	130 ngr./microl.
56	canin. Inf.(caries)	4 ngr/microl.	muy degrad.	150 ngr./microl.
57	1 mol. Inf.(caries)	no aparece ADN		140 ngr./microl.
58	3 molar Inf.	10 ngr./microl.	muy degrad.	70 ngr./microl.
59	2 prem. Inf.(caries)	5 ngr./microl.	poco degrad.	90 ngr./microl.
60	1 premol. sup.	4 ngr/microl.	muy degrad.	90 ngr./microl.
61	2 mol. Inf.(caries)	15 ngr./microl.	muy degrad.	135 ngr./microl.
62	1 molar sup.	20 ngr./microl.	sin degrad.	70 ngr./microl.
63	1 molar Inf.	20 ngr./microl.	muy degrad.	260 ngr./microl.
64	3 molar sup.	10 ngr./microl.	poco degrad.	250 ngr./microl.
65	inc. lat. Inf.	6 ngr./microl.	muy degrad.	100 ngr./microl.
66	2 molar sup.	20 ngr./microl.	sin degrad.	70 ngr./microl.

**ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LAS CANTIDADES
OBTENIDAS EN LOS DIENTES SANOS UTILIZADOS COMO
MUESTRA PATRON.**

num.	TIPO DIENTE	CANTIDAD ADN
1	can. Inf.	30 ngr./microl.
2	inc.lat.in.	20 ngr./microl.
3	1 premol.inf.	60 ngr./microl.
4	2 mol. sup.	40 ngr./microl.
5	inc. central. Inf.	7 ngr./microl.
6	1 mol. inf.	200 ngr./microl.
7	2 premol. Inf.	45 ngr./microl.
8	inc. lat. inf.	60 ngr./microl.
9	inc.lat.in.	30 ngr./microl. 1
10	1 mol. Inf.	80 ngr./microl.
11	2 mol. sup.	150 ngr./microi.
12	inc.lat.in.	40 ngr./microl.
13	1 mol. Inf.	20 ngr./microl.
14	2 mol. sup.	50 ngr./microl.
15	1 premol.inf.	40 ngr./microl.
16	1 mol. inf.	15 ngr./microl.
17	inc.lat.in.	25 ngr./microl.
18	inc.lat.in.	60 ngr./microl.
19	inc.lat.in.	45 ngr./microl.
20	1 mol. Inf.	40 ngr./microl.
21	2 mol. sup.	200 ngr./microl.
22	1 mol. Inf.	100 ngr./microl.

GRAFICOS Y PORCENTAJES.

GRUPOS EXPERIMENTALES.

Cantidad Media de ADN en ngr./ μ l. obtenida en grupo 1

sin nada de ADN .	10 muestras	
Menos de 5 ngr./ μ l.	4 muestras	2.75 ngr./ μ l
Más de 5 ngr./ μ l.	48 muestras	18.75 ngr./ μ l.

Cantidad media de ADN en ngr./ μ l. obtenida en grupo 2

sin nada de ADN.	8 muestras.	
Menos de 5 ngr./ μ l.	14 muestras	2.8 ngr./ μ l.
Más de 5 ngr./ μ l.	44 muestras	12.95 ngr./ μ l.

Proporción de ADN extraído en muestras tratadas con Sosa, respecto a las sometidas al calor: 1.44

Manchas de sangre procedente de las exodoncias

Se obtiene ADN en 65 muestras con un promedio de 102.78 ngr./ μ l. (Estos resultados no son comparativos, ya que la muestra no procede del interior radicular)œ.

Muestras patrón obtenidas de 22 dientes sanos

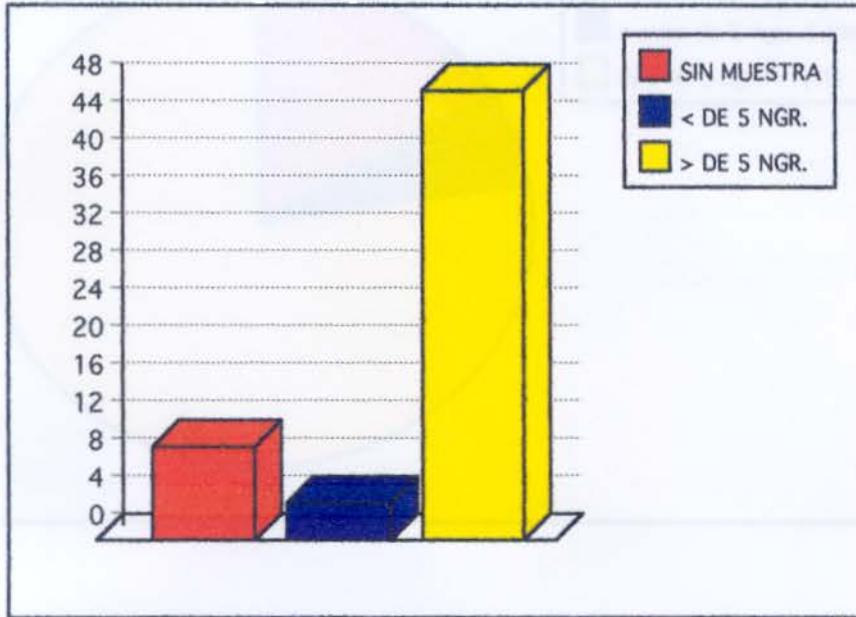
El promedio obtenido en 22 muestras es de 56,22 ngr./ μ l.

Relación entre la muestra patrón y los grupos experimentales:

La Proporción de promedios en el primer grupo es del 33,35 %, respecto a la muestra patrón.

La Proporción de promedios en el segundo grupo es del 23.03 %, respecto a la muestra patrón.

SIN MUESTRA	< DE 5 NGR.	> DE 5 NGR.
10	4	48



Grafica núm. 1.- Cantidad de ADN extraído en el 1º caso experimental, expresado en ngrs./ml



Gráfica núm. 2.- Porcentajes obtenidos en la extracción de ADN del primer caso experimental.

sin muestra	menos de 5 ngr.	más de 5 ngr.
8	14	44

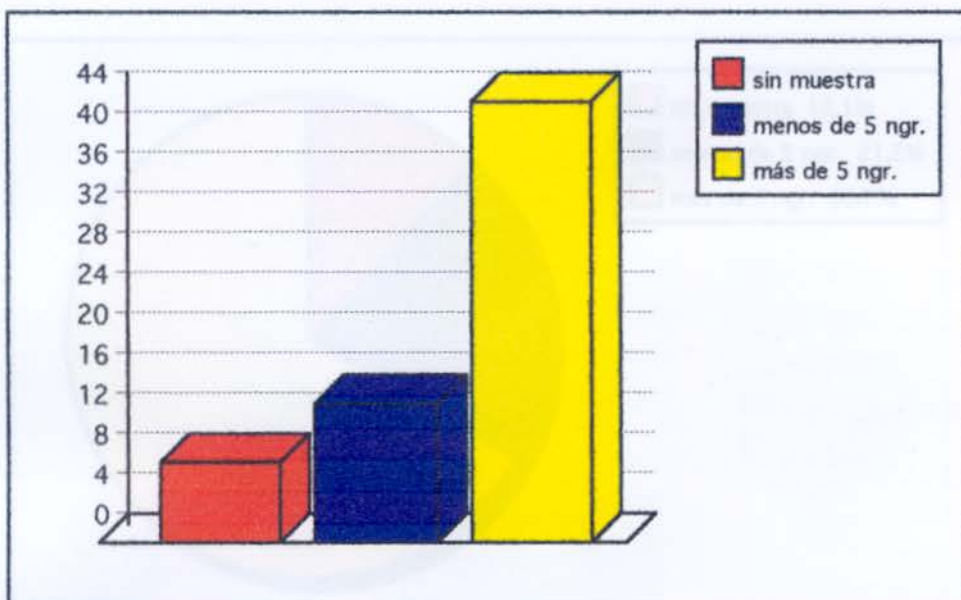


Gráfico núm. 3.- Extracción de ADN en el segundo caso experimental.

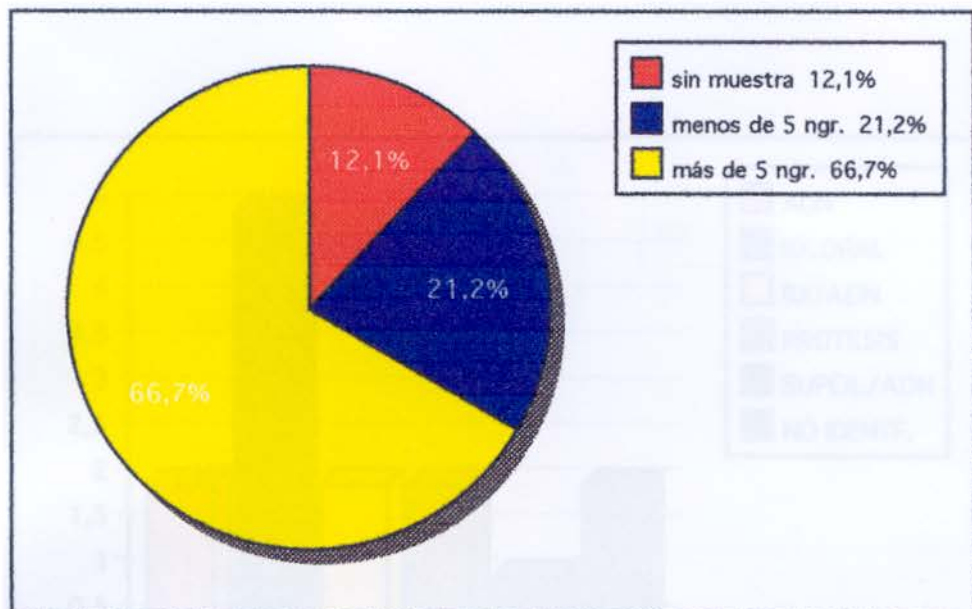


Gráfico núm. 4.- Porcentajes obtenidos en la extracción de ADN del segundo caso experimental.

ADN	RX.ORAL	RX/ADN	PROTESIS	SUPER./ADN	NO IDENTF.
2	5	2	2	1	2

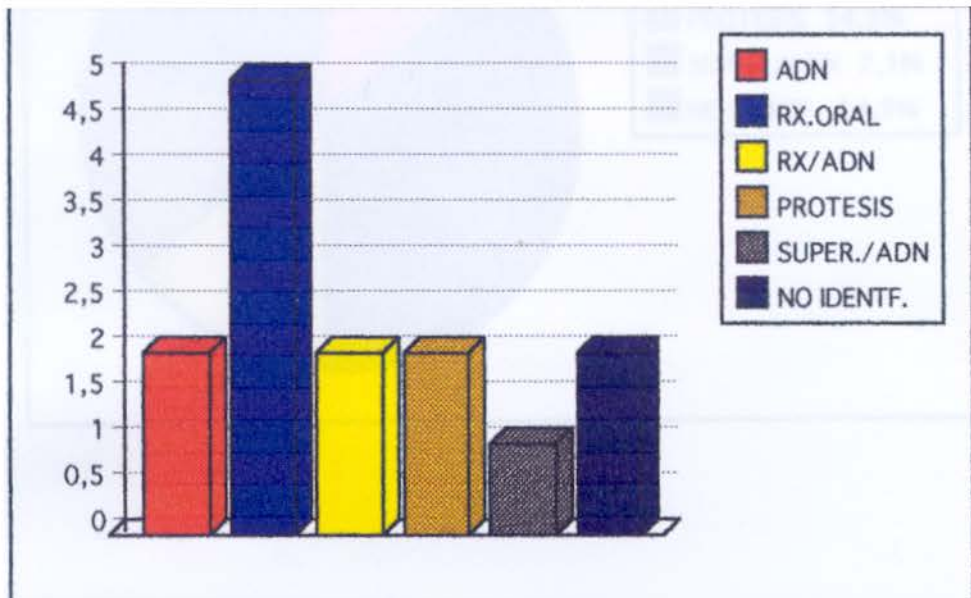


Gráfico núm. 5.- Resultados obtenidos en los casos forenses.

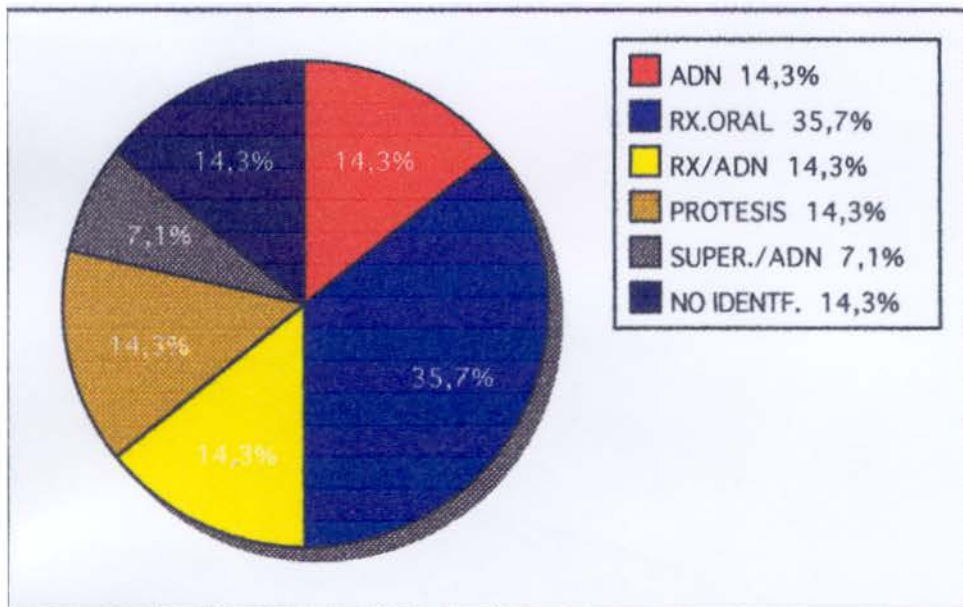


Figura núm. 6.- Porcentaje de resultados en los casos aislados.