



**ORIGINAL**

# Identificación humana por medios odontológicos y la bioquímica del diente como muestra.

## HUMAN IDENTIFICATION BY ODONTOLOGICAL METHODS AND THE BIOCHEMICAL APPLICATION OF THE TOOTH AS A SAMPLE.

Adserias-Garriga J.<sup>1</sup>, C. Zapico S.<sup>2</sup>

1 Department of Applied Forensic Sciences, Mercyhurst University

2 Department of Chemistry and Biochemistry and International Forensic Research Institute, Florida International University.

**RESUMEN:** Cuando se encuentran restos humanos esqueletizados, la prioridad de la investigación es determinar la identidad de la víctima. Una identificación positiva es un factor crucial para que las familias de las víctimas puedan pasar página; también se requiere para expedir el certificado de defunción y otros asuntos legales relacionados. La identificación de los restos humanos es un factor clave en las investigaciones forenses para poder investigar el crimen. Como consecuencia, la identificación es esencial debido a razones sociales, legales y forenses. En los últimos 30 años la odontología forense ha experimentado una importante transformación, en un principio se usaba ocasionalmente para identificación dental, pero recientemente su papel es más amplio, contribuyendo a la determinación del perfil biológico. Asimismo, la “huella genética” ha evolucionado no solo en cuanto a tecnología, también en su aplicación para la obtención no solo del perfil de ADN, también ayudando en la estimación de la edad, sexo y el ancestro. Aunque estas dos disciplinas se han desarrollado independientemente, sus caminos se han cruzado en muchas ocasiones en los escenarios que requieren la identificación de restos humanos. Esta revisión describe las contribuciones tanto de la odontología forense como de la biología molecular/bioquímica a la identificación humana, demostrando cómo un abordaje multidisciplinar contribuye a un proceso de identificación más eficiente y preciso.

**PALABRAS CLAVE:** Odontología Forense, Identificación humana, Biología y Bioquímica Forense.

**ABSTRACT:** When skeletonized human remains are discovered, the priority of the investigation is to determine the identity of the victim. Positive identification is a crucial factor for victims' families to turn the page; it is also required to issue the death certificate and other related legal matters. Identifying human remains is a key factor in forensic investigations in order to investigate crime. Thus, identification is essential for social, legal and forensic reasons. In the last 30 years, forensic dentistry has undergone a major transformation, originally used occasionally for dental identification, but recently its role is broader, contributing to the determination of the biological profile. Likewise, the “genetic fingerprint” has evolved not only in terms of technology, but also in its application to get not only the DNA profile, but also helping to estimate age, sex and ancestry. Although these two disciplines have been developed independently, their paths have been crossed on many occasions in scenarios that require the identification of human remains. This review describes the contributions of both forensic dentistry and molecular / biochemical biology to human identification, demonstrating how a multidisciplinary approach contributes to a more efficient and accurate identification process.

**KEY WORDS:** Forensic Dentistry, Human Identification, Forensic Biology and Biochemistry.

**CONTACTO:** Joe Adserias-Garriga Email: mjadserias@hotmail.com

### 1. INTRODUCCIÓN.

Ante el hallazgo de restos humanos, el principal objetivo de la investigación es determinar la identidad del fallecido; de hecho, cualquier investigación forense que involucre restos humanos sería muy difícil de resolver sin esta información. Para ello se pueden utilizar varios métodos y técnicas, dependiendo del estado de los restos.

El primer paso en el proceso de identificación es reconstruir el perfil biológico, que consiste en una descripción general del ancestro, el sexo, la edad, y a estatura del individuo.

Estos datos son los datos postmortem. Los datos antemortem consisten en cualquier información de ese individuo aportada por los familiares de la víctima que pueda utilizarse para la identificación.

La comparación de los datos antemortem and postmortem puede ofrecer una identificación positiva, una presunta identificación o una exclusión.

Se puede llegar a una identificación positiva científicamente probada con la utilización de las huellas dactilares, la odontología o el análisis del ADN. Por otra parte, una presunta identificación se da cuando hay varias consistencias entre los datos ante mortem y post mortem, pero ningún factor por sí solo justifica la identificación (Thompson y Black, 2006). Una presunta identificación puede basarse en los efectos personales, cicatrices, tatuajes, la evidencia contextual, el reconocimiento visual o la reconstrucción facial. Cuando los datos antemortem y postmortem no son consistentes, nos lleva a una exclusión.

La identificación dental es extremadamente útil cuando se intenta lograr una identificación positiva o una exclusión, ya sea en casos forenses aislados o en la identificación de víctimas de desastres de masas (DVI), donde la odontología forense ofrece un método expeditivo y científico de identificación comparativa. El campo de la odontología forense ha experimentado un cambio significativo en los últimos treinta años, desde la consulta a odontólogos forenses solo ocasionalmente en casos de identificación, hasta desempeñar un papel clave en el proceso de identificación cotidianamente (Senn y Stimson 2010). Hoy en día, la mayoría de las oficinas forenses, así como la mayoría de los departamentos de policía de todo el mundo, cuentan con odontólogos forenses como consultores que participan habitualmente en casos de identificación dental, estimación de la edad dental o marcas de mordedura.

A medida que avanzan las nuevas tecnologías, la odontología forense va incorporando nuevas técnicas y desarrollando nuevos métodos para su posterior aplicación en los casos forenses; Estos avances tecnológicos pueden aumentar significativamente la velocidad y la eficacia en la resolución de casos. Sin embargo, se debe se deben aplicar con rigurosidad científica para que puedan ser utilizados como evidencia forense en los tribunales (Kloosterman et al., 2015).

En la práctica actual, el análisis molecular de ADN es una herramienta extremadamente útil en investigaciones forenses. La creación de perfiles genéticos se basa en las repeticiones en tándem cortas (STR) y ayuda a la identificación humana a partir de muestras biológicas. En la última década, se han estudiado y propuesto nuevos biomarcadores para su uso en la identificación forense (Dumache et al., 2016). Asimismo, la tendencia actual es aplicar metodologías bioquímicas para determinar el perfil biológico: sexo, edad y ascendencia (Murakami et al., 2000; Witas et al., 2013; Cloos & Fledelius, 2000). Este artículo

tiene como objetivo revisar los métodos y técnicas que se pueden aplicar a los dientes y las estructuras orales para identificar al fallecido, desde la reconstrucción de un perfil biológico hasta la comparación antemortem y postmortem de datos dentales. Si bien algunas de estas técnicas también se pueden aplicar al individuo vivo, existen ciertas técnicas que son aplicables solo al cadáver.

## 2. MÉTODOS DE ODONTOLOGÍA Y BIOQUÍMICA APLICADOS A LA RECONSTRUCCIÓN DEL PERFIL BIOLÓGICO:

En los casos de identificación humana, el perfil biológico debe reconstruirse mediante marcadores específicos en huesos y dientes. La antropología forense ofrece un gran número de marcadores identificativos para la estimación del ancestro, el sexo, edad, estatura y, en ciertos casos, la patología. Los odontólogos forenses en particular, a través del examen de los dientes y las estructuras orales, pueden revelar características del individuo como la edad, el ancestro, el origen geográfico, el sexo, la ocupación, los hábitos y patologías pasadas y presentes (Berman et al., 2013a), como resultado, las estructuras dentales y maxilofaciales pueden ayudar a reconstruir el perfil biológico del individuo sin identificar. También, las técnicas moleculares han sido desarrolladas y aplicadas para la estimación del ancestro a través del ADN mitocondrial y los polimorfismos de nucleótido único (SNPs, por sus siglas en inglés) (Witas et al., 2013). Siguiendo esta misma línea de investigación, distintas metodologías bioquímicas han sido aplicadas para la estimación de la edad como por ejemplo la racemización del ácido aspártico (Cloos & Fledelius, 2000), mutaciones del ADN mitocondrial (Zapico & Ubelaker, 2015), epigenética (Bekaert et al., 2015), entrecruzamientos del colágeno (Martin-de las Heras et al., 1999), el análisis de los productos derivados de la glicosilación (AGEs, Advanced glycation end products, por sus siglas en inglés) (Baynes, 2001) o el acortamiento de los telómeros (Tsujii et al., 2002).

### 2.1. Estimación del Ancestro.

Algunos rasgos dentales pueden usarse como indicador de ciertos grupos ancestrales. Los rasgos más típicos de los individuos de origen caucásico son la cúspide de Carabelli en los primeros molares maxilares, una barbilla bilobulada, o una fosa canina profunda. Los indicadores de un ancestro negroide consisten en premolares multicúspide, diastema en la línea media maxilar, y un prognatismo muy pronunciado. Indicadores de ancestro mongoloide incluyen incisivos en forma de pala, fosas bucales y rotaciones de los

incisivos (Berman et al., 2013a). Aunque estas características dentales pueden ayudar a la estimación del ancestro, la conclusión final para esta determinación la tiene la evaluación antropológica. Las metodologías moleculares pueden ser aplicadas también para la estimación del ancestro, como el ADN mitocondrial y los SNPs. Sin embargo, hay pocos estudios que aplican esta metodología en dientes, la mayoría de estos trabajos han sido desarrollados con muestras de sangre. Los estudios que usan dientes son arqueológicos (Witas et al., 2013) o comparan antiguos especímenes con poblaciones actuales (Goncalves et al., 2010).

## 2.2. Origen Geográfico.

El tipo de restauración dental y los materiales usados pueden indicar el país o región donde el tratamiento fue realizado. Las coronas de plata u oro en los dientes anteriores son muy frecuentes en Centro y Sudamérica; las coronas de metal con revestimiento acrílico en los dientes anteriores son comunes en Europa del Este. Algunas condiciones dentales pueden ofrecer información sobre el origen geográfico de los restos humanos. Por ejemplo, la fluorosis dental puede ser indicativa de Texas, Nuevo Méjico, y otras partes rurales de Estados Unidos, China, África o India (Berman et al, 2013a). Además, modificaciones dentales se practican hoy en día en ciertas partes de Sudáfrica (Hollowell and Childers, 2007; Friedling and Morris, 2005).

El análisis de isótopos puede ser usado para la determinación del origen geográfico, como el  $^{13}\text{C}$ . Este es un isótopo estable que constituye alrededor del 1,1% de todo el carbón. Las plantas pueden discriminar entre  $^{12}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$ , creando diferencias en los niveles de estos isótopos entre distintos tipos de plantas. Basándose en la fijación del  $\text{CO}_2$  durante la fotosíntesis, es posible distinguir entre plantas C4 (como el maíz y la caña de azúcar), que contienen altas cantidades de  $^{13}\text{C}$ , y plantas C3 (como la patata, el trigo, y la remolacha azucarera), ya que se difunde a través de los estomas al aire (Kubasek et al., 2013). Plantas C4 tienden a crecer en ambientes más calientes o secos que las plantas C3. Los animales, incluyendo humanos, con dietas basadas principalmente en plantas C4 incorporarán más  $^{13}\text{C}$  que los que tienen dietas basadas en plantas C3, por lo que es posible diferenciar el origen geográfico. Otro isótopo estable que muestra variación geográfica es  $^{18}\text{O}$ . La incorporación de este isótopo en tejidos animales se correlaciona con los niveles de agua potable, y estos niveles varían con la latitud debido a diferencias en la evaporación y condensación entre  $^{16}\text{O}$  y  $^{18}\text{O}$  (Chesson et al., 2008). Los

estudios que han analizado estos isótopos en esmalte dental indican que podrían ser útil para dar información sobre el origen geográfico del individuo (Alkass et al., 2011, Alkass et al., 2013).

## 2.3. Determinación del sexo.

Aunque existen muchos estudios científicos que avalan el dimorfismo sexual de los dientes (Kapila et al., 2011; Schwartz and Dean, 2005; Pettenati-Soubayroux et al., 2002; Silva et al., 2016), esta determinación no es precisa (Berman et al., 2013a). La determinación del sexo en casos forenses debe llevarse a cabo a través del estudio antropológico o molecular. La determinación del sexo en restos humanos es más difícil si estos restos están fragmentados o mezclados. Además, desde el punto de vista antropológico, la determinación del sexo en restos de niños y preadolescentes es aún más complicada debido a que todavía no se han desarrollado las características sexuales (Potsch et al., 1992, Murakami et al., 2000). Los métodos moleculares han sido usados para resolver estos problemas. Entre estos métodos, la amplificación de la secuencia repetida en el cromosoma Y, DYZ3, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés), desarrollado por Witt y Erickson en 1986 (Tyler et al., 1986, Kobayashi et al., 1988, Fukushima et al., 1988, Horiuchi et al., 1988, Akane et al., 1991), que puede detectar también la secuencia repetida del cromosoma X, DXZ1, produciendo una determinación precisa del sexo. Este método fue estudiado también en dientes (Murakami et al., 2000), produciendo buenos resultados en pulpa y tejidos duros bajo ciertas condiciones, aunque a veces los tejidos pulparios no pudieron ser amplificados para la determinación del sexo, dando resultados los tejidos duros. Un estudio de nuestro grupo (Zapico & Ubelaker, 2013) analizó la eficiencia de la determinación del sexo en dentina y pulpa, pero basado en la amplificación del gen de la amelogenina. Estos genes se localizan en los cromosomas X e Y en humanos y expresan diferentes secuencias intrónicas. El gen de la amelogenina en el cromosoma X tiene 106 pares de bases, mientras que el mismo gen en el cromosoma Y tiene 112 pares de bases (Bansal et al., 2012). Las mujeres tienen dos genes AMEL idénticos pero los hombres no (Sivagami et al., 2000), que puede ser usado para la determinación del sexo. Nuestro estudio indica que el sexo puede determinarse a través de la pulpa y poca cantidad de dentina, aunque la eficiencia de extracción de ADN depende del tipo de diente analizado, en este caso los molares dieron los mejores resultados.

### 3. ESTIMACIÓN DE LA EDAD:

Para la reconstrucción del perfil biológico resulta básico estimar la edad de muerte de lo desconocido. La estimación de la edad se puede inferir mediante diversos enfoques, la selección de los métodos y técnicas que se utilizarán para estimar la edad dependerá de las condiciones de los restos, así como de su aplicabilidad a la categoría de edad del individuo.

#### 3.1. Estimación de la edad dental.

La estimación de la edad dental se puede abordar a través del desarrollo, erupción y cambios postformativos. Debido a que los dientes están altamente mineralizados y generalmente se conservan bien a lo largo de la putrefacción, son especialmente útiles en la estimación de la edad. Además, se ven mínimamente afectados por el daño ambiental y nutricional en comparación con otros indicadores de edad esquelética (Gran et al., 1965; Cunha et al., 2009; Elamin y Liversidge, 2013). Por lo tanto, la estimación de la edad basada en el desarrollo dental y la erupción muestra una mayor precisión que otros métodos antropológicos basados en el desarrollo y el crecimiento óseo.

#### 3.2. Estimación de la Edad Dental del Feto.

La dentición es un excelente indicador de edad desde el desarrollo intrauterino, debido al desarrollo del diente embrionario que comienza temprano en el desarrollo fetal. El grado de mineralización morfológica del esmalte se puede visualizar radiográficamente (Lewis y Senn, 2013). También se pueden realizar análisis histológicos de las líneas de crecimiento incremental dentro del esmalte, las estrías de Retzius (Copenhaver et al., 1978). Cuando se produce una alteración sistémica, el proceso de mineralización del esmalte se interrumpe y las estrías en desarrollo aparecerán más oscuras. El estrés fisiológico sufrido en el parto se reflejará en el proceso de mineralización del esmalte, por la aparición de la línea de crecimiento incremental más oscura y más grande en los dientes de hoja caduca, que se llama la línea neonatal. (Bath-Balogh y Fehrenbach, 2006). La presencia de la línea neonatal puede indicar que el niño vivió después del nacimiento, sin embargo se debe tener en cuenta que la línea neonatal tarda algunas horas o días en aparecer tras el nacimiento.

#### 3.3. Estimación de la Edad Dental del Niño.

La estimación de la edad dental en niños se basa en el desarrollo y la erupción de los dientes. Básicamente, existen dos categorías metodológicas para la estimación de la edad del niño: los atlas y el sistema de estadiaje. Ambas metodologías se basan en exámenes radiográfico. Schour y Massler (1941), Ubelaker (1989) y The London Atlas de AlQahtani et al. (2010) son los atlas más utilizados en odontología y antropología, y son aplicables tanto en contexto arqueológico como forense (Schour y Massler, 1941; Ubelaker, 1989; AlQahtani et al., 2010). Los atlas se pueden utilizar en rangos de edad que van desde semanas intraútero hasta la madurez. Si bien no se reflejan diferencias de sexo, la aplicación informática de AlQahtani permite registrar datos masculinos, femeninos y desconocidos; A pesar de que no hay diferencias significativas entre los sexos, los resultados obtenidos al registrar el sexo son ligeramente diferentes.

Un factor a tener en cuenta al trabajar con atlas es el concepto de erupción dentaria; mientras Ubelaker define la erupción como el momento en que el diente emerge a través del tejido gingival, AlQahtani define la erupción como la emergencia a través del hueso alveolar (Lewis y Senn, 2013). Con respecto al sistema de estadiaje, el sistema Moorrees (Moorrees, 1963a, b) y el sistema Demirjian (Demirjian et al., 1973; Demirjian y Goldstein, 1976) son los más utilizados en odontología forense. El sistema de Demirjian consiste en puntuar el cuadrante izquierdo mandibular excluyendo el tercer molar en ocho etapas (de A a H) (Demirjian et al., 1973; Demirjian y Goldstein, 1976).

#### 3.4. Estimación de la Edad Dental del Adolescente.

A medida que avanza el proceso de desarrollo esquelético, se dispone de menos indicadores de edad basados en el desarrollo. Los elementos esqueléticos pueden proporcionar una estimación de la edad en los adolescentes y la edad adulta temprana, como el desarrollo de huesos largos, la maduración de la mano y la muñeca, la fusión de la sincondrosis esfenoccipital / basilar, la cresta ilíaca y el anillo vertebral y la fusión del extremo esternal de la clavícula (Cunha et al., 2009).

Respecto a la estimación de la edad dental en este rango de edad, el único diente que todavía experimenta crecimiento y formación a los 14 años es el tercer molar (Lewis y Senn, 2013). Si bien el tercer molar es el diente más variable, es el indicador biológico que nos ofrece mayor confianza durante la adolescencia y la edad adulta temprana (Harris et al., 2010; Lewis y Senn 2013).

Mincer desarrolló un sistema de puntuación en 1993 aplicando las seis etapas de desarrollo de Demirjian en terceros molares. Este método se usa ampliamente para evaluar la mayoría de edad legal, por lo tanto, cuando se alcanza la etapa "H", existe una alta probabilidad de que el individuo tenga al menos dieciocho años (Lewis y Senn, 2013).

La combinación de indicadores dentales y óseos ofrece una mayor precisión de la estimación. Schmeling y col. (2004) propusieron estimaciones de edad que combinan el tercer molar, los huesos de la mano y la muñeca y el desarrollo de la clavícula (Schmeling et al., 2004). Cameriere et al. (2004) establecieron que la relación del área pulpar-diente del segundo molar y la etapa de desarrollo del tercer molar en combinación resultó en una mejor evaluación de si un individuo había alcanzado los dieciocho años de edad que cualquiera de los métodos por sí solo (Cameriere et al., 2004; Harris et al., 2010).

### 3.5. Estimación de la Edad Dental del Adulto.

Cuando el crecimiento y el desarrollo concluyen, la estimación de la edad esquelética y dental solo puede basarse en cambios degenerativos del esqueleto. Gustafson (1950) utilizó seis cambios postformativos del diente (desgaste, estado periodontal, dentina secundaria, aposición de cemento, reabsorción y translucidez radicular) que se puntúan entre 0 y 3 (Gustafson, 1950). Sin embargo, este estudio asume que todas las variables son igualmente efectivas en la evaluación de la edad, y que las seis variables son estadísticamente independientes (Harris et al., 2010), lo que constituye una limitación de este método.

Johanson (1971) realizó una modificación de este método, calificando microscópicamente los mismos cambios postformativos (Johanson, 1971). Maples (1978) generó diferentes fórmulas de regresión considerando la aposición secundaria de dentina y la translucidez de la raíz (Maples, 1978). Lamendin y col. (1992) consideraron la transparencia de la raíz y la recesión periodontal para la estimación de la edad (Lamendin et al., 1992), mientras que Prince y Ubelaker (2002) modificaron el método de Lamendin teniendo en cuenta el sexo y el ancestro (Prince y Ubelaker, 2002). Kvaal y col. (1995) desarrollaron un método para estimar la edad mediante la evaluación de cambios progresivos del tamaño de la pulpa debido a la aposición secundaria de la dentina. Aunque el desgaste dental se utiliza tradicionalmente para estimar la edad en los restos antiguos (Brothwell, 1989), es de poca utilidad en las poblaciones contemporáneas. Existen varios factores externos que deben considerarse porque pueden afectar la estimación de la edad, como el

tratamiento de ortodoncia, el tratamiento de conductos, las restauraciones dentales, el trauma y la oclusión. Por lo tanto, todas estas técnicas de estimación de la edad dental se basan en la evaluación de los dientes no restaurados y con una oclusión normal (Lewis y Senn, 2013).

### 3.6. Estimación de la edad basado en parámetros bioquímicos de muestras dentales.

Las nuevas metodologías para la estimación de la edad están basadas en el proceso natural del envejecimiento, que produce alteraciones en tejidos y órganos a distintos niveles bioquímicos (Zapico & Ubelaker, 2013). Siguiendo esta línea de investigación, algunas de estas nuevas metodologías bioquímicas han sido aplicadas a dientes para determinar la edad.

### 3.7. Racemización del Ácido Aspártico.

La racemización del ácido aspártico parece ser la técnica más precisa de todas las nuevas técnicas bioquímicas. Desde su descubrimiento en 1975 (Helfman & Bada, 1975), muchos estudios han puesto de manifiesto su precisión y su aplicación a varios tejidos. Esta técnica se basa en el proceso natural, que convierte compuestos activos ópticamente en una mezcla racémica. En los sistemas vivos, los aminoácidos L son los más comunes debido a la especificidad esteroquímica de los enzimas, que utilizan enantiómeros L. La racemización convierte esta forma L en forma D, que produce alteraciones en la configuración de proteínas metabólicamente estables, induciendo cambios en sus actividades químicas y biológicas (Masters et al., 1977). Estas alteraciones pueden contribuir a los cambios progresivos asociados con el proceso de envejecimiento (Helfman et al., 1977). En particular, el ácido aspártico tiene uno de los rangos de racemización más rápidos, esto lo convierte en el aminoácido ideal para usar en estudios forenses (Cloos & Fledelius, 2000).

Los estudios forenses de la aplicación de esta técnica para la estimación de la edad que han sido desarrollados en dentina (Helfman & Bada, 1976, Ohtani, 1995a, Ritz et al., 1990) y cemento (Ohtani, 1995c) encontraron una correlación positiva entre la racemización del ácido aspártico y la edad. La dentina fue el mejor tejido para la estimación cronológica de la edad, basado en su precisión, simplicidad, y tiempo requerido. Respecto a la técnica para la medición, la cromatografía de gases (GC, de sus siglas en inglés), parece ser la más apropiada. Sin embargo, esta metodología no está exenta de desventajas, el grado de racemización

depende del tipo de diente, se han observado valores diferentes entre las porciones labiales y linguales (Ritz et al., 1990, Ritz et al., 1993). Por lo tanto, una buena práctica es analizar “toda la dentina de las secciones longitudinales” y crear un muestreo estándar (Ohtani & Yamamoto, 1991b, Ohtani & Yamamoto, 1991a, Ohtani & Yamamoto, 1992). Esta metodología no es fiable en cuerpos que han sido expuestos a altas temperaturas (Ritz et al., 1993, Ritz et al., 1990), dado que la racemización es una reacción química de primer orden, está influenciada por la temperatura y otros factores (Arany & Ohtani, 2010). A pesar de estas desventajas, muchos estudios han demostrado su precisión para la estimación de la edad en restos humanos, con errores bajos (alrededor de  $\pm 3$  años) (Ogino et al., 1985, Ohtani, 1995b, Ohtani & Yamamoto, 2010).

### 3.8. Plomo.

El plomo es uno de los contaminantes más significativos del medio ambiente (Al-Qattan & Elfawal, 2010). Su exposición se mide como concentración de plomo en el diente ya que la dentina es el principal lugar para la deposición de plomo (Steenhout & Pourtois, 1981). Algunos autores han analizado la relación entre la acumulación de plomo y la edad. Los resultados han sido controvertidos, en dientes deciduos, algunos estudios encontraron un incremento lineal con la edad (Altshuller et al., 1962), mientras otros solo encontraron esta relación en un tipo de diente, como el canino (Mackie et al., 1977) o una regresión negativa del molar inferior (Pinchin et al., 1978). Otros autores no encontraron una correlación (Habercam et al., 1974, Holtzman et al., 1968). En dientes permanentes, muchos autores encontraron una correlación positiva entre los niveles de plomo y la edad (Strehlow & Kneip, 1969, Al-Qattan & Elfawal, 2010, Bercovitz & Laufer, 1991, Steenhout & Pourtois, 1981). De hecho, con objetivos forenses, Al-Qattan y Elfawal (Al-Qattan & Elfawal, 2010) encontraron una correlación significativa entre la edad y los niveles de plomo en dentina en la población de Kuwait, con una diferencia entre la edad real y la estimada de  $1.3 \pm 4.8$  años. Sin embargo, la fórmula propuesta, solo se puede aplicar a la población de Kuwait. Se requiere más investigaciones en otras poblaciones y ambientes.

### 3.9. Entrecruzamientos de Colágeno.

Las matrices de colágeno de dentina y otros tejidos esqueléticos conectivos se estabilizan mediante cruzamientos covalentes entre moléculas de colágeno (Eyre, 1987, Mechanic et al., 1971). Estos entrecruzamientos se forman a través de reacciones intermoleculares de residuos de aldehídos producidos en los monómeros de proteína de

lisil oxidasa (Piez, 1968). Sin embargo, estos desaparecen con la maduración de tejidos conectivos (Eyre et al., 1988, Walters & Eyre, 1983). A través de reacciones espontáneas en el polímero de colágeno, este puede producir componentes no-reducidos maduros (Bailey & Shimokomaki, 1971, Robins et al., 1973). Deoxipirridinolina (DPD), un componente no-reducido entrecruzado, fue analizado en molares permanentes de pacientes entre 15 y 73 años con fines forenses (Martin- de las Heras et al., 1999), utilizando un inmunoensayo. Este estudio encontró un incremento del ratio DPD en relación con la edad, sin embargo, el error de la estimación  $\pm 14.9$  años con un nivel de confianza de 65% level of confidence.

### 3.10. Composición química.

Las características químicas de la dentina se deterioran con la edad. De hecho, el proceso de envejecimiento produce una formación gradual de una dentina transparente sin caries, empezando por la punta de la raíz y a veces extendiéndose hasta la dentina de la corona (Micheletti Cremasco, 1998, Vasiliadis et al., 1983b, Vasiliadis et al., 1983a). La transparencia de la dentina se debe a la mineralización de la dentina alrededor de los túbulos dentinales (dentina peritubular) y la reducción gradual de los túbulos dentinales (Amprino & Engstrom, 1952). Estos túbulos se hacen más delgados con la edad y su número se reduce. Estos cambios con la edad están acompañados de cambios en la composición química (Kosa et al., 1990). La espectroscopía de Raman fue usada para analizar esta composición, estableciendo un coeficiente de correlación parcial entre los parámetros predictores y la edad, estimándola con un error medio de 5 años (Tramini et al., 2001).

Utilizando esta técnica en combinación con resonancia de Ultravioleta (UVRRS), se encontró un incremento en la altura del pico de la amida I en dentina deshidratada y desmineralizada, porque incrementa la interacción entre las fibras de colágeno causadas por el elongamiento y el movimiento intrafibrilar (Ager et al., 2006).

### 3.11. Productos derivados de la Glicosilación, Advanced Glycation End products (AGEs).

La reacción de Maillard es una serie de reacciones complejas entre azúcares reducidos y grupos amino de las proteínas, que pueden producir entrecruzamientos entre proteínas, así como productos fluorescentes. Los AGEs se forman durante las últimas fases de estas reacciones, y se acumulan en las proteínas de los tejidos, y contribuyen a los procesos de

envejecimiento y enfermedades asociadas (Baynes, 2001). Estas reacciones producen cambios de color, basándose en esto, algunos estudios han intentado realizar una estimación de la edad en tejidos duros dentales, como dentina y esmalte (Solheim, 1993, de, 1950, Brudevold et al., 1957), su color es más amarillo con la edad. Ten Cate llegó a las mismas conclusiones, encontrando un incremento de raíces amarillas con la edad (Ten Cate et al., 1977). Sin embargo, Lackovic y Wood (Lackovic & Wood, 2000), encontraron que las superficies mesiales de las raíces estaban menos amarillas que en las otras tres superficies, aunque encontraron un incremento positivo del color con la edad. Martin de las Heras y colaboradores (Martin-de las Heras et al., 2003) analizaron los cambios de color con la técnica de espectrorradiometría, encontrando una correlación con la edad, aunque el error fue 13.7 años y estaba afectado por el intervalo post-mortem.

### 3.12. Acortamiento de Telómeros.

Los cromosomas en eucariotas se protegen de la degradación y la recombinación anormal mediante estructuras especializadas llamadas telómeros, que son repeticiones simples de seis bases en humanos (Moyzis et al., 1988). Estas estructuras son replicadas por la telomerasa, una transcriptasa reversa específica que mantiene la longitud de los cromosomas. Sin embargo, debido al requerimiento de un oligo de ARN, las ADN polimerasas no pueden replicar el extremo 3' de la hebra parental de ADN, y en ausencia de mecanismos compensatorios, los telómeros se acortan por cada división celular (Counter et al., 1992), y como consecuencia, con la edad. Teniendo esto en cuenta, y usando Southern blot no radiactivo, la longitud de los telómeros fue analizada en ADN de pulpa de 100 molares sanos, encontrando una fuerte correlación negativa entre la longitud de los telómeros y la edad (Takasaki et al., 2003). Esta técnica fue aplicada a casos forenses, pero el error fue alto 7.52-10 años entre la edad estimada y la edad real (Tsuji et al., 2002). La causa de la muerte y el intervalo post-mortem parecen ser los factores clave en cuanto a la falta de precisión de esta técnica.

### 3.13. ADN Mitocondrial.

De acuerdo con la teoría de envejecimiento presentada por Harman (Harman, 1960), la producción de los radicales libres se incrementa con el edad, y juega un papel fundamental en el proceso degenerativo de senescencia, como el origen del daño molecular celular. El ADN mitocondrial (mtDNA, por sus siglas en inglés) está localizado cerca de la membrana interna de la mitocondria donde los enzimas de la Cadena de

Transporte de Electrones producen radicales libres, causando mutaciones heteroplásmicas. Estas mutaciones producen el deterioro de la función respiratoria de la mitocondria, que produce más mutaciones en el mtDNA (Beckman & Ames, 1998b, Beckman & Ames, 1998a, Harman, 1972, Wei & Lee, 2002). Estas mutaciones parecen acumularse con la edad, por lo que podrían ayudar a determinar este parámetro. Aunque este abordaje se ha analizado en diferentes tejidos, encontrando una buena correlación de mutaciones mitocondriales con la edad, solo existen dos estudios que investigaron esta metodología en dientes. Mornstad y colaboradores (Mornstad et al., 1999) demostraron una reducción de la cantidad de mtDNA en dentina con la edad, analizando la región hipervariable 2 (HV2, de sus siglas en inglés) del mtDNA en terceros molares. Un estudio de nuestro grupo (Zapico & Ubelaker, 2015), desarrollado también en terceros molares, estudió la eficiencia de amplificación de HV2 a través de PCR a tiempo real en dentina y pulpa, encontrando una correlación lineal negativa fuerte entre la amplificación de mtDNA y la edad en dentina. Sin embargo, no se encontró correlación en la pulpa, probablemente debido a que la mayoría de las mitocondrias están en la dentina. En este estudio, dos poblaciones diferentes fueron analizadas, encontrándose diferencias en las alteraciones del mtDNA entre ellas, lo que sugiere un componente ancestral.

### 3.14. Técnicas epigenéticas.

Recientemente, la investigación epigenética ha dado lugar a un nuevo campo de investigación para la estimación de la edad. Diferentes estudios indican que los niveles de metilación global descienden con la edad (Fraga, 2009), aunque sitios CpG locales específicos pueden estar hipo- o hiper-metilados con la edad (Florath et al., 2014). Los sitios CpG localizados en las islas CpG en particular se hipermetilan, mientras que los CpG hipometilados se encuentran fuera de estas islas (Johansson et al., 2013). Basándose en estas premisas, muchos grupos han identificado sitios CpG que se correlacionan significativamente con la edad, determinando este parámetro con modelos lineales, usando un set de marcadores de metilación en un tejido o en múltiples tejidos (Johansson et al., 2013). A pesar de estos estudios en diferentes tejidos, solo un artículo (Bekaert et al., 2015) ha analizado la aplicación de esta metodología en dientes. Los niveles de metilación de tres genes asociados con la edad (PDE4C, ELOVL2 y EDARADD), fueron analizados en muestras de dentina y una regresión cuadrática fue aplicada a los resultados con un  $r^2$  0.74 y una desviación absoluta de la 4.86 años. Este estudio preliminar en dientes abre la puerta a una nueva línea de investigación para la determinación de la edad.

### 3.15. Radiocarbono Análisis.

Uno de los abordajes relativamente nuevos para es el uso del análisis de radiocarbono para determinar el año de nacimiento, independientemente de la edad del individuo en el momento de la muerte (Spalding et al., 2005a, Spalding et al., 2005b). Clásicamente, el análisis de radiocarbono ( $^{14}\text{C}$ ) ha sido usado para datar material arqueológico, aunque se ha adaptado para su uso en casos forenses modernos basado en el deterioro radiactivo del  $^{14}\text{C}$  en el material biológico (Libby et al., 1964). Esta metodología se llama pulso-bomba  $^{14}\text{C}$  y tiene en cuenta el incremento sustancial de los niveles globales de  $^{14}\text{C}$  debido a los test nucleares de detonaciones de bombas entre 1955-1963 (Nydal & Lovseth, 1965, Spalding et al., 2005a). Las medidas repetidas de  $^{14}\text{C}$  en la atmósfera y en productos biológicos de edad conocida han dado valores de referencia que pueden ser comparados para la estimación de la edad (Spalding et al., 2005a). De hecho, este análisis ha sido mejorado por la aplicación de la técnica de espectrometría de masas acelerada (AMS, de sus siglas en inglés). Esta metodología cuenta todos los átomos  $^{14}\text{C}$  y ofrece unos resultados más precisos usando muestras más pequeñas que estudios previos (Ubelaker, 2014). Aunque diferentes tejidos han sido analizados con esta técnica, huesos y dientes parecen ser los más frecuentemente usados. Spalding y colaboradores (Spalding et al., 2005b) describen este análisis en esmalte dental para determinar la fecha de nacimiento de individuos si la formación de la corona ocurrió antes de la era del pulso-bomba. El esmalte dental no se remodela y preserva los valores de radiocarbono del tiempo de formación. Más tarde, el mismo autor presentó detalles adicionales para esta técnica (Buchholz & Spalding, 2010). En el 2010, Alkass y colaboradores (Alkass et al., 2010) usaron esmalte dental y análisis de radiocarbono para estimar la fecha de nacimiento y lo combinaron con datos de racemización de ácido aspártico para determinar la edad en el momento de la muerte. Un año más tarde, Ubelaker y Parra (Ubelaker & Parra, 2011) analizaron los niveles de radiocarbono en esmalte dental, hueso femoral cortical y hueso trabecular de los cuerpos vertebrales de cuatro individuos (con edades en el momento de la muerte entre 16-56 años) de Perú. Encontraron que los datos del esmalte dental fueron más precisos con las fechas de nacimiento conocidas teniendo en consideración el tiempo de la formación dental y los valores de la curva de la bomba en el hemisferio sur. En contraste, los valores de radiocarbono en el hueso trabecular eran más cercanos a los valores atmosféricos de la fecha de la muerte que los del hueso cortical. Muchos estudios apuntan a la precisión de esta técnica para la estimación de la fecha de nacimiento con un error de alrededor  $1.8 \pm 1.3$  años (Alkass et al., 2011, Alkass et al., 2013).

## 4. IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL.

La identificación individual es de gran relevancia por motivos sociales, legales y forenses. Una identificación positiva es un factor clave en el proceso de duelo, ya que puede ayudar a comprender y aceptar la pérdida, contribuyendo al cierre del mismo. Además, el certificado de defunción, emitido cuando se establece una identificación positiva, es necesario para resolver asuntos legales tales como el pago de deudas, seguros de vida, segundas nupcias o custodia de menores. Además, la investigación criminal es difícil de llevar a cabo sin la identificación de la víctima.

La identificación personal implica la comparación de datos postmortem y antemortem. El proceso de identificación y el método específico a utilizar dependen de las circunstancias de cada caso. No obstante, el proceso de identificación siempre debe ser preciso y estar basado en principios científicos (Herschaft et al., 2007).

### 4.1. Identificación comparativa por medios odontológicos.

La identificación comparativa por medios odontológicos implica el examen dental postmortem de restos humanos, la composición de odontogramas, toma de radiografías y la eventual aplicación de otras técnicas. Estos datos postmortem se comparan con los datos ante mortem de personas desaparecidas que coincidan con el perfil biológico de la víctima. El odontólogo del fallecido generalmente proporciona registros antemortem: Los registros dentales, las radiografías, los modelos de estudio, o cualquier otro dato que se pueden utilizar para comparar con los datos postmortem. Finalmente, se redactará un informe forense sobre los hallazgos y la conclusión de la comparación.

Existen diversos programas informáticos de identificación forense, que son de especial ayuda en desastres de masas, ya que estos softwares son capaces de gestionar un elevado número de datos antemortem y postmortem.

WinID fue desarrollado por el Dr. James McGivney como una herramienta de identificación dental asistida por ordenador. WinID es ampliamente utilizado en Estados Unidos, y ha sido de gran ayuda en casos como el ataque terrorista del World Trade Center o los huracanes Katrina y Ike (Berman et al., 2013b). DVI System International de PlassData Software es un programa global de desastres masivos, que incluye una sección dental. Este es utilizado por INTERPOL en desastres internacionales como el Tsunami del Sureste Asiático en 2005, los incendios forestales del Sábado Negro en Australia en 2009 o el accidente aéreo del German Wings en los Alpes franceses en abril de 2015 (<http://www.plassdata.com>).

El UVIS (Sistema Unificado de Identificación de Víctimas) fue desarrollado para la Ciudad de Nueva York tras el ataque del 11 de Septiembre. UDIM es la sección dental de UVIS desarrollada por el Dr. Kenneth Aschheim, odontólogo forense de la Office of Chief Medical Examiner de NYC (NYC-OCME). Este programa fácil de usar permite la importación ilimitada de imágenes, el manejo y unificación de fragmentos maxilares, todo lo cual es muy útil en casos que involucran fragmentación (UVIS, 2009; Berman et al, 2013b). UVIS / UDIM se utiliza en escenarios DVI, así como en el trabajo diario de casos en NYC-OCME, lo que ofrece grandes ventajas de la capacitación del personal y la velocidad de identificación.

#### 4.2. Perfil de ADN de estructuras dentales.

Como se ha descrito previamente, los dientes son las estructuras más resistentes del cuerpo humano, pueden sobrevivir después que los tejidos blandos y esqueléticos hayan sido destruidos debido a la mineralización de sus estructuras (Zapico & Ubelaker, 2013). En casos que implican restos humanos esquelizados, los dientes son la principal fuente de ADN. Su papel ha sido revisado ampliamente (Sakari et al., 2015, Pajnic, 2016). Sin embargo, es importante considerar que en casos de restos quemados, incluso los dientes pueden no ser útiles. Un estudio de nuestro grupo (Adserias et al., 2016) analizó los cambios macroscópicos y la eficiencia de obtener un perfil de ADN bajo diferentes temperaturas y tiempos. La temperatura máxima a la que se consiguió un perfil completo fue alrededor de 300°C. Nuestro estudio también demostró que algunos STRs son más propensos a la degradación que otros, dependiendo de su localización en el cromosoma.

#### 5. CONCLUSIONES.

El primer paso en el proceso identificativo es la creación del perfil biológico de la víctima, seguido de la comparación entre los datos ante-mortem y post-mortem. Las huellas dactilares, la comparación de registros dentales y el análisis de ADN son métodos científicos que se usan para la identificación positiva.

El análisis de los dientes y las estructuras orales puede identificar muchas características del individuo, contribuyendo a la reconstrucción del perfil biológico. En identificación comparativa, la odontología forense ofrece un método expeditivo de identificación basado en rasgos dentales, tratamiento y patología. El perfil de ADN ha sido usado tradicionalmente para identificación humana, pero

avances recientes en bioquímica han sido aplicados para la determinación del perfil biológico.

Los dientes son muestras excelentes para análisis bioquímicos y simultáneamente el campo de la odontología forense está evolucionando, introduciendo nuevas tecnologías. Estos dos factores conducen a una colaboración entre la odontología forense y la bioquímica, contribuyendo al avance de la ciencia forense.

#### 6. BIBLIOGRAFÍA.

1. ADSERIAS, J., UBELAKER D.H, C. ZAPICO S. (2016) Evaluation of macroscopic changes and the efficiency of DNA profiling from burnt teeth. *Science and Justice*, 56,437-442.
2. AGER, J.W., 3RD, NALLA, R.K., BALOOCH, G., KIM, G., PUGACH, M., HABELITZ, S., MARSHALL, G.W., KINNEY, J.H. & RITCHIE, R.O. (2006) On the increasing fragility of human teeth with age: a deep-UV resonance Raman study. *Journal of Bone and Mineral Research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 21,1879-87.
3. AKANE, A., SHIONO, H., MATSUBARA, K., NAKAHORI, Y., SEKI, S., NAGAFUCHI, S., YAMADA, M. & NAKAGOME, Y. (1991) Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods. *Forensic Science International*, 49,81-8.
4. ALQAHTANI, SJ, HECTOR MP, LIERSIDGE HM (2010) Brief communication: The London atlas of human tooth development and eruption. *American Journal of Physical Anthropology* 142: 481-490.
5. AL-QATTAN, S.I. & ELFAWAL, M.A. (2010) Significance of teeth lead accumulation in age estimation. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 17,325-8.
6. ALKASS, K., BUCHHOLZ, B.A., DRUID, H. & SPALDING, K.L. (2011) Analysis of <sup>14</sup>C and <sup>13</sup>C in teeth provides precise birth dating and clues to geographical origin. *Forensic Science International*, 209, 34-41.
7. ALKASS, K., BUCHHOLZ, B.A., OHTANI, S., YAMAMOTO, T., DRUID, H. & SPALDING, K.L. (2010) Age estimation in forensic sciences: application of combined aspartic acid racemization and radiocarbon analysis. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 9,1022-30.
8. ALKASS, K., SAITOH, H., BUCHHOLZ, B.A., BERNARD, S., HOLMLUND, G., SENN, D.R., SPALDING, K.L. & DRUID, H. (2013) Analysis of radiocarbon, stable isotopes and DNA in teeth to facilitate identification of unknown decedents. *PLoS One*, 8, e69597.
9. ALTSHULLER, L.F., HALAK, D.B., LANDING, B.H. & KEHOE, R.A. (1962) Deciduous teeth as an index of body burden of lead. *The Journal of Pediatrics*, 60,224-9.

10. American Board of Forensic Odontology (ABFO) (2013) Diplomates reference manual. <http://www.abfo.org>
11. AMPRINO, R. & ENGSTROM, A. (1952) Studies on x ray absorption and diffraction of bone tissue. *Acta Anatomica*, 15, 1-22.
12. ARANY S, IINO M, YOSHIOKA N (2004) Radiographic survey of third molar development in relation to chronological age among Japanese juveniles. *Journal of Forensic Sciences* 49: 534-538.
13. Arany, S. & Ohtani, S. (2010) Age estimation by racemization method in teeth: application of aspartic acid, glutamate, and alanine. *Journal of Forensic Sciences*, 55, 701-5.
14. BAILEY, A.J. & SHIMOKOMAKI, M.S. (1971) Age related changes in the reducible cross- links of collagen. *FEBS letters*, 16, 86-88.
15. BANSAL, A.K., SHETTY, D.C., BINDAL, R. & PATHAK, A. (2012) Amelogenin: A novel protein with diverse applications in genetic and molecular profiling. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 16, 395-9.
16. BATH-BALOGH, M AND FEHRENBACH MJ (2006) Enamel. In: Dental Embryology, Histology, and Anatomy, 2nd edn, St. Louis, MO: Elsevier Saunders; pp. 179- 189.
17. BAYNES, J.W. (2001) The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Experimental Gerontology*, 36, 1527-37.
18. BECKMAN, K.B. & AMES, B.N. (1998a) The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78, 547-81.
19. BECKMAN, K.B. & AMES, B.N. (1998b) Mitochondrial aging: open questions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 118-27.
20. BEKAERT, B., KAMALANDUA, A., ZAPICO, S.C., VAN DE VOORDE, W. & DECORTE, R. (2015) Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*, 1-9.
21. BERCOVITZ, K. & LAUFER, D. (1991) Age and gender influence on lead accumulation in root dentine of human permanent teeth. *Archives of Oral Biology*, 36, 671-3.
22. BERMAN GM, BUSH MA, BUSH PJ, FREEMAN AJ, LOOMIS PW, MILLER RG. Dental Identification (2013) In: Senn DR and Weems RA (eds) Manual of Forensic Odontology. 5th edn Boca Raton: CRC Press; pp. 81-87. a
23. BERMAN G M, CHRZ B, NAWROCKI LA, HERMSEN KP, MILLER RG, WEEMS RA. Disaster Victim Identification. (2013) In: Senn DR and Weems RA (eds) Manual of Forensic Odontology. 5th edn Boca Raton: CRC Press; pp. 186-191. b
24. BLANKENSHIP J.A, MINCER HH, ANDERSON KM, WOODS MA, BURTON EL. 2007. Third molar development in the estimation of chronologic age in American Blacks as compared with Whites. *Journal of Forensic Sciences* 52(2): 428-433.
25. BROTHWELL DR. (1989) The relationship of tooth wear to aging. In: Isçan MY (ed.). Age Markers in Human Skeleton. Springfield, CC Thomas. p303-16.
26. BRUDEVOLD, F., HEIN, J.W., BONNER, J.F., NEVIN, R.B., BIBRY, B.G. & HODGE, H.C. (1957) Reaction of tooth surfaces with one ppm of fluoride as sodium fluoride. *Journal of Dental Research*, 36, 771-9.
27. BUCHHOLZ, B.A. & SPALDING, K.L. (2010) Year of birth determination using radiocarbon dating of dental enamel. *Surface and Interface Analysis: SIA*, 42, 398-401.
28. CAMERIERE, R., L. FERRANTE, AND M. CINGOLANI. 2004. Precision and reliability of pulp/tooth area ration (RA) of second molar as indicator of adult age. *Journal of Forensic Sciences* 49: 1319-1323.
29. CHESSON, L.A., PODLESAK, D.W., THOMPSON, A.H., CERLING, T.E. & EHLERINGER, J.R. (2008) Variation of hydrogen, carbon, nitrogen, and oxygen stable isotope ratios in an American diet: fast food meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4084-91.
30. CLOOS, P.A. & FLEDELIUS, C. (2000) Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized: a biological clock of protein aging with clinical potential. *The Biochemical Journal*, 345 Pt 3, 473- 80.
31. COPENHAVER, W. M., D. E. KELLY, AND R. L. WOOD. 1978. The digestive system. In Bailey's Textbook of Histology, 17th edn, Baltimore, MD: Williams & Wilkins. pp. 455-551.
32. COUNTER, C.M., AVILION, A.A., LEFEUVRE, C.E., STEWART, N.G., GREIDER, C.W., HARLEY, C.B. & BACCETTI, S. (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO Journal*, 11, 1921-9.
33. CUNHA E, BACCINO E, MARTRILLE L, RAMSTHALER F, PRIETO J, SCHULIAR Y, LYNNERUP N, CATTANEO C. (2009) The problem of aging human remains and living individuals: A review. *Forensic Science International*. 15;193(1-3):1-13.
34. DE, J.T. (1950) [Senescence of the dentition]. *Paradentologie*, 4, 83-98. Demirjian A and Goldstein H (1976) New systems for dental maturity based on seven and four teeth. *Annals of Human Biology* 3: 411-421.
35. DEMIRJIAN A, GOLDSTEIN H, TANNER JM. (1973) A new system of dental age assessment. *Human Biology* 45: 211-227.
36. DUMACHE R, CIOCAN V, MURESAN C, ENACHE A. (2016) Molecular DNA Analysis in Forensic Identification. *Clin Lab*, 62(1-2):245-8.
37. ELAMIN F, LIVERSIDGE HM. 2013. Malnutrition has no effect on the timing of human tooth formation. *PLoS ONE* 8:e72274.
38. Eyre, D. (1987) Collagen cross-linking amino acids. *Methods in Enzymology*, 144, 115-39.
39. Eyre, D.R., Dickson, I.R. & Van Ness, K. (1988) Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related

- changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *The Biochemical Journal*, 252, 495-500.
40. FLORATH, I., BUTTERBACH, K., MULLER, H., BEWERUNGE-HUDLER, M. & BRENNER, H. (2014) Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Human Molecular Genetics*, 23, 1186-201.
41. FRAGA, M.F. (2009) Genetic and epigenetic regulation of aging. *Current Opinion in Immunology*, 21, 446-53.
42. FRIEDLING L.J., MORRIS AG. (2005). The frequency of culturally derived dental modification practices on the Cape Flats in the Western Cape. *SADJ*, 60, 3:97-102.
43. FUKUSHIMA, H., HASEKURA, H. & NAGAI, K. (1988) Identification of male bloodstains by dot hybridization of human Y chromosome-specific deoxyribonucleic acid (DNA) probe. *Journal of Forensic Sciences*, 33, 621-7.
44. GARN SM, LEWIS AB, KERESKY RS. (1965) Genetic, nutritional and maturational correlates of dental development. *Journal of Dental Research* 44:228-243.
45. GONCALVES, V.F., PARRA, F.C., GONCALVES-DORNELAS, H., RODRIGUES-CARVALHO, C., SILVA, H.P. & PENA, S. (2010) Recovering mitochondrial DNA lineages of extinct Amerindian nations in extant homopatric Brazilian populations. *Investigative Genetics*, 1, 13.
46. GUSTAFSON, G. 1950. Age determination on teeth. *Journal of American Dental Association* 41: 45-54.
47. HABERCAM, J.W., KEIL, J.E., REIGART, J.R. & CROFT, H.W. (1974) Lead content of human blood, hair, and deciduous teeth: correlation with environmental factors and growth. *Journal of Dental Research*, 53, 1160-3.
48. HARRIS EF, MINCER HH, ANDERSON KM, SENN DR. Age estimation from oral and dental structures (2010) In: Senn DR and Stimson PG (eds) *Forensic Dentistry*, 2nd edn Boca Raton: CRC Press; pp. 263-291.
49. HARMAN, D. (1960) The free radical theory of aging: the effect of age on serum mercaptan levels. *Journal of Gerontology*, 15, 38-40.
50. HARMAN, D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, 20, 145-7.
51. HELFMAN, P.M. & BADA, J.L. (1975) Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 2891-4.
52. HELFMAN, P.M. & BADA, J.L. (1976) Aspartic acid racemisation in dentine as a measure of ageing. *Nature*, 262, 279-81.
53. HELFMAN, P.M., BADA, J.L. & SHOU, M.Y. (1977) Considerations on the role of aspartic acid racemization in the aging process. *Gerontology*, 23, 419-25.
54. HERSCHAFT EE, ALDER MA, ORD DK, RAWSON RD, SMITH ES. (2007). *Manual of Forensic Odontology*. American Society of Forensic Odontology. 4th edn Boca Raton: CRC Press; pp. 7.
55. HOLLOWELL WH, CHILDERS NK. (2007) A new threat to adolescent oral health: the grill. *Pediatr Dent*. 29(4):320-2.
56. HOLTZMAN R.B., LUCAS H.F., JR. & ILCEWICZ, F.H. (1968) The concentration of lead in human bone. *ANL-7615*. Anl, 43-9.
57. HORIUCHI, N., MORISAKI, T., FUJII, H. & MIWA, S. (1988) A simple human sex determination method using biotin-labeled probes. *Nihon hoigaku zasshi = The Japanese Journal of Legal Medicine*, 42, 351-3.
58. JOHANSON G. (1971) Age determinations from human teeth: A critical evaluation with special consideration of changes after fourteen years of age. *Odontologisk Revy* 22: 1-126.
59. JOHANSSON, A., ENROTH, S. & GYLLENSTEN, U. (2013) Continuous Aging of the Human DNA Methylome Throughout the Human Lifespan. *PLoS One*, 8, e67378.
60. KAPILA R, NAGESH KS, IYENGAR AR, MEHKRI S. (2011) Sexual Dimorphism in Human Mandibular Canines: A Radiomorphometric Study in South Indian Population. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect*. 5(2).
61. KASPER KA, AUSTIN D, KVANLI AH, RIOS TR, SENN DR. 2009. Reliability of third molar development for age estimation in a Texas Hispanic population: A comparison study. *Journal of Forensic Sciences* 54(3): 651-657.
62. KLOOSTERMAN A, MAPES A, GERADTS Z, VAN EIJK E, KOPERC, VAN DEN BERG J, VERHEIJ S, VAN DER STEEN M, VAN ASTEN A. 2015 The interface between forensic science and technology: how technology could cause a paradigm shift in the role of forensic institutes in the criminal justice system. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20140264. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0264>
63. KOBAYASHI, R., NAKAUCHI, H., NAKAHORI, Y., NAKAGOME, Y. & MATSUZAWA, S. (1988) Sex identification in fresh blood and dried bloodstains by a nonisotopic deoxyribonucleic acid (DNA) analyzing technique. *Journal of Forensic Sciences*, 33, 613-20.
64. KOSA, F., ANTAL, A. & FARKAS, I. (1990) Electron probe microanalysis of human teeth for the determination of individual age. *Medicine, science, and the Law*, 30, 109-14.
65. KUBASEK, J., URBAN, O. & SANTRUCEK, J. (2013) C4 plants use fluctuating light less efficiently than do C3 plants: a study of growth, photosynthesis and carbon isotope discrimination. *Physiologia Plantarum*.
66. KVAAL SI & SOLHEIM T (1994) A non-destructive dental method for age estimation. *Journal of Forensic Odontostomatol* 12: 6-11.
67. LACKOVIC, K.P. & WOOD, R.E. (2000) Tooth root colour as a measure of chronological age. *The Journal of Forensic Odontostomatology*, 18, 37-45.

68. LAMENDIN, H, BACCINO E, HUMBERT JF, TAVERNIER JC, NOSSINTCHOUK RM, ZERILLI A (1992) A simple technique for age estimation in adult corpses: The two criteria dental method. *Journal of Forensic Sciences* 37(5): 1373–1379.
69. LEWIS JM., SENN DR, ALDER ME (2001) Standardization, automation and database creation for age determination reports. Paper presented at the Annual American Academy of Forensic Sciences Meeting, February 19–24, Seattle
70. WA. LEWIS JM., SENN DR, SILVAGGI J (2008) UT-Age 2008: An update. Paper presented at the Annual American Academy of Forensic Sciences Meeting, February 18–23, Denver, CO.
71. LEWIS JM AND SENN DR. (2013) Dental Age Estimation. In: Senn DR and Weems RA (eds) Manual of Forensic Odontology, 5th edn Boca Raton: CRC Press; pp. 211-255.
72. LIBBY, W.F., BERGER, R., MEAD, J.F., ALEXANDER, G.V. & ROSS, J.F. (1964) Replacement Rates for Human Tissue from Atmospheric Radiocarbon. *Science*, 146, 1170-2.
73. MACKIE, A.C., STEPHENS, R. & TOWNSHEND, A. (1977) Tooth lead levels in Birmingham children. *Archives of Environmental Health*, 32, 178-85.
74. MAPLES WR (1978) An improved technique using dental histology for estimation of adult age. *Journal of Forensic Sciences* 23(4): 764–770.
75. MAPLES, WR & RICE WR (1979) Some difficulties in the Gustafson dental age estimations. *Journal of Forensic Sciences* 24: 168–172.
76. MARTIN-DE LAS HERAS, S., VALENZUELA, A., BELLINI, R., SALAS, C., RUBINO, M. & GARCIA, J.A. (2003) Objective measurement of dental color for age estimation by spectroradiometry. *Forensic Science International*, 132, 57-62.
77. MARTIN-DE LAS HERAS, S., VALENZUELA, A. & VILLANUEVA, E. (1999) Deoxyypyridinoline crosslinks in human dentin and estimation of age. *International Journal of Legal Medicine*, 112, 222-6.
78. MASTERS, P.M., BADA, J.L. & ZIGLER, J.S., JR. (1977) Aspartic acid racemisation in the human lens during ageing and in cataract formation. *Nature*, 268, 71-3.
79. MECHANIC, G., GALLOP, P.M. & TANZER, M.L. (1971) The nature of crosslinking in collagens from mineralized tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 45, 644-53.
80. MICHELETTI CREMASCO, M. (1998) Dental histology: study of aging processes in root dentine. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale*, 74, 19-28.
81. MINCER HH, HARRIS EF, BERRYMAN HE (1993) The A.B.F.O. study of third molar development and its use as an estimator of chronological age. *Journal of Forensic Sciences* 38(2): 379–390.
82. MOORREES, C. F. A., E. A. FANNING, AND E. E. HUNT, JR., 1963a. Formation and resorption of three deciduous teeth in children. *American Journal of Physical Anthropology* 21: 205–213.
83. MOORREES, C. F. A., E. A. FANNING, AND E. E. HUNT, JR., 1963b. Age variation of formation stages for ten permanent teeth. *Journal of Dental Research* 42: 1490–1502.
84. MORNSTAD, H., PFEIFFER, H., YOON, C. & TEIVENS, A. (1999) Demonstration and semi- quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *International Journal of Legal Medicine*, 112, 98-100.
85. MOYZIS, R.K., BUCKINGHAM, J.M., CRAM, L.S., DANI, M., DEAVEN, L.L., JONES, M.D., MEYNE, J., RATLIFF, R.L. & WU, J.R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 6622-6.
86. MURAKAMI, H., YAMAMOTO, Y., YOSHITOME, K., ONO, T., OKAMOTO, O., SHIGETA, Y., DOI, Y., MIYAISHI, S. & ISHIZU, H. (2000) Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples. *Acta Medica Okayama*, 54, 21-32.
87. NYDAL, R. & LOVSETH, K. (1965) Distribution of radiocarbon from nuclear tests. *Nature*, 206, 1029-31.
88. OGINO, T., OGINO, H. & NAGY, B. (1985) Application of aspartic acid racemization to forensic odontology: post mortem designation of age at death. *Forensic Science International*, 29, 259-67.
89. OHTANI, S. (1995a) Estimation of age from dentin by using the racemization reaction of aspartic acid. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 16, 158-61.
90. OHTANI, S. (1995b) Estimation of age from the teeth of unidentified corpses using the amino acid racemization method with reference to actual cases. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 16, 238-42.
91. OHTANI, S. (1995c) Studies on age estimation using racemization of aspartic acid in cementum. *Journal of Forensic Sciences*, 40, 805-7.
92. OHTANI, S. & YAMAMOTO, K. (1991a) Age estimation using the racemization of amino acid in human dentin. *Journal of Forensic Sciences*, 36, 792-800.
93. OHTANI, S. & YAMAMOTO, K. (1991b) Estimation of ages from racemization of an amino acid in teeth--assessment of errors under various experimental conditions. *Nihon hoigaku zasshi = The Japanese Journal of Legal Medicine*, 45, 124-7.
94. OHTANI, S. & YAMAMOTO, K. (1992) Estimation of age from a tooth by means of racemization of an amino acid, especially aspartic acid--comparison of enamel and dentin. *Journal of Forensic Sciences*, 37, 1061-7.
95. OHTANI, S. & YAMAMOTO, T. (2010) Age estimation by amino acid racemization in human teeth. *Journal of Forensic Sciences*, 55, 1630-3.
96. PAJNIC, I.Z. (2016) Extraction of DNA from Human Skeletal Material. *Methods Molecular Biology*, 1420, 89-108.

97. PETTENATI-SOUBAYROUX I, SIGNOLI M, DUTOUR O. (2002) Sexual dimorphism in teeth: discriminatory effectiveness of permanent lower canine size observed in a XVIIIth century osteological series. *Forensic Science International* 23;126(3):227-32.
98. PIEZ, K.A. (1968) Cross-linking of collagen and elastin. *Annual Review of Biochemistry*, 37,547-70.
99. PINCHIN, M.J., NEWHAM, J. & THOMPSON, R.P. (1978) Lead, copper, and cadmium in teeth of normal and mentally retarded children. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 85, 89-94.
100. Plass Data website: <http://www.plassdata.com>.
101. POTSCH, L., MEYER, U., ROTHSCHILD, S., SCHNEIDER, P.M. & RITTNER, C. (1992) Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *International Journal of Legal Medicine*, 105, 139-43.
102. PRINCE DA & UBELAKER DH (2002) Application of Lamendin's adult ageing technique to a diverse skeletal sample. *Journal of Forensic Sciences* 47(1):107-116.
103. RITZ, S., SCHUTZ, H.W. & PEPPER, C. (1993) Postmortem estimation of age at death based on aspartic acid racemization in dentin: its applicability for root dentin. *International Journal of Legal Medicine*, 105, 289-93.
104. RITZ, S., SCHUTZ, H.W. & SCHWARZER, B. (1990) The extent of aspartic acid racemization in dentin: a possible method for a more accurate determination of age at death? *Zeitschrift fur Rechtsmedizin. Journal of Legal Medicine*, 103, 457-62.
105. ROBINS, S.P., SHIMOKOMAKI, M. & BAILEY, A.J. (1973) The chemistry of the collagen cross-links. Age-related changes in the reducible components of intact bovine collagen fibres. *The Biochemical Journal*, 131, 771-80.
106. SAKARI, S.L., JIMSON, S., MASTHAN, K.M. & JACOBINA, J. (2015) Role of DNA profiling in forensic odontology. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 7, S138-41.
107. SCHMELING, A, OLZE A, REISINGER W, GESERICK G (2004) Forensic age diagnostics of living people undergoing criminal proceedings. *Forensic Science International* 144: 243-245.
108. SCHOUR I AND MASSLER M (1941) The development of the human dentition. *Journal of the American Dental Association* 28: 1153-1160.
109. SCHWARTZ GT, DEAN MC. (2005) Sexual dimorphism in modern human permanent teeth. *American Journal of Physical Anthropology*. 128(2):312-7.
110. SENN DR AND STIMSON PG. Future of Forensic Dentistry (2010) In: Senn DR and Stimson PG (eds) Forensic Dentistry, 2nd edn Boca Raton: CRC Press; pp. 405-406.
111. SILVA, A. M., PEREIRA, M. L., GOUVEIA, S., TAVARES, J. N., AZEVEDO, A., CALDAS, I. M. (2016). A new approach to sex estimation using the mandibular canine index. *Med Sci Law*, 56(1), 7-12.
112. SIVAGAMI, A.V., RAO, A.R. & VARSHNEY, U. (2000) A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian population. *Forensic Science International*, 110, 107-15.
113. SOLHEIM, T. (1993) A new method for dental age estimation in adults. *Forensic Science International*, 59, 137-47.
114. SPALDING, K.L., BHARDWAJ, R.D., BUCHHOLZ, B.A., DRUID, H. & FRISEN, J. (2005a) Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell*, 122, 133-43.
115. SPALDING, K.L., BUCHHOLZ, B.A., BERGMAN, L.E., DRUID, H. & FRISEN, J. (2005b) Forensics: age written in teeth by nuclear tests. *Nature*, 437, 333-4.
116. STEENHOUT, A. & POURTOIS, M. (1981) Lead accumulation in teeth as a function of age with different exposures. *British Journal of Industrial Medicine*, 38, 297-303.
117. STREHLOW, C.D. & KNEIP, T.J. (1969) The distribution of lead and zinc in the human skeleton. *American Industrial Hygiene Association journal*, 30, 372-8.
118. TAKASAKI, T., TSUJI, A., IKEDA, N. & OHISHI, M. (2003) Age estimation in dental pulp DNA based on human telomere shortening. *International Journal of Legal Medicine*, 117, 232-4.
119. TEN CATE, A.R., THOMPSON, G.W., DICKINSON, J.B. & HUNTER, H.A. (1977) The estimation of age of skeletal remains from the colour of roots of teeth. *Dental Journal*, 43, 83-6.
120. THOMPSON T, BLACK S. (2006) Forensic Human Identification: An Introduction. CRC Press. ISBN 9780849339547.
121. TRAMINI, P., BONNET, B., SABATIER, R. & MAURY, L. (2001) A method of age estimation using Raman microspectrometry imaging of the human dentin. *Forensic Science International*, 118, 1-9.
122. TSUJI, A., ISHIKO, A., TAKASAKI, T. & IKEDA, N. (2002) Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Science International*, 126, 197-9.
123. TYLER, M.G., KIRBY, L.T., WOOD, S., VERNON, S. & FERRIS, J.A. (1986) Human blood stain identification and sex determination in dried blood stains using recombinant DNA techniques. *Forensic Science International*, 31, 267-72.
124. UBELAKER, D.H. (2014) Radiocarbon analysis of human remains: a review of forensic applications. *Journal Of Forensic Sciences*, 59, 1466-72.
125. UBELAKER, D.H. & PARRA, R.C. (2011) Radiocarbon analysis of dental enamel and bone to evaluate date of birth and death: perspective from the southern hemisphere. *Forensic Science International*, 208, 103-7.

126. Ubelaker, DH (1989) *Human Skeletal Remains, Excavation Analysis, Interpretation*, 2nd edn. Washington, DC: Taraxacum.
127. Unified Victim Identification System (UVIS) Guide (2009) [www.nyc.gov/.../UVIS%20Information%20Guide\\_20090917.pdf](http://www.nyc.gov/.../UVIS%20Information%20Guide_20090917.pdf)
128. VASILIADIS, L., DARLING, A.I. & LEVERS, B.G. (1983a) The amount and distribution of sclerotic human root dentine. *Archives of Oral Biology*, 28, 645-9.
129. VASILIADIS, L., DARLING, A.I. & LEVERS, B.G. (1983b) The histology of sclerotic human root dentine. *Archives of Oral Biology*, 28, 693-700.
130. WALTERS, C. & EYRE, D.R. (1983) Collagen crosslinks in human dentin: increasing content of hydroxypyridinium residues with age. *Calcified Tissue International*, 35, 401-5.
131. WEI, Y.H. & LEE, H.C. (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med* (Maywood), 227, 671-82.
132. WITAS, H.W., TOMCZYK, J., JEDRYCHOWSKA-DANSKA, K., CHAUBEY, G. & PLOSZAJ, T. (2013) mtDNA from the early Bronze Age to the Roman period suggests a genetic link between the Indian subcontinent and Mesopotamian cradle of civilization. *PLoS One*, 8, e73682.
133. ZAPICO, S.C. & UBELAKER, D.H. (2013) Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences. Estimation of age-at-death. *Ageing Research Reviews*, 12, 605-17
134. ZAPICO, S.C. & UBELAKER, D.H. (2013) Sex determination from dentin and pulp in a medicolegal context. *Journal of American Dental Association*, 144, 1379-85.
135. ZAPICO, S.C. & UBELAKER, D.H. (2015) Relationship Between Mitochondrial DNA Mutations and Aging. Estimation of Age-at-death. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*.