

Validación del uso del ADN extraído de dientes con caries en necroidentificación

Esther Alia García^{1*}
 Laura Alberdi Gil¹
 Beatriz Romero Hernández²
 Ana Royuela Vicente³

Rosa del Campo²
 David Parra Pecharomán⁴
 Juan López Palafox¹

¹ Facultad de Odontología. Universidad Alfonso X El Sabio.

² Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS).

³ Unidad de Bioestadística. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS).

⁴ Servicio de Criminalística de la Guardia Civil.

*Autor responsable: Facultad de Odontología, Universidad Alfonso X El Sabio.

Introducción

La Odontología Forense es una rama de la Odontología que tiene como objetivo la investigación en el esqueleto humano de las alteraciones psíquicas, físicas, químicas y biológicas que ocurrieron durante la vida o en el proceso de la muerte. Además se ocupa de la aplicación de los conocimientos odontológicos con fines de identificación y tiene utilidad en el Derecho Laboral, Civil y Penal (Ferreira Da Silva, 2007; Henrique Alves, 2007).

En los sucesos de carácter bélico o catástrofes naturales, es prioritaria la labor de recuperación e identificación de los restos mortales para poder entregarlos a sus

familiares en el menor tiempo posible. La identificación se lleva a cabo comparando los datos que se solicitan y se obtienen de los familiares (denominados datos ante-mortem), con los datos que los médicos forenses y los equipos policiales de identificación de víctimas obtienen de los cadáveres (datos post-mortem).

En necroidentificación existen los métodos no odontológicos (reconocimiento directo, documentación, prendas y objetos personales, estudios antropométricos, tatuajes, dactiloscopia, estudio interno del cadáver, estudios analíticos y radiología) y los odontológicos (odontograma, extracción de maxilares, prótesis, radiología oral,

cráneometría y dentometría, fotografía oral, queiloscopía, rugoscopia, superposición de imágenes y marcadores genéticos en el diente). De todos ellos, los más utilizados son los métodos no odontológicos debido a su sencillez y bajo coste. En situaciones en las cuales los procedimientos anteriores no son factibles o debido a la gran cantidad de degradación de los cuerpos se recurre a métodos odontológicos. Desde los años noventa, en las investigaciones de accidentes aéreos se recogen sistemáticamente muestras dentales para identificar los cuerpos. En los casos de cadáveres carbonizados, los dientes son piezas clave, ya que sus propiedades físico-químicas les permiten

Resumen

Objetivos: Los Odontólogos Forenses sólo utilizan dientes totalmente íntegros y libres de caries para identificar individuos. Los procesos cariogénicos ponen en contacto la cavidad pulpar del diente con el exterior, existiendo además contaminación con el ADN de los microorganismos que causan la caries. El objetivo principal de este trabajo fue validar el uso de la materia pulpar de dientes cariados en la extracción de ADN humano para identificar individuos.

Material y métodos: Se reclutaron 120 pacientes divididos en: A) grupo control (n=60), pacientes sin caries a los que se les había extraído una pieza dental generalmente por motivos ortodóncicos y B) grupo caries (n=60), pacientes a los que se había extirpado un diente cariado. Mediante fragmentación mecánica se liberó el canal y se recogió el material pulpar. Se obtuvo el ADN mediante un sistema comercial y posteriormente se realizó el proceso necesario para obtener el perfil genético del individuo utilizando. Los resultados se clasificaron en perfil óptimo (≥ 10 marcadores), perfil parcial (entre 5 y 9 marcadores), perfil bajo (≤ 5 marcadores) y sin perfil.

Resultados: La distribución y características de los pacientes incluidos en ambos grupos fueron similares. Tanto en los dientes con caries como en los sanos se obtuvo el mismo porcentaje de éxito en la identificación del individuo (41/60, 68,3%), aunque se obtuvieron más perfiles completos en el grupo de dientes con caries (35 vs 27). No se ha detectado ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Conclusiones: Se ha demostrado que los dientes cariados son, al menos, igual de válidos que los dientes sanos para los procesos de necroidentificación.

resistir temperaturas muy elevadas manteniendo intacto el material pulpar. A partir de este material se puede obtener el ADN suficiente para identificar la persona (Real Decreto 32/2009; CICR 2009; Jiménez-Arce 1999; López Palafox 1996, 2002a-d; Schuller-Götzburg 2006).

Clásicamente en Odontología Forense, solo se han utilizado dientes sanos sin fisuras, ni caries, que tienen los ápices totalmente formados, las raíces intactas y que conservan el brillo del esmalte. Además, siempre se recomienda elegir aquellas piezas dentales que se encuentren dentro de los alvéolos del hueso. Actualmente, los dientes con caries son desechados porque se considera que la pulpa ha estado expuesta a la microbiota bucal cariogénica, generándose una posible contaminación de ADN, además de que las caries pueden destruir el material pulpar. No se ha publicado ningún documento científico en el que se haya evaluado el uso de dientes con caries para obtener el ADN humano. La caries ha sido y es todavía la enfermedad crónica más frecuente del hombre moderno, y tiene una altísima prevalencia en todo el mundo. Es un problema de salud importante que afecta al 60-90% de los niños y, prácticamente, a la totalidad de los adultos. Para la OMS, la caries dental es la tercera calamidad sanitaria, después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Gispert 2005). Con la incorporación de nuevas tecnologías de secuenciación masiva, se han descrito la implicación de una gran variedad de especies bacterianas en las caries (Belda-Ferre, 2012).

El objetivo principal de este estudio fue validar el ADN extraído de dientes cariados para necroidentificación y compararlo con ADN extraído de dientes sanos. El objetivo secundario fue determinar si la concentración y la pureza del ADN pueden influir en la obtención del perfil genético del individuo.

Material y métodos

Recogida de dientes. El estudio se llevó a cabo en el periodo de tiempo 2011-2012. El comité Ético de la Universidad Alfonso X

Tabla 1. Principales características de los Loci STR del kit AmpFISTR®NGM Select. (Applied biosystem, 2012; Green, 2013)

Nombre del locus	Localización Cromosómica	Probabilidad de identidad genética (Pi)(1)	Probabilidad de exclusión de paternidad (PE)(2)
Amelogenina	X: p22.1-22.3 Y: p11.2		
D10S1248	10q26.3	0.0937	0.5680
D12S391	12p13.2	0.0232	0.7990
D16S539	16q24.1	0.1042	0.5790
D18S51	18q21.33	0.0312	0.7580
D19S433	19q12	0.0852	0.5070
D1S1656	1q42.2	0.0224	0.8110
D21S11	21q11.2-q21	0.0520	0.7290
D22S1045	22q12.3	0.1326	0.4550
D2S1338	2q35	0.0316	0.7520
D2S441	2p14	0.0980	0.4970
D3S1358	3p21.31	0.0749	0.5220
D8S1179	8q24.13	0.0635	0.6160
FGA	4q28	0.0387	0.6660
SE33	6	0.0085	0.9120
TH01	11p15.5	0.0798	0.5020
vWA	12p13.31	0.0654	0.6440
Pei			1.455231e-08
Combinado		2.35 x e-21	0.9999999854

(1) La probabilidad de identidad genética es la probabilidad de hallar dos individuos al azar que compartan el mismo genotipo, en la población estudiada, en este caso, caucásica.

(2) La probabilidad de exclusión de paternidad es la probabilidad, de que un individuo elegido al azar de la población (en este caso, población caucásica), sea excluido como posible padre.

El Sabio aprobó el proyecto y se crearon los consentimientos informados necesarios para que cada paciente estuviera debidamente informado del proyecto y sus fines. Se reclutaron a 120 pacientes de forma aleatoria, 60 de ellos pertenecieron al grupo caries con extracciones dentales debido a procesos cariogénicos de diferente afectación a nivel adamantino, cameral –pulpar y radicular, y otros 60 sujetos fueron incluidos en el grupo control, a los que se les había extraído un diente sano por motivos ortodóncicos y/o periodontales.

La selección de los pacientes, el diagnóstico y la indicación de tratamiento, así como todo el procedimiento clínico, fueron realizados por el mismo operador. Para la selección de la muestra dental con respecto a los criterios de inclusión, se consideró diente “sano” aquel en el que no existe evidencia de caries. De esta forma, los dientes con los siguientes defectos en ausencia de otro criterio positivo, son considerados “sanos”: 1) manchas blancas o lechosas, 2) zonas descoloridas o ásperas, 3) puntos o fisuras teñidos que retienen la sonda pero cuyo suelo o paredes no están

reblandecidos o el esmalte socavado y 4) áreas oscuras, brillantes, duras o punteadas del esmalte que muestran signos de fluorosis moderada o severa. El examen de los dientes se realizó a ojo desnudo. Aquellos dientes con caries visual o radiográficamente diagnosticadas fueron ubicados en el grupo caries, al igual que aquellos que presentan caries subobturación. Por el contrario, los dientes aparentemente "sanos", extraídos por otras patologías o por motivos ortodóncicos, formaron parte del grupo control. Se han

excluido del estudio dientes con otras patologías como reabsorción radicular externa o interna, ápices radiculares abiertos, fenestraciones óseas, endodoncias, fracturas radiculares, etc.

Extracción de ADN

Se procedió a la fragmentación mecánica de cada pieza dental para facilitar la recogida del material interno pulpar (Figura 1). Este material pulpar fue colocado en tubos eppendorf para proceder a la extracción



Figura 1. Fragmentación de un canino y un premolar con liberación del cuerno pulpar.



de ADN mediante el método comercial de QIAamp® (QiaGen, Alemania).

Quantificación de ADN y determinación de su pureza

La concentración del ADN de procedencia exclusivamente humano se determinó mediante el sistema Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen final de 25 µl en el termociclador iCycler Thermal Cycler de BIO-RAD, con un programa de amplificación de: 95°C 45 seg, 58°C 45 seg y 72°C 45 seg durante 35 ciclos. La pureza de las muestras se calculó mediante el cociente A260/280 en un aparato NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (ThermoScientific).

Análisis del perfil genético

La identificación genética de cada uno de los individuos se realizó mediante la obtención del perfil genético para el conjunto de marcadores de tipo STR del European Standard Set o ESS (Resolución del Consejo (CE) de 30 de noviembre de 2009 relativa al intercambio de resultados de análisis de ADN (2009/C 296/01, DOCE 5/12/2009). Este proceso comprende una fase de amplificación, que se realizó con el Kit de reactivos AmpFISTR®NGM™ (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante, una electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI-PRISM-3130 (Applied Biosystems), y finalmente el análisis de los resultados mediante el programa "GeneMapper" (versiones ID v3.2 e ID-X). En la tabla 1 se detallan todos los marcadores analizados en nuestras muestras. El resultado de la identificación se clasifica en:

- 1) perfil completo (≥10 marcadores STR autosómicos y marcador del gen de la amelogenina);
- 2) perfil parcial (5-9 marcadores STR autosómicos y el gen de la amelogenina),
- 3) perfil bajo (≤5 marcadores STR autosómicos y el gen de la amelogenina),
- 4) sin perfil, cuando no se podía identificar al individuo.

Análisis estadístico

Se utilizó el test de Wilcoxon para explorar las diferencias en la identificación, la concentración y la pureza de las muestras de ADN según el grupo de las muestras.

Resultados

Se recogieron 60 piezas sanas en el grupo control (23 hombres y 37 mujeres) y 60 piezas con caries en el grupo caries (35 hombres y 25 mujeres), correspondientes a incisivos (3 control/2 caries), caninos (2/3), premolares (n=18/2), molares (n=10/29) y cordales (n=27/24). Respecto a la edad de los individuos según el grupo de estudio, se han distribuido en \leq de 29 años (27 control/8 caries); de 30 a 59 años (24/42) y finalmente \geq de 60 años (9/10).

Las muestras cariadas se subdividieron en: 1.A) Lesión superficial, su profundidad se circunscribe al esmalte (n=8); 1.B) Lesión moderada, próxima mínimamente a la dentina (n=7); 1.C) Lesión profunda, alcanza un extenso compromiso de la dentina (n=9); 1.D) Lesión muy profunda sin compromiso pulpar, afecta la dentina adyacente al tejido pulpar (n=12); 1.E) Lesión muy profunda con compromiso pulpar, alcanza exposición pulpar (n=15), y finalmente 1.F) Caries con destrucción coronal dental y afectación a todos los niveles (n=9).

Los dientes sanos del grupo control se clasificaron en: 2.A) Diente obturado sin caries (n=4), 2.B) Diente permanente ausente por otras causas, extracciones ortodóncicas, traumatismos, enfermedad periodontal y extracción de cordales (n=51); 2.C) Dientes teñidos o con caries incipientes, donde la lesión cariológica no se ha producido (n=4), y 2.D) Dientes temporales (n=1). Los datos de los dientes y pacientes se describen en la Tabla 2.

A partir del material extraído de la cámara pulpar se obtuvo ADN. La distribución de las medidas de concentración y pureza de estas muestras de ADN se reflejan en la Figura 2. En las tablas 2 y 3 se resumen todos los datos obtenidos según tipo de diente y patología asociada. Se ha obtenido perfil genético en

Tabla 2. Características de los dientes sanos incluidos en el Grupo Control y resultados obtenidos en necroidentificación.

Diente	N°	Clasificación	ADN (ng/ μ l)		Perfil de Identificación del Individuo			
			Media	Rango	Completo	Parcial	Bajo	Sin perfil
Incisivo	3	2B	0,019	0,006-0,038				3
Canino	2	2B/2C	0,0001	0,0001			1	1
Premolar	18	2A (n=2)	0,057	0,01-0,09	1			1
		2B (n=14)	0,77	0,0001-3,64	9		1	4
		2C (n=1)	1,39		1			
		2D (n=1)	0,0001		1			
Molar	10	2A (n=2)	0,05	0,0040-0,099		1		1
		2B (n=8)	0,35	0,0001-2,74	2	2	1	3
Cordal	27	2B (n=26)	1,89	0,0001-16,1	12	4	4	5
		2C (n=2)	0,039	0,02-0,05		1		1
TOTAL	60		1,04	0,0001-16,1	26	8	7	19

Tabla 2. Características de los dientes con caries incluidos en el Grupo Caries y resultados obtenidos en necroidentificación.

Diente	N°	Clasificación	ADN (ng/ μ l)		Perfil de Identificación del Individuo			
			Media	Rango	Completo	Parcial	Bajo	Sin perfil
Incisivo	2	1B/1F	0,071	0,006-0,075	1			1
Canino	2	1E/1F	0,039	0,009-0,68	1			1
Premolar	3	1E (n=2)/1D	1,45	0,03-3,7		1		2
Molar	27	1A (n=3)	0,82	0,012-2,29	2			1
		1B (n=3)	0,063	0,0019-0,13	3			
		1C (n=5)	0,039	0,007-0,087	4		1	
		1D (n=4)	0,037	0,001-0,13	2			2
		1E (n=8)	1,01	0,008-7,05	2	1		5
		1F (n=4)	0,25	0,01-0,54	2		1	1
Cordal	26	1A (n=5)	0,036	0,008-0,11	3			2
		1B (n=3)	0,10	0,015-0,18	2			1
		1C (n=4)	0,70	0,04-2,50	4			
		1D (n=7)	1,25	0-8,45	4	1	1	1
		1E (n=4)	0,71	0,002-2,73	3			1
		1F (n=3)	1,70	0,06-3,12	1			2
TOTAL	60		0,60	0-8,45	34	3	3	20

82 muestras de las 120 analizadas (68,3%). En la Figura 3 se representa la concordancia de éxito en la obtención de los perfiles genéticos según la muestra. No se observó ninguna asociación estadística entre la concentración o la pureza de ADN de la muestra y la obtención de los perfiles genéticos. Igualmente tampoco se pudo detectar ninguna diferencia estadística entre los resultados obtenidos en el grupo caries y en el grupo control.

Discusión

Muchos estudios previos han señalado la importancia de los dientes y huesos como reservorios de ADN para necroidentificar en casos de catástrofes (Barrio Caballero 2003; Dell'osso 1995; Ferreira Da Silva 2007;

Grimoud 2002; Jiménez-Arce 1999; López Palafox 1996, 2002a-d; Pretty 2001; Rohland 2007; Schuller-Götzburg 2006; Tagliaro 2010). Sin embargo, en todos ellos se desechan los dientes con caries, creyendo que la lesión o los agentes microbianos podrían interferir en la obtención del ADN humano. En este trabajo hemos querido validar el ADN extraído en piezas dentarias con caries para necroidentificación, ya que la caries es una de las enfermedades más prevalente en la sociedad actual (Consejo de dentistas de España 2010; Elena-Sánchez, 2008; García Barbero 1997; Gispert 2005; Gutiérrez Acero 2006), y en muchas individuos no se pueden encontrar dientes totalmente sanos. Existen protocolos de recogida del interior

Figura 2. Distribución de la concentración y pureza de ADN de las muestras del Grupo Control y del Grupo Caries.

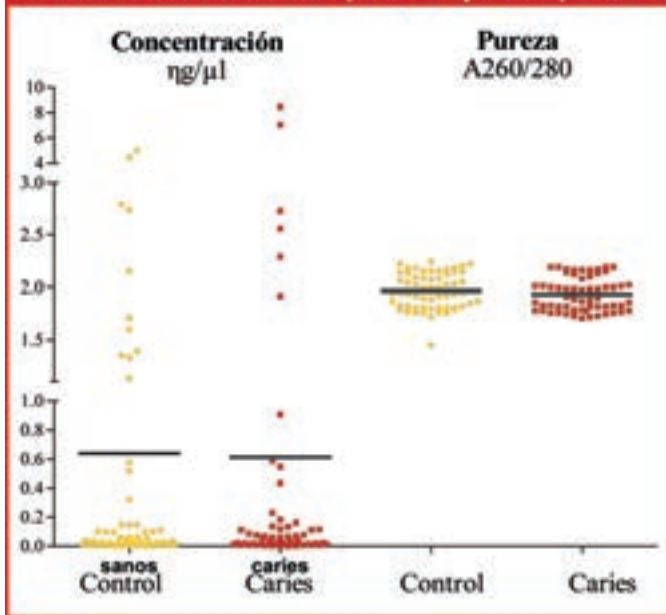
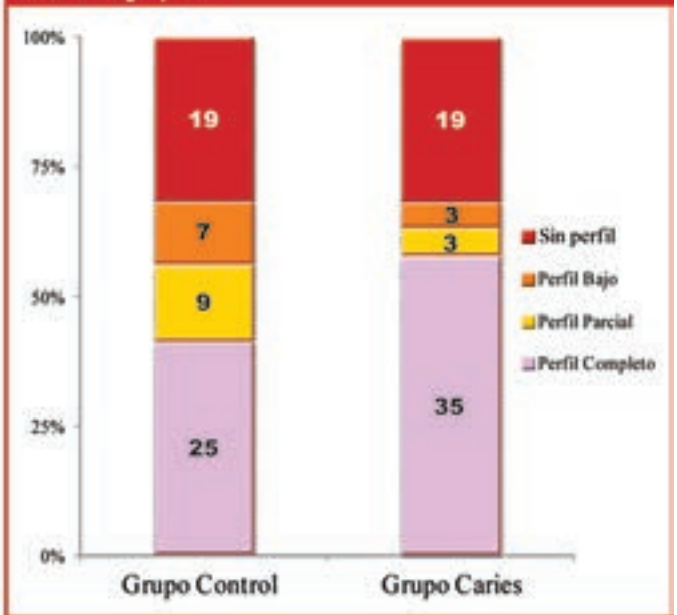


Figura 3. Distribución de los perfiles genéticos obtenidos en ambos grupos.



del diente, para evitar la contaminación exógena, algunos autores utilizan instrumentos rotatorios con los cuales realizan una incisión longitudinal o cervical en la pieza dentaria y mediante botadores o instrumentos quirúrgicos separan los dos fragmentos de la pieza dentaria, obteniendo una amplia exposición de la cámara pulpar (Grimoud 2002, 2004). Otros consideran que esta técnica puede contaminar el interior de la cavidad pulpar con el polvo procedente de la apertura mediante estos instrumentos, generándose inhibidores de la PCR posterior y recomiendan la técnica de la molienda, es decir, pulverizar el diente mediante molino de impactación electromagnético refrigerado con nitrógeno líquido (Baker 2001; Cárdenas-López 2013; Del Valle 2004; Presecki 2000). La mayoría de los métodos de extracción de ADN de huesos implican la pulverización del hueso y su descalcificación con EDTA. Otros autores recomiendan en el caso de las piezas dentales proceder al machacado de la zona radicular para hacer accesible la cavidad pulpar y poder extraer la pulpa dental rica en ADN. En algunas ocasiones la cavidad pulpar aparece vacía o quedan escasos restos de tejido pulpar, por lo que se puede proceder al raspado de

material biológico (Smith 1993; Tilotta 2010). En este estudio se decidió realizar esta última técnica de fragmentación. La disponibilidad de reactivos comerciales en genética forense ha supuesto un gran avance hacia la estandarización de métodos de análisis, nomenclaturas, métodos estadísticos y marcadores. En la Unión Europea el conjunto de marcadores genéticos de tipo STR viene determinado por el European Standard Set (ESS). Su uso ha permitido establecer bases de datos de perfiles de ADN, tanto con carácter policial como humanitario o social, como la Base de Datos INT-Fénix de la Secretaría de Estado de Seguridad del Ministerio del Interior, cuyo objetivo es la identificación genética de personas desaparecidas y cadáveres sin identificar, con la finalidad científica, de interés público, social y judicial, en investigaciones del Ministerio del Interior, de la que existen miles registros. La comparación de datos de perfiles genéticos entre los distintos laboratorios nacionales e internacionales en base a estos marcadores ha permitido la determinación de la identidad biológica de un gran número de individuos, siendo una potente herramienta de identificación. El análisis de nuestros resultados demuestra que no existe ninguna diferencia significativa

entre el grupo de control y el grupo de caries. En ambos grupos se han obtenido muestras de ADN con concentraciones y pureza similares, y los resultados de necroidentificación han sido similares, siendo incluso mejores en el grupo de caries. La concentración y la pureza del ADN son variables muy críticas en el proceso de necroidentificación. Sin embargo en nuestra experiencia hemos podido obtener perfiles completos en muestras muy concentradas pero también en muestras con concentraciones por debajo de 0,025 ng/μl, valor que se considera mínimo para poder obtener un perfil genético del individuo. En resumen podemos concluir que la obtención de la materia pulpar mediante fragmentación de la raíz es un procedimiento simple y fiable y que a partir de este material de dientes con caries se puede obtener un grado de identificación genética equiparable a los dientes sanos.

© DERECHOS RESERVADOS

Correspondencia
 Esther Alia García
 Avda de la Universidad s/n,
 Villanueva de la Cañada,
 28691 Madrid.
 estheraliagarcia@gmail.com

bibliografía

- 1.-Baker LE, McCormick WF, Matteson KJ. 2001. A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth. *J Forensic Sci.* 46:126-30.
- 2.-Barrio-Caballero P. 2013. Revisión de métodos de extracción de ADN en restos óseos en el laboratorio forense". *Revista Española de Medicina Legal.* 39 (2). Abril. En: <http://zl.elsevier.es/es/revista/revista-espanola-medicina-legal-285/articulo/revision-metodos-extraccion-adn-partir-90204570>. Fecha de consulta: 10/10/2013.
- 3.-Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, Mira A. 2012. The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 6(1):46-56.
- 4.-Cárdenas López V. L. 2013. Obtención de ADN a partir de restos óseos. En: <http://vcrdenaslopez.blogspot.com.es/>. Fecha de consulta. 19/10/13.
- 5.-CICR: Comité International de la Croix-Rouge. 2009. *Personnes disparues, analyses ADN et identification des restes humains: Guide des meilleures pratiques à suivre dans les situations de conflit armé et autres situations de violence.* Editorial: Référence. Deuxième édition. Suiza. 52p.
- 6.-Consejo de Dentistas de España. 2010. Mayores de 65 años, inmigrantes y las clases sociales más bajas, los que más caries tienen. En: http://www.consejodentistas.es/A04_PUBLICACIONES6.asp?Num=60 Fecha de consulta: 12/11/12.
- 7.-Del Valle C y cols. 2004. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. *Revista de Biología Tropical.* San José. Septiembre. 52(3).7p.
- 8.-Dell'Osso G y cols. 1995. A polymorphism study of the DNA extracted from dental tissues. *Minerva Stomatologica May.* 44(5);205-209p.
- 9.-Elena Sánchez, M. 2008. Evaluación del estado de salud bucodental y su relación con estilos de vida saludables en la población de Salamanca. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. Salamanca. 256p.
- 10.-Ferreira Da Silva R, Domingos Da Rocha S. 2007. Genetics and molecular biology: a literatura review of forensic dentistry application. *Brazilian Journal Oral Science.* 6(20).1254-1259p.
- García Barbero, J. 1997. Capítulo 9: Caries. En: *Patogenia y anatomía patológica.* En: *Patología y Terapéutica Dental.* Editorial Síntesis. Madrid. 172-180p.
- 11.-Gispert E. 2005. Sistema pronóstico del riesgo de caries en escolares de 7 a 14 años de edad. Tesis de especialidad. Ciudad de La Habana: Facultad de Estomatología. 1-4p.
- 12.-Grimoud A.M y cols. 2002. Schémas d'incisions et de fracture des différents morphotypes de dents adaptés au recueil de pulpes dentaires et à l'analyse d'ADN. *Bulletins et mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris.* 14 (1-2). 1-8p.
- 13.-Grimoud A.M y cols. 2004. Critères de sélection d'échantillons dentaires pour l'étude de l'ADN ancien. *Antropo.* France. 6; 43-51p.
- 14.-Gutierrez Acero, D. 2006. Microbiología de la caries radicular en el paciente mayor. *Avances en estomatología.* Madrid. Vol. 22. Nº 2. 6p.
- 15.-Henrique Alves R, Sales-Peres A. 2007. Use of DNA technology in forensic dentistry. *Journal Applied Oral Sciences.* 15(3):156-161p.
- 16.-Jiménez-Arce G; Morera-Brenes B. 1999. Revisión sobre la extracción de ADN a partir de huesos humanos. *Medicina Legal de Costa Rica.* 16(1-2) 104-114p.
- 17.-López Palafox J. 1996. Identificación de cadáveres calcinados y en grandes catástrofes: Aplicación de métodos de necroidentificación. Importancia de marcadores genéticos en tejido dental. Tesis doctoral de investigación. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 189p.
- 18.-López Palafox J. 2002a. Muerte por carbonización. Metodología en la identificación. Aplicación de la Odontología Forense. En: <http://www.maxillaris.com/hemeroteca/200204/forense.pdf>. Revisado 7/7/13.
- 19.-Lopez Palafox, J; Prieto Solla, L; López García-Franco, P. 2002b. Capítulo 7: Fase de la investigación. La escena del desastre (Aplicaciones de la Odontología Forense). En: *Investigación de víctimas en desastres.* Editoriales Bellisco. Madrid. 43-47p.
- 20.-Lopez Palafox, P; Prieto Solla, L; López García-Franco, P. 2002c. Capítulo 14: La identificación V: Estudios genéticos (Aplicaciones de la Odontología Forense). En: *Investigación de víctimas en desastres.* Editoriales Bellisco. Madrid. 103-145p.
- 21.-Presecki Z, Brkic H. 2000. Methods of preparing the tooth for DNA Isolation. *Acta Stomatologica Croatica.* 34(1). 21-24p.
- 22.-Pretty IA, Sweet D. 2001. A look at forensic dentistry. Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. *British Dental Journal.* April 14. 190(7). 359-366p.
- 23.-Real Decreto 32/2009, de 16 de enero, por el que se aprueba el Protocolo Nacional de actuación Médico-forense y de Policía Científica en sucesos con víctimas múltiples. *Boletín Oficial del Estado (BOE).* 2009. En: <http://www.boe.es/boe/dias/2009/02/06/pdfs/BOE-A-2009-2029.pdf>. Fecha de consulta: 15/5/13.
- 24.-Resolución del Consejo (CE) de 30 de noviembre de 2009 relativa al intercambio de resultados de análisis de ADN (2009/C 296/01, DOCE 5/12/2009).
- 25.-Rohland N, Hofreiter M. 2007. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols.* 2(7). 1756-62p.
- 26.-Schuller-Götzburg P y cols. 2006. Forensic odontologists successfully identify tsunami victims in Phuket, Thailand. *Forensic Science International.* 1-4. 204-207p.
- 27.-Smith BC, Fisher DL y cols. 1993. A systematic approach to the sampling of dental DNA. *Journal Forensic Science.* Sep; 38(5); 1194-1209p.
- 28.-Tagliaro F, De Leo D. 2010. Human skeletal remains development of DNA extraction and typing method. Tesis Doctoral. University of Verona. April. 1-58 p.
- 29.-Tilotta F y cols. 2010. A comparative study of two methods of dental pulp extraction for genetic fingerprinting. *Forensic Science International.* Oct 10; 202 (1-3). 39-43p.