

# **TESIS DOCTORAL**

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA LEGAL, TOXICOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA

Programa Oficial de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública



## **DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN ADN DENTAL Y SU UTILIDAD PARA LA ESTIMACIÓN DE LA EDAD**

Ana Belén Márquez Ruiz

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Ana Belén Márquez Ruiz  
ISBN: 978-84-9163-469-0  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48225>



**Universidad de Granada**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física**

## **Determinación de la longitud telomérica en ADN dental y su utilidad para la estimación de la edad**

Memoria de TESIS DOCTORAL realizada bajo la dirección de los Doctores Aurora Valenzuela Garach, Catedrática de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Granada, y Lucas González Herrera, Profesor Ayudante Doctor de Medicina Legal y Forense de la Universidad de Granada, presentada por la licenciada Ana Belén Márquez Ruiz para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada.

Granada, a 24 de mayo de 2017.

Fdo.: Ana Belén Márquez Ruiz

Vº Bº de los directores de la tesis:

Fdo.: Dra. Aurora Valenzuela Garach

Fdo.: Dr. Lucas González Herrera



La doctoranda, Ana Belén Márquez Ruiz, y los directores de la tesis, Dra. Aurora Valenzuela Garach y Dr. Lucas González Herrera, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

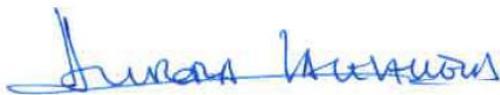
Granada, a 24 de mayo de 2017.

Doctoranda,

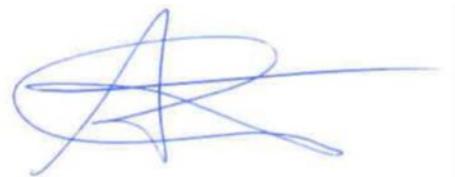


Fdo.: Ana Belén Márquez Ruiz

Directores de la tesis,



Fdo.: Dra. Aurora Valenzuela Garach



Fdo.: Dr. Lucas González Herrera



La presente tesis doctoral está avalada hasta la fecha de su lectura por la publicación: **Márquez-Ruiz AB**, González-Herrera L, Valenzuela A (2017). Usefulness of telomere length in DNA from human teeth for age estimation. *International Journal of Legal Medicine*. En prensa. doi:10.1007/S00414-017-1595-5

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, la doctoranda ha disfrutado de un contrato predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Granada (convocatoria 2012) y una ayuda FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España (ref.: FPU13/03543).

Esta tesis doctoral ha contado con la financiación del Consorcio para la Excelencia en Investigación Forense en Andalucía (CEIFA).



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han contribuido a que esta tesis doctoral sea posible.

A mis directores de tesis, la Dra. Aurora Valenzuela y el Dr. Lucas González. Gracias Aurora por la confianza depositada en mí, el entusiasmo transmitido, el esfuerzo y tiempo dedicado a esta tesis y a mi formación, y por servirme de guía en este camino. Gracias Lucas por tu ánimo constante y apoyo, por tus innumerables consejos y por tu disposición para ayudarme siempre en todo lo que he necesitado.

A M<sup>a</sup> José Serrano y Juan Sainz, investigadores principales de GENyO, por abrirme las puertas de sus laboratorios y poner a mi disposición su material e instalaciones.

A todos los miembros de GENyO que me han enseñado, ayudado y hecho pasar buenos ratos de trabajo durante mi estancia en este centro. En especial, agradecer a Carmen Belén Lupiañez y Alfonso Varela su inestimable ayuda para llevar a cabo la parte experimental de esta investigación.

A los miembros del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, especialmente a su Jefe de Servicio, el Dr. García Medina, y al personal de enfermería, por su amabilidad y buena disposición para colaborar de forma desinteresada en la recogida de la mayor parte de las muestras analizadas en este estudio.

A mis compañeros del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física y a todas las personas que han pasado por él en estos cuatro años. Gracias por hacerme sentir parte del Departamento desde el primer día, por los buenos momentos pasados, por vuestro afecto, consejos, ánimo y ofrecimiento constante.

A mi familia y amigos. A mis padres, a mi hermana, a mis abuelas. Gracias por vuestro cariño y apoyo incondicional, por enseñarme que con constancia, esfuerzo y dedicación todo se consigue, por animarme cuando lo he necesitado. Sin vosotros nada de esto hubiera sido posible.



# ÍNDICE



<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>1. IMPORTANCIA DE LA ESTIMACIÓN DE LA EDAD EN MEDICINA FORENSE</b>	<b>17</b>
<b>2. METODOLOGÍA FORENSE PARA LA ESTIMACIÓN DE LA EDAD</b>	<b>21</b>
2.1. EDAD DE MADURACIÓN SOMÁTICA Y SEXUAL	21
2.2. EDAD ÓSEA	21
2.3. EDAD DENTAL	27
2.3.1. Erupción y mineralización dentaria	28
2.3.2. Cambios en el diente durante el envejecimiento	32
2.3.2.1. Cambios morfológicos	32
2.3.2.2. Cambios histológicos	35
2.3.2.3. Cambios bioquímicos	36
2.3.2.4. Cambios moleculares	40
2.3.2.4.1. El ADN en el diente	40
2.3.2.4.2. Métodos moleculares para la estimación de la edad	47
<b>3. BIOLOGÍA DEL TELÓMERO</b>	<b>51</b>
3.1. ESTRUCTURA DEL TELÓMERO	51
3.1.1. ADN telomérico	51
3.1.2. Complejo protector o shelterina	52
3.1.3. Otras proteínas asociadas al telómero	54
3.2. REPLICACIÓN DEL TELÓMERO	55
3.3. MANTENIMIENTO DEL TELÓMERO	59
3.3.1. Alargamiento del telómero dependiente de la telomerasa	60
3.3.2. Alargamiento alternativo de los telómeros	65
3.4. MEDIDA DE LA LONGITUD DEL TELÓMERO	65
<b>II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>69</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>75</b>
<b>1. MUESTRAS</b>	<b>77</b>
1.1. RECOGIDA Y SELECCIÓN DE MUESTRAS	77
1.2. LIMPIEZA, DESCONTAMINACIÓN Y PULVERIZADO DE LAS MUESTRAS	79
<b>2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN</b>	<b>81</b>
<b>3. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA</b>	<b>84</b>
<b>4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>90</b>

<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>91</b>
<b>1. CONCENTRACIÓN DE ADN</b>	<b>93</b>
1.1. INFLUENCIA DEL SEXO, EL TIPO DE DIENTE Y LA EDAD	93
<b>2. EXPRESIÓN GÉNICA</b>	<b>99</b>
2.1. VALORES CT	99
2.1.1. Influencia del sexo, el tipo de diente y la edad	99
2.2. RATIO T/S RELATIVO	101
2.2.1. Influencia del sexo, el tipo de diente y la edad	102
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>107</b>
<b>1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN</b>	<b>109</b>
<b>2. LONGITUD TELOMÉRICA RELATIVA</b>	<b>113</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>123</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>127</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. IMPORTANCIA DE LA ESTIMACIÓN DE LA EDAD EN MEDICINA FORENSE

La estimación de la edad del sujeto forma parte del complejo proceso de identificación, constituyendo un problema que se presenta con relativa frecuencia en la práctica pericial forense. Los motivos por los que se hace necesaria la identificación de una persona, es decir, el establecimiento de su individualidad determinando aquellos rasgos o cualidades que la hacen única (Villanueva y Castilla, 2004), pueden ser de índole legal, sociocultural o religiosa.

Desde el punto de vista legal, el establecimiento de la identidad, ya se trate de un sujeto vivo o de un cadáver, se encuentra contemplado de diversas formas en nuestro ordenamiento jurídico. El Derecho Civil recoge el establecimiento de la identidad de la persona como requisito necesario para ciertos actos, como la transmisión de derechos<sup>1</sup>. Asimismo, la identificación del cadáver es requisito previo para proceder a la certificación de la muerte y la correspondiente inscripción del fallecimiento en el Registro Civil<sup>2</sup>, necesaria para la inhumación de los restos y la transmisión de bienes, derechos y obligaciones a los herederos del fallecido. Por su parte, el Derecho Penal establece que, cuando se originen dudas sobre la identidad del procesado, se procurará acreditar esta por cuantos medios sean conducentes al objeto<sup>3</sup>. En cuanto a la identidad de la víctima, en

---

<sup>1</sup> Cfr. Código Civil, Art. 685: *El Notario deberá conocer al testador y si no lo conociese se identificará su persona con dos testigos que le conozcan y sean conocidos del mismo Notario, o mediante la utilización de documentos expedidos por las autoridades públicas cuyo objeto sea identificar a las personas. También deberá el Notario asegurarse de que, a su juicio, tiene el testador la capacidad legal necesaria para testar. En los casos de los artículos 700 y 701, los testigos tendrán obligación de conocer al testador y procurarán asegurarse de su capacidad.*

<sup>2</sup> Cfr. Ley del Registro Civil, Art. 274: *El facultativo que haya asistido al difunto en su última enfermedad o cualquier otro que reconozca el cadáver enviará inmediatamente al Registro parte de defunción en el que, además del nombre, apellidos, carácter y número de colegiación del que lo suscriba, constará que existen señales inequívocas de muerte, su causa y, con la precisión que la inscripción requiere, fecha, hora y lugar del fallecimiento y menciones de identidad del difunto, indicando si es conocido de ciencia propia o acreditada y, en este supuesto, documentos oficiales examinados o menciones de identidad de persona que afirme los datos, la cual también firmará el parte. Si hubiere indicios de muerte violenta se comunicará urgente y especialmente al Encargado.*

<sup>3</sup> Cfr. Ley de Enjuiciamiento Criminal, Art. 373: *Si se originase alguna duda sobre la identidad del procesado, se procurará acreditar ésta por cuantos medios fueren conducentes al objeto;* Art. 374: *El Juez*

caso de muerte sospechosa de criminalidad se establece que, antes de proceder a la inhumación o inmediatamente después de su exhumación, se identificará al cadáver<sup>4</sup>.

Por tanto, en el contexto forense, el diagnóstico de la edad en personas vivas contribuye a la resolución de cuestiones civiles o penales que involucran a menores o adultos que no disponen de documentos válidos que acrediten su identidad, como puede ser el caso de inmigrantes indocumentados o situaciones en las que se produce una falsificación o usurpación de identidad. En cadáveres o restos cadavéricos, la estimación de la edad en el momento de la muerte facilita la construcción de un perfil biológico, necesario para la posterior identificación del fallecido (Cunha *et al.*, 2009).

La estimación diagnóstica de la edad de un sujeto se fundamenta en el principio genérico de que el organismo sufre una serie de cambios con el paso del tiempo, que siguen una secuencia cronológica bien establecida y bastante universal en la especie humana. Estos cambios afectan tanto a patrones bioquímicos como a la morfología externa del organismo, así como a la osificación y mineralización de huesos y dientes (Garamendi *et al.*, 2011). Estas modificaciones reflejan tres fases diferentes de la vida:

---

*hará constar, con la minuciosidad posible, las señas personales del procesado, a fin de que la diligencia pueda servir de prueba de su identidad; Art. 375: Para acreditar la edad del procesado y comprobar la identidad de su persona, el Secretario judicial traerá al sumario certificación de su inscripción de nacimiento en el Registro civil o de su partida de bautismo, si no estuviere inscrito en el Registro. En todo caso, cuando no fuere posible averiguar el Registro civil o parroquia en que deba constar el nacimiento o el bautismo del procesado, o no existiesen su inscripción y partida; y cuando por manifestar el procesado haber nacido en punto lejano hubiere necesidad de emplear mucho tiempo en traer a la causa la certificación oportuna, no se detendrá el sumario, y se suplirá el documento del artículo anterior por informes que acerca de la edad del procesado, y previo su examen físico, dieren los Médicos forenses o los nombrados por el Juez.*

<sup>4</sup> *Cfr. Ley de Enjuiciamiento Criminal, Art. 340: Si la instrucción tuviere lugar por causa de muerte violenta o sospechosa de criminalidad, antes de proceder al enterramiento del cadáver o inmediatamente después de su exhumación, hecha la descripción ordenada en el artículo 335, se identificará por medio de testigos que, a la vista del mismo, den razón satisfactoria de su conocimiento; Art. 341: No habiendo testigos de conocimiento, si el estado del cadáver lo permitiere, se expondrá al público antes de practicarse la autopsia, por tiempo a lo menos de veinticuatro horas, expresando en un cartel, que se fijará a la puerta del depósito de cadáveres, el sitio, hora y día en que aquél se hubiese hallado y el Juez que estuviere instruyendo el sumario, a fin de que quien tenga algún dato que pueda contribuir al reconocimiento del cadáver o al esclarecimiento del delito y de sus circunstancias lo comunique al Juez instructor; Art. 342: Cuando a pesar de tales prevenciones no fuere el cadáver reconocido, ordenará el Juez que se recojan todos los efectos personales con que se le hubiere encontrado, a fin de que puedan servir oportunamente para hacer la identificación; Art. 343: En los sumarios a que se refiere el artículo 340, aun cuando por la inspección exterior pueda presumirse la causa de la muerte, se procederá a la autopsia del cadáver por los Médicos forenses o, en su caso, por los que el Juez designe, los cuales, después de describir exactamente dicha operación, informarán sobre el origen del fallecimiento y sus circunstancias. Para practicar la autopsia se observará lo dispuesto en el artículo 353.*

crecimiento y desarrollo, equilibrio, y senescencia. La primera fase está representada por niños, adolescentes y adultos jóvenes, que están sometidos a cambios siguiendo un patrón bastante bien conocido y establecido, con unos márgenes cronológicos de variabilidad más o menos predecibles, en condiciones normales, entre sujetos de la misma edad. Sin embargo, una vez que el crecimiento ha concluido, los cambios degenerativos que se aprecian con el paso del tiempo varían enormemente de unos sujetos a otros, ya que se ven influenciados por numerosos factores (Valenzuela, 2004). Por ello, la estimación de la edad representa uno de los mayores retos a los que se enfrentan las ciencias forenses en la actualidad, especialmente cuando se trata de sujetos adultos.

El crecimiento y el desarrollo son dos procesos paralelos, e íntimamente ligados entre sí, que ocurren durante toda la vida del ser humano. El crecimiento es un fenómeno cuantitativo que puede definirse como el aumento en número y tamaño de las células que conforman el organismo, con el consiguiente aumento de la masa corporal. Por el contrario, el desarrollo es un proceso de carácter cuanti-cualitativo que consiste en la adquisición de funciones con aumento en la complejidad bioquímica y fisiológica de las estructuras corporales a lo largo del tiempo, alcanzando un creciente grado de maduración (Torres, 2002). El cuerpo humano se compone de moléculas en constante cambio, con una organización estructural y funcional característica, cuyo equilibrio depende de la relación entre las velocidades de formación y destrucción de la materia. Durante cada momento de la vida, este equilibrio puede manifestarse mediante el aumento, mantenimiento o disminución de la masa que conforma al organismo en relación al momento previo, lo que se denomina signo del crecimiento. El signo positivo del crecimiento se observa cuando la velocidad de formación de la materia es mayor que la de destrucción, por lo que se producirá un aumento de la masa corporal respecto al momento previo. Este signo es característico de los primeros años de vida, desde la concepción hasta el término de la pubertad, aunque también puede observarse durante la fase de recuperación de estados patológicos tales como la cicatrización. El signo neutro del crecimiento ocurre cuando la velocidad de síntesis es similar a la de destrucción, por lo que la masa corporal se mantiene relativamente estable. Este signo es propio de la edad adulta, aunque puede presentarse durante la infancia cuando las condiciones ambientales y nutricionales no son favorables. Por último, el signo negativo del crecimiento se caracteriza por una velocidad de formación menor que la de destrucción, ya sea por una

disminución de la primera o un aumento de la segunda. En condiciones fisiológicas, este signo se presenta durante la senectud (Torres, 2002).

Los eventos que ocurren durante los procesos de crecimiento y desarrollo generalmente presentan una secuencia constante, sin embargo, la edad en la que suceden pueden variar considerablemente entre una persona y otra de la misma edad cronológica (Cunningham, Scheuer y Black, 2016). Estas diferencias individuales, dependientes de factores genéticos, neuroendocrinos, socioculturales, patológicos o ambientales, han favorecido la distinción entre edad cronológica y edad biológica. La edad cronológica puede definirse como el tiempo que ha vivido una persona, a contar desde que nació. En cambio, la edad biológica de un sujeto se refiere al grado de desarrollo y maduración física del mismo. Esta edad biológica puede variar dentro de unos rangos fisiológicos de normalidad y se admite que coincide con la edad cronológica en la mayoría de las personas, siempre que estas no hayan sufrido trastornos de ningún tipo en el ritmo de crecimiento y desarrollo (Valenzuela, 2004). Sin embargo, puede haber personas que tengan una edad biológica retrasada en relación a su edad cronológica. De la misma forma, puede ocurrir que la edad biológica se encuentre adelantada respecto a la edad cronológica debido a un crecimiento y desarrollo más avanzado. Además, la discrepancia entre estas edades será mayor cuanto mayor sea la edad del individuo, por lo que también será menor la precisión del método empleado para estimar la edad (Cunha *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta estos principios y, por tanto, los errores que se pueden cometer, la estimación de la edad cronológica del sujeto se llevará a cabo a partir del estudio de su edad biológica, asumiendo que se trata de un sujeto que tuvo un crecimiento y desarrollo fisiológico encuadrable dentro de la normalidad, por lo que presumiblemente la edad biológica coincidirá con la edad cronológica.

## **2. METODOLOGÍA FORENSE PARA LA ESTIMACIÓN DE LA EDAD**

La estimación forense de la edad se basa en el estudio combinado de la edad de maduración somática y sexual, la edad ósea y la edad dental del sujeto.

### **2.1. EDAD DE MADURACIÓN SOMÁTICA Y SEXUAL**

En niños, adolescentes y adultos jóvenes, se recomienda que el procedimiento para la estimación forense de la edad comience con un examen físico en el que se lleve a cabo un registro tanto de datos antropométricos, fundamentalmente altura, peso y tipología corporal, como de aquellas características de madurez sexual externamente visibles. Estas características incluyen, en el sexo masculino, el desarrollo genital, la distribución del vello púbico, axilar y facial, y la prominencia laríngea; mientras que, en el sexo femenino, el desarrollo de los senos, la distribución del vello púbico y la forma de la cadera serán los principales signos de madurez sexual examinados (Schmeling, 2016). El propósito principal de esta evaluación física inicial es identificar o descartar trastornos del crecimiento y del desarrollo. La inferencia de la edad cronológica a partir de la edad biológica, basada en las edades ósea y dental, solo puede ser asumida para aquellos sujetos en los que no se obtengan hallazgos destacables que indiquen un crecimiento o desarrollo alejado de la normalidad (Schmeling, 2016).

### **2.2. EDAD ÓSEA**

Durante las dos primeras décadas de la vida, la edad ósea se estima mediante el estudio del desarrollo del esqueleto, fundamentalmente de los huesos largos, pudiéndose valorar estos cambios mediante la evaluación del grado de formación de los núcleos de osificación y del aumento de tamaño y longitud de los huesos. Los métodos recomendados para la estimación de la edad en menores de 20 años generalmente se

clasifican en base al grupo de edad al que *a priori* pertenezca el sujeto. De forma general, se emplean las siguientes categorías para distinguir entre los diferentes grupos de edad y desarrollo: fetos, recién nacidos, infantes (0-6 años), niños (6-12 años) y adolescentes (12-20 años) (Cunha *et al.*, 2009). Además, se debe tener en cuenta que la metodología empleada debe incluir la comparación de los resultados con tablas elaboradas a partir de datos procedentes de la población de referencia adecuada al caso, con el objetivo de reducir el impacto de factores étnicos y ambientales (Cunha *et al.*, 2009).

A lo largo de la vida, los elementos del esqueleto experimentan un cambio cronológico secuencial. Durante el periodo embrionario y fetal, se forman la mayoría de los centros primarios de osificación (Cunningham, Scheuer y Black, 2016). Por tanto, en el momento del nacimiento, la mayoría de los centros primarios ya se encuentran presentes, apareciendo en la radiografía como centros de osificación de aspecto amorfo y de pequeño tamaño. Asimismo, algunos centros secundarios de osificación, como los presentes en la cabeza del húmero, la epífisis distal del fémur y la epífisis proximal de la tibia, pueden ya ser identificados (Garamendi y Landa, 2010). En un recién nacido a término, además, se puede observar que la fontanela mayor se encuentra abierta y las fontanelas menores están en proceso de cierre o ya cerradas (Cunha *et al.*, 2009). La longitud de las diáfisis de los huesos largos no es determinante para la estimación de la edad en este momento, debido a las variaciones relacionadas con el tamaño del cuerpo, aunque se recomienda medir la tibia, el fémur o el húmero como indicador general (Cunha *et al.*, 2009).

Desde el nacimiento hasta los 5 años de edad, aparecen todos los centros de osificación que no se habían desarrollado antes del nacimiento. Desde los 5 a los 12 años de edad, los centros de osificación ya formados van creciendo y adoptando la morfología de los huesos adultos. Este periodo termina con la fusión de los componentes del acetábulo y la epífisis medial de la clavícula (Garamendi y Landa, 2010). Para estimar la edad en infantes se debe comprobar el grado de osificación de los huesos del cráneo, principalmente del temporal, occipital y frontal, y de la mandíbula (Cunha *et al.*, 2009). En niños, en los huesos largos, se debe considerar la longitud de las diáfisis, la aparición de los centros de osificación y la fusión de las epífisis (Cunha *et al.*, 2009).

Desde los 12 a los 20 años de edad, se produce la fusión de las epífisis con las diáfisis de los huesos largos. En la sínfisis púbica y en el extremo esternal de las costillas se aprecian los primeros cambios con la edad. Con la llegada de la pubertad, los huesos presentan ya rasgos de dimorfismo sexual (Garamendi y Landa, 2010). De forma general, en adolescentes se aplican los mismos métodos para estimar la edad que se recomiendan para niños (Cunha *et al.*, 2009). Sin embargo, se puede obtener información más específica y precisa mediante el estudio del desarrollo esquelético de los huesos del carpo y la mano (Greulich y Pyle, 1959; Tanner *et al.*, 1975). Cuando no se disponga de otras partes del cuerpo, el final de la adolescencia también se puede comprobar a través del estudio de la fusión de los anillos epifisarios de las vértebras torácicas y lumbares (Albert y Maples, 1995), y el grado de osificación del centro secundario de la cresta ilíaca, siguiendo los estadios de Risser (Scoles *et al.*, 1988; Izumi, 1995) (Figura 1).

En el periodo de transición comprendido entre la adolescencia y la edad adulta temprana (entre los 20 y los 25 años), se producen cambios en la sínfisis púbica y en el extremo esternal de las costillas, se culmina el cierre epifisario de los cuerpos vertebrales y comienza el cierre de las suturas craneales (Garamendi y Landa, 2010). Por tanto, en este rango de edad tan estrecho y tan particular del desarrollo y crecimiento humano, se pueden evaluar los contados cambios que se producen en las estructuras óseas indicando el final del crecimiento. Estos son la obliteración de las suturas del cráneo (Masset, 1989; Madeline y Elster, 1995), la fusión de los anillos vertebrales (Albert y Maples, 1995), la fusión de la cresta ilíaca (Scoles *et al.*, 1988), la fusión del extremo esternal de la clavícula (Schmeling *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2005; Garamendi *et al.*, 2007, Bassed *et al.*, 2011) y el desarrollo de los huesos de la mano y el carpo (Greulich y Pyle, 1959; Tanner *et al.*, 1975) (Figura 1).

Una vez terminado el crecimiento, el proceso de cambio ocasionado por el envejecimiento se traduce en modificaciones de la forma y de la estructura de los huesos. En base a estos cambios, se han desarrollado una serie de métodos de utilidad para la estimación de la edad ósea que, en su mayoría y debido a sus características, están destinados a ser aplicados en sujetos ya fallecidos (Figura 1). Además, la posibilidad de emplear un determinado método para la estimación de la edad en el momento de la muerte de un sujeto adulto se encuentra limitada en gran medida por el estado de conservación del cuerpo (Cunha *et al.*, 2009).

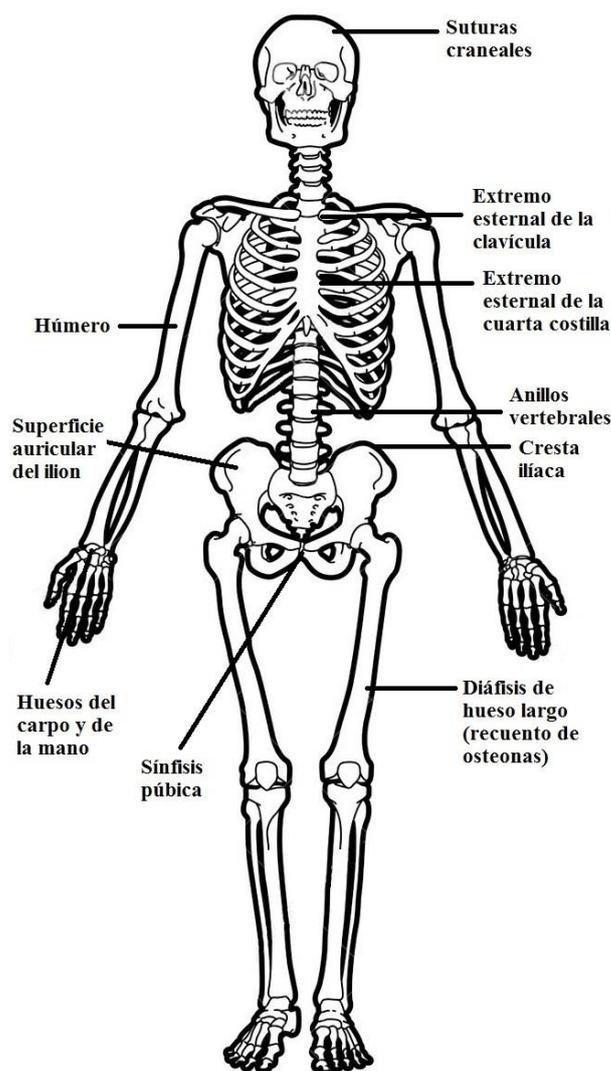
En el caso de que se trate de un cadáver reciente bien conservado o ya en estado de descomposición, se pueden evaluar los cambios que sufre la sínfisis púbica con la edad siguiendo el sistema propuesto por Suchey y Brooks (1990), un método que presenta mayor fiabilidad entre los 25 y los 40 años (Martrille *et al.*, 2007). En caso de no disponer de la sínfisis púbica, se recomienda estudiar la metamorfosis del extremo esternal de la cuarta costilla (Iscan, Loth y Wright, 1984, 1985, 1987), siempre y cuando este área específica de la costilla se encuentre en buen estado de conservación. Si la muestra ha estado enterrada durante un largo período de tiempo, el recuento de osteonas mediante el análisis microscópico de las diáfisis de los huesos largos (Kerley y Ubelaker, 1978; Stout y Paine, 1992) se presenta como una buena alternativa, a pesar de tratarse de un método mucho más laborioso.

En el caso de contar con un cadáver esqueletizado completo, se pueden aplicar varios métodos para la estimación de la edad, siempre teniendo en cuenta que todas las áreas anatómicas que presenten lesiones deben ser excluidas de la evaluación. Si la sínfisis púbica y las costillas están dañadas, se deben evitar algunos métodos, como el estudio del cierre de las suturas craneales, ya que ofrecen una gran variabilidad interindividual, así como desviaciones estándar demasiado amplias para ser utilizados con fines forenses (Hershkovitz *et al.*, 1997). Por ello, en estos casos, el estudio de la superficie auricular del ilion (Lovejoy *et al.*, 1985; Buckberry y Chamberlain, 2002) puede ser la mejor opción a pesar de presentar un error intraobservador significativo, lo que a veces conduce a resultados imprecisos (Cunha *et al.*, 2009). En todos los casos se recomienda de forma general que, si el estudio de la sínfisis púbica (Brooks y Suchey, 1990) o de la costilla (Iscan, Loth y Wright, 1984, 1985, 1987) indica que se trata de un adulto muy joven, se evalúe el estado de la unión epifisaria del extremo esternal de la clavícula (Schmeling *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2005; Garamendi *et al.*, 2007).

Cuando se trata de restos calcinados, la elección del método dependerá de si se han preservado determinados sitios anatómicos y del grado de calcinación de los restos. Siempre se realizarán radiografías para comprobar el desarrollo óseo, y así descartar o no que se trate de un adulto. Si se dispone solo de huesos aislados, el recuento de osteonas será una buena opción (Kerley y Ubelaker, 1978; Stout y Paine, 1992), ya que el calor no altera significativamente la forma y disposición de las mismas (Bradtmilller y Buikstra, 1984). Sin embargo, en estos casos se debe actuar con cautela por diversas razones. En

primer lugar, la mayoría de los métodos requieren que la morfología del hueso en cuestión sea identificable y, obviamente, cuando el hueso está muy afectado, esto no es posible. En segundo lugar, algunos huesos están tan calcinados que su estructura histológica ya no permite ser analizada e interpretada, por lo que ciertos métodos, como el análisis de las osteonas, no podrán ser aplicados.

En determinadas circunstancias, la estimación de la edad se debe realizar contando solo con algunas partes del cuerpo. En el caso de que se trate de un cráneo sin dientes, se dispone de una serie de métodos, caracterizados todos ellos por su imprecisión: cierre de las suturas del cráneo, recuento de osteonas y racemización de aminoácidos en hueso. Los problemas del análisis del cierre de las suturas incluyen la gran variabilidad interindividual y los amplios errores encontrados en las estimaciones (Hershkovitz *et al.*, 1997). El recuento de osteonas en el cráneo se ha estudiado en el hueso occipital y los propios autores no recomiendan este método para la estimación de la edad (Cool, Hendrikz y Wood, 1995). Por último, la racemización de aminoácidos en hueso es mucho menos precisa que en diente debido a la remodelación ósea, por lo que no puede recomendarse como un método fiable para fines forenses (Ohtani, 1998; Ritz-Timme, Schütz y Collins, 1999). En aquellos casos en los que no se disponga del cráneo, se recomienda el estudio de la sínfisis púbica (Brooks y Suchey, 1990). Si el resultado se encuadra dentro de las tres últimas etapas establecidas por el método de Suchey-Brooks, debe utilizarse un método más preciso en personas de edad avanzada, como el análisis de las osteonas (Kerley y Ubelaker, 1978; Stout y Paine, 1992). La estimación de la edad a través del análisis de la sínfisis púbica se puede complementar mediante el estudio de la cuarta costilla (Iscan, Loth y Wright, 1984, 1985, 1987) y de la superficie auricular del ilion (Lovejoy *et al.*, 1985; Buckberry y Chamberlain, 2002). Si solo está disponible el torso, se recomienda aplicar el método de Iscan (Iscan, Loth y Wright, 1984, 1985, 1987) para la evaluación de la cuarta costilla. En el caso de contar solo con los miembros superiores, se propone el examen y la evaluación de la estructura del húmero por el método combinado de Acsádi y Nemeskéri (1970). Si la estimación de la edad se debe realizar contando solo con los miembros inferiores, el recuento de osteonas, aplicando las ecuaciones pertinentes del método de Kerley y Ubelaker (1978), debe ser la opción elegida.



**Figura 1.** Estructuras analizadas por los principales métodos dedicados a la estimación de la edad ósea en adolescentes y adultos.

A pesar de contar en la literatura con una variada metodología para la estimación de la edad en restos humanos adultos, esta presenta grandes limitaciones, márgenes de error demasiado amplios y la necesidad de contar con poblaciones de referencia específicas para cada caso. Además, estos problemas se agravan a medida que aumenta la edad del sujeto, no existiendo prácticamente métodos que permitan discriminar razonablemente entre las edades más avanzadas (Cunha *et al.*, 2009).

En resumen, no existe un indicador que refleje con precisión los muchos factores que afectan a la edad y se acumulan con el paso del tiempo, por lo que se deben utilizar tantos indicadores dentales y esqueléticos como sea posible. Asimismo, para maximizar el potencial de cada método, en la evaluación final se debe considerar principalmente el

método o métodos que presenten una menor imprecisión para un rango de edad particular, una vez que se haya clasificado al sujeto dentro de un grupo de edad general, esto es, como subadulto o adulto, a partir de un estudio preliminar mediante el análisis de la sínfisis púbica o de la costilla (Martrille *et al.*, 2007).

### **2.3. EDAD DENTAL**

El establecimiento de la edad dental se considera de máxima utilidad para la estimación de la edad cronológica. La maduración de la dentición es el proceso más constante, mantenido y universal, incluso entre poblaciones de distinto origen étnico, aunque puede verse influenciado por aspectos nutricionales, hábitos higiénicos o diferencias climáticas (Martín de las Heras, 2005). No obstante, la literatura señala que la estimación de la edad basada en métodos dentales es más fiable que aquella realizada a partir del análisis esquelético, ya que el desarrollo dental se supone menos influenciado por factores étnicos y ambientales que el desarrollo óseo (Cunha *et al.*, 2009). Su utilidad, por tanto, se debe a que los dientes presentan un patrón de formación establecido, comenzando por la corona, continuando por la raíz y finalizando por el estrechamiento y cierre del ápice radicular; sus tiempos de erupción son conocidos; y manifiestan una gran resistencia frente a condiciones adversas, haciendo de ellos una muestra de gran valía en el ámbito forense. Debido a su alto contenido mineral, los dientes presentan una gran resistencia frente a los agentes físicos, químicos y a la putrefacción, lo que permite que puedan ser empleados para la estimación de la edad incluso en cadáveres recientes mal conservados y en restos esqueletizados. Además, los tejidos dentarios nos brindan la posibilidad de obtener material genético bien conservado ante condiciones adversas, algo que otros tejidos no pueden ofrecer (Higgins y Austin, 2013).

Una vez que se ha formado y erupcionado toda la dentición permanente, el estudio del grado de mineralización y erupción dentaria ya no son válidos para la estimación de la edad dental. Por tanto, a partir de la segunda década de la vida, los criterios empleados para este fin serán los cambios morfológicos, histológicos, bioquímicos y moleculares que acontecen en los tejidos dentarios y estructuras relacionadas como consecuencia del proceso normal de envejecimiento. De hecho, las modificaciones que sufre el diente con

el paso de los años se han ido imponiendo como métodos de indudable ayuda en la estimación de la edad cronológica del sujeto adulto. Sin embargo, la mayor parte de este tipo de métodos no son de utilidad en sujetos vivos, ya que requieren del examen macroscópico o microscópico del diente e incluso de la destrucción del mismo.

En las últimas décadas, como consecuencia de los problemas que presentan los métodos morfológicos tradicionales, especialmente en sujetos adultos, se han realizado numerosos intentos con el fin de desarrollar nuevos métodos que permitan conseguir una mayor precisión en el diagnóstico de la edad. Estos métodos se fundamentan también en los cambios causados por el proceso fisiológico de envejecimiento, aunque esta vez poniendo el foco en aquellos cambios que ocurren en los tejidos y órganos a nivel molecular. Esta metodología incluye métodos basados en los cambios observados en las proteínas, como son la racemización del ácido aspártico y la acumulación de productos finales de glicación avanzada, y en las alteraciones encontradas en el ADN, incluyendo el acortamiento de los telómeros y los cambios en la metilación del ADN.

### **2.3.1. Erupción y mineralización dentaria**

Hasta alcanzar la segunda década de la vida, la dentición se encuentra en un período de formación, desarrollo y erupción. Es posible, por tanto, estudiar el estadio de erupción y el grado de mineralización de los dientes para estimar la edad cronológica del sujeto, incluso antes de su aparición en boca gracias al estudio radiográfico.

Los dientes temporales comienzan su mineralización entre las semanas 13 y 18 de vida intrauterina, iniciándose en los incisivos centrales y terminando en los segundos molares. Los dientes permanentes inician su calcificación varios meses después del nacimiento, a excepción de los primeros molares permanentes, que ya han comenzado su mineralización en el momento del nacimiento (Cunningham, Scheuer y Black, 2016). Desde el nacimiento hasta los 5 años de edad, los dientes temporales van erupcionando y los permanentes se van calcificando. Desde los 5 hasta aproximadamente los 12 años de edad, los dientes permanentes van reemplazando a los temporales hasta completar la

dentición adulta, a excepción de los terceros molares, de erupción más variable y tardía (Garamendi y Landa, 2010).

El estudio de la erupción dentaria se realiza mediante una simple exploración de la cavidad oral con el objeto de llevar a cabo un registro de los dientes que están presentes en boca. Para aquellos dientes que todavía no han emergido en la cavidad oral, hecho que no se produce hasta que aproximadamente se ha formado la mitad o las dos terceras partes de la raíz, se hace necesario realizar radiografías panorámicas para valorar el grado de formación y el tiempo estimado para que se produzca la erupción clínica de estos dientes. Posteriormente, se emplean atlas o diagramas elaborados para distintas edades, poblaciones y sexos que orientan sobre la edad cronológica presumible del sujeto examinado en función de su patrón de erupción, como pueden ser los esquemas propuestos por Schour y Massler (1941). La evaluación del patrón de erupción dentaria es un método sencillo, económico y que ofrece resultados inmediatos. Sin embargo, la cronología de la erupción dentaria no es un buen indicador de la edad cuando se utiliza de forma aislada, debido a que se encuentra influenciado por diversos factores como la raza, el sexo, la nutrición, el clima o ciertas patologías sistémicas (Lunt y Law, 1974).

Por su parte, la maduración dentaria es un proceso continuo y secuencial que se correlaciona con diferentes estadios morfológicos de mineralización, comenzando con la calcificación de la cúspide o el borde incisal del diente y terminando por el cierre del ápice radicular. Por ello, para conocer el grado de mineralización de cada diente, es imprescindible llevar a cabo un estudio radiográfico, consistiendo generalmente en la realización de una ortopantomografía, que permite valorar la dentición al completo en una sola imagen. Distintos autores han definido diversas series de estadios que permiten determinar en qué momento del desarrollo se encuentra el diente y relacionarlo con la edad que corresponde al mismo, derivada del estudio de una muestra de referencia de edades y sexos conocidos (Nolla, 1960; Moorrees, Fanning y Hunt, 1963; Liliequist y Lundberg, 1971; Demirjian, Goldstein y Tanner, 1973; Haavikko, 1974; Gustafson y Koch, 1974). La escala más utilizada con fines forenses es la propuesta por Demirjian, Goldstein y Tanner (1973), que se basa en ocho estadios de desarrollo dentario, descritos mediante dibujos esquemáticos y criterios de valoración bien definidos. Estos autores, además de presentar un esquema para analizar el grado de maduración dentaria, propusieron un método para la estimación de la edad dental, que otorga una puntuación

## | I. INTRODUCCIÓN

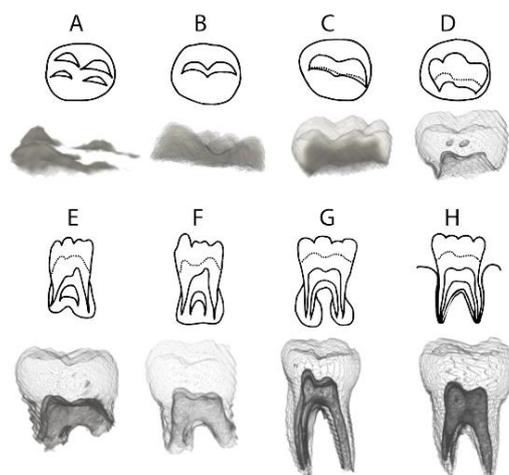
específica a cada uno de los dientes considerados en el estudio (todos los dientes permanentes de la hemiarcada inferior izquierda a excepción del tercer molar) en función del estadio de desarrollo en el que se encuentren, cuya suma puede ser convertida directamente en la edad dentaria mediante el uso de tablas y curvas de percentiles específicas para cada sexo. No obstante, a pesar de tratarse de un método sencillo, válido, con buena reproducibilidad y de uso extendido, cuando se ha aplicado en diferentes poblaciones se han encontrado diferencias entre los distintos grupos étnicos, resultando en una sobrestimación o subestimación de la edad dental, según el caso. Por tanto, se recomienda el empleo de tablas específicas adecuadas a la población a la que pertenezca el sujeto en cuestión (Chaillet, Nyström y Demirjian, 2005).

Aproximadamente entre los 14 años, cuando se produce el cierre del ápice del segundo molar permanente, y los 20-25 años, el tercer molar es el único diente en formación, por lo que el estudio de su desarrollo es de gran importancia en la práctica forense para la estimación de la edad en este reducido rango de edad, tan interesante desde el punto de vista legal. Sin embargo, su utilidad está limitada ya que es un diente que se encuentra a menudo ausente en la cavidad oral por agenesia o porque no llega a erupcionar, y que exhibe una gran variabilidad en su proceso de mineralización entre sujetos (Bolaños *et al.*, 2003).

A pesar de que los estadios de mineralización descritos por Demirjian *et al.* no incluyen la valoración del tercer molar, estos esquemas son los recomendados por la mayoría de los autores para establecer el grado de mineralización de este diente (Solari y Abramovitch, 2002; Gunst *et al.*, 2003; De Salvia *et al.*, 2004; Chaillet, Nyström, Demirjian, 2005; Olze *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2005; Martín-de las Heras *et al.*, 2008; Streckbein *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2015). Así, el método de Mincer, Harris y Berryman (1993) se basa en la estimación de la edad dental por comparación del grado de desarrollo del tercer molar con esquemas de mineralización estandarizados, de acuerdo con los propuestos por Demirjian (Figura 2). La utilidad de este método, propuesto por la *American Board of Forensic Odontology*, es que ofrece además la posibilidad de conocer en términos de probabilidad si un individuo tiene al menos 18 años, aunque no nos permite asegurar, con un grado de fiabilidad suficiente, que un sujeto menor de 18 años no pueda ya presentar una mineralización completa del tercer molar, ni que otro mayor de 18 aún no haya alcanzado el cierre completo de los ápices. Además, su utilidad está limitada si se emplea

para estimar la edad de un sujeto procedente de una población diferente a la de referencia del método. En esta línea, se han publicado diversos trabajos sobre la estimación de la edad basada en la mineralización del tercer molar en distintos grupos étnicos (Olze *et al.*, 2003; Olze *et al.*, 2004; Thevissen, Fieuws y Willems, 2010). Las conclusiones fundamentales de estos estudios indican diferencias entre las distintas poblaciones de estudio por grupos de edad, de forma que en algunas edades una población presenta patrones de mineralización más avanzados respecto a otras, mientras que a otras edades ocurre lo contrario. Por tanto, se recomienda emplear poblaciones de referencia adecuadas al caso concreto.

Los métodos propuestos para evaluar la mineralización del tercer molar se basan en su mayoría en la evaluación de una ortopantomografía, una radiografía panorámica bidimensional de ambos maxilares. Sin embargo, cuando se produce la superposición de estructuras óseas o dientes adyacentes, las raíces de los terceros molares no se pueden visualizar en la posición más adecuada y es enormemente difícil discernir entre un estadio de maduración y otro inmediatamente superior o inferior. Debido a estas dificultades de evaluación, modalidades alternativas de imagen, como la tomografía computarizada y la resonancia magnética, se están abriendo paso en la estimación médico-legal de la edad dental (Yang, Jacobs y Willems, 2006; Graham *et al.*, 2010; Baumann *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015; Basset, Briggs y Drummer, 2011; Treviño-Tijerina *et al.*, 2016). Un ejemplo de esta tendencia es el desarrollo del programa informático DentaVol<sup>®</sup>, que permite una visualización y evaluación más precisas del grado de maduración del tercer molar a partir de imágenes de tomografía computarizada (Figura 2). Este programa permite obtener una imagen tridimensional aislada del tercer molar y evaluar no solo parámetros cualitativos, como son los estadios de mineralización, sino también parámetros cuantitativos, referidos a las medidas volumétricas del diente, con el fin de determinar su grado de maduración. La estimación de la edad dental a partir de estos parámetros, mediante el uso de DentaVol<sup>®</sup>, se ha mostrado además como un buen indicador de la mayoría de edad (Márquez-Ruiz *et al.*, 2017).



**Figura 2.** Comparación entre los esquemas propuestos por Demirjian, Goldstein y Tanner (1973) y las imágenes obtenidas con DentaVol® en los diferentes estadios de desarrollo del tercer molar. Adaptado de Márquez-Ruiz *et al.*, 2017.

## 2.3.2. Cambios en el diente durante el envejecimiento

### 2.3.2.1. Cambios morfológicos

Como consecuencia del proceso natural de envejecimiento, se producen una serie de cambios morfológicos en el diente que pueden ser observados a nivel macroscópico y/o microscópico. Uno de estos cambios es la atrición dental, que consiste en la pérdida de sustancia dentaria como consecuencia del contacto de los dientes con sus antagonistas durante la masticación. No obstante, hay que tener en cuenta que el grado de atrición del diente, debido a la naturaleza del acto masticatorio, puede verse afectado, además de por el paso del tiempo, por el tipo de alimentación, el tipo de oclusión, la morfología dentaria o parafunciones como el bruxismo (Grippe, Simring y Schreiner, 2004). El diente también se oscurece con el paso de los años, adquiriendo un color más amarillento. Existen diversas teorías, más o menos discutibles, que intentan explicar este cambio de color. El principal factor causal parece ser el aumento de grosor de la capa de dentina con la edad, que se traduce en una mayor saturación de su color que, debido a la translucidez y al adelgazamiento progresivo de la capa de esmalte, se hace más dominante (Nanci, 2012a). El color del diente también puede variar por el depósito de sustancias pigmentantes en la superficie dental, procesos patológicos sistémicos y locales, o la

ingesta de ciertas sustancias como las tetraciclinas o el flúor. La recesión gingival, es decir, la migración del margen gingival en sentido apical, también se ha propuesto como un proceso fisiológico vinculado al envejecimiento. Sin embargo, la recesión puede estar causada por diversos factores como la inflamación crónica que acontece en la enfermedad periodontal, el cepillado traumático, malposiciones dentarias, piercings o factores iatrogénicos como un diseño inadecuado de la aparatología removible o movimientos ortodónticos no controlados (Ardila, 2009). Otro cambio que se puede observar en dientes maduros es la transparencia radicular, que comienza en la dentina en la proximidad del ápice y se extiende en sentido coronal con el paso de los años. Este fenómeno se debe al incremento de depósitos de dentina peritubular con la edad, que reduce el diámetro e incluso oblitera los túbulos dentinarios, cambiando el índice de refracción de la dentina radicular (Nanci, 2012b). También a nivel dentinario, la aposición de dentina secundaria se produce de forma fisiológica y gradual una vez que se ha completado la formación del diente. El depósito de dentina secundaria es mucho más lento que el de la dentina primaria, y se produce principalmente en el techo y suelo de la cámara pulpar. Por ello, este depósito es parcialmente responsable de la esclerosis tubular y la reducción del volumen de la pulpa que ocurren durante el envejecimiento (Carvalho y Lussi, 2017). A nivel radicular, se produce la reabsorción de la raíz y un aumento de la rugosidad de su superficie (Solheim y Kvaal, 1993). Además, el cemento aumenta de grosor de manera continua por aposición de nuevas capas (Nanci, 2012c).

El estudio de los principales cambios morfológicos que sufre el diente con el paso del tiempo se ha aprovechado desde el punto de vista forense para proponer modelos predictores que permitan una estimación, lo más aproximada posible, de la edad cronológica del sujeto. No hay que olvidar que estos parámetros, a excepción de la transparencia radicular, que se muestra bastante inalterable, además de ser cambios que ocurren de manera fisiológica en el diente a lo largo de la vida del individuo, pueden estar también ocasionados por diferentes factores externos y patológicos. Gustafson (1950) sentó las bases de esta metodología proponiendo el primer método científico basado en el estudio morfológico del diente seccionado, obteniendo una fórmula que permitía estimar la edad con un error de  $\pm 10$  años. Los parámetros dentales considerados, de mayor a menor correlación con la edad, fueron la transparencia radicular, la atrición, la aposición de dentina secundaria, la reabsorción radicular, la aposición de cemento y la recesión gingival. Más tarde, Bang y Ramm (1970) estudiaron el fenómeno de la transparencia

radicular, pero de una manera más sofisticada. Estos autores presentaron ecuaciones de regresión para dientes seccionados y no seccionados, considerando el tipo de diente y la longitud de transparencia radicular. Posteriormente, Johanson (1971) estudió los cambios estructurales evaluados por Gustafson (1950) y, aportándole un peso específico a cada uno de ellos, aplicó un análisis estadístico de regresión múltiple para obtener una fórmula que ofrecía una mayor exactitud en la predicción de la edad, con un error estándar de  $\pm 5.16$  años. Por su parte, el método dental propuesto por Lamendin *et al.* (1992) presenta como únicos parámetros para la estimación de la edad, la altura del nivel de inserción del ligamento periodontal y la altura de la transparencia radicular. Este método es sencillo, aplicable a ambos sexos y únicamente a dientes unirradiculares, y está considerado como uno de los métodos más precisos para la estimación de edad en sujetos fallecidos de entre 40 y 60 años (Baccino *et al.*, 1999; Martrille *et al.*, 2007). Sin embargo, en edades avanzadas, especialmente cuando existe enfermedad periodontal, el método subestima la edad real (Foti *et al.*, 2001). En 1993, Solheim presentó un modelo de regresión para cada sexo y tipo de diente, excluyendo molares, usando los parámetros que presentaban mayor correlación con la edad y consiguiendo estimaciones cuyo error variaba entre los 7 y los 10 años, según el tipo de diente. Otros métodos valoran únicamente la aposición de dentina secundaria como indicador de la edad dental en adultos, considerando la relación existente entre la pulpa y el diente completo o la raíz, en función de distintas medidas de largura, anchura o área realizadas en radiografías dentales (Kvaal *et al.*, 1995; Cameriere, Ferrante y Cingolani, 2004, Cameriere *et al.*, 2007). La ventaja principal que presentan estos métodos radiográficos es que no son invasivos y no requieren la exodoncia del diente, por lo que pueden ser aplicados tanto en cadáveres como en sujetos vivos.

La informática y el análisis automatizado de imágenes también se han ido incorporado al análisis de los cambios estructurales del diente con la edad. A partir de dientes seccionados y de un programa de análisis adecuado, se pueden cuantificar de forma automática parámetros morfológicos como la atrición dental, la oclusión de la cavidad pulpar, la transparencia radicular, la formación de dentina secundaria y la reabsorción radicular (Mandojana *et al.*, 2001; Valenzuela *et al.*, 2002). Otra de las variables incluidas en algunos de los modelos de regresión propuestos para la estimación de la edad es el color dentinario. En este sentido, la espectrorradiometría se ha propuesto como una técnica válida para medir las coordenadas cromáticas de la dentina de forma objetiva (Martín-de las Heras *et al.*, 2003).

### 2.3.2.2. Cambios histológicos

Durante el envejecimiento, se producen una serie de cambios en cada uno de los tejidos que conforman el diente. En el esmalte, la permeabilidad se reduce, ya que sus poros disminuyen de tamaño a medida que los cristales de hidroxiapatita adquieren más iones y la superficie aumenta. Además, la composición de la capa superficial cambia a medida que se produce el intercambio de iones con el medio oral. Concretamente, se ha observado un progresivo aumento del contenido de fluoruro en la superficie. No obstante, no hay que olvidar que factores externos como la ingesta de agua fluorada o la aplicación tópica de flúor también incrementan el contenido de este mineral en el diente. Otras características del esmalte envejecido, tal y como se han señalado anteriormente, son el desgaste progresivo por la atrición y el cambio de color (Nanci, 2012a).

En la dentina, el depósito continuo de dentina intratubular resulta en una reducción gradual del diámetro de los túbulos, que pueden incluso obliterarse completamente, dando lugar a la dentina esclerótica. Esta dentina se encuentra con frecuencia cerca del ápice radicular en dientes de sujetos de mediana edad. Asociado a la presencia de esclerosis, se produce un aumento de la fragilidad y una reducción de la permeabilidad de la dentina. Otro cambio relacionado con la edad es el aumento de áreas con tractos muertos, es decir, áreas donde los túbulos dentinarios están vacíos o desprovistos de procesos odontoblasticos (Nanci, 2012b).

En la pulpa, se reduce el volumen de la cámara pulpar y del canal radicular como consecuencia del depósito continuo de dentina. En ocasiones, en dientes maduros, el canal radicular puede aparecer obliterado casi al completo. El aporte sanguíneo también se reduce, como consecuencia del estrechamiento de los accesos a través de los forámenes y por procesos degenerativos vasculares. Desde aproximadamente los 20 años de edad, el número de células, especialmente de fibrocitos, disminuye gradualmente hasta los 70 años, momento en el que la densidad celular se ha reducido hasta la mitad. La cantidad de colágeno aumenta de forma proporcional, con un cambio en la distribución de las fibras de colágeno, que adquieren la apariencia de paquetes fibrosos. El cuadro de envejecimiento del órgano pulpar se completa con la degeneración de las fibras nerviosas y el aumento de calcificaciones distróficas, con reducción de la capacidad metabólica y del potencial de reparación de la pulpa (Nanci, 2012b).

Por su parte, el cemento aumenta de grosor con la edad, ya que su aposición se produce de forma continua durante toda la vida, disponiéndose en capas alrededor de la dentina radicular. La aposición de cemento ocurre en fases, dando como resultado dos tipos de capas con diferentes propiedades ópticas y de tinción, debido a su mayor o menor mineralización, y que pueden ser observadas mediante microscopía óptica. Las líneas incrementales más estrechas y de tinción oscura (zonas más mineralizadas) están separadas por bandas más anchas de coloración pálida (zonas hipomineralizadas). La distancia entre una línea incremental y otra representa el depósito de cemento que ha ocurrido durante un año en muchos mamíferos, por lo que el recuento de estas líneas se ha utilizado de forma rutinaria para estimar la edad en animales (Kvaal, Solheim y Bjerketvedt, 1996). En dientes humanos, el recuento de los anillos o líneas incrementales de cemento es un método histológico que se ha empleado como indicador de la edad dental, aunque con una evidente controversia entre los distintos autores respecto a su utilidad en la práctica forense debido a la falta de contundencia de los resultados. Mientras que algunos autores no han detectado una relación entre el número de líneas incrementales y la edad, otros han encontrado una conexión bien correlacionada (Meinl *et al.*, 2008).

### **2.3.2.3. Cambios bioquímicos**

Uno de los métodos más precisos de entre los disponibles para la estimación de la edad en adultos se basa en la racemización del ácido aspártico (RAA) (Meissner y Ritz-Timme, 2010). Este método se fundamenta en el hecho de que las proteínas del organismo se sintetizan utilizando sólo una de las formas ópticamente activas de los aminoácidos, la forma levógira (L). Sin embargo, con el tiempo, esta pureza óptica se pierde por la lenta pero inevitable isomerización de los aminoácidos, es decir, por la transformación de las formas isoméricas L en formas dextrógiras (D) con el fin de alcanzar una mezcla racémica o equilibrada. A este proceso natural se le conoce como racemización. La racemización de los aminoácidos se produce después de que el recambio proteico haya cesado, por lo que aquellas proteínas permanentes con bajo o nulo recambio podrán mostrar una acumulación de D-aminoácidos con la edad (Helfman y Bada, 1975).

El aminoácido elegido para el estudio de la utilidad de la racemización en la estimación forense de la edad ha sido el ácido aspártico, ya que presenta una de las tasas de racemización más altas de entre todos los aminoácidos estables. En 1975, Helfman y Bada publicaron el primer estudio que analizó la RAA en esmalte dental de sujetos vivos, encontrando un aumento del ratio D/L del ácido aspártico con la edad. Desde entonces, diferentes trabajos han demostrado una correlación positiva entre la RAA y la edad en una gran variedad de tejidos. La estimación de la edad basada en la RAA es posible si el tejido analizado contiene una concentración lo suficientemente alta de proteínas metabólicamente estables. Estas proteínas se producen principalmente en tejidos altamente braditróficos, con una baja tasa de recambio proteico (Ritz y Schütz, 1993). Entre estos tejidos se encuentra la dentina (Ohtani y Yamamoto, 2010), el esmalte (Griffin *et al.*, 2008) y el cemento dental (Ohtani, 1995), así como el cristalino (Masters, Bada y Zigler, 1977), la esclerótica (Klumb *et al.*, 2016), la sustancia blanca cerebral (Man *et al.*, 1983), los discos intervertebrales (Ritz y Schütz, 1993), el cartílago costal (Pfeiffer, Mörnstad y Teivens, 1995), el hueso (Ohtani *et al.*, 2002), y la elastina de la piel (Ritz-Timme, Laumeier y Collins, 2003a), las arterias (Dobberstein, Tung y Ritz-Timme, 2010), el ligamento amarillo (Ritz-Timme, Laumeier y Collins, 2003b) o la epiglotis (Matzenauer, Reckert y Ritz-Timme, 2014).

La RAA en tejidos dentales, especialmente en dentina, se considera la mejor opción para la estimación de la edad empleando este método, debido a la simplicidad de la técnica y a una precisión que puede llegar a ser excelente (Ohtani y Yamamoto, 2005). No obstante, se debe tener en cuenta que los dientes deben estar libres de caries para alcanzar una estimación de la edad fiable (Griffin *et al.*, 2008), ya que las bacterias y los procesos infecciosos pueden alterar las tasas de RAA. Además, en personas de edad avanzada, los dientes han estado presentes en la cavidad oral durante un largo periodo de tiempo, por lo que la influencia del ambiente es mayor que en sujetos jóvenes. El nivel de RAA también varía respecto al tipo de diente y su posición en la boca (Ohtani, Ito y Yamamoto, 2003) debido a que cada diente presenta un momento de inicio de la formación del tejido dentinario distinto (Ritz, Schütz y Schwarzer, 1990).

El método basado en la RAA no presenta la amplia variabilidad intraobservador mostrada por los métodos morfológicos tradicionales (Waite *et al.*, 1999). En sujetos de edad avanzada, sin embargo, se encuentra un mayor nivel de variabilidad respecto a los sujetos

jóvenes (Ohtani, Ito y Yamamoto, 2003), una limitación común al resto de métodos. Otra dificultad a tener en cuenta es que se trata un método destructivo, por lo que normalmente se aplica en cadáveres o en dientes ya extraídos de personas vivas. Para alcanzar una buena precisión y obtener resultados comparables, es de suma importancia normalizar todo el proceso analítico, desde la selección y preparación de las muestras, hasta la separación cromatográfica y cuantificación de los enantiómeros (Ritz-Timme *et al.*, 2000). Además, la RAA es un proceso que puede verse influenciado por la historia *post mortem* de la muestra (Ohtani, 2002; Ohtani, Ito y Yamamoto, 2003; Griffin *et al.*, 2008). Bajo condiciones *post mortem* normales, la temperatura ambiente se encuentra muy por debajo de la temperatura corporal del sujeto vivo y, por tanto, la RAA ocurre muy lentamente, ya que es un proceso dependiente de la temperatura (Ogino, Ogino y Nagy, 1985). Sin embargo, la exposición a temperaturas extremadamente altas, como ocurre en el caso de cadáveres quemados, puede introducir grandes errores en la estimación de la edad. Además, los largos intervalos *post mortem* pueden alterar el proceso de RAA, debido a la diagénesis de las proteínas y a la contaminación (Griffin *et al.*, 2009), por lo que el método es adecuado siempre y cuando el intervalo *post mortem* no exceda décadas (Ritz-Timme *et al.*, 2000; Dobberstein *et al.*, 2008; Dobberstein, Tung y Ritz-Timme, 2010). Por todo ello, la fiabilidad de los resultados dependerá en gran medida del tiempo transcurrido tras la muerte y de las condiciones ambientales a las que haya estado sometido el cuerpo durante este periodo (Dobberstein *et al.*, 2008).

A pesar de todas sus limitaciones, la RAA representa en la actualidad el estándar de oro en la estimación de la edad a nivel bioquímico. El error medio entre la edad estimada mediante este método y la edad real se encuentra alrededor de los  $\pm 3$  años (Zapico y Ubelaker, 2013). Además, en comparación con otros métodos moleculares, se dispone de una amplia literatura sobre la estandarización de la metodología y de los procedimientos de muestreo, así como sobre la evaluación de los sesgos potenciales del método.

La evidencia de que se produce una acumulación de productos finales de glicación avanzada (*Advanced Glycation End Products*, AGEs) durante el proceso fisiológico de envejecimiento en diversos tejidos ha dado lugar a que también se considere su utilidad como parámetro para la estimación de la edad (Sato, Kondo y Ohshima, 2001; Pilin *et al.*, 2007). La glicación no enzimática de las proteínas, también conocida como reacción de Maillard, consiste en una serie compleja de reacciones entre azúcares reductores y grupos

amino que conduce al pardeamiento, fluorescencia y reticulación de las proteínas. Los AGEs, que se forman durante las últimas etapas de esta reacción, se acumulan en proteínas de vida media larga, como el colágeno, durante el proceso normal de envejecimiento en la mayoría de los tejidos (Meissner y Ritz-Timme, 2010). Estos incluyen el cristalino (Ramalho *et al.*, 1996), el cartílago (Verzijl *et al.*, 2000), la piel (Dyer *et al.*, 1993), el líquido pericárdico (Simm *et al.*, 2007) y las células piramidales del sistema nervioso central (Li *et al.*, 1995). La formación de AGEs puede alterar las propiedades funcionales de las proteínas, conducir a la rigidez de los tejidos, promover la formación de radicales libres e inducir respuestas inflamatorias, así como intervenir en la regulación génica (Nass *et al.*, 2007). Estas sustancias también se consideran implicadas en la patogénesis de las principales complicaciones de la diabetes, como son la nefropatía y las enfermedades vasculares (Ulrich y Cerami, 2001). Los pacientes diabéticos presentan una generación acelerada de AGEs (Schleicher, Wagner y Nerlich, 1997), mientras que los pacientes con enfermedad renal terminal muestran una mayor acumulación de estos productos debido a una menor eliminación (Koschinsky *et al.*, 1997). Los AGEs también se pueden originar de forma exógena, como consecuencia del calentamiento de los alimentos. Sin embargo, la contribución de estos AGEs exógenos a la alteración de las proteínas durante el proceso de envejecimiento se encuentra bajo discusión, aunque existe evidencia experimental de su absorción en el intestino (Koschinsky *et al.*, 1997; Ulrich y Cerami, 2001).

Los métodos basados en la correlación entre la acumulación de AGEs en los tejidos y la edad se ven limitados por la heterogeneidad de este grupo de sustancias y de los métodos de detección, así como por la falta de procedimientos estandarizados. A esto se debe añadir que las lesiones por quemaduras alteran esta correlación, ya que el calentamiento induce la formación de estos productos. De igual manera, en sujetos diabéticos la acumulación acelerada de AGEs conduce a sobreestimaciones de la edad. Además, cuanto mayor sea la edad del sujeto, mayor será la exposición a todas aquellas variables que influyen en la acumulación de estos productos (Meissner y Ritz-Timme, 2010). Por todo ello, todavía se hace necesario una mejor evaluación de los parámetros que influyen en este proceso, encontrar el mejor sustrato, y estandarizar los procedimientos de muestreo y la metodología desarrollada, con el fin de hallar la verdadera utilidad del método para la estimación forense de la edad.

Siguiendo esta línea de investigación, en la Universidad de Granada, se ha estudiado la relación de la furosina y la pentosidina, que se forman en las etapas temprana y avanzada de la reacción de Maillard, respectivamente, con la edad en hueso y dentina. Mientras que se encontró una fuerte correlación entre el contenido de estos productos en ambos tejidos y la edad, los mejores resultados, en cuanto a la estimación de la edad del individuo, se observaron aplicando un modelo de regresión lineal múltiple, en el que los valores de furosina y pentosidina en dentina estaban presentes, que ofreció un error estándar de 6.19 años (Valenzuela *et al.*, comunicación personal).

Otras investigaciones de esta Universidad han contribuido al conocimiento de los cambios bioquímicos que experimenta el diente con la edad mediante el estudio de la degradación del colágeno de la dentina. La primera aproximación se llevó a cabo midiendo los enlaces de deoxipiridinolina (DPD), que estabilizan fisiológicamente las cadenas de colágeno maduras de la matriz extracelular de la dentina, detectándose un incremento con la edad. Mediante regresión lineal, se obtuvieron ecuaciones para el cálculo de la edad a partir del valor de DPD, con un error estándar de 14.34 años (Martín-de las Heras, Valenzuela y Villanueva, 1999). Sin embargo, otros autores, en un estudio posterior, no encontraron relación entre la concentración de DPD en dentina y la edad del individuo (Açil *et al.*, 2002). Una segunda contribución consistió en el hallazgo e identificación de la enzima gelatinasa A en dentina humana y el estudio de su relación con la edad. Los patrones de distribución de esta enzima difirieron en las distintas fracciones proteicas de dentina analizadas y estos cambios variaron con la edad (Martín-de las Heras, Valenzuela y Overall, 2000a). Además, no se detectó la presencia de gelatinasa A en fracciones proteicas de dentina desmineralizada en sujetos mayores de 41 años (Martín-de las Heras, Valenzuela y Overall, 2000b).

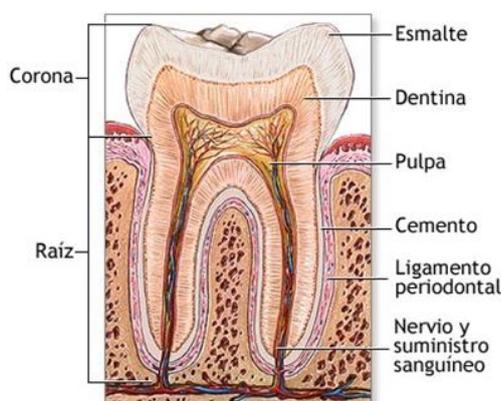
#### **2.3.2.4. Cambios moleculares**

##### **2.3.2.4.1. El ADN en el diente**

Los dientes se consideran una muestra forense de elección para la obtención de ADN a partir de tejidos mineralizados. Debido a su composición única y a su ubicación dentro de los maxilares, los dientes se encuentran bien protegidos frente a las condiciones

ambientales y físicas que aceleran los procesos de degradación *post mortem* del ADN. Además, el ADN dental es a menudo de mayor calidad y menos propenso a la contaminación que el ADN extraído de los huesos (Higgins y Austin, 2013).

En cuanto a la distribución del ADN en el diente, se ha demostrado que las raíces, compuestas de cemento, dentina y pulpa, ofrecen más ADN que la corona (Gaytmenn y Sweet, 2003), que, aunque también contiene dentina y pulpa, está compuesta predominantemente de esmalte (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura interna del diente. Tomado de [www.adamimages.com](http://www.adamimages.com).

El esmalte, que cubre la corona del diente, es el tejido más duro del cuerpo humano. Este tejido es de contenido mineral en el 96 % de su peso, por lo que es acelular y no contiene ADN (Nanci, 2012a). El esmalte proporciona una barrera física que protege a las células del interior del diente de las condiciones adversas externas tales como el calor, la luz ultravioleta, la humedad y los microorganismos (Pinchi *et al.*, 2011). Aunque el esmalte *in vivo* presenta una permeabilidad limitada (Bertacci *et al.*, 2007), el tamaño de los poros entre sus cristales minerales es extremadamente pequeño, impidiendo la penetración de moléculas de mayor tamaño que el agua. Esta característica es de particular importancia para la preservación del ADN ya que permite restringir el acceso de microorganismos y contaminantes ambientales al diente tanto *in vivo* como después de la muerte (Higgins y Austin, 2013).

El complejo dentino-pulpar forma la mayor parte de la estructura dental y, a diferencia del esmalte, es altamente celular. La dentina presenta un 65 % de su peso de contenido

mineral en forma de hidroxiapatita carbonatada, macromoléculas orgánicas (principalmente colágeno) y agua. Generalmente, la dentina no contiene cuerpos celulares nucleados, aunque las células odontoblásticas pueden quedar atrapadas en la dentina durante la formación de la dentina terciaria, una respuesta común a la caries dental. La dentina es un tejido estructuralmente único, densamente perforado por los túbulos odontoblásticos, paralelos y anillados por el mineral, que la atraviesan desde la cámara pulpar. Estos túbulos contienen procesos de células odontoblásticas y fibras nerviosas (Nanci, 2012b). Por su parte, la pulpa es un tejido conectivo ricamente vascularizado e innervado que contiene numerosos tipos celulares. Estos incluyen odontoblastos, fibroblastos, células de defensa, como los histiocitos y los macrófagos, células plasmáticas, células nerviosas y células mesenquimales indiferenciadas. Los odontoblastos están orientados con sus cuerpos celulares a lo largo del borde de la pulpa y sus largos procesos tisulares se extienden a través de la dentina. Las células que se encuentran en mayor número en el tejido pulpar son los odontoblastos y los fibroblastos (Chiego y Avery, 2014). La pulpa se interconecta con los tejidos periodontales mediante el ápice radicular y los canales accesorios, a través de los cuales pasan los vasos sanguíneos. Los canales accesorios se sitúan predominantemente a lo largo de la mitad inferior de la raíz y, en molares, a través del suelo de la cámara pulpar hacia el área de la furca (Vertucci y Anthony, 1986). Dada la celularidad relativamente alta de la pulpa, este tejido proporciona la fuente más rica de ADN en los dientes (Malaver y Yunis, 2003). Sin embargo, la pulpa puede encontrarse en cantidad limitada o incluso ausente en dientes envejecidos y/o con patologías (Higgins y Austin, 2013).

El cemento es un tejido avascular mineralizado de estructura laminada que cubre las raíces de los dientes. Está compuesto por un 45-50 % de mineral inorgánico (hidroxiapatita), colágeno y proteínas de matriz no colágenas. El cemento se clasifica en dos tipos en base a la presencia o ausencia de células (cementocitos) (Chiego y Avery, 2014). El cemento celular es fuente de ADN, ya que contiene cementocitos dentro de la matriz extracelular (Yamamoto *et al.*, 2010). El cemento celular es similar a la composición física y química del hueso, aunque es estructural y funcionalmente diferente (Bosshardt, 2005). Este tipo de cemento es avascular, no tiene innervación y contiene menos sales inorgánicas. A diferencia del cemento óseo, no experimenta una remodelación mantenida, sino que su espesor se incrementa continuamente a lo largo de la vida (Gonçalves *et al.*, 2005). El cemento celular se observa predominantemente en la

porción apical de las raíces y en el área de la furca de los molares (Štamfelj *et al.*, 2008), y puede estar ausente en los dientes anteriores (Bosshardt, 2005). Otras fuentes de ADN asociadas al cemento incluyen inclusiones de tejidos blandos, residuos de sangre, vasos que lo atraviesan a través de canales accesorios, tejidos periodontales adheridos y fragmentos de hueso atrapados entre las raíces de los molares (Higgins y Austin, 2013).

El contenido total de ADN en el diente varía considerablemente entre individuos y también entre dientes de un mismo individuo (Gaytmenn y Sweet, 2003). Algunos de los factores que influyen en el contenido de ADN incluyen el tipo de diente, la edad cronológica del individuo y el estado de salud del diente.

Los cuatro tipos de dientes humanos (incisivos, caninos, premolares y molares) difieren en forma y tamaño, pero presentan una estructura histológica similar (Malaver y Yunis, 2003). Diversos estudios, que comparan el contenido de ADN entre diferentes tipos de dientes, han demostrado que los dientes con mayor volumen de pulpa proporcionan la mejor fuente de ADN (De Leo, Turrina y Marigo, 2000), debido a la mayor presencia de células en este tejido. También se ha demostrado que se obtiene más ADN de los dientes multirradiculares que de los unirradiculares (De Leo, Turrina y Marigo, 2000), probablemente debido a un mayor volumen pulpar y a una mayor superficie radicular que permite una mayor presencia de cemento. Cabe señalar que los dientes multirradiculares no sólo tienen una superficie radicular mayor, sino que también contienen más cemento celular por superficie de raíz que los dientes unirradiculares, que en algunos casos presentan poco o ningún cemento celular (Higgins y Austin, 2013). Por tanto, cuando se disponga de varios dientes de un mismo individuo para el análisis del ADN se deben seleccionar aquellos con mayor volumen pulpar y superficie radicular, siendo los molares los candidatos de elección, tal y como indican los protocolos de INTERPOL en su Guía de Identificación de Víctimas de Catástrofes (2014) y las recomendaciones de la *International Society for Forensic Genetics* para la identificación genética en grandes catástrofes (Prinz *et al.*, 2007). En ausencia de molares, se espera que los premolares tengan más cemento celular que los dientes anteriores, aunque los caninos tendrán un volumen de pulpa mayor. Cuando se selecciona un diente, también debe tenerse en cuenta si el diente no ha llegado a erupcionar, ya que los dientes retenidos en su alveolo están protegidos en su totalidad por el hueso alveolar, por lo que presentan menos posibilidades

de contaminación (Álvarez-García *et al.*, 1996). Además, los dientes multirradiculares tienen menos probabilidad de pérdida *post mortem* que los dientes anteriores.

El aumento de la edad cronológica produce una serie de cambios en los tejidos dentales que también afectan al contenido de ADN del diente. El cambio negativo más evidente es la disminución del volumen de la pulpa como resultado de la deposición continua de dentina secundaria. La pulpa no sólo disminuye en volumen con el tiempo, sino que también se reduce en celularidad y se vuelve más fibrosa. Como parte del proceso de envejecimiento, la dentina aumenta en volumen y también se vuelve progresivamente esclerótica. El proceso de esclerosis implica la oclusión de los túbulos dentinarios con cristales de fosfato de calcio y la posterior degeneración de los procesos odontoblásticos y las fibras nerviosas asociadas (Nanci, 2012b). Un cambio positivo que se produce con la edad es que la cantidad de cemento celular aumenta con la edad, aunque se ha observado que los cementocitos sólo son viables a una profundidad limitada, ya que dependen de los nutrientes del ligamento periodontal que deben difundirse a través del cemento a las células (Chiego y Avery, 2014). Otros cambios que ocurren con la edad pueden afectar a la preservación *post mortem* del ADN. Por ejemplo, el esmalte se mineraliza con mayor intensidad a lo largo del tiempo (Bertacci *et al.*, 2007), aunque también se pierde por desgaste natural, y la dentina disminuye en porosidad debido a la oclusión de los túbulos (Senawongse *et al.*, 2008). Por todo ello, el avance de la edad conduce a una disminución en el contenido de ADN y a un cambio en su distribución. Mientras que en personas maduras los molares siguen siendo los dientes de elección para el análisis del ADN, factores como el nivel de desgaste de los dientes y la abundancia de cemento deben ser considerados al seleccionar la muestra. Además, en estos casos, la elección del diente puede estar limitada por el aumento de la exposición a patologías dentales, tratamientos y pérdidas dentales (Higgins y Austin, 2013).

Las patologías dentales tienen un impacto negativo en el contenido de ADN de los dientes. La caries dental, una enfermedad microbiana, da como resultado la destrucción localizada de los tejidos calcificados de los dientes. Esto facilita la entrada de bacterias a la pulpa, tanto directamente como a través de los túbulos dentinarios vacíos, que producen muerte celular. En respuesta a la caries, la pulpa se retrae y la dentina terciaria se deposita. Esta dentina terciaria presenta una estructura menos organizada que la dentina primaria y secundaria y, como la deposición ocurre a una velocidad rápida, los

cuerpos celulares de los odontoblastos pueden encapsularse en el tejido mineralizado (Lee *et al.*, 2006). En última instancia la caries puede conducir a una pérdida completa de la pulpa o a la pérdida del diente. El cemento celular sólo puede verse afectado por la caries si está expuesto a la cavidad oral, lo que puede ocurrir en la enfermedad periodontal avanzada. La periodontitis, o enfermedad periodontal, es una enfermedad inflamatoria inducida por placa que afecta las estructuras de soporte del diente, esto es, hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento. La acumulación de placa en la superficie de los dientes conduce a la inflamación crónica y a la producción de toxinas, que destruyen los tejidos de soporte y alteran su unión al diente. Durante el progreso de la enfermedad se destruye el hueso alveolar que conduce a una pérdida de unión, una reducción de la altura de la encía alrededor del diente y la exposición del cemento a la cavidad oral. El cemento afectado por la enfermedad periodontal pierde el apego a las fibras periodontales, y se recubre con placa y cálculo (Daly *et al.*, 1979). La enfermedad periodontal avanzada que afecta al cemento celular puede conducir a una reducción en la disponibilidad de ADN debido a la pérdida física del cemento, como resultado del tratamiento dental dirigido a eliminar el tejido afectado, y a la muerte de los cementocitos. Por tanto, las enfermedades dentales no sólo reducen la cantidad de ADN disponible, sino que también aumentan el potencial de contaminación. Es por ello que los dientes seleccionados para el análisis del ADN deben estar intactos. Sin embargo, es importante señalar que los dientes con patologías y aquellos que han recibido tratamiento dental todavía pueden producir suficiente ADN para la extracción y amplificación, aunque esto requiere una cuidadosa valoración tanto de la extensión de la enfermedad como de los tejidos específicos disponibles para la extracción (Higgins y Austin, 2013).

En relación a la degradación *post mortem* del ADN en el diente, esta ha demostrado ser dependiente del tiempo, aunque esta relación es compleja y se ve claramente afectada por diversos factores ambientales (Rubio *et al.*, 2009, Rubio *et al.*, 2013). La degradación del ADN en el período *post mortem* se inicia mediante la liberación de enzimas intracelulares endógenas (lipasas, nucleasas y proteasas), y se continúa por la acción de enzimas exógenas producidas por microorganismos invasores e invertebrados ambientales (Alaeddini *et al.*, 2010). La porosidad limitada de los dientes y su ubicación protegida restringen físicamente la acción de los organismos exógenos en las células de los dientes. Sin embargo, las enzimas endógenas siguen actuando y los procesos de hidrólisis y oxidación espontánea siguen ocurriendo, aunque de una forma más lenta respecto a cómo

actúan los organismos exógenos (Higgins y Austin, 2013). La pulpa se descompone a un ritmo más lento que otros tejidos blandos (Boy, Bernitz y Van Heerden, 2003), presumiblemente debido a que se encuentra bien protegida frente a las condiciones adversas y a la naturaleza única de las células que la componen. Se ha demostrado que la pulpa es biológicamente viable, es decir, que contiene al menos un 50 % de células viables, durante más de 12 horas de período *post mortem* y aún muestra células viables transcurridas 24 horas tras la muerte (Caviedes-Bucheli *et al.*, 2006). Además, si el cadáver se encuentra en un ambiente seco, se estimulará la desecación de la pulpa, protegiendo así al ADN de los daños hidrolíticos, mientras que un ambiente húmedo permitirá la putrefacción y destrucción completa de la pulpa (Pötsch *et al.*, 1992).

El componente mineral de los dientes, por su parte, preserva el ADN humano actuando de barrera física frente a los microorganismos y contaminantes (Milos *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que esta preservación del ADN también se ve reforzada por su adsorción por parte de la hidroxiapatita (Collins *et al.*, 1995). Durante la diagénesis *post mortem* ocurre una reprecipitación de los tejidos mineralizados por lo que potencialmente el ADN puede asociarse al componente mineral del diente. A pesar de que el ADN se conserva en los tejidos duros dentales, aún no se conoce la naturaleza exacta de la asociación del ADN al contenido mineral ni la fase del proceso de descomposición en la que esta se produce (Higgins y Austin, 2013). Los efectos de la descomposición *post mortem* en los tejidos duros del diente también son poco conocidos, aunque la asociación íntima entre el colágeno y la hidroxiapatita parece ser la causa de que estos tejidos sean extremadamente estables durante este proceso (Turner-Walker, 2008). El colágeno mineralizado se encuentra protegido físicamente de los procesos de hidrólisis y disolución por los cristales minerales (Collins *et al.*, 1995). Por tanto, la pérdida de colágeno sólo puede ocurrir tras la disolución de los minerales, que son termodinámicamente estables. Sin embargo, la solubilidad de la hidroxiapatita sí se ve afectada tanto por la presencia de agua como por el pH y la porosidad del tejido mineralizado (Turner-Walker, 2008). Ciclos de humedad y sequía o un flujo continuo de agua causan más daño a los tejidos mineralizados del diente que un entorno anegado de agua de forma permanente (Turner-Walker, 2008). Por tanto, la pérdida del contenido mineral y la degradación del colágeno dependerán más de las condiciones ambientales que del intervalo *post mortem* de los restos (Dobberstein *et al.*, 2008; Turner-Walker, 2008).

En resumen, el tiempo transcurrido desde la muerte y las condiciones ambientales bajo las cuales se descompone un cuerpo tendrán efecto sobre la probabilidad de que el análisis de ADN se realice con éxito y sobre el tejido dental que albergará mayor cantidad de ADN. Un intervalo *post mortem* corto y/o un ambiente seco favorecerán la preservación del ADN en la pulpa, mientras que un intervalo *post mortem* largo y/o un ambiente húmedo aumentará la dependencia hacia los tejidos duros dentales para la obtención de ADN (Higgins y Austin, 2013). Además, es importante tener en cuenta que el ADN obtenido a partir de restos esqueléticos presenta una serie de características físico-químicas debidas a la degradación *post mortem* del material genético. Estas incluyen la escasez y fragmentación de las cadenas, las modificaciones moleculares del ADN, y la presencia de inhibidores de la PCR en los extractos, principalmente compuestos del suelo o subproductos de la propia degradación del ADN (Barrio-Caballero, 2013).

#### **2.3.2.4.2. Métodos moleculares para la estimación de la edad**

Los cambios observados en el ADN como consecuencia del envejecimiento han servido como base para el desarrollo de métodos moleculares para la estimación forense de la edad. Entre ellos destacan el análisis de los marcadores de metilación del ADN y el acortamiento telomérico.

La metilación del ADN es un proceso fisiológico que consiste en la unión covalente de un grupo metilo al carbono 5' de las citosinas de los dinucleótidos CpG localizados en las regiones promotoras de los genes. La metilación del ADN es un mecanismo habitual de control de diferentes procesos celulares como la protección de la integridad del genoma, el mantenimiento de patrones de expresión específicos de cada tejido o la definición de la impronta genética. La distribución de estos patrones de metilación es específica de cada tipo celular y se establece durante el desarrollo embrionario. La alteración de los patrones de metilación del ADN puede ocurrir por un incremento o hipermetilación, que conlleva una represión de la transcripción génica, o por una disminución o hipometilación, con la consecuente activación de esta transcripción (Jaenisch y Bird, 2003).

Durante el desarrollo temprano del embrión, los patrones de metilación del ADN se establecen para ayudar en la diferenciación celular, permitiendo así que las células tengan

estructuras y funciones específicas (Straussman *et al.*, 2009). Los patrones de metilación establecidos permanecen relativamente estables durante toda la vida. Sin embargo, durante el desarrollo y el envejecimiento la metilación del ADN sufre cambios. Los factores subyacentes a estos cambios incluyen la diferenciación celular, el envejecimiento, factores ambientales y factores genéticos. El envejecimiento puede modificar la metilación del ADN a través de la deriva epigenética y el reloj epigenético. La deriva epigenética está causada por la acumulación estocástica de pequeños errores en la transmisión y mantenimiento de la metilación del ADN (Martin, 2005). Por su parte, el reloj epigenético se refiere al fenómeno por el cual sitios específicos del genoma sufren cambios en la metilación del ADN con la edad, que son progresivos y comunes entre individuos y a veces incluso entre tejidos (Hannum *et al.*, 2013; Horvath, 2013). Sin embargo, diversos estudios han sugerido que las variaciones que se pueden dar entre individuos en la metilación del ADN vienen determinadas en su mayoría por factores genéticos (Bjornsson *et al.*, 2008; Kaminsky *et al.*, 2009). Asimismo, se ha sugerido que factores ambientales como la dieta, el estrés o el tabaquismo, también pueden alterar la metilación del ADN en diversas etapas del desarrollo humano (Pal y Tyler, 2016).

Los cambios en la metilación del ADN asociados a la edad han sido ampliamente estudiados tanto a nivel general como en regiones específicas del ADN. Diversos estudios han mostrado un aumento de la metilación del ADN en los primeros años de vida y una pérdida gradual en etapas posteriores a lo largo de todo el genoma (Jones, Goodman y Kobor, 2015). Tras el nacimiento, los niveles medios de metilación del ADN aumentan en la sangre durante el primer año de vida, y después del primer año, los niveles medios de metilación se mantienen relativamente estables, excepto en algunas regiones en las que frecuentemente aumentan (Martino *et al.*, 2011). Tras alcanzar la edad adulta, la metilación del ADN en general disminuye a lo largo de todo el genoma y, de forma específica, en los elementos repetitivos (Jones, Goodman y Kobor, 2015).

Con el desarrollo de la tecnología de microarrays, se han detectado cambios más específicos en la metilación del ADN en determinados genes o regiones genómicas que han mostrado una fuerte correlación con la edad (Koch y Wagner, 2011; Bell *et al.*, 2012; Jones, Goodman y Kobor, 2015). Si bien existe evidencia de que el cambio en los patrones de metilación del ADN es independiente del tejido (Horvath *et al.*, 2012), lo que podría convertirse en una herramienta útil para estimar la edad de un individuo, la tasa de

aumento del nivel de metilación generalmente varía en función del tipo de tejido (Issa, 2003).

Diversos estudios han propuesto modelos estadísticos para estimar la edad que podrían aplicarse a un amplio espectro de tejidos, así como en sangre o saliva, con un error inferior a los 5 años (Bocklandt *et al.*, 2011; Hannum *et al.*, 2013; Horvath, 2013; Weidner *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2015; Zbieć-Piekarska *et al.*, 2015; Bekaert *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Freire-Aradas *et al.*, 2016). Cabe destacar que el análisis de la metilación de todo el genoma requiere de una cantidad sustancial de ADN, tiempo y esfuerzo. Por tanto, aquellos ensayos que precisen del análisis de unos cuantos sitios CpG resultará más atractivo para los investigadores forenses, siempre y cuando proporcione una precisión comparable a la ofrecida por el análisis del genoma completo. Por todo lo mencionado anteriormente, la metilación del ADN se considera en la actualidad el biomarcador predictivo de la edad más prometedor (Lee, Lee y Shin, 2016).

Otro marcador del envejecimiento es el acortamiento telomérico. Los telómeros son estructuras especializadas que se localizan en los extremos de los cromosomas lineales protegiéndolos de la degradación y la fusión (Martínez y Blasco, 2015). Tras cada división celular, la incapacidad de la enzima ADN polimerasa para replicar completamente el extremo 3' de la hebra molde de ADN produce un acortamiento de la longitud del telómero (Olovnikov, 1973). Otros mecanismos también pueden contribuir a este acortamiento, incluyendo la acción de las nucleasas, el daño oxidativo y el estrés del propio proceso de replicación (Blackburn, Epel y Lin, 2015). En aquellas células en las que normalmente se expresa, como las células germinales, las células madre o las células tumorales, la enzima telomerasa puede compensar este desgaste añadiendo repeticiones teloméricas en los extremos de los cromosomas (Zhao *et al.*, 2014; Martínez y Blasco, 2015). Sin embargo, en las células somáticas normales no se detecta actividad de esta enzima. En consecuencia, tras varios ciclos de división celular, los telómeros alcanzan una longitud crítica que conduce a la senescencia celular (Stewart *et al.*, 2012). Por tanto, la teoría telomérica del envejecimiento se fundamenta en los siguientes principios básicos: el envejecimiento es un proceso programado, el acortamiento telomérico da lugar a un paro irreversible del ciclo celular y aquellas células en las que no se expresa la telomerasa solo pueden alcanzar un número limitado y característico de divisiones,

conocido como límite de Hayflick (López-Otín *et al.*, 2013; Bernadotte, Mikhelson, y Spivak, 2016).

En esta línea, diferentes trabajos, algunos destinados al estudio del envejecimiento y otros orientados específicamente a la estimación de la edad con fines forenses, han mostrado una relación inversa entre la longitud de los telómeros y la edad en una variedad de células y tejidos (Harley, Futcher y Greider, 1990; Takubo *et al.*, 2002; Tsuji *et al.*, 2002; Takasaki *et al.*, 2003; Karlsson *et al.*, 2008; Hewakapuge *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2009; Mokry *et al.*, 2010; Takubo *et al.*, 2010; Kumei *et al.*, 2011; Srettabunjong *et al.*, 2014). No obstante, se debe tener en cuenta que la longitud del telómero depende de las características del individuo, viéndose afectada por una combinación de factores genéticos, epigenéticos y medioambientales (Bekaert, De Meyer y Van Oostveldt, 2005; Ren *et al.*, 2009; Shammas, 2011). Por tanto, la longitud telomérica varía entre sujetos de la misma edad e incluso entre tejidos del mismo sujeto (Oeseburg *et al.*, 2010), mostrando éstos diferentes niveles de atrición (Bekaert, De Meyer y Van Oostveldt, 2005). Además, comparando diferentes células del mismo tejido se revela que cada una muestra diferentes longitudes de sus telómeros, haciendo necesario el cálculo de una longitud media (Tsuji *et al.*, 2002).

Por todo ello, las investigaciones dedicadas a la estimación de la edad basada en la longitud telomérica se dirigen hacia el análisis de diferentes tejidos, la mejora de los procedimientos de análisis, la comparación de datos de medida en un mismo sujeto y el empleo de tamaños de muestra amplios, con el fin de alcanzar una mayor fiabilidad del método.

### 3. BIOLOGÍA DEL TELÓMERO

Los telómeros son estructuras especializadas de ADN y proteínas asociadas que se localizan en los extremos de los cromosomas lineales. Su función principal consiste en asegurar la estabilidad de los cromosomas, protegiendo al ADN genómico de la degradación y la fusión y salvaguardando la correcta segregación del material genético durante la división celular.

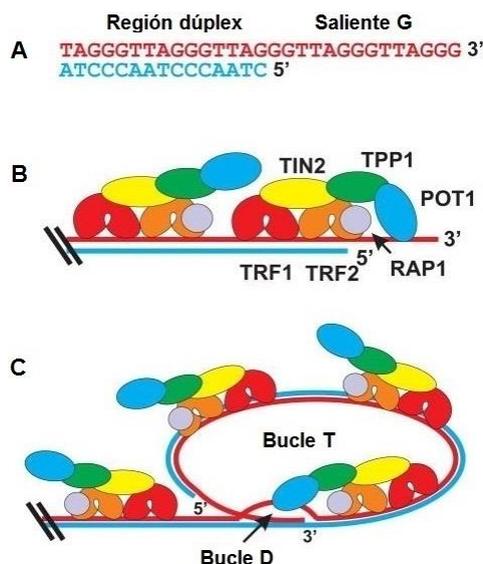
#### 3.1. ESTRUCTURA DEL TELÓMERO

##### 3.1.1. ADN telomérico

El ADN telomérico humano comprende alrededor de 10 a 15 kilobases de repeticiones en tándem de una secuencia de seis nucleótidos. Estructuralmente, los telómeros contienen una región de ADN de doble cadena, que abarca su mayor parte, y una región de ADN de cadena sencilla. Así, la hebra 3', rica en guanina (hebra G), está formada por la secuencia de nucleótidos 5' TTAGGG, con un saliente monocatenario de 30 a 400 nucleótidos de extensión en su extremo 3', mientras que la hebra complementaria 5', rica en citosina (hebra C), muestra la secuencia 5' CCCTAA (Martínez y Blasco, 2015) (Figura 4).

La naturaleza rica en guanina del ADN telomérico promueve la formación de estructuras de orden superior, conocidas como G-cuadrupeles. Estas estructuras se forman cuando cuatro bases de guanina se unen a través de enlaces de hidrógeno de Hoogsteen para formar una estructura plana, estabilizada por un catión monovalente, que se apila con otras similares. En los seres humanos, estas estructuras teloméricas se han implicado en la protección de los telómeros, la supresión de la recombinación y la inhibición de la extensión del telómero dependiente de la enzima telomerasa (Lu *et al.*, 2013). Además, el saliente 3' puede plegarse sobre sí mismo e invadir la región telomérica de doble cadena

formando el llamado bucle telomérico o bucle T, y generando a su vez un bucle de desplazamiento, o bucle D, en el lugar de la invasión (Figura 4). La formación del bucle T tiene como función proteger los extremos de los cromosomas de la degradación y de los mecanismos de reparación del ADN, así como de la acción de la telomerasa (Martínez y Blasco, 2015).



**Figura 4.** Estructura del telómero. (A) ADN telomérico, (B) complejo protector o shelterina y (C) formación del bucle T. Adaptado de Stewart *et al.*, 2012.

### 3.1.2. Complejo protector o shelterina

El ADN telomérico se encuentra asociado a un complejo especializado de seis proteínas conocido como complejo protector o shelterina (Figura 4). Este complejo tiene como funciones esenciales permitir a las células distinguir los extremos naturales de los cromosomas de sitios de rotura del ADN, reprimir las respuestas de reparación del ADN y regular el mantenimiento de la longitud de los telómeros dependiente de la telomerasa (Palm y De Lange, 2008). La especificidad de la shelterina por el ADN telomérico se debe al reconocimiento de las repeticiones TTAGGG por tres de sus componentes: los factores de unión a repeticiones teloméricas 1 y 2 (TRF1 y TRF2, respectivamente), que se unen al ADN bicatenario de los telómeros; y la proteína protectora de telómeros 1 (POT1), que se une a las repeticiones teloméricas del saliente 3' monocatenario. TRF1 y

TRF2 reclutan hacia el telómero al resto de proteínas del complejo, esto es, el factor nuclear 2 de interacción con TRF1 (TIN2), la proteína activadora/represora 1 (RAP1), la proteína tripeptidil peptidasa 1 (TPP1) y POT1. TIN2 y TPP1 actúan como proteínas enlazadoras que mantienen unido el complejo: TIN2 estabiliza el complejo interactuando con TRF1, TRF2 y TPP1, mientras que TPP1, a su vez, interacciona con POT1 formando así un vínculo entre el saliente 3' y las proteínas de unión al dúplex de ADN telomérico. Por su parte, RAP1 interactúa con TRF2 (Palm y De Lange, 2008).

TRF1 y TRF2 son estructuralmente similares (Palm y De Lange, 2008) aunque desempeñan funciones diferentes. Mientras TRF1 ayuda a promover la replicación a través del dúplex de ADN telomérico (Sfeir *et al.*, 2009), TRF2 desempeña funciones destinadas a garantizar el mantenimiento del saliente 3' y evitar su degradación (Zhu *et al.*, 2003). TRF2 también desempeña un papel clave en la generación del saliente monohebra tras la replicación del ADN mediante el reclutamiento de la nucleasa Apollo (Wu *et al.*, 2010).

POT1 y TPP1 actúan juntas formando un heterodímero que regula la actividad de la telomerasa y el acceso al saliente 3' (Baumann y Price, 2010). Una función clave de POT1-TPP1 es prevenir que el complejo proteína de replicación A (RPA), de unión al ADN de cadena sencilla, se una al saliente 3' y provoque una respuesta al daño del ADN mediada por la proteína ATR (relacionada con ataxia-telangiectasia y RAD3) (Denchi y De Lange, 2007). POT1 y TPP1 también intervienen en la regulación de la longitud de los telómeros (Baumann y Price, 2010). Ambas proteínas regulan la acción de la telomerasa en el extremo del cromosoma, aunque lo hacen de distinto modo. Mientras POT1 puede secuestrar el extremo 3' del ADN telomérico para hacerlo inaccesible a la telomerasa (Churikov y Price, 2008), TPP1 participa en el reclutamiento de la enzima y estimula su actividad mediante el aumento de su procesividad (Zaug *et al.*, 2010).

TIN2 juega un papel clave en la estabilización de la shelterina y el mantenimiento de la asociación del resto de componentes del complejo al telómero (O'Connor *et al.*, 2006). Además, la interacción TIN2-TPP1 es responsable de la asociación de POT1-TPP1 con la región dúplex del ADN telomérico, lo que puede ayudar a POT1 a competir con RPA para unirse al saliente 3' o a la base del bucle T (Kibe *et al.*, 2010). TIN2 también juega

un papel importante en el mantenimiento de la integridad de los cromosomas a través de interacciones con proteínas que no forman parte de la shelterina (Stewart *et al.*, 2012).

Por último, RAP1 funciona en tándem con TRF2 para prevenir la recombinación no homóloga y las fusiones cromosómicas (Sarthý *et al.*, 2009). Además, esta proteína ha sido encontrada en asociación con repeticiones TTAGGG localizadas en regiones extra-teloméricas, donde parece desempeñar un papel en la regulación de la expresión génica (Martínez *et al.*, 2010).

### **3.1.3. Otras proteínas asociadas al telómero**

Además del complejo shelterina, los telómeros presentan otras proteínas asociadas que contribuyen de manera importante al mantenimiento y la protección de los extremos de los cromosomas. Un gran número de estas proteínas son reclutadas hacia el telómero por el complejo shelterina, por lo que se suele hacer referencia a ellas como factores accesorios de la shelterina, siendo TRF1, TRF2 y POT1 los mediadores implicados en estas interacciones. Algunos de estos factores se asocian a los telómeros de forma transitoria y la mayoría presentan además funciones no teloméricas, siendo más abundantes en otras localizaciones del núcleo o del citoplasma (Palm y De Lange, 2008; Diotti y Loayza, 2011). Estas proteínas accesorias se encuentran implicadas tanto en los procesos de reparación (Ku70/Ku80, ERCC1/XPF, Apollo, el complejo MRN, RAD51D y la familia PARP), señalización del daño (el complejo MRN y el complejo 9-1-1) y replicación del ADN (el complejo ORC y las helicasas de la familia RecQ) como en aquellos procesos involucrados en las modificaciones de la conformación estructural de la cromatina (HP1) (Palm y De Lange, 2008).

Por otro lado, se ha identificado un complejo proteico adicional, conocido como CST, que se asocia a los telómeros y comprende tres subunidades: el componente conservado de protección del telómero 1 (CTC1), el supresor de Cdc13 1 (STN1) y la proteína de la vía telomérica con STN1 (TEN1). El complejo CST presenta similitudes estructurales y funcionales con RPA y, aunque se une al ADN monocatenario, no muestra especificidad por la secuencia de ADN telomérico (Miyake *et al.*, 2009). Por tanto, este complejo

desempeña sus funciones tanto en los telómeros como en otras partes del genoma (Stewart *et al.*, 2012). La coexistencia de la shelterina y el complejo CST en el telómero sugiere una división de tareas entre ambos complejos. Mientras que la shelterina destaca como responsable de la protección de los telómeros (Palm y de Lange, 2008), el complejo CST es necesario para la replicación a través del dúplex de ADN telomérico (Stewart *et al.*, 2012) y la síntesis de relleno de la hebra C tras la acción de la telomerasa (Wang *et al.*, 2012).

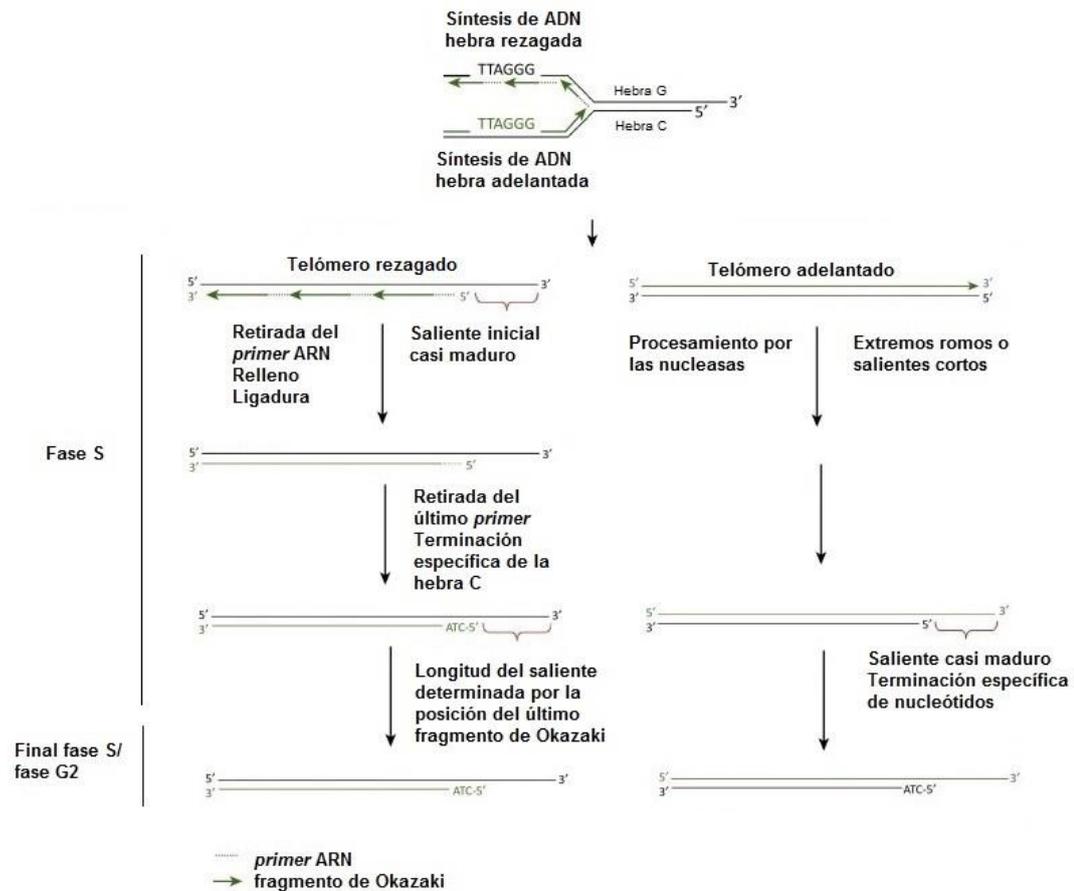
### 3.2. REPLICACIÓN DEL TELÓMERO

Durante cada ciclo de división celular, los telómeros se acortan debido a la incapacidad de las ADN polimerasas convencionales de replicar completamente las moléculas de ADN lineal, lo que se conoce como problema de la replicación del extremo (Olovnikov, 1973). La base molecular de esta pérdida de ADN radica en que las ADN polimerasas requieren un grupo 3'-OH libre como punto de partida para la adición de nucleótidos por lo que no pueden iniciar la síntesis de ADN *de novo* por sí solas, y, por tanto, necesitan la presencia de un cebador (Martínez y Blasco, 2015).

La replicación de los telómeros constituye una fase crítica del ciclo de división celular, ya que un fracaso en la regeneración de la estructura nucleoproteica conduce a la activación de la respuesta al daño del ADN y a la inestabilidad genómica asociada a la desprotección de los telómeros. La replicación del ADN telomérico es un proceso de múltiples etapas durante las cuales se produce el paso de la horquilla de replicación a lo largo del dúplex telomérico seguido del procesamiento de los extremos del ADN para generar el saliente monohebra 3', necesario para la unión de la shelterina, la formación del bucle T, la acción de la enzima telomerasa y el mantenimiento de la longitud del telómero. La formación del saliente en ambos extremos del cromosoma implica la digestión por nucleasas, la extensión de la hebra G por la telomerasa y el relleno de la hebra C complementaria por el complejo multiproteico polimerasa alfa ( $P\alpha$ )-primasa (PP) (Stewart *et al.*, 2012).

La replicación del dúplex telomérico es semiconservativa, es decir, cada hebra parental actúa como molde para la síntesis de una nueva hebra complementaria, y es llevada a

cabo por la maquinaria de replicación convencional. La disposición antiparalela de las hebras parentales y la dirección obligada de síntesis de la ADN polimerasa de 5' a 3' implica que la síntesis de ADN sea continua en una de las hebras (hebra adelantada), y que necesite cebarse repetidamente en la hebra complementaria (hebra rezagada), ocurriendo de manera discontinua en forma de fragmentos cortos de ADN denominados fragmentos de Okazaki (Martínez y Blasco, 2015). El inicio de la síntesis de ADN depende del complejo PP (Pellegrini, 2012). La subunidad primasa del complejo sintetiza los cebadores de ARN que luego son extendidos por la Pol $\alpha$ , originando el cebador híbrido de ARN-ADN requerido por las polimerasas procesivas para la síntesis de ADN en las hebras adelantada y rezagada. En la hebra rezagada, los cebadores de ARN se degradan, los huecos se rellenan con ADN y los fragmentos de Okazaki se ligan para ensamblar en última instancia la hebra. Sin embargo, el último cebador no puede ser reemplazado. Además, este cebador no es terminal, sino que se sitúa aleatoriamente a unos 70-100 nucleótidos del extremo de la hebra (Chow *et al.*, 2012). Por tanto, el telómero generado tras la síntesis de la hebra rezagada presenta un saliente monohebra 3' inmediatamente después de la replicación. También en este momento, la hebra C rezagada muestra la secuencia específica CCAATC en su extremo 5'. Por su parte, la síntesis de la hebra adelantada da lugar a extremos romos o salientes cortos de 1 ó 2 nucleótidos debido a que la maquinaria de replicación se disocia de las terminaciones del cromosoma antes de la incorporación del último o los dos últimos nucleótidos. Tras la replicación del dúplex telomérico, la hebra C es procesada por las nucleasas para generar el saliente G 3' y no adquiere la secuencia terminal específica CCAATC-5' hasta el final de la fase S y el principio de la fase G2 (Chow *et al.*, 2012). Por tanto, la síntesis incompleta de la hebra rezagada y la resección post-replicativa de la hebra C generan los salientes 3' en ambos telómeros recién sintetizados, lo que contribuye al acortamiento del telómero (Martínez y Blasco, 2015) (Figura 5).



**Figura 5.** Mecanismo de replicación del ADN telomérico. Adaptado de Martínez y Blasco, 2015.

La replicación de la región dúplex telomérica plantea un problema para la maquinaria de replicación, probablemente debido a la naturaleza repetitiva de la secuencia de ADN y a su potencial para formar estructuras secundarias. En consecuencia, se hace necesaria la participación de un grupo de proteínas adicionales a la maquinaria de replicación convencional para asegurar una replicación eficaz de esta región del cromosoma. Estas proteínas incluyen a TRF1, la helicasa reguladora de la longitud de los telómeros (RTEL1), la helicasa deficiente en el síndrome de Bloom (BLM), la helicasa deficiente en el síndrome de Werner (WRN), la endonucleasa flap 1 (FEN1) y el complejo CST (Stewart *et al.*, 2012).

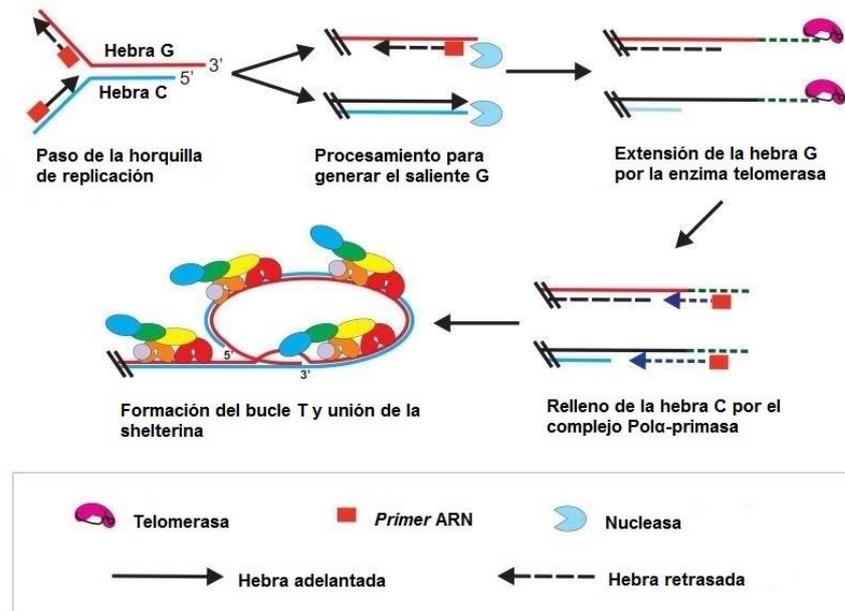
TRF1 recluta a BLM para resolver los G-cuadrupeles formados en la hebra G, facilitando así la progresión de la horquilla de replicación y previniendo la fragilidad de la hebra rezagada. Por otro lado, RTEL1 interactúa con TRF2 para desmontar los bucles T durante la fase S. Esta helicasa también facilita el desplegamiento de los G-cuadrupeles

interaccionando con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), previniendo así la fragilidad del telómero. WRN también se asocia con los telómeros interaccionando con TRF2 durante la fase S y se ha propuesto que interviene en el desplegamiento de los G-cuadrupeles y en facilitar los procesos de recombinación telomérica tales como la formación y desmontaje del bucle T y la replicación inducida por rotura. Por su parte, FEN1 se localiza en los telómeros a través de interacciones con TRF2. FEN1 también se une a BLM y a WRN, y se ha propuesto que previene la fragilidad de los telómeros facilitando el desplegamiento de los G-cuadrupeles y reiniciando las horquillas de replicación colapsadas durante la síntesis de la hebra rezagada de los telómeros (Martínez y Blasco, 2015).

Una vez acabada la replicación, en las células positivas para la telomerasa, las hebras complementarias 5' y 3' del ADN telomérico se extienden secuencialmente por la acción de esta enzima y del complejo PP, respectivamente (Figura 6). Los componentes de la shelterina TIN2-TPP1 reclutan a la telomerasa mientras que POT1-TPP1 promueve el alargamiento procesivo de los telómeros (Nandakumar y Cech, 2013). La telomerasa alarga la hebra G a través de la transcripción inversa de su subunidad molde de ARN (Greider y Blackburn, 1985), mientras que el complejo PP alarga la hebra C copiando el saliente G elongado (Reveal, Henkels y Turchi, 1997). El complejo CST también desempeña un papel clave en este proceso ya que se une al extremo 3' extendido por la telomerasa e interacciona con la Pol $\alpha$  para facilitar el relleno de la hebra C (Wang *et al.*, 2012). Además, el complejo CST es capaz de inhibir la actividad de la telomerasa impidiendo su acceso al telómero y suprimiendo la función estimuladora de POT1-TPP1 mediante interacción física y competencia por la unión al sustrato. La unión del complejo CST al ADN telomérico aumenta de manera constante durante la fase S, con un pico al final de esta fase y al comienzo de la fase G2, y es estrictamente dependiente de la acción de la telomerasa (Chen, Redon y Lingner, 2012).

Por tanto, los telómeros desempeñan de algún modo funciones opuestas en la célula. Por un lado, han de proteger a los extremos del cromosoma de los efectos no deseados de las nucleasas y los mecanismos de reparación del ADN, y por otro, deben permitir el acceso de la telomerasa y del resto de factores que intervienen en el proceso de replicación a los extremos del cromosoma. Esta contradicción ha llevado a sugerir que los telómeros son estructuras dinámicas que pueden pasar de un estado protegido cerrado a un estado

transitorio más abierto, en el cual el extremo del ADN se encuentra disponible para el acceso de los factores de replicación (Blackburn, 2001).



**Figura 6.** Replicación del ADN telomérico en células positivas para la telomerasa. Adaptado de Stewart *et al.*, 2012.

### 3.3. MANTENIMIENTO DEL TELÓMERO

La regulación de la dinámica de la longitud telomérica consiste en la compleja interacción entre los procesos de desgaste y los mecanismos de alargamiento de los telómeros. El acortamiento de los telómeros debido al problema de la replicación del extremo representa una pérdida de unas 50 a 100 pb en cada división celular, aunque esto varía dependiendo del tipo de célula (Huffman *et al.*, 2000). Otros factores, como las especies reactivas de oxígeno, la radiación, factores ambientales asociados al estrés, así como los antecedentes genéticos, también pueden conducir a una tasa de acortamiento más acelerada (Epel *et al.*, 2004). Existen dos mecanismos ampliamente definidos de mantenimiento de los telómeros en humanos: el mantenimiento mediado por la enzima telomerasa y el alargamiento alternativo de los telómeros (ALT). El principal mecanismo de elongación de los telómeros, empleado por la mayoría de las células con alta capacidad proliferativa, depende de la expresión de la telomerasa, una transcriptasa inversa que

alarga los telómeros. Por su parte, el ALT es un mecanismo alternativo, que se activa en una parte de las células cancerosas y depende de eventos de recombinación homóloga.

La integridad telomérica tiene implicaciones tanto en el cáncer como en el envejecimiento, ya que el desgaste de los telómeros actúa como punto de control clave de la proliferación celular al actuar como desencadenante de la senescencia replicativa. En la mayoría de células somáticas diferenciadas, que carecen de telomerasa, la tasa de acortamiento de los telómeros refleja una combinación de todas las actividades que reducen la secuencia telomérica. Por tanto, los telómeros sufren un acortamiento gradual, dando lugar a la inhibición de la proliferación mediante senescencia replicativa o, de una forma menos frecuente, mediante apoptosis. Este acortamiento progresivo del telómero se ha propuesto como una de las marcas moleculares del envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2013). Por el contrario, las células cancerosas destacan por su capacidad para proliferar indefinidamente. La mayoría contrarrestan el acortamiento de los telómeros mediante la reactivación de la telomerasa, mientras que otras lo hacen mediante el mecanismo del ALT (Shay, Reddel y Wright, 2012). En este tipo de células las actividades de alargamiento y acortamiento de los telómeros se encuentran en equilibrio, por lo que la longitud de los telómeros es bastante constante (Stewart *et al.*, 2012).

### **3.3.1. Alargamiento del telómero dependiente de la telomerasa**

La telomerasa compensa el desgaste de los telómeros a través de la adición *de novo* de repeticiones TTAGGG en los extremos cromosómicos, estabilizando la longitud y manteniendo la integridad del telómero. Esta ribonucleoproteína está formada por una subunidad catalítica (hTERT) con capacidad transcriptasa inversa, una subunidad ARN (hTR), que sirve como molde para la adición de ADN por hTERT, y una serie de proteínas específicas accesorias necesarias para la funcionalidad completa de la enzima (MacNeil, Bensoussan y Autexier, 2016).

La subunidad hTR es reclutada al nucléolo donde se ensambla con la subunidad hTERT formando un complejo de telomerasa maduro. Aunque los dominios que regulan la interacción y el ensamblaje de hTERT y hTR se encuentran bien caracterizados (Schmidt

y Cech, 2015), el sitio de ensamblaje y los mecanismos que lo regulan permanecen poco claros. Posteriormente, la proteína TCAB1 reconoce el dominio CAB de hTR y recluta a la telomerasa al cuerpo de Cajal, donde la telomerasa pasa a ser catalíticamente activa. En la fase S, el cuerpo de Cajal se colocaliza en el telómero y facilita el reclutamiento de la enzima (MacNeil, Bensoussan y Autexier, 2016).

Una vez en el telómero, el acceso de la telomerasa al extremo del ADN está modulado por la shelterina. La telomerasa es reclutada por los telómeros mediante la interacción directa del dominio TEN de hTERT con el fragmento TPP1-glutamato y rico en leucina (TEL) del dominio N-terminal de TPP1 (Nandakumar *et al.*, 2012). La telomerasa se une al extremo 3' de la hebra G por complementariedad del ADN telomérico con hTR. El molde ARN es transcrito inversamente en ADN por la actividad catalítica de hTERT, formando una repetición telomérica corta. Una vez que se ha añadido esta repetición telomérica, el extremo 3' del cromosoma se reposiciona en dirección 5' para que la telomerasa pueda añadir repeticiones adicionales sin la disociación completa de la enzima, un proceso llamado adición procesiva de repeticiones (RAP) (MacNeil, Bensoussan y Autexier, 2016).

Existen diversos factores que regulan la actividad de la telomerasa en los telómeros. La proteína TPP1, además de desempeñar un papel clave en el reclutamiento de la telomerasa (Xin *et al.*, 2007), se ha propuesto que, en asociación con POT1, estimula la procesividad de la enzima en los telómeros (Wang *et al.*, 2007). El complejo TPP1-POT1-hTERT se mantiene asociado durante la elongación del telómero y se transloca en el ADN telomérico de cadena sencilla. Curiosamente, POT1 también puede actuar como inhibidor de la elongación de los telómeros mediante la unión al extremo 3' del saliente monohebra y el reclutamiento del complejo CST, bloqueando el acceso de la telomerasa al telómero. Por lo tanto, TPP1 es un regulador de la actividad de la telomerasa y de su RAP, ya sea por la promoción de su translocación a lo largo de la hebra G mientras se une a él o actuando como una señal de freno en el extremo monohebra del ADN telomérico cuando la actividad de la telomerasa ya no es necesaria (Baumann y Price, 2010).

Por su parte, TRF1 y TRF2 actúan sobre todo como reguladores negativos de la longitud del telómero. Aunque no afectan directamente a la actividad de la telomerasa, parecen afectar al estado del sustrato telomérico disponible. Su unión al ADN telomérico de doble

## | I. INTRODUCCIÓN

cadena impulsa la formación de bucles T, estructuras teloméricas secundarias protectoras que bloquean el sitio de acoplamiento de la telomerasa y el alargamiento de los telómeros. Estas estructuras se encuentran en mayor abundancia en los telómeros largos y en niveles más bajos en los telómeros cortos, dando lugar a la preferencia de la telomerasa por los telómeros más cortos, que estarán más fácilmente disponibles (Smogorzewska *et al.*, 2000).

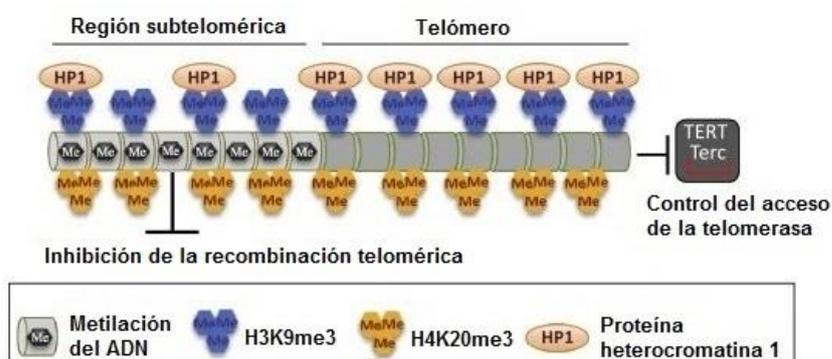
Las helicasas también desempeñan un papel fundamental en el alargamiento de telómeros, ya que a través de la resolución de estructuras secundarias como los bucles T y los G-cuadrupeletes, permite el acceso de telomerasa a su sustrato (Chavez, Tsou y Johnson, 2009).

Otro factor importante que interviene en el mantenimiento del telómero es TERRA, un ARN largo no codificante generado por la transcripción del telómero (Azzalin *et al.*, 2007). Se ha sugerido que TERRA puede competir potencialmente con el sustrato telomérico en su interacción con la telomerasa (Redon, Reichenbach y Lingner, 2010). Sin embargo, este papel inhibitorio de la telomerasa de TERRA no se ha podido demostrar *in vivo* en humanos.

La regulación de la longitud del telómero por el complejo CST también es clave para el mantenimiento del telómero. Se ha propuesto que este complejo establece el límite superior de alargamiento de los telómeros al unirse al ADN monocatenario telomérico y desplazar a la telomerasa una vez que el saliente telomérico ha alcanzado una cierta longitud. Además, el complejo CST promueve el relleno de la hebra C, reclutando al complejo PP hacia el saliente telomérico (Rice y Skordalakes, 2016).

De igual modo, el estado de la estructura de la heterocromatina en los telómeros se ha propuesto como modulador del acceso de la telomerasa a los extremos de los cromosomas y, por tanto, como regulador de la extensión del telómero. En particular, los telómeros y las regiones subteloómicas se organizan en nucleosomas enriquecidos con modificaciones epigenéticas que afectan a la conformación estructural de la cromatina llevándola hacia un estado más cerrado o silente, que restringe el acceso de la telomerasa a los telómeros. Estas modificaciones incluyen la hipermetilación del ADN, la trimetilación de las histonas H3K9 y H4K20, la hipacetilación de las histonas H3 y H4 y

la presencia de la proteína HP1 (García-Cao *et al.*, 2003; Gonzalo *et al.*, 2006; Benetti *et al.*, 2007). Estas marcas de heterocromatina, por tanto, actúan como reguladores de la longitud de los telómeros y de su integridad estructural (Figura 7). Se ha demostrado que la cromatina telomérica de las células madre pluripotentes se caracteriza por un estado más abierto, que permite la generación de telómeros hiperlargos por acción de la telomerasa. Durante la diferenciación de la cromatina telomérica, su conformación estructural cambia a un estado más cerrado que restringe el acceso de la telomerasa y provoca que los telómeros se acorten (Flores *et al.*, 2008). Por el contrario, la reprogramación de células somáticas adultas a células madre pluripotentes inducidas cambia la estructura de la cromatina telomérica de un estado cerrado a un estado más abierto, acompañado de la elongación de los telómeros por la telomerasa (Marion *et al.*, 2009). Estos hallazgos revelan que la estructura de la cromatina telomérica es dinámica y está controlada por programaciones epigenéticas asociadas al potencial de diferenciación de las células (Martínez y Blasco, 2015).



**Figura 7.** Regulación de la longitud del telómero por modificaciones epigenéticas. Adaptado de Martínez y Blasco, 2015.

La telomerasa es una enzima altamente regulada y en condiciones normales su actividad se limita a células con capacidad de proliferación prolongada. En otros tejidos, la telomerasa se inactiva durante la gestación, restringiendo así el potencial de proliferación (Cifuentes-Rojas y Shippen, 2012). Las células altamente proliferativas, como las células precursoras hematopoyéticas, los linfocitos activados y los queratinocitos, reflejan una situación natural en la que la longitud de los telómeros está directamente determinada por el nivel de telomerasa. En estas células, por tanto, la longitud del telómero viene dada por el balance entre el grado de alargamiento del ADN por acción de la telomerasa y la

erosión sufrida por la incompleta replicación del ADN y otros mecanismos tales como la acción de las nucleasas, el daño oxidativo y el estrés replicativo (Blackburn, Epel y Lin, 2015). La longitud final depende además de varios factores adicionales, incluyendo el nivel de expresión de la telomerasa en la célula, el tráfico de telomerasa al telómero por los cuerpos de Cajal, la facilidad con la que la telomerasa accede al ADN terminal y la presencia de moléculas que directamente estimulan o inhiben la actividad de la enzima (Cifuentes-Rojas y Shippen, 2012). Sin embargo, los niveles de telomerasa expresados son bajos, lo que parece ser insuficiente para compensar el problema de la replicación. En consecuencia, sus telómeros se acortan, pero a un ritmo menor de lo que se esperaría de una célula negativa para la telomerasa (Stewart *et al.*, 2012).

Diversos estudios han indicado que la telomerasa se recluta preferentemente en los telómeros más cortos, que adoptan de forma transitoria una estructura abierta, sin protección (Bianchi y Shore, 2008). En las células con niveles naturales de telomerasa, la mayoría de los telómeros son extendidos en cada ciclo celular por una sola molécula de telomerasa. Esta molécula sintetiza en promedio 60 nucleótidos de la secuencia telomérica en cada reacción de procesamiento. Sin embargo, en células con niveles muy altos de enzima, o telómeros que se han acortado artificialmente, múltiples moléculas de telomerasa actúan sobre cada telómero durante un ciclo celular (Zhao *et al.*, 2011). Se cree que esta diferencia en la acción de la telomerasa refleja la probabilidad de que las moléculas de telomerasa accedan al telómero mientras este permanece en un estado accesible. Si los niveles de telomerasa son bajos, el telómero puede volver a un estado cerrado no extensible antes de que una segunda molécula pueda acceder al extremo del ADN. Sin embargo, los telómeros cortos pueden entrar en un estado no extensible de forma más lenta mientras que los altos niveles de enzima aumentarían la probabilidad de que una segunda molécula gane acceso antes de que cambie la conformación del telómero (Stewart *et al.*, 2012). En contraste con el reclutamiento preferencial de la telomerasa hacia los telómeros cortos en las células normales, en las células cancerosas la telomerasa alarga la mayoría de los telómeros en cada ciclo de replicación, lo que indica diferencias significativas en la regulación de la longitud de los telómeros entre las células normales y las células cancerosas (Bianchi y Shore, 2008; Zhao *et al.*, 2009). Estas diferencias son probablemente el resultado tanto de alteraciones en la regulación de los factores que intervienen en el mantenimiento de la longitud del telómero como de cambios en el estado epigenético (Stewart *et al.*, 2012).

### 3.3.2. Alargamiento alternativo de los telómeros

El alargamiento alternativo de los telómeros (ALT) es un mecanismo de mantenimiento de los telómeros independiente de la telomerasa que ocurre en aproximadamente el 15 % de los cánceres. El ALT depende de la recombinación, aunque los mecanismos moleculares a través de los que se produce la elongación de los telómeros en el cáncer humano son poco conocidos (Min, Wright y Shay, 2017).

La evidencia disponible parece encajar mejor con un modelo de actividad del ALT en el que los extremos monocatenarios de los telómeros invaden ADN telomérico bicatenario o hibridan con ADN telomérico de cadena sencilla, usándolo como molde para la síntesis de nuevo ADN telomérico y así alargarse. El molde para la copia puede ser el mismo telómero (a través de la formación de un bucle T), el telómero de una cromátida hermana o de otro cromosoma, o una de las muchas formas de ADN telomérico extracromosómico presente en las células en las que se produce. Las proteínas necesarias para la actividad del ALT también se encuentran presentes en las células normales, en las que intervienen en los procesos habituales de recombinación y reparación del ADN (Cesare y Reddel, 2010). Sin embargo, las células que emplean el mecanismo del ALT para compensar el acortamiento de los telómeros presentan características inusuales, como longitudes teloméricas muy heterogéneas y abundante ADN telomérico extracromosómico (Shay, Reddel y Wright, 2012).

### 3.4. MEDIDA DE LA LONGITUD DEL TELÓMERO

De entre los distintos métodos destinados a la cuantificación de la longitud de los telómeros, cabe destacar tres: el análisis de los fragmentos de restricción terminal (TRF), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

El primer método desarrollado para medir la longitud media de los telómeros fue el método TRF (Allshire, Dempster y Hastie, 1989). En este procedimiento, el ADN genómico es digerido utilizando un cóctel de enzimas de restricción de corte frecuente

que carecen de sitios de reconocimiento en las regiones teloméricas y subteloméricas, por lo que no cortan el ADN de esta región. Los fragmentos de restricción terminal obtenidos son separados, en función de su tamaño, mediante electroforesis en gel de agarosa. Estos fragmentos se analizan mediante *Southern blot* o hibridación en gel utilizando una sonda específica para el ADN telomérico. Las longitudes variables de los telómeros hacen que se presenten como un frotis, siendo el tamaño y la intensidad del frotis evaluados por comparación con una escala de ADN que comprende tamaños de fragmentos conocidos. Para la aplicación de esta técnica, la integridad del ADN genómico extraído es crucial, tal y como ocurre con el resto de métodos utilizados para cuantificar la longitud telomérica. Este método no requiere el uso de equipos costosos o especializados, y ofrece la posibilidad de obtener una estimación de la longitud media del telómero en kilobases. Sin embargo, una limitación importante consiste en que las enzimas de restricción utilizadas dan como resultado la inclusión de ADN subtelomérico, lo que conduce a una sobreestimación de la longitud real de los telómeros. Asimismo, los resultados pueden variar entre laboratorios si se utilizan diferentes enzimas de restricción. Además, esta metodología requiere grandes cantidades de ADN ( $\geq 1 \mu\text{g}$ ), es laboriosa y no puede detectar telómeros cortos debido a que estos no pueden unirse a la sonda de manera eficiente. A pesar de ello, y puesto que el método TRF ha sido la primera técnica desarrollada para la medición de la longitud telomérica media y ha servido de referencia para otros métodos emergentes, todavía se considera el estándar de referencia (Montpetit *et al.*, 2014).

El desarrollo de métodos FISH para medir la longitud de los telómeros resolvió con éxito algunos de los inconvenientes del método TRF, proporcionando mayor sensibilidad, especificidad y resolución (Vera y Blasco, 2012). El principal logro de los métodos basados en FISH radica en su capacidad para medir la longitud de los telómeros en células individuales (Q-FISH en células interfásicas, *Flow-FISH* y HT Q-FISH) e incluso a nivel cromosómico (Q-FISH en células metafásicas), en ambos casos utilizando suspensiones celulares o secciones histológicas. El análisis de la longitud telomérica por FISH se basa en marcar específicamente los telómeros con sondas fluorescentes de ácido péptidonucleico (PNA). Ya que cada sonda telomérica de PNA reconoce tres repeticiones teloméricas, la intensidad de la señal fluorescente emitida al hibridarse con un telómero dado es directamente proporcional a la longitud del telómero, proporcionando una medición cuantitativa de la misma (Vera y Blasco, 2012). Particularmente, el método Q-

FISH convencional, en cromosomas en metafase (Poon *et al.*, 1999), es un método preciso que proporciona longitudes teloméricas específicas del brazo del cromosoma. El principal inconveniente, además de ser una técnica muy laboriosa y de bajo rendimiento, es que las células deben ser capaces de dividirse y, por lo tanto, no es aplicable a células detenidas en el ciclo celular. Además, debido a que el método está basado en la hibridación, es difícil cuantificar telómeros extremadamente cortos (Nersisyan, 2016).

Por su parte, el ensayo qPCR para la determinación de la longitud de los telómeros mide las señales teloméricas (T) y las señales de un gen de copia única (S), en comparación con un ADN de referencia, para proporcionar un ratio T/S relativo proporcional a la longitud promedio de los telómeros (Cawthon, 2002). En el método qPCR original, las señales T y S se cuantifican en pocillos separados que contienen una muestra equivalente (Cawthon, 2002). Sin embargo, posteriormente, se introdujo un ensayo multiplexado, denominado método de la PCR cuantitativa multiplex monocromática (MMQPCR), en el cual T y S se cuantifican en el mismo pocillo, con el fin de evitar errores significativos asociados a posibles discrepancias de volumen de pipeteo entre las reacciones de los genes telómero y copia única (Cawthon, 2009). Al igual que TRF, la qPCR telomérica utiliza el ADN genómico para medir la longitud de los telómeros, sin embargo, a diferencia del ensayo TRF, qPCR requiere sólo pequeñas cantidades de ADN y es altamente susceptible a un formato de alto rendimiento. Una desventaja importante del método qPCR frente al análisis TRF se basa en el hecho de que qPCR sólo proporciona valores de longitud telomérica relativa y no puede proporcionar valores absolutos en kilobases (Cawthon, 2002). Esta limitación se ha intentado solventar mediante la incorporación de un oligómero estándar para medir la longitud absoluta del telómero (O'Callaghan *et al.*, 2008). Otra limitación adicional del método es que sólo puede proporcionar valores promedio de la longitud del telómero por muestra de células, no siendo capaz de determinar la longitud media del telómero por célula o la longitud individual de cada telómero (Vera y Blasco, 2012).

Existen otros métodos que se utilizan con menos frecuencia, ya que están destinados a propósitos más específicos. Este es el caso del análisis de la longitud individual del telómero (STELA) (Baird *et al.*, 2003), que utiliza un enlazador específico del saliente 3' del telómero y un cebador subtelomérico para amplificar los telómeros en extremos cromosómicos específicos mediante PCR. Entre las ventajas del método se incluyen que

## | I. INTRODUCCIÓN

permite estimar la longitud de los telómeros en cromosomas específicos y es capaz de medir telómeros cortos, lo cual es importante en estudios sobre el envejecimiento inducido por el acortamiento telomérico y para explicar las variaciones en la longitud de los telómeros entre cromosomas (Nersisyan, 2016). Sin embargo, la variabilidad de secuencias en la mayoría de las regiones subtelo méricas sólo permite detectar telómeros en los brazos cromosómicos Xp, Yp, 2p, 11q, 12q y 17p. Además, es incapaz de detectar telómeros largos (Aubert, Hills y Lansdorp, 2012).

## **II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La resolución de casos relacionados con la identificación humana constituye un problema frecuente en la práctica pericial forense. No cabe duda de que la identificación, ya se trate de un sujeto vivo, de un cadáver reciente o de restos esqueletizados, presenta por sí misma importantes repercusiones médico-legales. Particularmente, el establecimiento de la identidad de restos humanos parcial o completamente esqueletizados es una cuestión de interés médico-legal que aún en nuestros días sigue siendo un tema científico de debate abierto. Con relativa frecuencia, los restos se encuentran en un avanzado estado de putrefacción e incluso ya han alcanzado un grado de esqueletización más o menos generalizado, siendo frecuente que se disponga exclusivamente de restos óseos y dentarios, e incluso tan sólo de estos últimos. En estas circunstancias, la prueba pericial solicitada generalmente pretende obtener información sobre tres aspectos forenses diferentes: contribuir de la forma más precisa posible al conocimiento de la data de los restos, establecer la identificación del cadáver o de los restos cadavéricos y aportar datos que permitan deducir conclusiones sobre la forma y mecanismo de la muerte.

En el campo de la identificación humana, la odontología forense desempeña un papel prioritario. La importancia forense del diente, para la estimación de la edad biológica, radica fundamentalmente en las características particulares de su desarrollo evolutivo, así como en los fenómenos que acontecen con el paso de los años en la estructura dentaria. Si además añadimos su singular resistencia a los agentes químicos, físicos y a la putrefacción, debido a su alta composición mineral, y la enorme variedad de características individualizadoras que nos proporciona (tratamientos odontológicos, malposiciones, tinciones, etc.), el diente puede considerarse un elemento diagnóstico de inestimable interés forense.

En sujetos de edades comprendidas entre el nacimiento y los 20 años, es decir, en sujetos que no han finalizado plenamente la formación de su dentición, se puede estimar la edad dental mediante el estudio del grado de mineralización dental y la cronología y secuencia de la erupción dentaria. Tras el desarrollo completo de la dentición, a partir de la segunda década de la vida, la edad dental se estima en base a los cambios que acontecen en la estructura dentaria con el paso de los años. Para tal tarea, se han descrito métodos

## | II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

morfológicos, histológicos, bioquímicos y moleculares que suponen disponer de piezas dentarias aisladas. Los primeros estudian los parámetros morfológicos dentarios que se modifican con el paso del tiempo. No obstante, estos parámetros sólo deben ser empleados en combinación con otros en la estimación de la edad dental, debido a su subjetividad y a la influencia de la experiencia del ojo del observador. En cuanto a los métodos histológicos, éstos no se han mostrado fiables para ser empleados en la estimación de la edad dentaria (Cunha *et al.*, 2009).

Por ello, en las tres últimas décadas, las investigaciones se han orientado hacia el estudio de los cambios que ocurren en los componentes bioquímicos y moleculares del diente durante el proceso natural de envejecimiento (Meissner y Ritz-Timme, 2010). Entre estos cambios, se observan dos alteraciones fundamentales de las proteínas que ocurren durante el envejecimiento: la racemización del ácido aspártico (AAR) y la generación de productos finales de glicación avanzada. En relación al ADN, destacan dos procesos dependientes de la edad: el acortamiento de los telómeros y los cambios en los patrones de metilación del ADN. Aunque, hasta el momento, la determinación del grado de racemización del ácido aspártico en dentina es el método molecular disponible que ha mostrado una mayor precisión en la estimación de la edad biológica, es un procedimiento que presenta limitaciones en casos de individuos de edad avanzada, cuando el intervalo *post mortem* excede décadas o cuando los restos han estado expuestos a altas temperaturas (Meissner y Ritz-Timme, 2010). Por tanto, es importante tomar en cuenta otras técnicas ya que el contexto forense y los restos humanos disponibles determinarán la posibilidad de aplicar una u otra metodología.

Entre los métodos de biología molecular, el acortamiento de los telómeros que se produce tras cada división celular se encuentra bien documentado en una gran variedad de células y tejidos, presentándose como un prometedor biomarcador para la estimación de la edad en el ámbito forense (Bernadotte, Mikhelson y Spivak, 2016). Sin embargo, en tejido mineralizado, apenas se ha publicado un estudio destinado a la estimación forense de la edad basada en la medida de la longitud de los telómeros. En esta investigación, Takasaki *et al.* (2003) determinaron la longitud telomérica en ADN procedente de pulpa dental, empleando el método clásico para la medición de telómeros, el método TRF (Allshire, Dempster y Hastie, 1989). Los resultados obtenidos mostraron una tendencia al acortamiento del telómero con la edad, si bien se observaron claras limitaciones del estudio por la

metodología empleada, por no ser del todo precisa ni reproducible.

Por todo ello, ya que el diente, por sus particulares características, puede considerarse un elemento diagnóstico de indudable interés en la estimación de la edad tanto en sujetos vivos como en cadáveres recientes y restos cadavéricos, resulta relevante llevar a cabo estudios en tejido dentario, y con métodos de medición más precisos, con el fin de determinar la utilidad de esta metodología para la estimación de la edad con fines forenses. En esta línea, en los últimos años, se han desarrollado nuevos métodos para determinar la longitud telomérica buscando una mayor precisión en las medidas. Entre ellos destaca el método qPCR (Cawthon, 2002). Esta técnica puede ser empleada con éxito para una rápida y precisa medición de la longitud de los telómeros en muestras biológicas (Aubert, Hills y Lansdorp, 2012) ya que aumenta la eficacia y disminuye costes, empleándose en la actualidad en numerosos estudios que relacionan la longitud telomérica con distintos tipos de cáncer, envejecimiento y otras patologías sistémicas (Karlsson *et al.*, 2008; Hewakapuge *et al.*, 2008; Elbers *et al.*, 2014; Campa *et al.*, 2015; Zubakov *et al.*, 2016; Allende *et al.*, 2016).

En consecuencia, este trabajo persiguió los siguientes **objetivos**:

1. Determinar la longitud telomérica relativa en muestras de ADN extraído de diente completo, procedentes de sujetos de sexo y edades conocidas, empleando el método qPCR.
2. Analizar el grado de correlación existente entre la longitud relativa de los telómeros, determinada en ADN dental, y la edad cronológica del sujeto.
3. Estudiar la influencia del sexo y el tipo de diente en la longitud telomérica relativa en ADN dental. Asimismo, evaluar el efecto del sexo, el tipo de diente y la edad en la concentración del ADN obtenido en cada una de las muestras.
4. Proponer un modelo estadístico de utilidad en el ámbito forense para estimar la edad cronológica de un sujeto a partir de la longitud relativa de sus telómeros determinada en ADN procedente de diente completo.

## | II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5. Validar el modelo de regresión propuesto en la muestra de estudio y evaluar las posibles limitaciones del mismo en cuanto a su potencial empleo como método diagnóstico de la edad en la práctica pericial forense.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. MUESTRAS

### 1.1. RECOGIDA Y SELECCIÓN DE MUESTRAS

La muestra objeto de estudio consistió en 91 dientes permanentes procedentes de 77 personas (20 hombres, 53 mujeres y 4 muestras de las que no se dispuso de información respecto al sexo) de edades comprendidas entre los 15 y los 85 años, siendo la edad media  $31.54 \pm 13.17$  años. Seis personas (4 mujeres y 2 hombres) aportaron más de un diente al estudio. Los datos de mayor relevancia en relación a los 91 dientes analizados se muestran en la Tabla 1.

Los dientes se obtuvieron de exodoncias realizadas en distintos centros del Sistema Sanitario Público de Andalucía y en clínicas dentales privadas de Granada, por motivos periodontales, ortodónticos, prostodónticos o quirúrgicos. El criterio de inclusión en el estudio radicó en que los dientes se encontraran intactos, es decir, libres de caries, y/o de tratamientos endodónticos o restauradores, con el fin de evitar factores que redujeran el contenido de ADN del diente y aumentaran la posibilidad de contaminación (Higgins y Austin, 2013). La metodología de la investigación fue aprobada por el Comité de Ética en Investigación Humana de la Universidad de Granada (UGR), con el correspondiente informe favorable de la Comisión de Ética en Investigación de la UGR, de 11 de octubre de 2013 y número de registro 820.

Los datos recogidos para cada muestra fueron la fecha de exodoncia, la fecha de nacimiento y el sexo del paciente y el tipo de diente. La edad cronológica se determinó para cada caso calculando el tiempo transcurrido (considerando los años y los meses) entre la fecha de nacimiento del sujeto y la fecha de exodoncia del diente en cuestión. A cada muestra se le asignó un número aleatorio con el fin de evitar que el observador tuviera conocimiento, durante el procesamiento de la muestra, de cualquiera de los datos registrados anteriormente. Tras la exodoncia, el diente se lavó con agua destilada, se secó a temperatura ambiente y se almacenó en una bolsa individual debidamente etiquetada para ser conservado a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser procesado.

**Tabla 1.** Características individuales de la muestra, de menor a mayor edad.

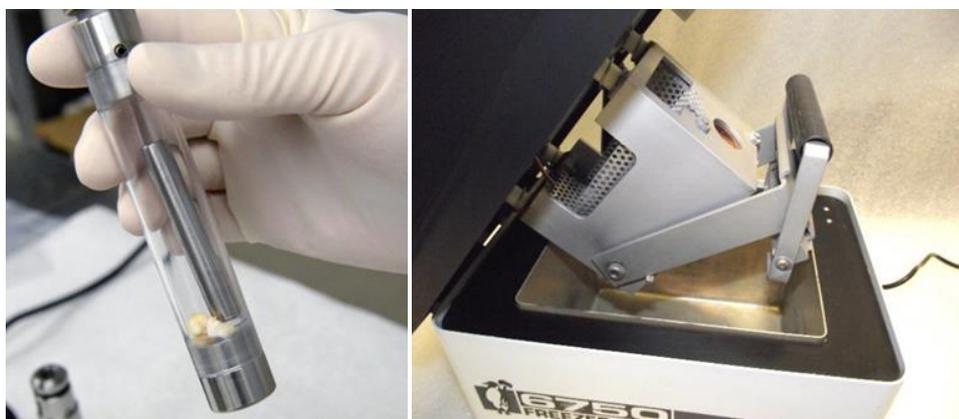
Individuo	Sexo	Edad (años)	Individuo	Sexo	Edad (años)
			39 <sup>a</sup>	Mujer	26.17
1 <sup>a</sup>	Mujer	15.50	40 <sup>a</sup>	Mujer	26.50
2 <sup>a</sup>	Mujer	18.17	41 <sup>a</sup>	Mujer	26.67
3 <sup>a</sup>	Mujer	18.33	42 <sup>a</sup>	Mujer	27.00
4 <sup>a</sup>	Mujer	18.58	43 <sup>a</sup>	Mujer	27.33
5 <sup>a</sup>	Mujer	19.08	44 <sup>a</sup>	Mujer	27.92
6 <sup>a</sup>	Mujer	19.25	45 <sup>b</sup>	Mujer	28.42
7 <sup>a</sup>	Hombre	19.50	46 <sup>a</sup>	Mujer	28.58
8 <sup>a</sup>	Mujer	20.00	47 <sup>a</sup>	Mujer	28.75
9 <sup>a</sup>	Hombre	20.25	48 <sup>a</sup>	Hombre	28.83
10 <sup>a</sup>	Mujer	20.42	49 <sup>a</sup>	Mujer	29.00
11 <sup>a</sup>	Mujer	20.42	50 <sup>a</sup>	Sin datos	30.00
12 <sup>a</sup>	Hombre	21.42	51 <sup>a</sup>	Mujer	30.67
13 <sup>a</sup>	Mujer	21.67	52 <sup>a</sup>	Mujer	31.00
14 <sup>a</sup>	Mujer	21.83	53 <sup>a</sup>	Mujer	31.00
15 <sup>a</sup>	Hombre	21.83	54 <sup>a</sup>	Mujer	33.75
16 <sup>a</sup>	Hombre	22.00	55 <sup>a</sup>	Sin datos	34.33
17 <sup>a</sup>	Hombre	22.25	56 <sup>a</sup>	Mujer	36.00
18 <sup>a</sup>	Hombre	22.50	57 <sup>a</sup>	Sin datos	37.58
19 <sup>a</sup>	Hombre	22.50	58 <sup>a</sup>	Mujer	37.58
20 <sup>a</sup>	Mujer	22.50	59 <sup>a</sup>	Mujer	37.75
21 <sup>a</sup>	Mujer	22.83	60 <sup>a</sup>	Mujer	37.83
22 <sup>a</sup>	Mujer	23.00	61 <sup>a</sup>	Mujer	40.42
23 <sup>a</sup>	Mujer	23.08	62 <sup>a</sup>	Hombre	40.67
24 <sup>a</sup>	Mujer	23.08	63 <sup>a</sup>	Mujer	41.50
25 <sup>a</sup>	Hombre	23.17	64 <sup>a</sup>	Hombre	41.83
26 <sup>a</sup>	Mujer	23.17	65 <sup>a</sup>	Mujer	42.75
27 <sup>a</sup>	Mujer	23.25	66 <sup>c</sup>	Mujer	43.67
28 <sup>a</sup>	Mujer	23.25	67 <sup>a</sup>	Hombre	46.00
29 <sup>a</sup>	Mujer	23.33	68 <sup>b</sup>	Mujer	50.00
30 <sup>a</sup>	Mujer	23.42	69 <sup>d</sup>	Hombre	50.00
31 <sup>a</sup>	Mujer	23.42	70 <sup>d</sup>	Hombre	50.00
32 <sup>a</sup>	Mujer	23.92	71 <sup>b</sup>	Hombre	52.67
33 <sup>a</sup>	Mujer	24.17	72 <sup>b</sup>	Mujer	53.00
34 <sup>a</sup>	Mujer	25.08	73 <sup>c</sup>	Hombre	60.00
35 <sup>a</sup>	Hombre	25.17	74 <sup>b</sup>	Hombre	64.83
36 <sup>a</sup>	Mujer	25.83	75 <sup>a</sup>	Sin datos	70.58
37 <sup>a</sup>	Mujer	25.83	76 <sup>d</sup>	Hombre	73.83
38 <sup>a</sup>	Mujer	26.08	77 <sup>b</sup>	Mujer	85.00

<sup>a</sup> Individuos que aportaron un molar. <sup>b</sup> Individuos que aportaron más de un diente: (45) 2 molares; (68) incisivo y canino; (71) 2 incisivos; (72) 3 incisivos, 2 caninos y 3 premolares; (74) 2 incisivos y 2 caninos; (77) premolar y molar. <sup>c</sup> Individuos que aportaron un premolar. <sup>d</sup> Individuos que aportaron un incisivo.

## 1.2. LIMPIEZA, DESCONTAMINACIÓN Y PULVERIZADO DE LAS MUESTRAS

El proceso de limpieza se inició con la retirada de cualquier resto de tejido blando o hueso adherido a la superficie del diente con la ayuda de una cureta. Para eliminar la contaminación superficial, las muestras se limpiaron exhaustivamente mediante lavados sucesivos con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % y agua ultra pura *Milli-Q*<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y secadas a temperatura ambiente. Posteriormente, cada superficie del diente se irradió con luz ultravioleta de 256 nm durante 10 minutos.

Tras la limpieza, se procedió a pulverizar cada diente en un molino criogénico de laboratorio *6750 Freezer/Mill*<sup>®</sup> (SPEX<sup>®</sup> SamplePrep, Stanmore, Reino Unido). Para ello, en una cabina de seguridad biológica, se introdujo el diente junto con un percutor en un vial de policarbonato, que se cerró herméticamente con dos tapones de acero inoxidable colocados en ambos extremos (Figura 8). Una vez rellenado el molino con nitrógeno líquido, se colocó el vial en su interior para comenzar el procedimiento de pulverizado. El pulverizado propiamente dicho lo realizó el percutor, de forma cilíndrica y de acero inoxidable, moviéndose magnéticamente de un lado a otro entre los dos tapones de cierre e impactando en la muestra. El protocolo seleccionado consistió en 15 minutos de pre-enfriamiento y 4 ciclos de pulverizado con 10 golpes del percutor por segundo durante 1 minuto, con 1 minuto de enfriamiento entre ciclos.



**Figura 8.** Vial cerrado herméticamente con el percutor y una muestra en su interior (izquierda) y vista interna del molino criogénico (derecha).

### | III. MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez finalizado el protocolo, se sacó el vial del molino y se dejó atemperar a temperatura ambiente. En el interior de una cabina biológica, se decantó el polvo de diente que contenía el vial en un tubo cónico de plástico estéril, previamente rotulado con el código de la muestra, que se almacenó a -20 °C.

La limpieza del vial de policarbonato y del resto de elementos de acero se llevó a cabo mediante un primer lavado con detergente y agua, seguido de un lavado con hipoclorito de sodio al 10 %, un aclarado con agua ultra pura *Milli-Q*<sup>®</sup>, un lavado con etanol al 96 %, y un último aclarado con agua ultra pura *Milli-Q*<sup>®</sup>. Todos los componentes se secaron y se trataron con las soluciones *DNAZap*<sup>™</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, California, EEUU), según las indicaciones del fabricante, antes de ser introducidos en bolsas para proceder a su esterilización en autoclave, y así volver a ser utilizados con una nueva muestra.

## 2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Para la **extracción de ADN** se empleó un método convencional (Smith *et al.*, 1993) con modificaciones, fundamentado en la adición al polvo de diente de un tampón o *buffer* de extracción para conseguir la lisis celular y la digestión proteica, seguida de la extracción de ADN mediante disolventes orgánicos, y de la concentración y purificación del extracto resultante mediante el empleo de dispositivos de ultrafiltración por centrifugación.

La primera etapa del protocolo empleado consistió en la lisis celular, con la consiguiente liberación de los ácidos nucleicos al medio, y en la degradación de la fracción proteica asociada al ADN. Para ello se empleó un *buffer* de extracción con los siguientes compuestos: dodecilsulfato de sodio (SDS), detergente que desnatura proteínas y solubiliza lípidos de membrana; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), agente quelante de cationes, como el calcio o el magnesio, que desestabiliza membranas y protege al ADN de la acción de enzimas nucleasas; cloruro de sodio (NaCl), sal que forma una capa iónica alrededor del ADN favoreciendo su precipitación; Tris-hidrocloruro (Tris-HCl), tampón que mantiene el pH de la solución estable; y proteinasa K, que degrada enzimáticamente las proteínas.

Posteriormente, para eliminar las proteínas del sobrenadante resultante de la lisis, se añadió una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. El fenol desnatura las proteínas de la muestra y el cloroformo disuelve lípidos, desnatura proteínas y elimina posibles restos de fenol en la fase acuosa; fase en la que, mediante centrifugación, el ADN permanecerá soluble mientras que las proteínas quedarán en la interfase y en la fase orgánica de la solución debido a su polaridad. Por su parte, el alcohol isoamílico estabiliza la molécula de ADN y favorece su precipitación.

Por último, para concentrar y purificar el ADN, se empleó un sistema de ultrafiltración por centrifugación con filtros de tamaño de poro de 30 kDa. Este sistema permitió la retención selectiva del ADN extraído, así como el desecho de los agentes contaminantes

### | III. MATERIAL Y MÉTODOS

del extracto y la reducción del volumen de la muestra, aumentando por tanto la concentración del ADN obtenido.

Para llevar a cabo todo este proceso, tras el pulverizado, se pesaron 500 mg de polvo de diente en un tubo cónico con tapón de rosca de 1.5 ml al que se añadieron 700  $\mu$ l de *buffer* de extracción (7  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M (pH 8.0) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU), 12.6  $\mu$ l de EDTA 0.5 M (pH 8.0) (Sigma-Aldrich), 14  $\mu$ l de NaCl 5 M (Sigma-Aldrich), 140  $\mu$ l de SDS al 10 % (Sigma-Aldrich), y 526.4  $\mu$ l de agua destilada estéril) y 50  $\mu$ l de solución de 20 mg/ml de proteinasa K (Sigma-Aldrich). El tubo se agitó para que todo el polvo de diente entrara en contacto con los reactivos y se incubó a 37 °C en agitación durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se añadieron 25  $\mu$ l de una solución de 20 mg/ml de proteinasa K, se agitó y se volvió a incubar a 37 °C en agitación durante toda la noche (12-18 horas). Al día siguiente, se centrifugó 5 minutos a 3000 r.p.m. y se recolectó el sobrenadante para ser transferido a un nuevo tubo. El primer tubo se volvió a centrifugar 3 minutos a 13000 r.p.m. para seguir recolectando sobrenadante. Al tubo con todo el sobrenadante recuperado, se le agregó la misma cantidad que contenía de una solución comercial de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich), se agitó hasta obtener una emulsión de consistencia lechosa y se centrifugó 3 minutos a 13000 r.p.m. Una vez separadas la fase orgánica y la acuosa, se recuperó la fase acuosa en dos tiempos, transfiriendo lo recuperado a un dispositivo de ultrafiltración *Amicon*<sup>®</sup> *Ultra-0.5 Ultracel-30 membrane, 30 kDa* (Merck KGaA), previamente hidratado con 100  $\mu$ l de agua destilada estéril, y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 10 y 15 minutos en cada uno de los pasos o, en su defecto, hasta que se produjera un filtrado completo. El filtrado se eliminó y, para limpiar la membrana, se añadieron 200  $\mu$ l de agua destilada estéril, centrifugando a 3500 r.p.m. durante 25 minutos. Por último, se procedió a resuspender el extracto con 75  $\mu$ l de agua destilada estéril, se invirtió la membrana pasándola a un tubo limpio, y se centrifugó 5 minutos a 5500 r.p.m. para recuperar el ADN extraído. Una vez finalizado el proceso, se desechó la membrana, se cerró el tubo y se almacenó a una temperatura de -20 °C.

La **concentración de ADN** de doble cadena en cada muestra, expresada en ng/ $\mu$ l, fue obtenida mediante espectrofluorimetría empleando el kit *Quant-iT*<sup>™</sup> *PicoGreen*<sup>®</sup> *dsDNA Assay Kit* (Invitrogen<sup>™</sup>) y el lector multimodal de microplacas *GloMax*<sup>®</sup>-*Multi Microplate Multimode Reader* (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU). El proceso

implicó la creación de una curva patrón a partir de diluciones seriadas de un ADN de concentración inicial conocida, facilitado por el propio kit, y la interpolación en esta curva de los valores obtenidos para las muestras a cuantificar. Para la lectura de la fluorescencia se empleó el módulo para fluorescencia del lector, concretamente el kit óptico azul (excitación a 490 nm y emisión a 510-570 nm).

### 3. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA

Una vez determinadas las concentraciones de ADN, se procedió a la normalización de la muestra. Para conseguir una concentración de ADN final de 1 ng/μl en todas las muestras, se realizó una dilución en dos pasos. La concentración para la primera dilución se seleccionó de acuerdo a la concentración inicial de la muestra. La concentración óptima para esta primera dilución fue de 10 ng/μl. Para asegurar el ajuste a la concentración deseada final de 1 ng/μl, se realizó una nueva medida siguiendo el protocolo de cuantificación de ADN descrito en el apartado anterior.

Tras normalizar la muestra, la longitud telomérica se determinó mediante qPCR a tiempo real, siguiendo el método descrito por Cawthon (2002) con algunas modificaciones. Esta técnica permite la cuantificación relativa de la longitud telomérica a través del cálculo del ratio T/S relativo. Este ratio representa la proporción entre el número de copias de la secuencia telomérica (T) presentes en la muestra y el número de copias de un gen de copia única (S), usado como control cuantitativo, con respecto a un ADN de referencia. En nuestro ensayo, el gen de copia única o gen endógeno empleado fue el gen RPLP0 (también llamado 36B4), que codifica para la proteína ribosomal larga P0.

Las reacciones de amplificación de la secuencia telomérica y las reacciones de amplificación del gen RPLP0 se hicieron siempre por separado en placas de 384 pocillos, cargando cada muestra analizada y sus réplicas en las mismas posiciones de pocillo en ambas placas. Por tanto, se prepararon dos mezclas de amplificación, una que contenía el par de cebadores o *primers* que específicamente amplificaba la secuencia telomérica, y otra con el par de *primers* que específicamente amplificaba el gen RPLP0.

Las secuencias de los *primers* empleados, prediseñados por Sigma-Aldrich, fueron las siguientes (dirección 5'-3'):

*telomere forward (Tel Fw),*

GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT;

*telomere reverse (Tel Rev),*

TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA;

*human RPLP0 forward (RPLP0 Fw),*  
CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC;  
*human RPLP0 reverse (RPLP0 Rev),*  
CCCATTATATCATCAACGGGTACAA.

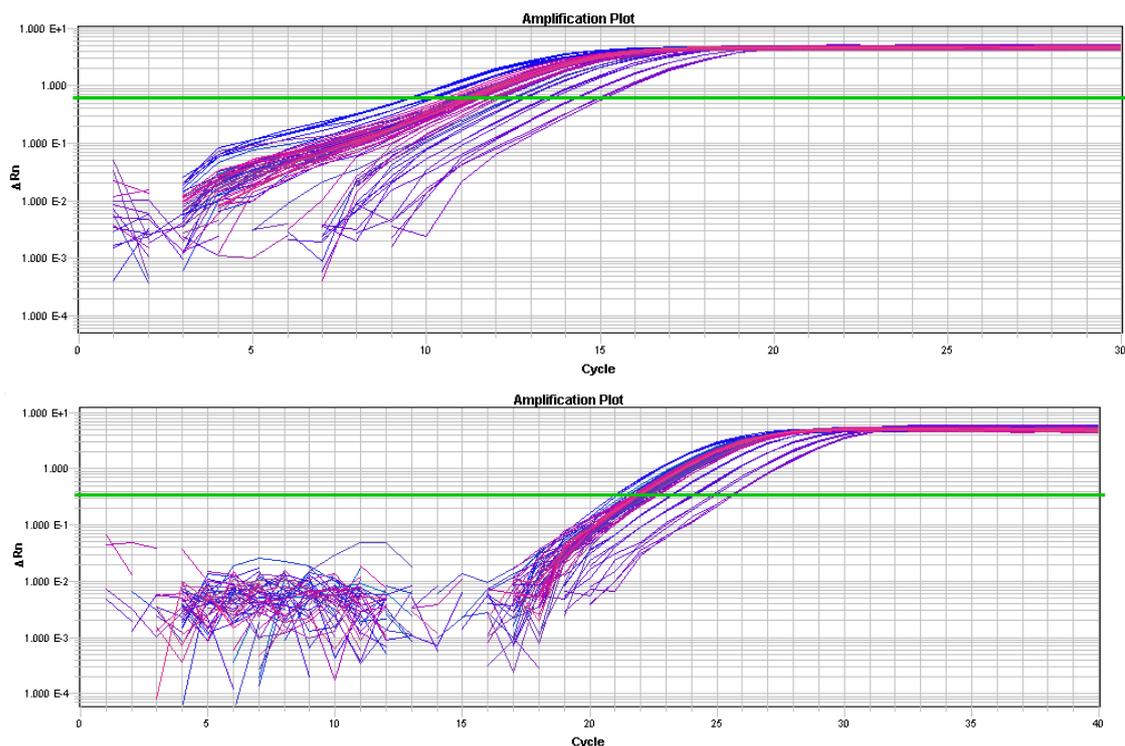
Cada pocillo de la placa contenía 5 ng de ADN seco (previamente cargado en la placa y dejado secar durante toda la noche) y 9  $\mu$ l de la mezcla de amplificación correspondiente. Para la reacción de amplificación de la secuencia telomérica, esta mezcla contenía por pocillo analizado 5  $\mu$ l de *QuantiFast SYBR Green PCR kit* (Qiagen, Hilden, Alemania), 0.27  $\mu$ l de *primer Tel Fw* (10  $\mu$ M), 0.90  $\mu$ l de *primer Tel Rev* (10  $\mu$ M) y 3.38  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. En cambio, la mezcla preparada para la reacción de amplificación del gen RPLP0 contenía por pocillo 5  $\mu$ l de *QuantiFast SYBR Green PCR kit*, 0.30  $\mu$ l de *primer RPLP0 Fw* (10  $\mu$ M), 0.50  $\mu$ l de *primer RPLP0 Rev* (10  $\mu$ M) y 4.20  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.

En cada placa, se incluyó una curva patrón con el fin de evaluar la eficiencia de cada qPCR. Para ello se usó como ADN de referencia una mezcla de 4 muestras seleccionadas de nuestro estudio, de concentraciones comprendidas entre los 57.29 y los 73.60 ng/ $\mu$ l (concentración media:  $65.53 \pm 8.27$  ng/ $\mu$ l) extraídas de 4 molares procedentes de 3 mujeres y 1 hombre, con edades comprendidas entre los 19.50 y los 26.17 años (edad media:  $23.63 \pm 3.10$  años). La curva se preparó mediante una dilución seriada y comprendió 9 puntos por triplicado, con cantidades totales de ADN de 60, 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.938, 0.469 y 0.234 ng, respectivamente. Además, en cada placa se añadieron controles positivos y negativos, también por triplicado. Los controles positivos consistieron en muestras de ADN, seleccionadas del propio estudio, que se incluyeron en todas las placas como controles de calidad, y como control negativo se empleó agua.

Todos los análisis se llevaron a cabo en un equipo *7900HT Fast Real-Time PCR system* (Applied Biosystems, Grand Island, Nueva York, EEUU). Las condiciones del programa de amplificación de la secuencia telomérica consistieron en un paso inicial de activación de la enzima uracil-ADN-N-glicosilasa (UNG) a 50 °C durante 2 minutos, seguida de una incubación a 95 °C durante 5 minutos, y de 30 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 2 minutos a 54 °C. El protocolo de qPCR para el gen RPLP0 comenzó con la activación de la UNG a 50 °C durante 2 minutos, continuando con una incubación a 95 °C durante 5 minutos, y

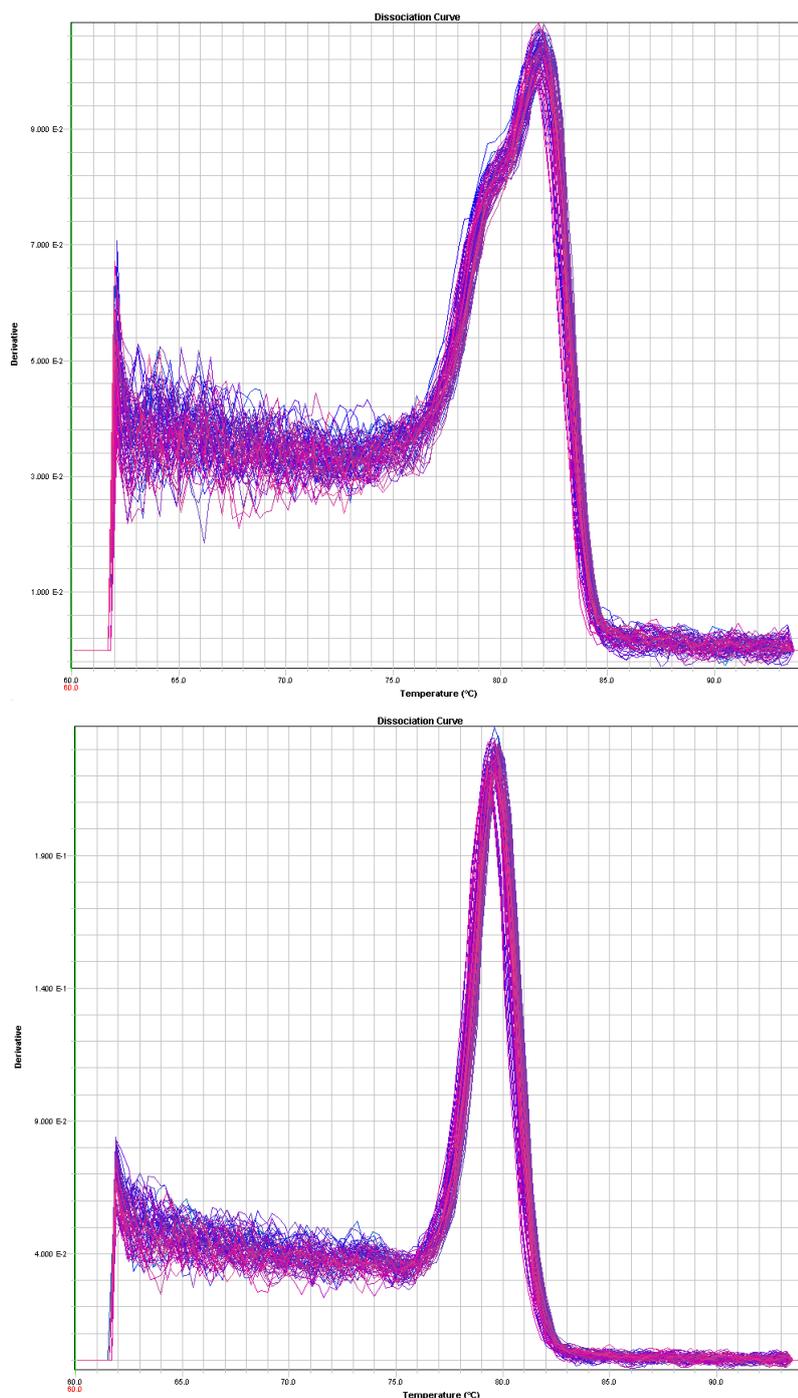
40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 58 °C. Los datos se analizaron con el programa *ABI Sequence Detection System*, versión 2.4 (Applied Biosystems).

La qPCR permitió la monitorización a tiempo real de la amplificación de ADN combinada con la detección mediante el uso de un fluorocromo. El fluorocromo se une al ADN bicatenario y, tras ser excitado por un haz de luz de longitud de onda determinada, emite fluorescencia que se incrementa proporcionalmente al aumento de la cantidad de ADN en cada ciclo. La fluorescencia leída por el equipo al final de cada ciclo de amplificación se representa en una gráfica frente al número de ciclo, de tal manera que se obtiene una curva que muestra el transcurso del proceso, conocida como curva de amplificación (Figura 9). De esta forma, la curva consta de una fase inicial donde la emisión de fluorescencia de la reacción se encuentra por debajo del nivel de fluorescencia basal, una segunda fase en la que se produce un incremento de la fluorescencia, de forma exponencial en su inicio y después lineal, y una tercera fase (fase meseta) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia emitida. Durante la fase exponencial, la amplificación es más eficiente y se encuentra menos afectada por aquellas condiciones que limitan la reacción. Por tanto, en este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señale la zona de incremento exponencial de la curva, representado en el gráfico por una recta horizontal conocida como línea umbral o *threshold*, que debe estar situada en el centro de la misma para la correcta cuantificación de los datos. Por ello, tras las reacciones de amplificación y antes de exportar los datos obtenidos, se seleccionó el mismo valor umbral para todas las reacciones del mismo gen (secuencia telomérica o RPLP0), asegurando que quedara situado en el centro de la parte exponencial de la segunda fase de la curva de amplificación (Figura 9). El punto de intersección de la curva de amplificación con esta línea umbral se denomina ciclo umbral o *cycle threshold* (Ct), y puede definirse como el ciclo en el cual la fluorescencia de la reacción aumenta significativamente respecto a la fluorescencia basal sobrepasando el umbral establecido. Por tanto, cuanto mayor sea la cantidad inicial de ADN de la muestra, menor será el número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar este umbral, por lo que menor será su valor Ct (Walker, 2002). Para el análisis de resultados, puesto que se analizaron tres réplicas por muestra, se consideró la media de los dos valores Ct más próximos entre los tres obtenidos.



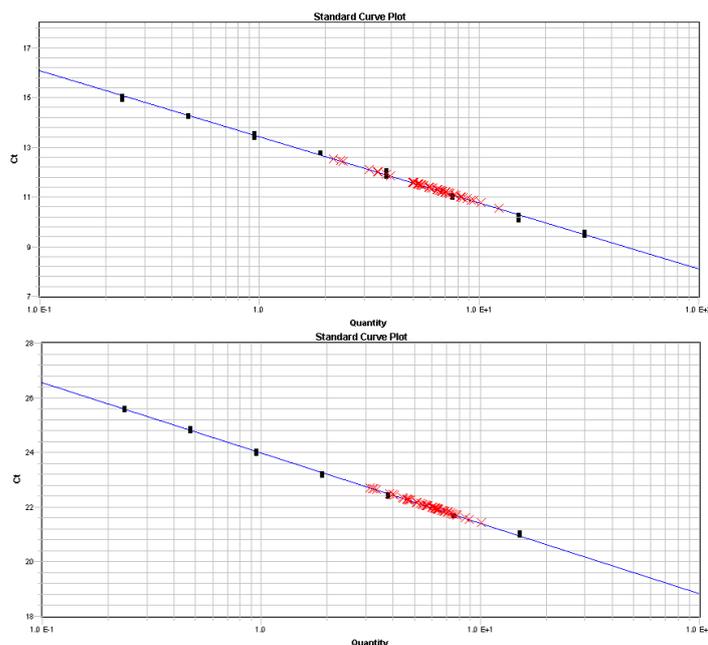
**Figura 9.** Gráficas de amplificación para la secuencia telomérica (arriba) y para el gen RPLP0 (abajo). La intersección entre la línea umbral (verde) y la curva de amplificación para cada muestra determinó el Ct empleado para la cuantificación.

Cabe destacar que el sistema de detección por fluorescencia empleado (SYBR Green) se caracteriza por su unión inespecífica al ADN de doble cadena, incluyendo los dímeros de primer. Por tanto, debido a esta inespecificidad, se analizó la curva de disociación obtenida tras cada reacción. La presencia de un solo pico estrecho en la curva indicó la homogeneidad de amplicones (temperaturas de fusión similares) y, por tanto, una amplificación específica (Figura 10).



**Figura 10.** Curvas de disociación generadas tras una qPCR para la secuencia telomérica (arriba) y tras una qPCR para el gen RPLP0 (abajo).

La eficiencia de cada reacción se calculó usando la pendiente de la curva patrón generada (Figura 11), empleando la siguiente fórmula:  $\text{eficiencia} = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$ . La eficiencia puede definirse como una medida de la velocidad a la que la ADN polimerasa convierte los reactivos en amplicones (Taylor *et al.*, 2010). Valores de eficiencia entre el 90 y el 110 % se consideraron aceptables.



**Figura 11.** Curvas patrón utilizadas para calcular la eficiencia en una reacción de amplificación para la secuencia telomérica (arriba) y para el gen RPLP0 (abajo).

Para determinar la variabilidad intra-ensayo, se calculó el coeficiente de variación (CV) entre triplicados. El criterio establecido para volver a ensayar una muestra por triplicado fue que el coeficiente de variación estuviera por encima del 10 %. La variabilidad entre ensayos se determinó mediante el CV medio del tercer punto de la curva patrón incluida en cada placa, empleado en este caso como control de calidad. Ambas variabilidades se analizaron para las qPCR de la secuencia telomérica y para las qPCR del gen RPLP0 por separado.

Tras ello, se procedió a calcular la longitud telomérica relativa, representada por el ratio T/S relativo, aplicando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Para ello, en primer lugar, se determinó el ratio T/S para cada muestra ( $\Delta Ct_{\text{muestra}}$ ) como la diferencia entre el valor Ct medio obtenido para el gen diana (secuencia telomérica) y el valor Ct medio obtenido para el gen control (RPLP0). Para obtener un valor relativo, se seleccionó como ADN de referencia el tercer punto de la curva patrón y se calculó su ratio T/S ( $\Delta Ct_{\text{referencia}}$ ) tomando la media de los valores Ct medios para la secuencia telomérica y la media de los valores Ct medios para el gen RPLP0 obtenidos para ese punto en las distintas reacciones. Por último, usando este ratio T/S de referencia, se determinó el ratio T/S relativo para cada muestra, esto es,  $\text{ratio T/S relativo (muestra)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{referencia}}$ .

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete *SPSS Statistics*, versión 23.0 (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EEUU). El perfil de la población de estudio se describió empleando medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas, esto es, media  $\pm$  desviación estándar, mediana y rangos promedios, incluyendo los intervalos de confianza (IC 95 %) y el rango (valor mínimo y máximo); y distribución de frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas.

Para analizar las diferencias entre los valores medios de las variables cuantitativas entre dos grupos independientes, se realizó el test t de Student previa prueba de Levene para evaluar la igualdad de varianzas. En el caso de que no se cumplieran las suposiciones de normalidad y/o el tamaño de muestra en alguno de los grupos fuera inferior a 20, se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon para el contraste de dos medianas o rangos promedios. Cuando se compararon valores medios en más de dos grupos, se aplicó ANOVA de un factor y, en el caso de ser significativo, se procedió a aplicar test de comparaciones múltiples (o comparaciones *a posteriori*, que proporcionan información detallada entre las medias dos a dos) mediante el método HSD (*Honestly Significant Difference*) de Tukey, con el fin de valorar qué grupos diferían entre sí y en qué magnitud. Si no se cumplían los supuestos de normalidad, se aplicó el test equivalente no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comprobar si dos variables cuantitativas estaban relacionadas y conocer la fuerza y direccionalidad de dicha relación, se empleó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ), cuyo cálculo es paramétrico, o bien, el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman ( $\rho$ ), en función de la normalidad de las variables analizadas. En aquellos casos en los que se aplicaron técnicas de regresión lineal, la bondad del ajuste del modelo de regresión estimado a los datos reales se determinó mediante el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Asimismo, para validar el modelo lineal, se comprobó que los residuos cumplieran las hipótesis de normalidad, homocedasticidad (o igualdad de varianzas) e independencia.

El nivel de significación estadística para este estudio fue  $p < 0.05$ .

## **IV. RESULTADOS**



## 1. CONCENTRACIÓN DE ADN

La concentración media de ADN del conjunto de la muestra fue de  $40.63 \pm 16.93$  ng/ $\mu$ l, siendo la concentración mínima de 4.00 ng/ $\mu$ l, determinada en un incisivo perteneciente a un hombre de 50 años, y la concentración máxima de 73.60 ng/ $\mu$ l, obtenida a partir de un molar exodonciado a una mujer de 26 de años de edad.

### 1.1. INFLUENCIA DEL SEXO, EL TIPO DE DIENTE Y LA EDAD

La influencia del sexo en la concentración de ADN se estudió en los dientes de los 73 sujetos de los que se disponía información respecto al sexo, esto es, en 87 dientes procedentes de 20 hombres y 53 mujeres. En el caso de que se contara con más de un diente de una misma persona, se consideró el valor medio de las concentraciones de ADN determinadas para cada uno de los dientes aportados. Para esta variable, no se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres (Tabla 2).

**Tabla 2.** Edad y concentración de ADN según el sexo.

Sexo	<i>n</i>	Edad (años)	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ l)	
		Media $\pm$ D.E. (Min-Max)	Media $\pm$ D.E.	Rango promedio
Hombres	20	$36.46 \pm 17.28$ (19.50-73.83)	$38.30 \pm 21.66$	34.35
Mujeres	53	$28.81 \pm 11.35$ (15.50-85.00)	$46.78 \pm 11.66$	38.00
Total	73	$30.90 \pm 13.56$ (15.50-85.00)	$44.46 \pm 15.38$	

*n*: número de casos; D.E.: desviación estándar; Min: mínimo; Max: máximo.

Sin embargo, cuando se estudió el efecto del tipo de diente, considerando esta vez los datos de los 91 dientes analizados de forma independiente, sí se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Concretamente, el rango promedio de la concentración de ADN obtenido en molares fue significativamente mayor que los calculados en incisivos, caninos y premolares, respectivamente (Tabla 3).

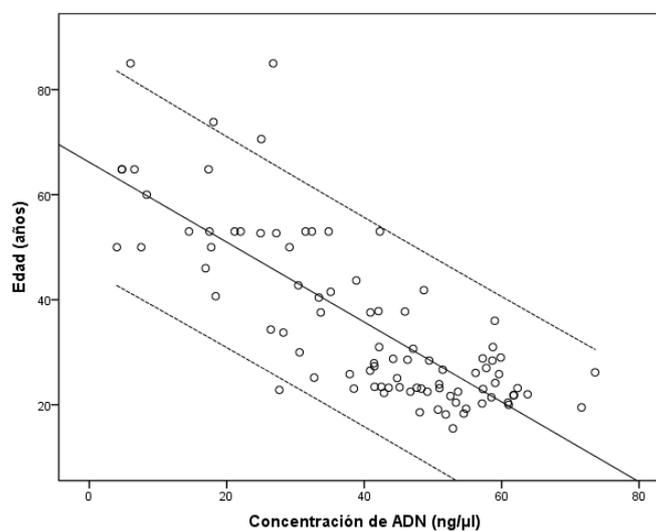
**Tabla 3.** Edad y concentración de ADN según el tipo de diente.

Tipo de diente	<i>n</i>	Edad (años)	Concentración de ADN (ng/μl)	
		Media ± D.E. (Min - Max)	Media ± D.E.	Rango promedio
Incisivos	11	56.17 ± 7.94 (50.00-73.83)	16.14 ± 10.01	11.73
Caninos	5	57.13 ± 7.13 (50.00-64.83)	24.99 ± 14.38	21.40
Premolares	6	57.95 ± 14.24 (43.67-85.00)	21.46 ± 12.91	17.67
Molares	69	28.39 ± 11.10 (15.50-85.00)	47.34 ± 12.13	55.71*
Total	91	35.28 ± 16.25 (15.50-85.00)	40.63 ± 16.93	

*n*: número de casos; D.E.: desviación estándar; Min: mínimo; Max: máximo.

\* Diferencias significativas entre molares e incisivos ( $p < 0.001$ ), molares y caninos ( $p < 0.01$ ), y molares y premolares ( $p < 0.001$ ).

En cuanto a la relación con la edad cronológica, el coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r = -0.792$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 91$ ) indicó la existencia de una correlación lineal negativa estadísticamente significativa entre la concentración de ADN y la edad, mostrando la presencia de bajas concentraciones en las edades más avanzadas (Figura 12).



**Figura 12.** Correlación entre la concentración de ADN y la edad. La línea continua representa la regresión lineal ( $R^2 = 0.628$ ) y las líneas discontinuas muestran los intervalos de confianza al 95 % para los valores predichos.

Para valorar con mayor profundidad esta relación con la edad, se procedió a dividir la muestra en tres grupos, representando a la población más joven (grupo 1: 15-35 años), de mediana edad (grupo 2: 36-55 años) y de edad más avanzada (grupo 3:  $\geq 56$  años) de la

muestra. El análisis estadístico mostró la existencia de diferencias significativas entre el grupo 1 y el resto de grupos, encontrándose mayores concentraciones en el grupo de edad más joven (Tabla 4).

**Tabla 4.** Concentración de ADN según el grupo de edad.

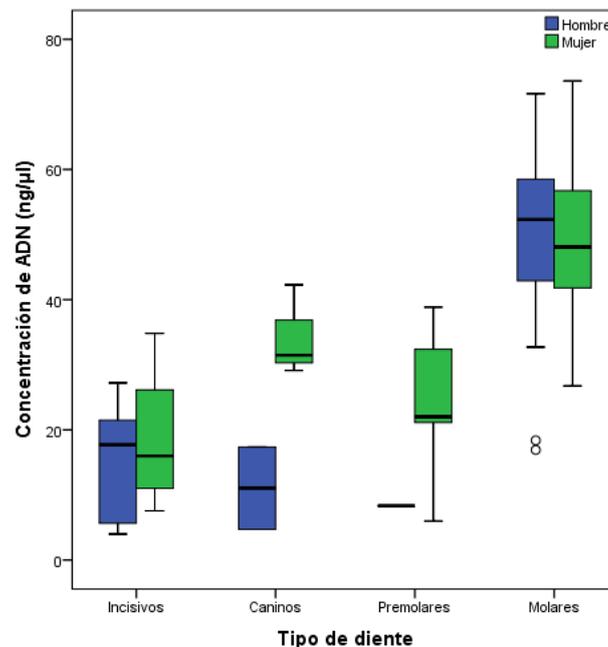
Grupo de edad <sup>a</sup>	<i>n</i>	Concentración de ADN (ng/μl)	
		Media ± D.E.	Rango promedio
Grupo 1	56	50.18 ± 10.31	60.63*
Grupo 2	26	29.61 ± 13.00	27.27
Grupo 3	9	13.06 ± 8.85	9.11
Total	91	40.63 ± 16.93	

<sup>a</sup> Grupo 1: 15-35 años; grupo 2: 36-55 años; grupo 3: ≥56 años.

*n*: número de casos; D.E.: desviación estándar.

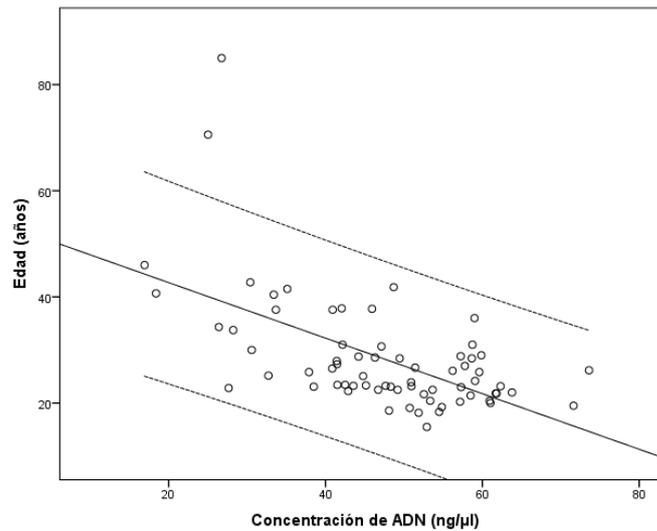
\* Diferencias significativas entre el grupo 1 y el grupo 2 ( $p < 0.001$ ), y el grupo 1 y el grupo 3 ( $p < 0.001$ ).

Cuando se agrupó la muestra en función del tipo de diente, para evitar la influencia observada de esta variable en las comparaciones, tampoco se encontraron diferencias significativas entre sexos (Figura 13).



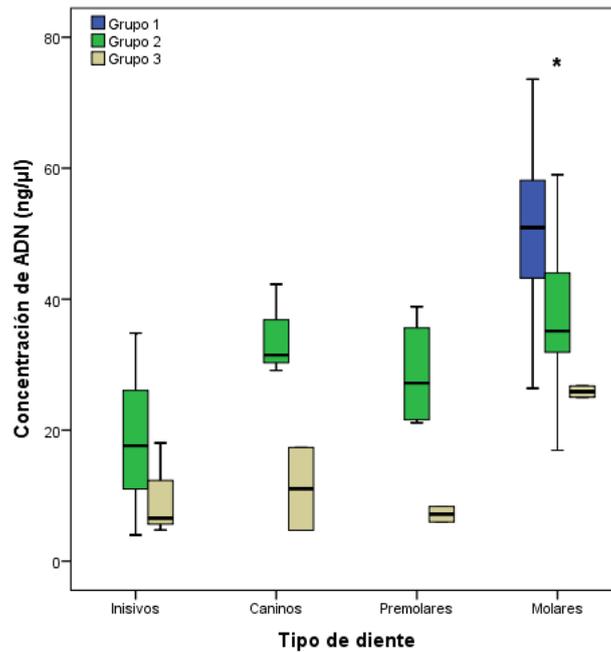
**Figura 13.** Concentración de ADN según el tipo de diente y el sexo. La línea horizontal señala la mediana, la caja representa el rango intercuartil y las líneas verticales corresponden a los valores máximos y mínimos. Los valores atípicos se indican mediante círculos abiertos.

En cuanto a la edad, el coeficiente de correlación lineal también indicó la existencia de una correlación lineal negativa significativa entre la concentración de ADN y la edad en premolares ( $\rho = -0.941$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) y molares ( $r = -0.572$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 69$ ; Figura 14). En molares, además, se encontraron diferencias significativas entre el grupo de edad más joven y el resto de grupos de edad (Figura 15).

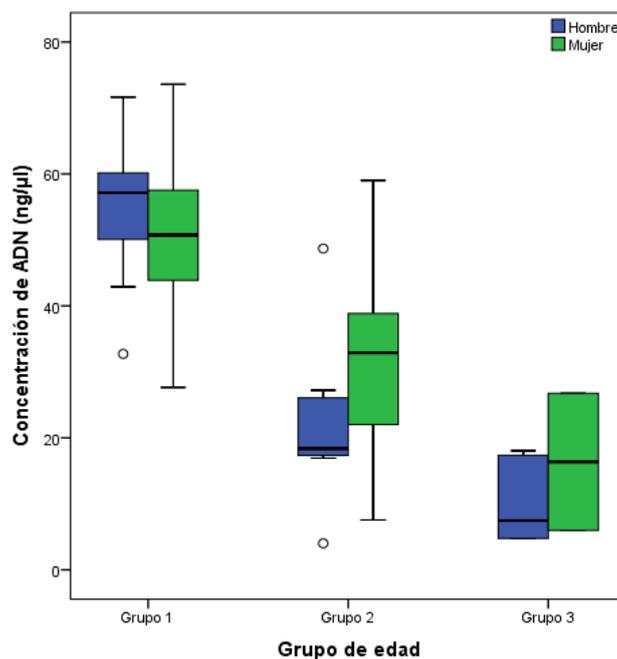


**Figura 14.** Correlación entre la concentración de ADN y la edad en molares. La línea continua representa la regresión lineal ( $R^2 = 0.327$ ) y las líneas discontinuas muestran los intervalos de confianza al 95 % para los valores predichos.

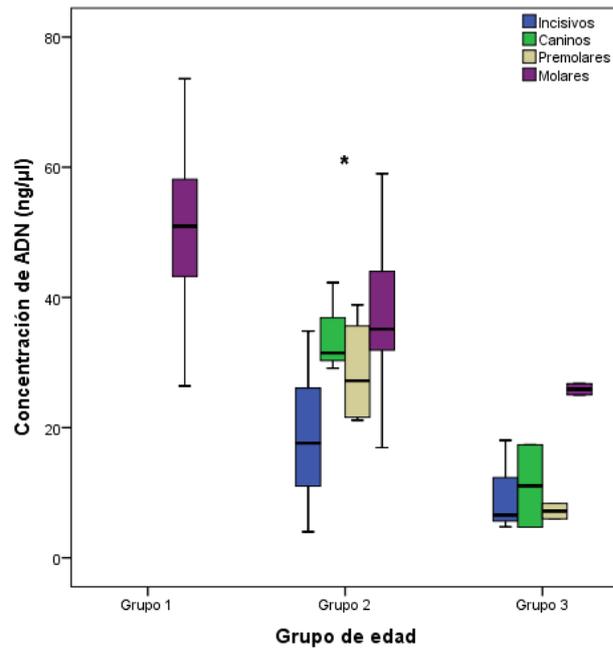
Para contrarrestar la influencia encontrada de la edad en la concentración de ADN, se evaluó el comportamiento de las variables sexo y tipo de diente dentro de los grupos de edad previamente definidos en la muestra (grupo 1: 15-35 años; grupo 2: 36-55 años; grupo 3:  $\geq 56$  años). Analizando la influencia del sexo, no se hallaron diferencias entre hombres y mujeres en ninguno de los grupos (Figura 16). Asimismo, no se encontraron diferencias entre tipos de dientes, excepto entre incisivos y molares en el grupo 2 (Figura 17). Por último, se observó una correlación lineal negativa significativa entre la concentración de ADN y la edad tanto en el grupo 1 ( $r = -0.385$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 56$ ) como en el grupo 2 ( $r = -0.569$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 26$ ).



**Figura 15.** Concentración de ADN según el tipo de diente y el grupo de edad (grupo 1: 15-35 años; grupo 2: 36-55 años; grupo 3:  $\geq 56$  años). La línea horizontal señala la mediana, la caja representa el rango intercuartil y las líneas verticales corresponden a los valores máximos y mínimos. \* Diferencias significativas entre el grupo 1 y el grupo 2 ( $p < 0.01$ ), y el grupo 1 y el grupo 3 ( $p < 0.05$ ) en molares.



**Figura 16.** Concentración de ADN según el grupo de edad (grupo 1: 15-35 años; grupo 2: 36-55 años; grupo 3:  $\geq 56$  años) y sexo. La línea horizontal señala la mediana, la caja representa el rango intercuartil y las líneas verticales corresponden a los valores máximos y mínimos. Los valores atípicos se indican mediante círculos abiertos.



**Figura 17.** Concentración de ADN según el grupo de edad (grupo 1: 15-35 años; grupo 2: 36-55 años; grupo 3:  $\geq 56$  años) y el tipo de diente. La línea horizontal señala la mediana, la caja representa el rango intercuartil y las líneas verticales corresponden a los valores máximos y mínimos. \* Diferencias significativas entre molares e incisivos ( $p < 0.01$ ) en el grupo 2.

## 2. EXPRESIÓN GÉNICA

### 2.1. VALORES CT

Como paso previo al cálculo del ratio T/S relativo, se analizaron los rangos de los valores Ct obtenidos tras la realización de los ensayos de qPCR llevados a cabo tanto para el gen diana (secuencia telomérica) como para el gen endógeno de control (gen RPLP0).

La eficiencia media de los ensayos de qPCR, calculada a partir de la pendiente de la curva patrón, fue de  $104.6 \pm 2.9$  % para el par de *primers* de la secuencia telomérica y de  $107.8 \pm 4.8$  % para el par de *primers* del gen RPLP0. Los coeficientes de correlación de la curva patrón fueron superiores a 0.99 en todos los ensayos. El CV medio intra-placa fue de 0.88 % (IC 95 %: 0.09-4.79 %) para la qPCR telomérica y de 0.42 % (IC 95 %: 0.05-8.80 %) para la qPCR del gen RPLP0. El CV entre ensayos fue de 0.83 % (IC 95 %: 0.45-1.41 %) para la qPCR telomérica y de 0.31 % (IC 95 %: 0.22-0.53 %) para la qPCR del gen RPLP0.

Tras valorar la eficiencia y la variabilidad de los ensayos, se procedió a evaluar las posibles diferencias en los valores Ct entre sexos y tipos de dientes, así como su relación con la edad cronológica, tanto para la secuencia telomérica como para el gen RPLP0.

#### 2.1.1. Influencia del sexo, el tipo de diente y la edad

Los rangos de los valores Ct obtenidos fueron aceptables tanto para la secuencia telomérica (10.33-13.15) como para el gen RPLP0 (21.46-22.84) en todas las muestras.

Tras el análisis de los datos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los valores Ct medios entre sexos (Tabla 5). En aquellos casos en

los que se dispuso de más de un diente de un mismo sujeto, para llevar a cabo el análisis estadístico se tomó el valor Ct medio de los valores obtenidos en cada uno de los dientes.

**Tabla 5.** Valor Ct según el sexo para la secuencia telomérica y el gen RPLP0.

Sexo	<i>n</i>	Valor Ct TEL		Valor Ct RPLP0	
		Media ± D.E.	Rango promedio	Media ± D.E.	Rango promedio
Hombres	20	11.38 ± 0.66	40.45	22.03 ± 0.25	36.40
Mujeres	53	11.23 ± 0.49	35.70	22.00 ± 0.24	37.23
Total	73	11.27 ± 0.54		22.01 ± 0.24	

*n*: número de casos; D.E.: desviación estándar; TEL: secuencia telomérica.

En cuanto a las diferencias encontradas entre tipos de dientes, el rango promedio del valor Ct determinado en molares para la secuencia telomérica fue significativamente menor que los rangos promedios obtenidos para los demás tipos de dientes (Tabla 6). Para el gen RPLP0, el rango promedio del valor Ct no difirió de forma significativa entre los distintos tipos de dientes (Tabla 6).

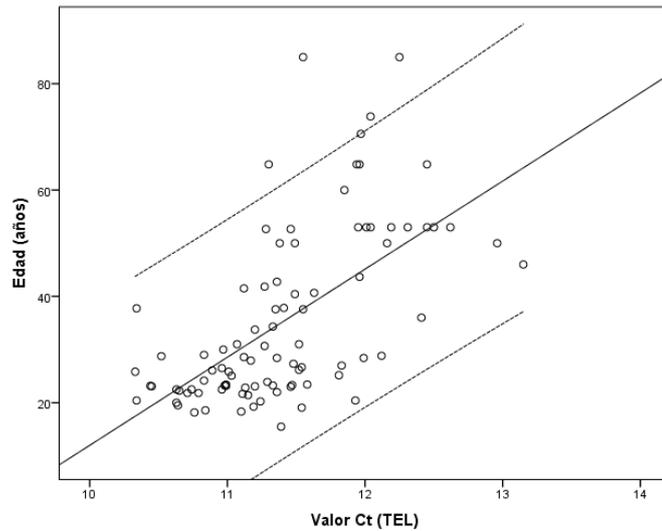
**Tabla 6.** Valor Ct según el tipo de diente para la secuencia telomérica y el gen RPLP0.

Tipo de diente	<i>n</i>	Valor Ct TEL		Valor Ct RPLP0	
		Media ± D.E.	Rango promedio	Media ± D.E.	Rango promedio
Incisivos	11	11.94 ± 0.60	68.00	22.14 ± 0.35	58.82
Caninos	5	12.24 ± 0.22	81.40	22.06 ± 0.17	52.60
Premolares	6	12.01 ± 0.13	75.50	21.96 ± 0.17	38.42
Molares	69	11.21 ± 0.50	37.36*	22.01 ± 0.25	44.14
Total	91	11.41 ± 0.60		22.02 ± 0.25	

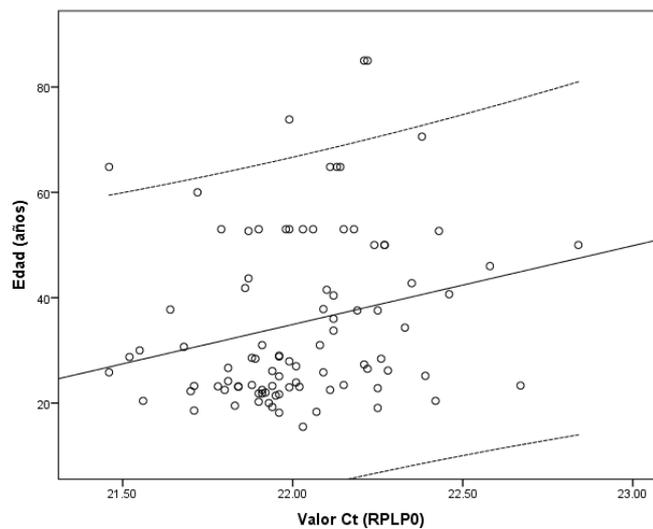
*n*: número de casos; D.E.: desviación estándar; TEL: secuencia telomérica.

\* Diferencias significativas entre molares e incisivos ( $p < 0.001$ ), molares y caninos ( $p < 0.001$ ), y molares y premolares ( $p < 0.001$ ).

Por otro lado, se analizó la correlación entre los valores Ct y la edad para ambos genes. Si bien se encontró una correlación positiva significativa para la secuencia telomérica ( $r = 0.611$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 91$ ; Figura 18), esta correlación se mostró muy débil para el gen RPLP0 ( $r = 0.233$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 91$ ; Figura 19).



**Figura 18.** Correlación entre el valor Ct para la secuencia telomérica (TEL) y la edad. La línea continua representa la regresión lineal ( $R^2 = 0.373$ ) y las líneas discontinuas muestran los intervalos de confianza al 95 % para los valores predichos.



**Figura 19.** Correlación entre el valor Ct para el gen RPLP0 y la edad. La línea continua representa la regresión lineal ( $R^2 = 0.054$ ) y las líneas discontinuas muestran los intervalos de confianza al 95 % para los valores predichos.

## 2.2. RATIO T/S RELATIVO

El valor medio del ratio T/S relativo en el conjunto de la muestra fue de  $0.92 \pm 0.29$ , siendo el valor mínimo de 0.38, calculado en un molar de un hombre de 46 años, y el valor máximo de 1.49, determinado en un molar perteneciente a un hombre de 23 años. El

análisis estadístico permitió comprobar si existían diferencias entre sexos, tipos de dientes y grupos de edad para esta variable, así como su relación con la edad.

### 2.2.1. Influencia del sexo, el tipo de diente y la edad

De forma general, no se observaron diferencias significativas cuando el rango promedio del ratio T/S relativo determinado en hombres se comparó con el rango promedio obtenido en mujeres (Tabla 7). En el caso de que se contara con más de un diente de un mismo sujeto, se consideró la media de los valores del ratio T/S relativo determinados para cada uno de los dientes. En cuanto a la influencia del tipo de diente, sí se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el rango promedio obtenido en molares y los rangos promedios calculados en incisivos, caninos y premolares, respectivamente (Tabla 8).

**Tabla 7.** Ratio T/S relativo según el sexo.

Sexo	<i>n</i>	Ratio T/S relativo	
		Media ± D.E.	Rango promedio
Hombres	20	0.94 ± 0.32	34.35
Mujeres	53	1.00 ± 0.24	38.00
Total	73	0.98 ± 0.26	

*n*: número de casos; D.E.: desviación estándar.

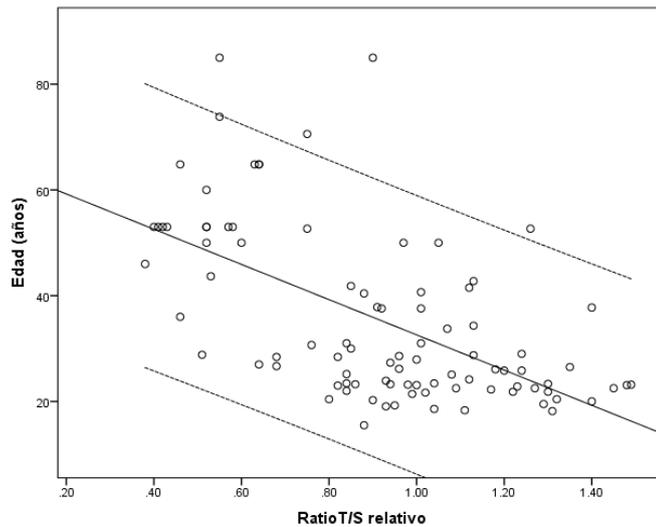
**Tabla 8.** Ratio T/S relativo según el tipo de diente.

Tipo de diente	<i>n</i>	Ratio T/S relativo	
		Media ± D.E.	Rango promedio
Incisivos	11	0.70 ± 0.28	27.09
Caninos	5	0.51 ± 0.10	10.90
Premolares	6	0.54 ± 0.03	13.58
Molares	69	1.02 ± 0.24	54.38*
Total	91	0.92 ± 0.29	

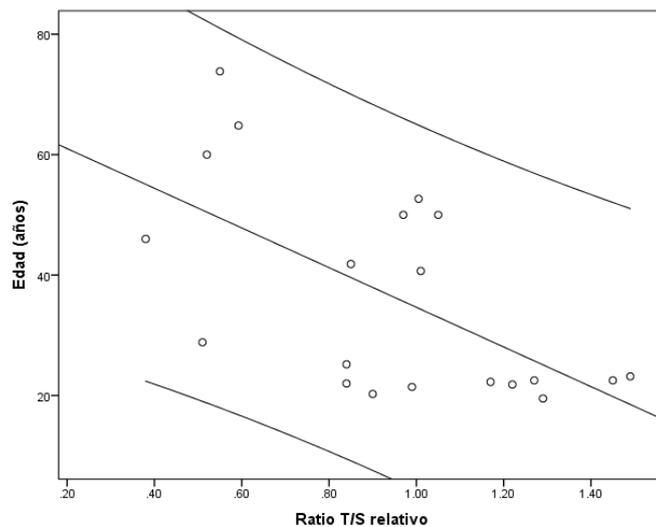
*n*: número de casos; D.E.: desviación estándar.

\* Diferencias significativas entre molares e incisivos ( $p < 0.001$ ), molares y caninos ( $p < 0.001$ ), y molares y premolares ( $p < 0.001$ ).

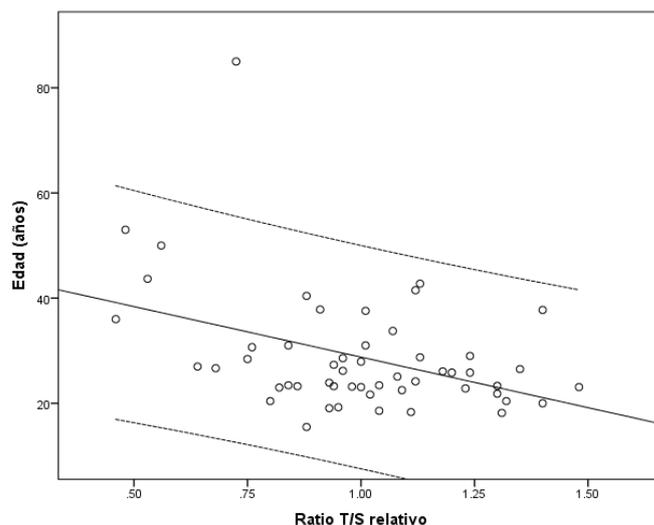
Asimismo, el coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r = -0.591$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 91$ ) indicó la existencia de una correlación lineal negativa estadísticamente significativa entre este ratio y la edad, señalando la presencia de valores de ratio T/S relativo más bajos en las edades más avanzadas (Figura 20). Esta correlación se mostró más fuerte en el sexo masculino ( $r = -0.607$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 20$ ; Figura 21) que en el femenino ( $r = -0.406$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 53$ ; Figura 22).



**Figura 20.** Correlación entre la longitud telomérica relativa (expresada como el ratio T/S relativo) y la edad. La línea continua representa la regresión lineal ( $R^2 = 0.349$ ) y las líneas de puntos señalan los intervalos de confianza al 95 % para los valores predichos.



**Figura 21.** Correlación entre la longitud telomérica relativa (expresada como el ratio T/S relativo) y la edad en hombres. La línea continua representa la regresión lineal ( $R^2 = 0.368$ ) y las líneas de puntos señalan los intervalos de confianza al 95 % para los valores predichos.



**Figura 22.** Correlación entre la longitud telomérica relativa (expresada como el ratio T/S relativo) y la edad en mujeres. La línea continua representa la regresión lineal ( $R^2 = 0.165$ ) y las líneas de puntos señalan los intervalos de confianza al 95 % para los valores predichos.

Además, cuando la muestra se dividió en grupos de edad (grupo 1: 15-35 años; grupo 2: 36-55 años; grupo 3:  $\geq 56$  años), los resultados mostraron diferencias significativas entre el rango promedio determinado en el grupo 1, con valores más altos, y los obtenidos en los grupos 2 y 3, respectivamente (Tabla 9).

**Tabla 9.** Ratio T/S relativo según el grupo de edad.

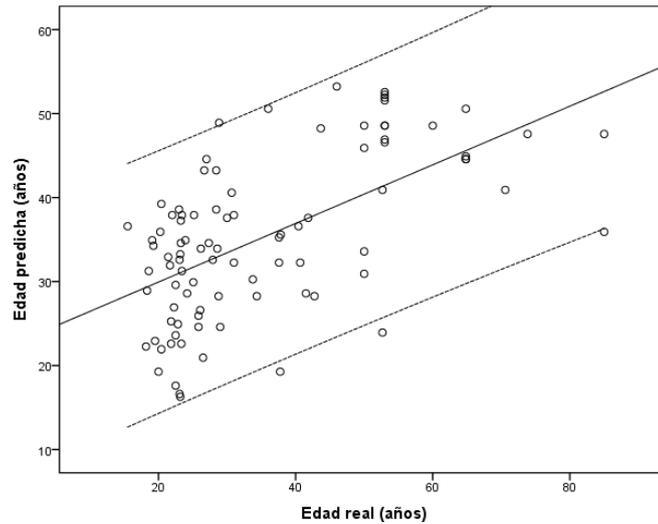
Grupo de edad <sup>a</sup>	n	Ratio T/S relativo	
		Media $\pm$ D.E.	Rango promedio
Grupo 1	56	1.04 $\pm$ 0.22	56.79*
Grupo 2	26	0.75 $\pm$ 0.30	32.02
Grupo 3	9	0.63 $\pm$ 0.13	19.22
Total	91	0.92 $\pm$ 0.29	

<sup>a</sup> Grupo 1: 15-35 años; grupo 2: 36-55 años; grupo 3:  $\geq 56$  años.

n: número de casos; D.E.: desviación estándar.

\* Diferencias significativas entre el grupo 1 y el grupo 2 ( $p < 0.001$ ) y el grupo 1 y el grupo 3 ( $p < 0.001$ ).

La ecuación de regresión lineal derivada para estimar la edad del sujeto a partir de la longitud telomérica relativa fue  $y = 65.89 - 33.30x$ , donde  $y$  representa la edad en años y  $x$  representa el ratio T/S relativo. El error estándar de la estimación de la edad fue de  $\pm 13.18$  años. Para evaluar la exactitud de esta ecuación, las edades reales de los sujetos participantes en el estudio se compararon con las edades predichas (Figura 23).



**Figura 23.** Edad real frente a la edad predicha de acuerdo al valor de la longitud telomérica relativa. La línea continua representa la regresión lineal ( $R^2 = 0.349$ ) y las líneas de puntos señalan los intervalos de confianza al 95 % para los valores predichos.

El error medio de la predicción en la muestra de estudio fue de  $\pm 9.85$  años. Las edades estimadas se encontraron dentro de los  $\pm 10$  años de la edad real en el 61.04 % de los sujetos (61.54 % de los dientes). Las diferencias (en años) entre la edades real y estimada por grupo de edad para todos los dientes se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Número de casos y porcentajes según la diferencia entre la edad real y la estimada por grupo de edad<sup>a</sup> para todos los dientes.

Grupo de edad <sup>a</sup>	n	Diferencia (años)		
		$\pm 0-5$	$\pm 6-10$	$> \pm 10$
Grupo 1 (%)	56	23 (41.07)	15 (26.78)	18 (32.14)
Grupo 2 (%)	26	14 (53.85)	4 (15.38)	8 (30.77)
Grupo 3 (%)	9			9 (100.0)
Total (%)	91	37 (40.66)	19 (20.88)	35 (38.46)

<sup>a</sup> Grupo 1: 15-35 años; grupo 2: 36-55 años; grupo 3:  $\geq 56$  años.  
n: número de casos.



## **V. DISCUSIÓN**



## 1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Debido a su resistencia natural frente a la degradación *post mortem* y a los cambios y daños causados por condiciones adversas de diversa índole, el diente se considera una fuente de ADN de elección para el análisis forense de restos humanos, incluso cuando se compara con el hueso (Higgins y Austin, 2013).

Tras la muerte, las propias enzimas del organismo, así como las bacterias, hongos e insectos que posteriormente invaden los restos, y, finalmente, los procesos químicos, fundamentalmente hidrólisis y oxidación, completarán el proceso de degradación del ADN (Barrio-Caballero, 2013). Sin embargo, la velocidad y el grado de desarrollo de este proceso dependerán tanto de factores endógenos como exógenos. Por ello, la calidad y cantidad del ADN extraído del diente se verán influenciadas no sólo por condiciones externas tales como la temperatura, el grado de humedad, el pH y el intervalo de tiempo *post mortem*, sino también por factores individuales como la edad y el sexo del sujeto, el tipo de diente y el estado de salud del mismo (Higgins y Austin, 2013).

Respecto a los factores externos, inmediatamente después de la exodoncia y de un primer lavado, las muestras se mantuvieron refrigeradas para ser almacenadas posteriormente a una temperatura de -20 °C en ambiente controlado. En este estudio, el inicio de los procesos de degradación del ADN estaría desencadenado por el cese de la perfusión sanguínea tras la exodoncia del diente, privando, por tanto, de oxígeno y nutrientes a los tejidos dentales. Por este motivo, con el fin de proteger al ADN de esta degradación post-exodoncia, las muestras se conservaron a bajas temperaturas durante todo el proceso de estudio. La temperatura es el factor que más condiciona la preservación del ADN (Barrio-Caballero, 2013). Se ha demostrado que la conservación a bajas temperaturas de un resto durante el período *post mortem* produce una ralentización de las reacciones químicas responsables de la degradación orgánica del ADN (Höss *et al.*, 1996), favoreciendo una conservación óptima (Lindahl, 1993). Además, en el caso que nos ocupa, es importante considerar que la deshidratación del tejido pulpar puede ser más rápida cuando los dientes se extraen y se almacenan a temperatura ambiente que cuando permanecen intactos en el cadáver (Pötsch *et al.*, 1992), afectando a la integridad del ADN recuperado.

Los dientes no son inmunes a la contaminación, aunque su menor porosidad hace que sean más resistentes a ella que los huesos (Higgins y Austin, 2013). En este estudio se empleó el mismo protocolo de limpieza y descontaminación superficial en todas las muestras, con el fin de eliminar cualquier fuente de contaminación exógena que pudiera tener un impacto negativo en los procesos posteriores de extracción, amplificación y análisis del ADN. El protocolo empleado incluyó lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % y una posterior irradiación con luz ultravioleta para eliminar la posible contaminación introducida durante el proceso de limpieza del diente, ya fuera por moléculas de ADN del propio investigador o presentes en forma de aerosol en el ambiente. El impacto real de las técnicas de descontaminación en el contenido de ADN del diente aún no ha sido bien establecido, sin embargo, se recomienda evitar el uso de productos químicos que puedan destruir el ADN endógeno (Higgins y Austin, 2013). En este caso, se optó por un método conservador, evitando el uso de la abrasión mecánica o de soluciones de hipoclorito sódico a altas concentraciones, y aplicado de forma rutinaria en el Laboratorio de Identificación Genética de la UGR, cuando la extracción de ADN se realiza a partir de dientes intactos.

Como paso previo a la extracción del ADN propiamente dicha, cada muestra fue pulverizada en un molino de impactación electromagnética refrigerado con nitrógeno líquido. El pulverizado permitió aumentar la superficie de tejido disponible para que actuaran los distintos reactivos empleados en el protocolo de extracción (Barrio-Caballero, 2013). Por otro lado, el uso de nitrógeno líquido hizo que la muestra se mantuviera congelada durante todo el proceso, haciéndola lo suficientemente frágil como para conseguir un pulverizado adecuado y evitando la posible degradación del material genético del diente por el calor generado durante la trituración mecánica (Barrio-Caballero, 2013). En este estudio, los dientes analizados, como ya se ha señalado previamente, se encontraban libres de caries y no habían estado expuestos a contaminantes ambientales. Por ello, se optó por no eliminar el esmalte de los dientes, evitando así la abrasión mecánica de la superficie dental, un procedimiento que podría afectar a la integridad del ADN por el calor producido. Algunos autores han indicado que, si el esmalte se procesa junto con el resto de tejidos dentales, las altas concentraciones de mineral, incluido el calcio, pueden complicar el proceso de extracción e inhibir la amplificación del ADN. En este estudio, la solución de extracción empleada contenía EDTA, un agente quelante de cationes bivalentes como el calcio. Además, la extracción

de ADN a partir del pulverizado completo del diente se ha empleado con éxito en el análisis de ADN en numerosos estudios (Smith *et al.*, 1993; Álvarez-García *et al.*, 1996; Sweet y Hildebrand, 1998; Pfeiffer *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2001; De Leo, Turrina y Marigo, 2002; Parsons *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2013).

El protocolo de extracción de ADN por fenol/cloroformo se encuentra entre los métodos de elección para la obtención de ADN a partir de huesos y dientes, ofreciendo buenos resultados en el análisis de ADN (Sweet y Hildebrand, 1998; Pfeiffer *et al.*, 1999; Alakoç y Aka, 2009; Rubio *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2013). Este protocolo permite recuperar una mayor cantidad de ADN, eliminar compuestos orgánicos y suele ser un procedimiento de uso extendido en los laboratorios de identificación genética. Entre los inconvenientes del método se encuentra la posibilidad de que no se eliminen completamente los inhibidores de la PCR en el extracto, el uso de disolvente orgánicos, caracterizados por su toxicidad y que pueden ser perjudiciales para la salud del investigador, y que se trata de un procedimiento largo y laborioso (Barrio-Caballero, 2013). En esta investigación, tanto el pulverizado completo del diente como la extracción orgánica con fenol/cloroformo, se emplearon de forma satisfactoria.

Antes de proceder a medir la longitud de los telómeros, se determinó la concentración de ADN en todos los dientes. Ya que los factores ambientales estaban controlados, se estudió la influencia de los factores individuales en la concentración del ADN extraído. Respecto al sexo, no se encontraron diferencias significativas en la concentración media de ADN dental entre hombres y mujeres (Tabla 2), en consonancia con lo publicado en un estudio anterior (Rubio *et al.*, 2013). En cuanto al tipo de diente, se observaron mayores concentraciones de ADN en molares (Tabla 3), de acuerdo con las observaciones publicadas por otros autores que señalaban mayores concentraciones de ADN en los dientes posteriores (De Leo, Turrina y Marigo, 2000; Rubio *et al.*, 2013). Estos resultados podrían explicarse por la presencia de un mayor volumen de pulpa y una mayor superficie radicular en los molares respecto a los demás tipos de dientes, siendo la pulpa y el cemento celular las mejores fuentes de ADN nuclear en el diente (Higgins y Austin, 2013). Por otro lado, el análisis de regresión lineal mostró una correlación significativa entre la edad del sujeto y la concentración de ADN dental, mostrando mayores concentraciones de ADN a edades más tempranas (Figura 12). Del mismo modo, la comparación entre grupos de edad destacó la presencia de concentraciones

significativamente más altas en los grupos de menor edad respecto a los de una edad más avanzada (Tabla 4). Estos hallazgos se pueden atribuir principalmente a la disminución en volumen, como consecuencia del depósito continuo de dentina, y a la pérdida de celularidad que la pulpa sufre con el paso del tiempo (Higgins y Austin, 2013).

Los resultados obtenidos tras evaluar la influencia de las distintas variables categóricas en la concentración de ADN en los distintos tipos de dientes y grupos de edad, siguieron, de forma general, la misma línea que las observaciones realizadas cuando se consideró el conjunto de la muestra. Las concentraciones de ADN fueron significativamente más altas en molares (Figuras 13, 15 y 17) y en los grupos de edad más jóvenes (Figuras 15, 16 y 17), con una relación lineal negativa entre la concentración de ADN y la edad (Figura 14), de igual forma que no se hallaron diferencias significativas entre sexos (Figura 13 y 16). Sin embargo, esta tendencia no se siguió en todos los grupos, no encontrándose significación, en cuanto a la correlación con la edad, en incisivos ( $n = 11$ ), caninos ( $n = 5$ ) y premolares ( $n = 6$ ) y, respecto a la mayor concentración de ADN en molares, en el grupo de mayor edad ( $n = 9$ ). Este hecho podría explicarse por el tamaño de la muestra para estos grupos, ya que fue considerablemente inferior respecto al tamaño del resto de grupos de su categoría.

## 2. LONGITUD TELOMÉRICA RELATIVA

Para determinar la longitud relativa de los telómeros en ADN extraído de diente, se empleó una modificación del método qPCR propuesto por Cawthon (2002). Aunque el método TRF (Allshire, Dempster y Hatie, 1989) se considera el método estándar de referencia para medir la longitud telomérica, se decidió utilizar un ensayo de qPCR por diversas razones. En primer lugar, el método qPCR requiere pequeñas cantidades de ADN y menor tiempo de procesamiento que otros métodos. Otras ventajas incluyen su alto rendimiento, simplicidad, robustez y reproducibilidad (Vera y Blasco, 2012). Además, se ha utilizado en estudios recientes para la estimación forense de la edad fundamentada en el acortamiento de los telómeros (Karlsson *et al.*, 2008; Hewakapuge *et al.*, 2008; Zubakov *et al.*, 2016).

Un aspecto a considerar en cualquier estudio de expresión génica es la selección apropiada del gen endógeno o de referencia, paso fundamental para una adecuada normalización y validación de los resultados. En este estudio, el gen RPLP0 se mostró estable y adecuado para su uso como control cuantitativo en nuestras muestras, no encontrándose diferencias en sus niveles de expresión cuando se hicieron comparaciones entre sexos (Tabla 5) y tipos de dientes (Tabla 6). Si bien se observó una correlación significativa no esperada entre el valor Ct y la edad del sujeto, esta fue muy débil (Figura 19).

En cuanto a los niveles de expresión de la secuencia telomérica, no se encontraron diferencias significativas entre los valores Ct determinados para cada sexo (Tabla 5). En relación a la influencia del tipo de diente, los molares mostraron un valor Ct significativamente más bajo que el resto de dientes (Tabla 6). Además, la correlación lineal de esta variable con la edad fue significativa (Figura 18). Por tanto, la secuencia telomérica presentó una mayor expresión en los molares y en los individuos más jóvenes, ya que en estos casos alcanzó el umbral de fluorescencia establecido en ciclos de amplificación más tempranos, es decir, presentó valores Ct más bajos.

Una vez calculada la longitud telomérica relativa de todas las muestras, expresada como el ratio T/S relativo, se procedió a evaluar la influencia del sexo, el tipo de diente y la edad en esta variable. En relación al efecto del sexo, no se encontraron diferencias significativas en la longitud relativa de los telómeros entre sexos (Tabla 7), de acuerdo con algunos autores (Srettabunjong *et al.*, 2014; Zubakov *et al.*, 2016) y en desacuerdo con lo publicado por otros (Ren *et al.*, 2009; Gardner *et al.*, 2014). La controversia en la literatura respecto a las diferencias entre sexos en la longitud telomérica es evidente. Un meta-análisis llevado a cabo por Gardner *et al.* (2014) mostró que las mujeres presentaban una longitud telomérica promedio mayor que los hombres, a pesar de la heterogeneidad significativa entre los distintos estudios evaluados. No obstante, la asociación entre el sexo y la longitud de los telómeros dependió del método de medición: el método TRF fue el único que mostró una diferencia inequívoca entre sexos, no encontrándose este efecto de forma universal cuando se aplicó el ensayo qPCR (el método aplicado en este estudio) o el método *Flow*-FISH. Además, hubo poca evidencia de que la fuerza de la asociación entre el sexo y la longitud de los telómeros variara según el grupo de edad (mayores o menores de 55 años). Uno de los argumentos expuestos para explicar una mayor longitud telomérica en mujeres es el efecto de los estrógenos, que pueden estimular la producción de telomerasa y proteger a los telómeros frente al daño producido por las especies reactivas de oxígeno (Aviv, 2002). También se ha sugerido que esta diferencia de longitud entre sexos podría estar causada por una menor tasa de desgaste de los telómeros en las mujeres (Okuda *et al.*, 2002). Si bien se ha observado que la tasa de acortamiento de los telómeros es más lenta en mujeres que en hombres (Bekaert *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011), esta asociación no mostró fortaleza, por lo que se hace necesario que se confirme en estudios de mayor envergadura (Chen *et al.*, 2011). Por otro lado, nuestros resultados mostraron una correlación más fuerte entre la longitud relativa de los telómeros y la edad en hombres (Figura 21), en consonancia con los datos obtenidos en otros estudios (Hewakapuge *et al.*, 2008; Srettabunjong *et al.*, 2014). La posibilidad de una mayor tasa de acortamiento en los telómeros del sexo masculino podría hacer más evidente la correlación negativa entre la longitud telomérica relativa y la edad. Con todo, nuestros resultados deben ser considerados con cautela debido al tamaño relativamente pequeño de muestra para los hombres ( $n = 20$ ).

Hasta donde conocemos, este es el primer estudio que compara la longitud relativa de los telómeros entre los diferentes tipos de dientes. La relevancia de este parámetro radica en la capacidad de poder seleccionar el tipo de diente más adecuado para la estimación de la edad cuando se disponga de varios dientes de un mismo individuo para el análisis forense. El proceso de extracción de ADN requiere la destrucción del diente, por lo que ya no estará disponible para futuros análisis en los que la preservación de la integridad de la muestra sea esencial, como puede ser el caso de los métodos morfológicos aplicados para la estimación de la edad dental. En este estudio, las estimaciones de la edad realizadas en caninos y molares mostraron un error inferior a  $\pm 5$  años en la mayoría de los casos (Tabla 11), aunque estos resultados deben valorarse con precaución teniendo en cuenta el reducido tamaño de muestra de incisivos, caninos y premolares.

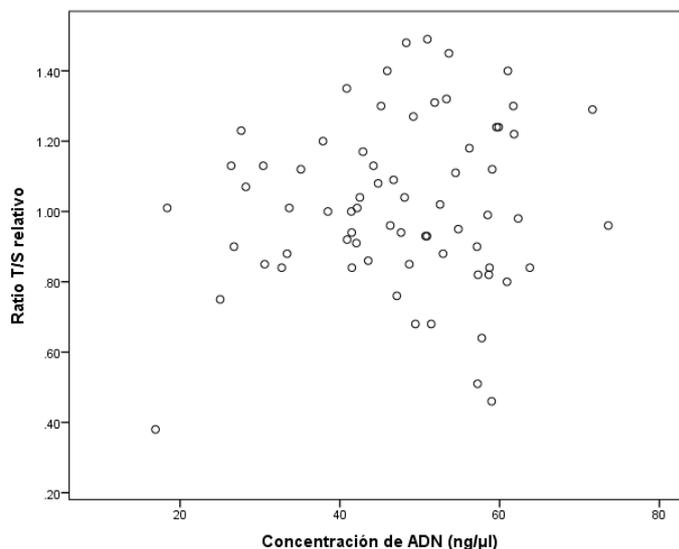
**Tabla 11.** Número de casos y porcentajes según la diferencia entre la edad real y la estimada por tipo de diente.

Tipo de diente	<i>n</i>	Diferencia (años)		
		$\pm 0-5$	$\pm 6-10$	$> \pm 10$
Incisivos (%)	11	4 (36.36)		7 (63.64)
Caninos (%)	5	3 (60.0)		2 (40.0)
Premolares (%)	6	1 (16.67)	3 (50.0)	2 (33.33)
Molares (%)	69	28 (40.58)	17 (24.64)	24 (34.78)
Total (%)	91	37 (40.66)	19 (20.88)	35 (38.46)

*n*: número de casos.

Nuestros resultados mostraron que los molares presentaban una longitud relativa media significativamente mayor que el resto de tipos de dientes (Tabla 8). Aunque también se observaron concentraciones medias de ADN más altas en molares (Tabla 3), no se encontró una correlación significativa entre la concentración de ADN y la longitud relativa de los telómeros en este tipo de diente que pudiera explicar este hallazgo ( $r = 0.118$ ,  $p = 0.336$ ,  $n = 69$ ; Figura 24). Sin embargo, el hecho de que los molares en nuestra muestra pertenecieran principalmente al grupo de edad más joven sí puede ayudar a interpretar estos resultados (Tabla 12). Como se ha indicado anteriormente, nuestros resultados mostraron una correlación negativa significativa entre la longitud relativa de los telómeros y la edad (Figura 20). Esta correlación también fue evidente al detectarse

longitudes relativas significativamente mayores en los grupos de edad de menor edad respecto a los grupos de mayor edad (Tabla 9). Por tanto, se hacen necesarios estudios a gran escala para poder establecer con mayor precisión posibles diferencias en la longitud de los telómeros entre los distintos tipos de dientes.



**Figura 24.** Diagrama de dispersión de la concentración de ADN frente al ratio T/S relativo en molares.

La asociación encontrada entre la longitud de los telómeros y la edad fue consistente con los resultados previamente publicados (Tsuji *et al.*, 2002; Takasaki *et al.*, 2003; Karlsson *et al.*, 2008; Hewakapuge *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2009; Srettabunjong *et al.*, 2014; Zubakov *et al.*, 2016), obtenidos tanto con el método TRF como con el método qPCR en una variedad de células y tejidos humanos (Tabla 13). No obstante, en aquellos estudios en los que se empleó el método TRF se encontraron correlaciones más fuertes, una observación también evidente cuando se estudiaron muestras dentales. Takasaki *et al.* (2003) publicaron una correlación entre la longitud promedio de los telómeros y la edad de 0.562, empleando el método TRF en ADN extraído de pulpa dental, mientras que, en nuestro estudio, analizando el ADN procedente del diente completo con el método qPCR, la correlación entre la longitud relativa del telómero y la edad fue menos fuerte ( $R^2 = 0.349$ ; Figura 20). Por otro lado, Kumei *et al.* (2011), también en muestras dentales, aunque utilizando hibridación *dot blot*, encontraron que la longitud del telómero se correlacionaba fuertemente con la edad ( $R^2 = 0.825$ ). Sin embargo, estos datos fueron el resultado del análisis de solo cuatro muestras de pulpa dental de mujeres, y no se propuso

una ecuación para estimar la edad.

**Tabla 12.** Ratio T/S relativo por grupo de edad y tipo de diente.

Grupo de edad <sup>a</sup>	Tipo de diente	n	Ratio T/S relativo
			Media ± D.E.
Grupo 1	Molares	56	1.04 ± 0.22
	Total	56	1.04 ± 0.22
Grupo 2	Incisivos	8	0.74 ± 0.33
	Caninos	3	0.48 ± 0.10
	Premolares	4	0.55 ± 0.03
	Molares	11	0.92 ± 0.29
	Total	26	0.75 ± 0.30
Grupo 3	Incisivos	3	0.61 ± 0.05
	Caninos	2	0.55 ± 0.13
	Premolares	2	0.54 ± 0.02
	Molares	2	0.83 ± 0.11
	Total	9	0.63 ± 0.13

<sup>a</sup> Grupo 1: 15-35 años; grupo 2: 36-55 años; grupo 3: ≥56 años.  
n: número de casos; D.E.: desviación estándar.

**Tabla 13.** Comparación entre los diferentes estudios sobre la longitud telomérica para la estimación forense de la edad.

Estudio	Tamaño muestra	Tejido	R <sup>2</sup>	E.E.	Método
Tsuji <i>et al.</i> (2002)	60	Sangre	0.69	±7.04	TRF
Takasaki <i>et al.</i> (2003)	100	Pulpa dental	0.56	±7.52	TRF
Karlsson <i>et al.</i> (2008)	96	Sangre	0.3	±22	qPCR
Hewakapuge <i>et al.</i> (2008)	167	Células bucales	0.04	N.D.	qPCR
Ren <i>et al.</i> (2009)	105	Sangre	0.83	±9.83	TRF
Srettabunjong <i>et al.</i> (2014)	100	Sangre	0.39	±9.60	TRF
Zubakov <i>et al.</i> (2016)	305	Sangre	0.14	±15.36	qPCR
Presente estudio	91	Diente	0.35	±13.18	qPCR

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación; E.E.: error estándar en años; N.D.: no determinado; TRF: análisis del fragmento de restricción terminal; qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real.

Cabe recordar que cada método utiliza diferentes metodologías y genera diferentes parámetros de medida de la longitud del telómero. El ensayo qPCR ofrece valores relativos de la longitud del telómero, mientras que el método TRF proporciona una longitud absoluta del telómero en kilobases, un valor que incluye también a las repeticiones subteloméricas y, por lo tanto, enmascara la longitud real de las repeticiones teloméricas (Aviv *et al.*, 2011; Vera y Blasco, 2012). Además, es importante señalar que los factores pre-analíticos que influyen en cada uno de los métodos pueden ser muy diferentes. Mientras que la integridad del ADN genómico es crucial para el análisis mediante *Southern blot*, es menos crítica para el ensayo qPCR. Sin embargo, la presencia de inhibidores residuales de la PCR, que pueden estar presentes incluso tras la purificación de ADN, puede contribuir a la variabilidad de los resultados ofrecidos por la qPCR (Aviv *et al.*, 2011). En cuanto a la correlación entre las medidas facilitadas por uno y otro método, existe discrepancia en la literatura. Algunos autores indican que esta correlación es fuerte ( $R^2 = 0.68-0.83$ ) (Cawthon, 2002; Cawthon, 2009; Aviv *et al.*, 2011; Kimura y Aviv, 2011), mientras que un estudio reciente, con un tamaño de muestra mucho más amplio, ha señalado una correlación más modesta ( $R^2 = 0.27$ ) (Martin-Ruiz *et al.*, 2015). Además, se ha señalado que el método TRF presenta menor error en la medición que el método qPCR. En la literatura se han descrito coeficientes de variación intra e inter-ensayo que oscilan entre el 1.25 % y el 12 % para el método TRF y entre el 2.27 % y el 28 % para el ensayo qPCR (Martin-Ruiz *et al.*, 2015). En nuestro ensayo, el CV medio entre placas ( $n = 5$ ) fue de 0.83 % para la PCR telomérica y de 0.31 % para la PCR del gen RPLP0. El CV intra-placa fue siempre inferior a 5.2 % en la PCR telomérica (CV medio = 0.88 %) y a 8.8 % en la PCR de RPLP0 (CV medio = 0.42 %).

Por tanto, las diferencias entre los resultados aportados por los diferentes estudios pueden deberse tanto a los métodos como a los protocolos empleados, encontrándose amplia variabilidad entre laboratorios (Martin-Ruiz *et al.*, 2015). Otros factores que pueden influir significativamente en la medida de la longitud del telómero incluyen factores pre-analíticos, tales como el método de extracción del ADN (Raschenberger *et al.*, 2016) o la presencia de inhibidores de la PCR (Aviv *et al.*, 2011), el tamaño de la muestra o el tipo de tejido analizado (Takubo *et al.*, 20010). Además, se deben tener en cuenta los factores raciales y étnicos (Diez-Roux *et al.*, 2009; Lynch *et al.*, 2016), genéticos (Aviv y Susser, 2013; Hjelmborg *et al.*, 2015), ambientales y de estilo de vida (Lin, Epel y Blackburn, 2012) que caracterizan a la muestra objeto de estudio. Varios trabajos han estimado que la

genética contribuye al 30-80 % de la variabilidad interindividual en la longitud de los telómeros, con un 20-70 % de variabilidad no explicada, que probablemente se debe a factores externos potencialmente modificables (Lin, Epel y Blackburn, 2012).

La ecuación estimada de regresión lineal simple presentó un error estándar de la estimación de  $\pm 13.18$  años, lo que sugiere que el método puede ser válido para asignar un rango de edad que contribuya a la identificación del individuo, pero no alcanza la precisión necesaria para ser aplicado por sí solo para la estimación de la edad con fines forenses. En relación a los resultados publicados con anterioridad, este error fue algo superior a los obtenidos en aquellos estudios que emplearon el método TRF para estimar la edad a partir de la longitud telomérica e inferior a los ofrecidos por los estudios que utilizaron el método qPCR (Tabla 13). Merece la pena señalar también que nuestros resultados se encuentran en el mismo rango de desviación que diferentes métodos morfológicos e histológicos empleados para estimar la edad dental (Meinl *et al.*, 2008) (Tabla 14). La discrepancia entre la edad cronológica real y la edad estimada en nuestra muestra aplicando esta ecuación fue inferior a  $\pm 5$  años en el 41 % de los casos en el grupo de edad más joven (15-35 años) y en el 54 % de los casos en el grupo de edad intermedio (36-55 años), en cambio, en todos los casos del grupo de mayores de 55 años, la diferencia entre las edades real y estimada fue superior a  $\pm 10$  años (Tabla 10). Estos resultados revelan que, en nuestra muestra, cuanto mayor fue la edad del sujeto, menor fue la exactitud del método mostrando una mayor discrepancia entre la edad real y la edad estimada, una interpretación ampliamente aceptada en la literatura (Cunha *et al.*, 2009).

**Tabla 14.** Error de diferentes métodos dedicados a la estimación de la edad dental en adultos, de acuerdo con Meinl *et al.* (2008).

Método	E.A.M.	E.E.
Lamendin <i>et al.</i> (1992)	14.8	15.9
Bang y Ramm (1970)	13.0	14.9
Recuento de anillos de cemento	6.9	9.4
Presente estudio	9.85	13.18

E.A.M.: error absoluto medio en años; E.E.: error estándar en años.

El error encontrado en las estimaciones llevadas a cabo en nuestro estudio puede ser el reflejo de las diferencias en la longitud relativa de los telómeros entre individuos de la misma edad, tal y como otros autores han sugerido (Karlsson *et al.*, 2008; Hewakapuge *et al.*, 2008; Srettabunjong *et al.*, 2014). Por ejemplo, la longitud telomérica relativa determinada para los 11 individuos que contaban con 23 años de edad osciló entre 0.82 y 1.49 ( $1.06 \pm 0.25$ ) (Tabla 15), lo que ilustra una clara variabilidad entre individuos de la misma edad en nuestra muestra.

**Tabla 15.** Valores del ratio T/S relativo para los individuos de 23 años de edad.

	Sexo	Tipo de diente	Ratio T/S relativo
1	Mujer	Molar	0.82
2	Mujer	Molar	0.84
3	Mujer	Molar	0.86
4	Mujer	Molar	0.93
5	Mujer	Molar	0.94
6	Mujer	Molar	0.98
7	Mujer	Molar	1.00
8	Mujer	Molar	1.04
9	Mujer	Molar	1.30
10	Mujer	Molar	1.48
11	Hombre	Molar	1.49

En conclusión, el desarrollo de métodos de biología molecular como herramienta para la estimación de la edad con fines forenses se encuentra cada vez más extendido, pudiendo ser especialmente útiles en aquellos casos en los que la información morfológica es limitada. Nuestros resultados mostraron una correlación significativa entre la edad y la longitud relativa de los telómeros determinada en ADN dental por qPCR. Asimismo, revelaron que la longitud relativa de los telómeros no se vio afectada por el sexo, aunque su correlación con la edad presentó mayor fortaleza en hombres que en mujeres. En los molares, la longitud telomérica relativa fue significativamente mayor cuando se comparó con aquellas determinadas en los demás tipos de dientes. El error estándar de las predicciones de la edad realizadas en esta investigación a partir de la longitud telomérica

relativa, expresada como el valor del ratio T/S relativo, sugiere que este método puede ser utilizado para asignar un intervalo de edad que contribuya a la identificación del individuo, especialmente cuando los tejidos mineralizados sean la única muestra forense disponible. Sin embargo, la magnitud de este error hace que el método no pueda ser considerado lo suficientemente preciso para ser aplicado de forma aislada para la estimación forense de la edad, especialmente en las edades más avanzadas. Es por ello que la determinación de la longitud relativa de los telómeros en ADN dental se podría complementar con el estudio, también en muestras de diente, de biomarcadores del envejecimiento de aparición más reciente, como el análisis de la metilación del ADN, con el fin de obtener modelos más precisos para predecir la edad con fines forenses a partir de restos humanos esqueletizados.



## **VI. CONCLUSIONES**



**Primera:**

La longitud relativa de los telómeros, expresada mediante el ratio T/S relativo, se ha determinado de forma satisfactoria en muestras de ADN extraído de diente, aplicando el método qPCR.

**Segunda:**

La longitud telomérica relativa se asocia de forma significativa con la edad, siendo el ADN procedente de los dientes de sujetos más jóvenes el que presenta telómeros más largos. La longitud telomérica relativa no difiere entre sexos. En cuanto a la influencia del tipo de diente, los molares presentan mayores longitudes teloméricas.

**Tercera:**

La longitud de los telómeros no se ve influenciada por la concentración del ADN de partida de la muestra. Por su parte, esta concentración no se afecta por el sexo, es significativamente más alta en molares y se correlaciona negativamente con la edad.

**Cuarta:**

La medida de la longitud telomérica en ADN dental se incorpora como un método molecular novedoso en la contribución a la estimación de la edad con fines forenses. Se propone un modelo de regresión lineal para estimar la edad de los sujetos a partir de la longitud relativa de sus telómeros, de utilidad en el campo forense para asignar un intervalo de edad que contribuya a la identificación del individuo, especialmente en aquellos casos en los que se disponga únicamente de restos esqueléticos.

**Quinta:**

El error medio de la predicción de la edad en la muestra de estudio es de  $\pm 9.85$  años. Este error es más alto en el grupo de edad más avanzada, mostrando que cuanto mayor es la edad real del sujeto, menor es la exactitud del método. Es por ello que se hace necesario complementar el análisis de la longitud relativa de los telómeros en ADN dental con el estudio, en muestras de diente, de otros marcadores moleculares del envejecimiento con el fin de obtener modelos que permitan predecir la edad de una forma más precisa a partir de tejidos dentarios.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



## A

Açil Y, Springer ING, Prasse JG, Hedderich J, Jepsen S (2002) Concentration of collagen cross-links in human dentin bears no relation to the individual age. *International Journal of Legal Medicine* 116:340-343. doi: 10.1007/s00414-002-0333-8

Acsádi G, Nemeskéri I (1970) *History of human life span and mortality*. Budapest: Akadémiai Kiadó.

Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A (2010) Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA: a review. *Forensic Science International Genetics* 4:148-157. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.09.007

Alakoç YD, Aka PS (2009) «Orthograde entrance technique» to recover DNA from ancient teeth preserving the physical structure. *Forensic Science International* 188:96-98. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.03.020

Albert AM, Maples WR (1995) Stages of epiphyseal union for thoracic and lumbar vertebral centra as a method of age determination for teenage and young adult skeletons. *Journal of Forensic Sciences* 40:623-633. doi: 10.1520/JFS13838J

Allende M, Molina E, González-Porras JR, Toledo E, Lecumberri R, Hermida J (2016) Short leukocyte telomere length is associated with cardioembolic stroke risk in patients with atrial fibrillation. *Stroke* 47:863-865. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011837

Allshire RC, Dempster M, Hastie ND (1989) Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Research* 17:4611-4627. doi: 10.1093/nar/17.12.4611

Alonso A, Andelinović S, Martín P, Sutlović D, Erceg I, Huffine E, de Simón LF, Albarrán C, Definis-Gojanović M, Fernández-Rodríguez A, García P, Drmić I, Rezić B, Kuret S, Sancho M, Primorac D (2001) DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croatian Medical Journal* 42:260-266.

Álvarez-García A, Muñoz I, Pestoni C, Lareu MV, Rodríguez-Calvo MS, Carracedo A (1996) Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. *International Journal of Legal Medicine* 109:125-129. doi: 10.1007/BF01369671

Ardila Medina CM (2009) Recesión gingival: una revisión de su etiología, patogénesis y tratamiento. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral* 21:35-43. doi: 10.4321/S1699-65852009000100005

Aubert G, Hills M, Lansdorp PM (2012) Telomere length measurement: caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutation Research* 730:59-67. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.04.003

Aviv A (2002) Telomeres, sex, reactive oxygen species, and human cardiovascular aging. *Journal of Molecular Medicine* 80:689-695. doi: 10.1007/s00109-002-037

Aviv A, Hunt SC, Lin J, Cao X, Kimura M, Blackburn E (2011) Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic Acids Research* 39:e134. doi: 10.1093/nar/gkr634

Aviv A, Susser E (2013) Leukocyte telomere length and the father's age enigma: Implications for population health and for life course. *International Journal of Epidemiology* 42:457-462. doi: 10.1093/ije/dys236

Azzalin CM, Reichenbach P, Khoraiuli L, Giulotto E, Lingner J (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 318:798-801. doi: 10.1126/science.1147182

## **B**

Baccino E, Ubelaker D, Hayek L, Zerilli A (1999) Evaluation of seven methods of estimating age at death from mature human skeletal remains. *Journal of Forensic Sciences* 44:931-936. doi:10.1520/JFS12019J

Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D (2003) Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nature Genetics* 33:203-207. doi: 10.1038/ng1084

Bang G, Ramm E (1970) Determination of age in humans from root dentin transparency. *Acta Odontologica Scandinavica* 28:3-35. doi: 10.3109/00016357009033130

Barrio-Caballero PA (2013) Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal* 39:54-62. doi: 10.1016/j.reml.2012.11.002

Bassed RB, Briggs C, Drummer OH (2011) Age estimation using CT imaging of the third molar tooth, the medial clavicular epiphysis, and the spheno-occipital synchondrosis: a multifactorial approach. *Forensic Science International* 212:273.e1-e5. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.06.007

Bassed RB, Drummer OH, Briggs C, Valenzuela A (2011) Age estimation and the medial clavicular epiphysis: analysis of the age of majority in an Australian population using computed tomography. *Forensic Science, Medicine and Pathology* 7:148-154. doi: 10.1007/s12024-010-9200-y

Baumann P, Price C (2010) Pot1 and telomere maintenance. *FEBS Letters* 584:3779-3784. doi: 10.1016/j.febslet.2010.05.024

Baumann P, Widek T, Merkens H, Boldt J, Petrovic A, Urschler M, Kirnbauer B, Jakse N, Scheurer E (2015) Dental age estimation of living persons: comparison of MRI with OPG. *Forensic Science International* 253:76-80. doi: 10.1016/j.forsciint.2015.06.001

Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van de Voorde W, Decorte R (2015) Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics* 10:922-930. doi: 10.1080/15592294.2015.1080413

Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Langlois M, Segers P, Cooman L, Van Damme P, Cassiman P, Van Criekinge W, Verdonck P, De Backer GG, Gillebert TC, Van Oostveldt P; Asklepios investigators (2007) Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging Cell* 6:639-647. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00321.x

Bekaert S, De Meyer T, Van Oostveldt P (2005) Telomere attrition as ageing biomarker. *Anticancer Research* 25:3011-3021.

Bell JT, Tsai PC, Yang TP, Pidsley R, Nisbet J, Glass D, Mangino M, Zhai G, Zhang F, Valdes A, Shin SY, Dempster EL, Murray RM, Grundberg E, Hedman AK, Nica A, Small KS; MuTHER Consortium, Dermitzakis ET, McCarthy MI, Mill J, Spector TD, Deloukas P (2012) Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genetics* 8:e1002629. doi: 10.1371/journal.pgen.1002629

Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Schotta G, Klatt P, Jenuwein T, Blasco MA (2007) Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *The Journal of Cell Biology* 178:925-936. doi: 10.1083/jcb.200703081

Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM (2016) Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging* 8:3-11. doi: 10.18632/aging.100871

Bertacci A, Chersoni S, Davidson CL, Prati C (2007) In vivo enamel fluid movement. *European Journal of Oral Sciences* 115:169-173. doi: 10.1111/j.1600-0722.2007.00445.x

Bianchi A, Shore D (2008) How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Molecular Cell* 31:153-165. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.013

Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, Yu W, Rongione MA, Ekström TJ, Harris TB, Launer LJ, Eiriksdottir G, Leppert MF, Sapienza C, Gudnason V, Feinberg AP (2008) Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA* 299:2877-2883. doi: 10.1001/jama.299.24.2877

Blackburn EH (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106:661-673. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00492-5

Blackburn EH, Epel ES, Lin J (2015) Human telomere biology: a contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* 350:1193-1198. doi: 10.1126/science.aab3389

Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E (2011) Epigenetic predictor of age. *PLoS One* 6:e14821. doi: 10.1371/journal.pone.0014821

Bolaños MV, Moussa H, Manrique MC, Bolaños MJ (2003) Radiographic evaluation of third molar development in Spanish children and young people. *Forensic Science International* 133:212-219. doi: 10.1016/S0379-0738(03)00037-9

Bosshardt DD (2005) Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *Journal of Dental Research* 84:390-406. doi: 10.1177/154405910508400501

Boy SC, Bernitz H, Van Heerden WF (2003) Flow cytometric evaluation of postmortem pulp DNA degradation. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 24:123-127. doi: 10.1097/01.PAF.0000069647.55347.3b

Bradt Miller B, Buikstra JE (1984) Effects of burning on human bone microstructure: a preliminary study. *Journal of Forensic Sciences* 29:535-540. doi: 10.1520/JFS11701J

Brooks S, Suchey JM (1990) Skeletal age determination based on the os pubis: a comparison of the Acsádi-Nemeskéri and Suchey-Brooks methods. *Human Evolution* 5:227-238. doi: 10.1007/BF02437238

Buckberry J, Chamberlain AT (2002) Age estimation from the auricular surface of the ilium: a revised method. *American Journal of Physical Anthropology* 239:231-239. doi: 10.1002/ajpa.10130

## C

Cameriere R, Ferrante L, Belcastro MG, Bonfiglioli B, Rastelli E, Cingolani M (2007) Age estimation by pulp/tooth ratio in canines by mesial and vestibular peri-apical X-rays. *Journal of Forensic Sciences* 52:1151-1155. doi: 10.1111/j.1556-4029.2007.00530.x

Cameriere R, Ferrante L, Cingolani M (2004) Variations in pulp/tooth area ratio as an indicator of age: a preliminary study. *Journal of Forensic Sciences* 49:317-319. doi: 10.1520/JFS2003259

Campa D, Martino A, Varkonyi J, Lesueur F, Jamroziak K, Landi S, Jurczyszyn A, Marques H, Andersen V, Jurado M, Brenner H, Petrini M, Vogel U, García-Sanz R, Buda G, Gemignani F, Ríos R, Vangsted AJ, Dumontet C, Martínez-López J, Moreno MJ, Stępień A, Wątek M, Moreno V, Dieffenbach AK, Rossi AM, Butterbach K, Jacobsen SE, Goldschmidt H, Sainz J, Hillengass J, Orciuolo E, Dudziński M, Weinhold N, Reis RM, Canzian F (2015) Risk of multiple myeloma is associated with polymorphisms within telomerase genes and telomere length. *International Journal of Cancer* 136:E351-E358. doi: 10.1002/ijc.29101

Carvalho TS, Lussi A (2017) Age-related morphological, histological and functional changes in teeth. *Journal of Oral Rehabilitation* 44:291-298. doi: 10.1111/joor.12474

Caviedes-Bucheli J, Avendaño N, Gutierrez R, Hernández S, Moreno GC, Romero MC, Muñoz HR (2006) Quantification of lactate-dehydrogenase and cell viability in postmortem human dental pulp. *Journal of Endodontics* 32:183-185. doi: 10.1016/j.joen.2005.10.040

Cawthon RM (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research* 30:e47. doi: 10.1093/nar/30.10.e47

Cawthon RM (2009) Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research* 37:1-7. doi: 10.1093/nar/gkn1027

Cesare AJ, Reddel RR (2010) Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature Reviews Genetics* 11:319-330. doi: 10.1038/nrg2763

Chaillet N, Nyström ME, Demirjian A (2005) Comparison of dental maturity in children of different ethnic origins: international maturity curves for clinicians. *Journal of Forensic Sciences* 50:1164-1174. doi: 10.1520/JFS2005020

Chavez A, Tsou AM, Johnson FB (2009) Telomeres do the (un)twist: helicase actions at chromosome termini. *Biochimica et Biophysica Acta* 1792:329-340. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.02.008

Chen LY, Redon S, Lingner J (2012) The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature* 488:540-544. doi: 10.1038/nature11269

Chen W, Kimura M, Kim S, Cao X, Srinivasan SR, Berenson GS, Kark JD, Aviv A (2011) Longitudinal versus cross-sectional evaluations of leukocyte telomere length dynamics: age-dependent telomere shortening is the rule. *The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences* 66:312-319. doi: 10.1093/gerona/glq223

Chiego DJ, Avery JK (2014) *Essentials of oral histology and embryology: a clinical approach*. San Luis: Mosby.

Chow TT, Zhao Y, Mak SS, Shay JW, Wright WE (2012) Early and late steps in telomere overhang processing in normal human cells: the position of the final RNA primer drives telomere shortening. *Genes & Development* 26:1167-1178. doi: 10.1101/gad.187211.112

Churikov D, Price CM (2008) Pot1 and cell cycle progression cooperate in telomere length regulation. *Nature Structural & Molecular Biology* 15:79-84. doi: 10.1038/nsmb1331

Cifuentes-Rojas C, Shippen DE (2012) Telomerase regulation. *Mutation Research* 730:20-27. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.10.003

Collins MJ, Riley MS, Child AM, Turner-Walker G (1995) A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen. *Journal of Archaeological Science* 22:175-183. doi: 10.1006/Jasc.1995.0019

Cool SM, Hendrikz JK, Wood WB (1995) Microscopic age changes in the human occipital bone. *Journal of Forensic Sciences* 40:789-796. doi: 10.1520/JFS15385J

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* 193:1-13. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.09.008

Cunningham C, Scheuer L, Black S (2016) Skeletal development and ageing. En: *Developmental juvenile osteology*, pp 5-18. Londres: Academic Press.

## D

Daly CG, Kieser JB, Corbet EF, Seymour GJ (1979) Cementum involved in periodontal disease: a review of its features and clinical management. *Journal of Dentistry* 7:185-193. doi: 10.1016/0300-5712(79)90088-5

De Leo D, Turrina S, Marigo M (2000) Effects of individual dental factors on genomic DNA analysis. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 21:411-415. doi: 10.1097/00000433-200012000-00023

De Salvia A, Calzetta C, Orrico M, De Leo D (2004) Third mandibular molar radiological development as an indicator of chronological age in a European population. *Forensic Science International* 146 Suppl:S9-S12. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.09.021

Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM (1973) A new system of dental age assessment. *Human Biology* 45:211-227.

Denchi EL, de Lange T (2007) Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* 448:1068-1071. doi: 10.1038/nature06065

Diez-Roux AV, Ranjit N, Jenny NS, Shea S, Cushman M, Fitzpatrick A, Seeman T (2009) Race/ethnicity and telomere length in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Aging Cell* 8:251-257. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00470.x

Diotti R, Loayza D (2011) Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus* 2:119-135. doi: 10.4161/nucl.2.2.15135

Dobberstein RC, Huppertz J, von Wurmb-Schwark N, Ritz-Timme S (2008) Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *Forensic Science International* 179:181-191. doi: 10.1016/j.forsciint.2008.05.017

Dobberstein RC, Tung SM, Ritz-Timme S (2010) Aspartic acid racemisation in purified elastin from arteries as basis for age estimation. *International Journal of Legal Medicine* 124:269-275. doi: 10.1007/s00414-009-0392-1

**E**

Elbers CC, García ME, Kimura M, Cummings SR, Nalls MA, Newman AB, Park V, Sanders JL, Tranah GJ, Tishkoff SA, Harris TB, Aviv A (2014) Comparison between southern blots and qPCR analysis of leukocyte telomere length in the health ABC study. *The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences* 69:527-531. doi: 10.1093/gerona/glt121

Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM (2004) Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:17312-17315. doi: 10.1073/pnas.0407162101

**F**

Flores I, Canela A, Vera E, Tejera A, Cotsarelis G, Blasco MA (2008) The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes & Development* 22:654-667. doi: 10.1101/gad.451008

Foti B, Adalian P, Signoli M, Ardagna Y, Dutour O, Leonetti G (2001) Limits of the Lamendin method in age determination. *Forensic Science International* 122:101-106. doi: 10.1016/S0379-0738(01)00472-8

Freire-Aradas A, Phillips C, Mosquera-Miguel A, Girón-Santamaría L, Gómez-Tato A, Casares de Cal M, Álvarez-Dios J, Ansedo-Bermejo J, Torres-Español M, Schneider PM, Pośpiech E, Branicki W, Carracedo Á, Lareu MV (2016) Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. *Forensic Science International Genetics* 24:65-74. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.06.005

**G**

Garamendi González PM, Bañón González R, Pujol Robinat A, Aguado Bustos FF, Landa Tabuyo MI, Prieto Carrero JL, Serrulla Rech F (2011) Recomendaciones sobre métodos de estimación forense de la edad de los menores extranjeros no acompañados. *Revista Española de Medicina Legal* 37:22-29. doi: 10.1016/S0377-4732(11)70057-8

Garamendi González PM, Landa Tabuyo MI (2010) Determinación de la edad mediante la radiología. *Revista Española de Medicina Legal* 36:3-13. doi: 10.1016/S0377-4732(10)70030-4

Garamendi P, Botella M, Alemán I, Landa M (2007) Fusión de la epífisis esternal de la clavícula en relación con la edad: aplicaciones en la estimación forense de la edad. *Cuadernos de Medicina Forense* 13:143-156. doi: 10.4321/S1135-76062007000200003

García-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA (2003) Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nature Genetics* 36:94-99. doi: 10.1038/ng1278

Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, Martin-Ruiz C, Shiels P, Sayer AA, Barbieri M, Bekaert S, Bischoff C, Brooks-Wilson A, Chen W, Cooper C, Christensen K, De Meyer T, Deary I, Der G, Diez-Roux A, Fitzpatrick A, Hajat A, Halaschek-Wiener J, Harris S, Hunt SC, Jagger C, Jeon HS, Kaplan R, Kimura M, Lansdorp P, Li C, Maeda T, Mangino M, Nawrot TS, Nilsson P, Nordfjall K, Paolisso G, Ren F, Riabowol K, Robertson T, Roos G, Staessen JA, Spector T, Tang N, Unryn B, van der Harst P, Woo J, Xing C, Yadegarfar ME, Park JY, Young N, Kuh D, von Zglinicki, Ben-Shlomo Y; Halcyon study team (2014) Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Experimental Gerontology* 51:15-27. doi: 10.1016/j.exger.2013.12.004

Gaytmenn R, Sweet D (2003) Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *Journal of Forensic Sciences* 48:622-625. doi: 10.1520/JFS2002372

Gonçalves PF, Sallum EAS, Sallum AW, Casati MZ, Toledo S, Nociti FH (2005) Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Brazilian Journal of Oral Sciences* 4: 651-658. doi: 10.20396/bjos.v4i12.8641790

Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, Blasco MA (2006) DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nature Cell Biology* 8:416-424. doi: 10.1038/ncb1386

Graham JP, O'Donnell CJ, Craig PJ, Walker GL, Hill AJ, Cirillo GN, Clark RM, Gledhill SR, Schneider-Kolsky ME (2010) The application of computerized tomography (CT) to the dental ageing of children and adolescents. *Forensic Science International* 195:58-62. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.11.011

Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-413. doi: 10.1016/0092-8674(85)90170-9

Greulich W, Pyle S (1959) Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. Stanford: Stanford University Press.

Griffin RC, Chamberlain AT, Hotz G, Penkman KE, Collins MJ (2009) Age estimation of archaeological remains using amino acid racemization in dental enamel: a comparison of morphological, biochemical, and known ages-at-death. *American Journal of Physical Anthropology* 140:244-252. doi: 10.1002/ajpa.21058

Griffin RC, Moody H, Penkman KE, Fagan MJ, Curtis N, Collins MJ (2008) A new approach to amino acid racemization in enamel: testing of a less destructive sampling methodology. *Journal of Forensic Sciences* 53:910-916. doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00753.x

Grippo JO, Simring M, Schreiner S (2004) Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited. *Journal of the American Dental Association* 135:1109-1118. doi: 10.14219/jada.archive.2004.0369

Gunst K, Mesotten K, Carbonez A, Willems G (2003) Third molar root development in relation to chronological age: a large sample sized retrospective study. *Forensic Science International* 136:52-57. doi: S0379073803002639

Guo Y, Olze A, Ottow C, Schmidt S, Schulz R, Heindel W, Pfeiffer H, Vieth V, Schmelting A (2015) Dental age estimation in living individuals using 3.0 T MRI of lower third molars. *International Journal of Legal Medicine* 129:1265-1270. doi: 10.1007/s00414-015-1238-7

Gustafson G (1950) Age determination on teeth. *Journal of the American Dental Association* 41:45-54. doi: 10.14219/jada.archive.1950.0132

Gustafson G, Koch G (1974) Age estimation up to 16 years of age based on dental development. *Odontologisk Revy* 25:297-306.

## H

Haavikko K (1974) Tooth formation age estimated on a few selected teeth. A simple method for clinical use. *Proceedings of the Finnish Dental Society* 70:15-19.

Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular Cell* 49:359-367. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.016

Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458-460. doi: 10.1038/345458a0

Helfman PM, Bada JL (1975) Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72:2891-2894. doi: 10.1073/pnas.72.8.2891

Hershkovitz I, Latimer B, Dutour O, Jellema LM, Wish-Baratz S, Rothschild C, Rothschild BM (1997) Why do we fail in aging the skull from the sagittal suture? *American Journal of Physical Anthropology* 103:393-399. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199707)103:3<393::AID-AJPA8>3.0.CO;2-R

Hewakapuge S, van Oorschot RAH, Lewandowski P, Baidur-Hudson S (2008) Investigation of telomere lengths measurement by quantitative real-time PCR to predict age. *Legal Medicine* 10:236-242. doi: 10.1016/j.legalmed.2008.01.007

Higgins D, Austin JJ (2013) Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. *Science & Justice* 53:433-441. doi: 10.1016/j.scijus.2013.06.001

Hjelmborg JB, Dalgard C, Moller S, Steenstrup T, Kimura M, Christensen K, Kyvik KO, Aviv A (2015) The heritability of leucocyte telomere length dynamics. *Journal of Medical Genetics* 52:297-302. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102736

Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14:R115. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115

Horvath S, Zhang Y, Langfelder P, Kahn RS, Boks MP, van Eijk K, van den Berg LH, Ophoff RA (2012) Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome Biology* 13:R97. doi: 10.1186/gb-2012-13-10-r97

Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S (1996) DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research* 24:1304-1307. doi: 10.1093/nar/24.7.1304

Huffman KE, Levene SD, Tesmer VM, Shay JW, Wright WE (2000) Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *The Journal of Biological Chemistry* 275:19719-19722. doi: 10.1074/jbc.M002843200

## I

INTERPOL (2014) Disaster Victim Identification Guide. Disponible en: <https://www.interpol.int/INTERPOL-expertise/Forensics/DVI-Pages/DVI-guide>

Işcan MY, Loth SR, Wright RK (1984) Age estimation from the rib by phase analysis: white males. *Journal of Forensic Sciences* 29:1094-1104.

Işcan MY, Loth SR, Wright RK (1985) Age Estimation from the rib by phase analysis: white females. *Journal of Forensic Sciences* 30:853-863. doi: 10.1520/JFS11018J

Işcan MY, Loth SR, Wright RK (1987) Racial variation in the sternal extremity of the rib and its effect on age determination. *Journal of Forensic Sciences* 32:452-466. doi: 10.1520/JFS11147J

Issa JP (2003) Age-related epigenetic changes and the immune system. *Clinical Immunology* 109:103-108. doi: 10.1016/S1521-6616(03)00203-1

Izumi Y (1995) The accuracy of Risser staging. *Spine* 20:1868-1871. doi: 10.1097/00007632-199509000-00004

## J

Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33 Suppl:245-254. doi: 10.1038/ng1089

Johanson G (1971) Age determination from human teeth. *Odontologisk Revy* 22:40-126.

Jones MJ, Goodman SJ, Kober MS (2015) DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* 14:924-932. doi: 10.1111/accel.12349

## K

Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GH, Wong AH, Feldcamp LA, Virtanen C, Halfvarson J, Tysk C, McRae AF, Visscher PM, Montgomery GW, Gottesman II, Martin NG, Petronis A (2009) DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nature Genetics* 41:240-245. doi: 10.1038/ng.286

Karlsson AO, Svensson A, Marklund A, Holmlund G (2008) Estimating human age in forensic samples by analysis of telomere repeats. *Forensic Science International Genetics Supplement Series* 1:569-571. doi: 10.1016/j.fsigss.2007.10.153

Kerley ER, Ubelaker DH (1978) Revisions in the microscopic method of estimating age at death in human cortical bone. *American Journal of Physical Anthropology* 49:545-546. doi: 10.1002/ajpa.1330490414

Kibe T, Osawa GA, Keegan CE, de Lange T (2010) Telomere protection by TPP1 is mediated by POT1a and POT1b. *Molecular and Cellular Biology* 30:1059-1066. doi: 10.1128/MCB.01498-09

Kimura M, Aviv A (2011) Measurement of telomere DNA content by dot blot analysis. *Nucleic Acids Research* 39:e84. doi: 10.1093/nar/gkr235

Klumb K, Matzenauer C, Reckert A, Lehmann K, Ritz-Timme S (2016) Age estimation based on aspartic acid racemization in human sclera. *International Journal of Legal Medicine* 130:207-211. doi: 10.1007/s00414-015-1255-6

Koch CM, Wagner W (2011) Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging* 3:1018-1027. doi: 10.18632/aging.100395

Kumei Y, Akiyama H, Onizuka T, Kobayashi C (2011) Variation of telomeric DNA content in gingiva and dental pulp. *Archives of Oral Biology* 56:1641-1645. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.07.009

Kvaal SI, Kolltveit KM, Thomsen IO, Solheim T (1995) Age estimation of adults from dental radiographs. *Forensic Science International* 74:175-185. doi: 10.1016/0379-0738(95)01760-G

Kvaal SI, Solheim T, Bjerketvedt D (1996) Evaluation of preparation, staining and microscopic techniques for counting incremental lines in cementum of human teeth. *Biotechnic & Histochemistry* 71:165-172. doi: 10.3109/10520299609117155

## L

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* 37:1373-1379. doi: 10.1520/JFS13327J

Lee HY, Jung SE, Oh YN, Choi A, Yang WI, Shin KJ (2015) Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: a preliminary study. *Forensic Science International Genetics* 19:28-34. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.014

Lee HY, Lee SD, Shin KJ (2016) Forensic DNA methylation profiling to obtain investigative leads from evidence material. *BMB Reports* 49:17-18. doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.7.070

Lee YL, Liu J, Clarkson BH, Lin CP, Godovikova V, Ritchie HH (2006) Dentin-pulp complex responses to carious lesions. *Caries Research* 40:256-264. doi: 10.1159/000092235

Liliequist B, Lundberg M (1971) Skeletal and tooth development. A methodologic investigation. *Acta Radiologica: Diagnosis* 11:97-112. doi: 10.1177/028418517101100201

Lin J, Epel E, Blackburn E (2012) Telomeres and lifestyle factors: roles in cellular aging. *Mutation Research* 730:85-89. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.08.003

Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709-715. doi: 10.1038/362709a0

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194-1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039

Lovejoy CO, Meindl RS, Pryzbeck TR, Mensforth RP (1985) Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium: a new method for the determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology* 68:15-28. doi: 10.1002/ajpa.1330680103

Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M (2013) Telomeres-structure, function, and regulation. *Experimental Cell Research* 319:133-141. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.09.005

Lunt RC, Law DB (1974) A review of the chronology of eruption of deciduous teeth. *Journal of the American Dental Association* 89:872-879. doi: 10.14219/jada.archive.1974.0484

Lynch SM, Peek MK, Mitra N, Ravichandran K, Branas C, Spangler E, Zhou W, Paskett ED, Gehlert S, DeGraffinreid C, Rebbeck TR, Riethman H (2016) Race, ethnicity, psychosocial factors, and telomere length in a multicenter setting. *PLoS One* 11:e0146723. doi: 10.1371/journal.pone.0146723

## M

MacNeil DE, Bensoussan HJ, Autexier C (2016) Telomerase regulation from beginning to the end. *Genes* 7:64. doi: 10.3390/genes7090064

Madeline LA, Elster AD (1995) Suture closure in the human chondrocranium: CT assessment. *Radiology* 196:747-756. doi: 10.1148/radiology.196.3.7644639

Malaver PC, Yunis JJ (2003) Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croatian Medical Journal* 44:306-309.

Man EH, Sandhouse ME, Burg J, Fisher GH (1983) Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain. *Science* 220:1407-1408. doi: 10.1126/science.6857259

Mandojana JM, Martín-de las Heras S, Valenzuela A, Valenzuela M, Luna JD (2001) Differences in morphological age-related dental changes depending on postmortem interval. *Journal of Forensic Sciences* 46:889-892. doi: 10.1520/JFS15063J

Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, Serrano M, Blasco MA (2009) Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4:141-154. doi: 10.1016/j.stem.2008.12.010

Márquez-Ruiz AB, Treviño-Tijerina MC, González-Herrera L, Sánchez B, Ramírez-González AR, Valenzuela A (2017) Three-dimensional analysis of third molar development to estimate age of majority. *Science & Justice*. En prensa. doi: 10.1016/j.scijus.2017.04.002

Martin GM (2005) Epigenetic drift in aging identical twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:10413-10414. doi: 10.1073/pnas.0504743102

Martín de las Heras S (2005) Estimación de la edad a través del estudio dentario. *Ciencia Forense* 7:69-90.

Martín-de las Heras S, García-Forteza P, Ortega A, Zodikovich S, Valenzuela A (2008) Third molar development according to chronological age in populations from Spanish and Magrebian origin. *Forensic Science International* 174:47-53. doi: 10.1016/j.forsciint.2007.03.009

Martín-de las Heras S, Valenzuela A, Bellini R, Salas C, Rubiño M, García JA (2003) Objective measurement of dental color for age estimation by spectroradiometry. *Forensic Science International* 132:57-62. doi: 10.1016/S0379-0738(02)00454-1

Martín-de las Heras S, Valenzuela A, Overall CM (2000a) The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Archives of Oral Biology* 45:757-765. doi: 10.1016/S0003-9969(00)00052-2

Martín-de las Heras S, Valenzuela A, Overall CM (2000b) Gelatinase A in human dentin as a new biochemical marker for age estimation. *Journal of Forensic Sciences* 45:807-811. doi: 10.1520/JFS14774J

Martín-de las Heras S, Valenzuela A, Villanueva E (1999) Deoxypyridinoline crosslinks in human dentin and estimation of age. *International Journal of Legal Medicine* 112:222-226. doi: 10.1007/s004140050240

Martínez P, Blasco MA (2015) Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends in Biochemical Sciences* 40:504-515. doi: 10.1016/j.tibs.2015.06.003

Martínez P, Thanasoula M, Carlos AR, Gómez-López G, Tejera AM, Schoeftner S, Dominguez O, Pisano DG, Tarsounas M, Blasco MA (2010) Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. *Nature Cell Biology* 12:768-780. doi: 10.1038/ncb2081

Martino DJ, Tulic MK, Gordon L, Hodder M, Richman TR, Metcalfe J, Prescott SL, Saffery R (2011) Evidence for age-related and individual-specific changes in DNA methylation profile of mononuclear cells during early immune development in humans. *Epigenetics* 6:1085-1094. doi: 10.4161/epi.6.9.16401

Martin-Ruiz CM, Baird D, Roger L, Boukamp P, Kronic D, Cawthon R, Dokter MM, van der Harst P, Bekaert S, de Meyer T, Roos G, Svenson U, Codd V, Samani NJ, McGlynn L, Shiels PG, Pooley KA, Dunning AM, Cooper R, Wong A, Kingston A, von Zglinicki T. (2015) Reproducibility of telomere length assessment: an international collaborative study. *International Journal of Epidemiology* 44:1673-1683. doi: 10.1093/ije/dyu191

Martrille L, Ubelaker DH, Cattaneo C, Seguret F, Tremblay M, Baccino E (2007) Comparison of four skeletal methods for the estimation of age at death on white and black adults. *Journal of Forensic Sciences* 52:302-307. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00367.x

Masset C (1989) Age estimation on the basis of cranial sutures. En: *Age markers in the human skeleton*, pp 71-103. Springfield: Charles C Thomas.

Masters PM, Bada JL, Zigler JS (1977) Aspartic acid racemisation in the human lens during ageing and in cataract formation. *Nature* 268:71-73. doi: 10.1038/268071a0

Matzenauer C, Reckert A, Ritz-Timme S (2014) Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in elastic cartilage of the epiglottis. *International Journal of Legal Medicine* 128:995-1000. doi: 10.1007/s00414-013-0940-6

Meinl A, Huber CD, Tangl S, Gruber GM, Teschler-Nicola M, Watzek G (2008) Comparison of the validity of three dental methods for the estimation of age at death. *Forensic Science International* 178:96-105. doi: 10.1016/j.forsciint.2008.02.008

Meissner C, Ritz-Timme S (2010) Molecular pathology and age estimation. *Forensic Science International* 203:34-43. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.010

Milos A, Selmanović A, Smajlović L, Huel RL, Katzmarzyk C, Rizvić A, Parsons TJ (2007) Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croatian Medical Journal* 48:486-493.

Min J, Wright WE, Shay JW (2017) Alternative lengthening of telomeres can be maintained by preferential elongation of lagging strands. *Nucleic Acids Research* 45:2615-2628. doi: 10.1093/nar/gkw1295

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* 38:379-390. doi: 10.1520/JFS13418J

Miyake Y, Nakamura M, Nabetani A, Shimamura S, Tamura M, Yonehara S, Saito M, Ishikawa F (2009) RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. *Molecular Cell* 36:193-206. doi: 10.1016/j.molcel.2009.08.009

Mokry J, Soukup T, Micuda S, Karbanova J, Visek B, Brckova E, Suchanek J, Bouchal J, Vokurkova D, Ivancakova R (2010) Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010:673513. doi: 10.1155/2010/673513

Montpetit AJ, Alhareeri AA, Montpetit M, Starkweather AR, Elmore LW, Filler K, Mohanraj L, Burton CW, Menzies VS, Lyon DE, Jackson-Cook CK (2014) Telomere length: a review of methods for measurement. *Nursing Research* 63:289-299. doi: 10.1097/NNR.0000000000000037

Moorrees CFA, Fanning EA, Hunt EE (1963) Age Variation of Formation Stages for Ten Permanent Teeth. *Journal of Dental Research* 42:1490-1502. doi: 10.1177/00220345630420062701

## N

Nanci A (2012a) Enamel: composition, formation and structure. En: Ten Cate's oral histology: development, structure and function, pp 122-164. San Luis: Mosby.

Nanci A (2012b) Dentin-pulp complex. En: Ten Cate's oral histology: development, structure and function, pp 165-204. San Luis: Mosby.

Nanci A (2012c) Periodontium. En: Ten Cate's oral histology: development, structure and function, pp 205-232. San Luis: Mosby.

Nandakumar J, Bell CF, Weidenfeld I, Zaug AJ, Leinwand LA, Cech TR (2012) The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature* 492:285-289. doi: 10.1038/nature11648

Nandakumar J, Cech TR (2013) Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14:69-82. doi: 10.1038/nrm3505

Nersisyan L (2016) Integration of telomere length dynamics into systems biology framework: a review. *Gene Regulation and Systems Biology* 10:35-42. doi: 10.4137/GRSB.S39836

Nolla CA (1960) The development of the permanent teeth. *Journal of Dentistry for Children* 27:254-266.

## O

O'Callaghan N, Dhillon V, Thomas P, Fenech M (2008) A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *Biotechniques* 44:807-809. doi: 10.2144/000112761

O'Connor MS, Safari A, Xin H, Liu D, Songyang Z (2006) A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:11874-11879. doi: 10.1073/pnas.0605303103

Oeseburg H, De Boer RA, Van Gilst WH, Van Der Harst P (2010) Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Archiv* 459:259-268. doi: 10.1007/s00424-009-0728-1

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* 29:259-267. doi: 10.1016/0379-0738(85)90119-7

Ohtani S (1995) Studies on age estimation using racemization of aspartic acid in cementum. *Journal of Forensic Sciences* 40:805-807. doi: 10.1520/JFS15388J

Ohtani S (1998) Rate of aspartic acid racemization in bone. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 19:284-287. doi: 10.1097/00000433-199809000-00017

Ohtani S (2002) Technical notes for age estimation using the femur: influence of various analytical conditions on D-aspartic acid contents. *International Journal of Legal Medicine* 116:361-364. doi: 10.1007/s00414-002-0339-2

Ohtani S, Ito R, Yamamoto T (2003) Differences in the D/L aspartic acid ratios in dentin among different types of teeth from the same individual and estimated age. *International Journal of Legal Medicine* 117:149-152. doi: 10.1007/s00414-003-0365-8

Ohtani S, Matsushima Y, Kobayashi Y, Yamamoto T (2002) Age estimation by measuring the racemization of aspartic acid from total amino acid content of several types of bone and rib cartilage: a preliminary account. *Journal of Forensic Sciences* 47:32-36. doi: 10.1520/JFS15202J

Ohtani S, Yamamoto T (2005) Strategy for the estimation of chronological age using the aspartic acid racemization method with special reference to coefficient of correlation between D/L ratios and ages. *Journal of Forensic Sciences* 50:1020-1027. doi: 10.1520/JFS2004354

Ohtani S, Yamamoto T (2010) Age estimation by amino acid racemization in human teeth. *Journal of Forensic Sciences* 55:1630-1633. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01472.x

Okuda K, Bardeguet A, Gardner JP, Rodriguez P, Ganesh V, Kimura M, Skurnick J, Awad G, Aviv A (2002) Telomere length in the newborn. *Pediatric Research* 52:377-381. doi: 10.1203/01.PDR.0000022341.72856.72

Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology* 41:181-190. doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7

Olze A, Bilang D, Schmidt S, Wernecke KD, Geserick G, Schmeling A (2005) Validation of common classification systems for assessing the mineralization of third molars. *International Journal of Legal Medicine* 119:22-26. doi: 10.1007/s00414-004-0489-5

Olze A, Schmeling A, Taniguchi M, Maeda H, van Niekerk P, Wernecke KD, Geserick G (2004) Forensic age estimation in living subjects: the ethnic factor in wisdom tooth mineralization. *International Journal of Legal Medicine* 118:170-173. doi: 10.1007/s00414-004-0434-7

Olze A, Taniguchi M, Schmeling A, Zhu BL, Yamada Y, Maeda H, Geserick G (2003) Comparative study on the chronology of third molar mineralization in a Japanese and a German population. *Legal Medicine* 5 Suppl 1:S256-S260. doi: 10.1016/S1344-6223(02)00143-8

## P

Pal S, Tyler JK (2016) Epigenetics and aging. *Science Advances* 2:e1600584-e1600584. doi: 10.1126/sciadv.1600584

Palm W, de Lange T (2008) How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual Review of Genetics* 42:301-334. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130350

Parsons TJ, Huel R, Davoren J, Katzmarzyk C, Milos A, Selmanović A, Smajlović L, Coble MD, Rizvić A (2007) Application of novel «mini-amplicon» STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. *Forensic Science International Genetics* 1:175-179. doi: 10.1016/j.fsigen.2007.02.003

Pellegrini L (2012) The Pol  $\alpha$ -primase complex. *Subcellular Biochemistry* 62:157-169. doi: 10.1007/978-94-007-4572-8\_9

Pfeiffer H, Huhne J, Seitz B, Brinkmann B (1999) Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *International Journal of Legal Medicine* 112:142-144. doi: 10.1007/s004140050219

Pfeiffer H, Mörnstad H, Teivens A (1995) Estimation of chronologic age using the aspartic acid racemization method. I. On human rib cartilage. *International Journal of Legal Medicine* 108:19-23. doi: 10.1007/BF01845611

Pilin A, Pudil F, Bencko V, Bezdícková D (2007) Contents of pentosidine in the tissue of the intervertebral disc as an indicator of the human age. *Soudni Lekarstvi* 52:60-64.

Pinchi V, Torricelli F, Nutini AL, Conti M, Iozzi S, Norelli GA (2011) Techniques of dental DNA extraction: some operative experiences. *Forensic Science International* 204:111-114. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.05.010

Poon SS, Martens UM, Ward RK, Lansdorp PM (1999) Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36:267-278. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19990801)36:43.O.CO;2-O

Pötsch L, Meyer U, Rothschild S, Schneider PM, Rittner C (1992) Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *International Journal of Legal Medicine* 105:139-143. doi: 10.1007/BF01625165

Prieto JL, Barbería E, Ortega R, Magaña C (2005) Evaluation of chronological age based on third molar development in the Spanish population. *International Journal of Legal Medicine* 119:349-354. doi: 10.1007/s00414-005-0530-3

Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons TJ, Sajantila A, Scheithauer R, Schmitter H, Schneider PM (2007) DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Science International Genetics* 1:3-12. doi: 10.1016/j.fsigen.2006.10.003

## R

Raschenberger J, Lamina C, Haun M, Kollerits B, Coassin S, Boes E, Kedenko L, Köttgen A, Kronenberg F (2016) Influence of DNA extraction methods on relative telomere length measurements and its impact on epidemiological studies. *Scientific Reports* 6:25398. doi: 10.1038/srep25398

Redon S, Reichenbach P, Lingner J (2010) The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Research* 38:5797-5806. doi: 10.1093/nar/gkq296

Ren F, Li C, Xi H, Wen Y, Huang K (2009) Estimation of human age according to telomere shortening in peripheral blood leukocytes of Tibetan. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 30:252-255. doi: 10.1097/PAF.0b013e318187df8e

Reveal PM, Henkels KM, Turchi JJ (1997) Synthesis of the mammalian telomere lagging strand in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 272:11678-11681. doi: 10.1074/jbc.272.18.11678

Rice C, Skordalakes E (2016) Structure and function of the telomeric CST complex. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 14:161-167. doi: 10.1016/j.csbj.2016.04.002

Ritz S, Schütz HW (1993) Aspartic acid racemization in intervertebral discs as an aid to postmortem estimation of age at death. *Journal of Forensic Sciences* 38:633-640. doi: 10.1520/JFS13449J

Ritz S, Schütz HW, Schwarzer B (1990) The extent of aspartic acid racemization in dentin: a possible method for a more accurate determination of age at death? *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 103:457-462. doi: 10.1007/BF01263154

Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins MJ (2003a) Aspartic acid racemization: Evidence for marked longevity of elastin in human skin. *The British Journal of Dermatology* 149:951-959. doi: 10.1111/j.1365-2133.2003.05618.x

Ritz-Timme S, Laumeier I, Collins M (2003b) Age estimation based on aspartic acid racemization in elastin from the yellow ligaments. *International Journal of Legal Medicine* 117:96-101. doi: 10.1007/s00414-002-0355-2

Ritz-Timme S, Rochholz G, Schütz HW, Collins MJ, Waite ER, Cattaneo C, Kaatsch HJ (2000) Quality assurance in age estimation based on aspartic acid racemisation. *International Journal of Legal Medicine* 114:83-86. doi: 10.1007/s004140000159

Ritz-Timme S, Schütz HW, Collins MJ (1999) Evaluation of aspartic acid racemization ratios in the human femur for age estimation. *Journal of Forensic Sciences* 44:874-876.

Rubio L, Martínez LJ, Martínez E, Martín de las Heras S (2009) Study of short- and long-term storage of teeth and its influence on DNA. *Journal of Forensic Sciences* 54:1411-1413. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01159.x

Rubio L, Santos I, Gaitán MJ, Martín-de las Heras S (2013) Time-dependent changes in DNA stability in decomposing teeth over 18 months. *Acta Odontologica Scandinavica* 71:638-643. doi: 10.3109/00016357.2012.700068

## S

Sarthy J, Bae NS, Scrafford J, Baumann P (2009) Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres. *EMBO Journal* 28:3390-3399. doi: 10.1038/emboj.2009.275

Sato Y, Kondo T, Ohshima T (2001) Estimation of age of human cadavers by immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the hippocampus. *Histopathology* 38:217-220. doi: 10.1046/j.1365-2559.2001.01059.x

Schmeling A, Dettmeyer R, Rudolf E, Vieth V, Geserick G (2016) Forensic Age Estimation. *Deutsches Ärzteblatt International* 113:44-50. doi: 10.3238/arztebl.2016.0044

Schmeling A, Schulz R, Reisinger W, Mühler M, Wernecke KD, Geserick G (2004) Studies on the time frame for ossification of the medial clavicular epiphyseal cartilage in conventional radiography. *International Journal of Legal Medicine* 118:5-8. doi: 10.1007/s00414-003-0404-5

Schmidt JC, Cech TR (2015) Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes & Development* 29:1095-1105. doi: 10.1101/gad.263863.115

Schour I, Massler M (1941) The development of the human dentition. *Journal of the American Dental Association* 28:1153-1160.

Schulz R, Mühler M, Mutze S, Schmidt S, Reisinger W, Schmeling A (2005) Studies on the time frame for ossification of the medial epiphysis of the clavicle as revealed by CT scans. *International Journal of Legal Medicine* 119:142-145. doi: 10.1007/s00414-005-0529-9

Scoles P, Salvagno R, Villalba K, Riew D (1988) Relationship of iliac crest maturation to skeletal and chronologic age. *Journal of Pediatric Orthopedics* 8:639-644. doi: 10.1097/01241398-198811000-00002

Senawongse P, Otsuki M, Tagami J, Mjör IA (2008) Morphological characterization and permeability of attrited human dentine. *Archives of Oral Biology* 53:14-19. doi: 10.1016/j.archoralbio.2007.07.010

Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, Schildkraut CL, de Lange T (2009) Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138:90-103. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.021

Shammas MA (2011) Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 14:28-34. doi: 10.1097/MCO.0b013e32834121b1

Shay JW, Reddel RR, Wright WE (2012) Cancer and telomeres: an ALTERNative to telomerase. *Science* 336:1388-1390. doi: 10.1126/science.1222394

Smith BC, Fisher DL, Weedn VW, Warnock GR, Holland MM (1993) A systematic approach to the sampling of dental DNA. *Journal of Forensic Sciences* 38:1194-1209. doi: 10.1520/JFS13524J

Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Molecular and Cellular Biology* 20:1659-1668. doi: 10.1128/MCB.20.5.1659-1668.2000

Soares CB, Figueiroa JN, Dantas RM, Kurita LM, Pontual A, Ramos-Perez FM, Perez DE, Pontual ML (2015) Evaluation of third molar development in the estimation of chronological age. *Forensic Science International* 254:13-17. doi: 10.1016/j.forsciint.2015.06.022

Solari AC, Abramovitch K (2002) The accuracy and precision of third molar development as an indicator of chronological age in Hispanics. *Journal of Forensic Sciences* 47:531-535.

Solheim T (1993) A new method for dental age estimation in adults. *Forensic Science International* 59:137-147. doi: 10.1016/0379-0738(93)90152-Z

Solheim T, Kvaal S (1993) Dental root surface structure as an indicator of age. *The Journal of Forensic Odontostomatology* 11:9-21.

Srettabunjong S, Satitsri S, Thongnoppakhun W, Tirawanchai N (2014) The study on telomere length for age estimation in a Thai population. *The American Journal of Forensic Medicine Pathology* 35:148-153. doi: 10.1097/paf.0000000000000095

Štamfelj I, Vidmar G, Cvetko E, Gašperšič D (2008) Cementum thickness in multirrooted human molars: a histometric study by light microscopy. *Annals of Anatomy* 190:129-139. doi: 10.1016/j.aanat.2007.10.006

Stewart JA, Chaiken MF, Wang F, Price CM (2012a) Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutation Research* 730:12-19. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.08.011

Stewart JA, Wang F, Chaiken MF, Kasbek C, Chastain PD, Wright WE, Price CM (2012b) Human CST promotes telomere duplex replication and general replication restart after fork stalling. *EMBO Journal* 31:3537-3549. doi: 10.1038/emboj.2012.215

Stout SD, Paine RR (1992) Histological age estimation using rib and clavicle. *American Journal of Physical Anthropology* 87:111-115. doi: 10.1002/ajpa.1330870110

Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, Simon I, Yakhini Z, Cedar H (2009) Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nature Structural & Molecular Biology* 16:564-571. doi: 10.1038/nsmb.1594

Streckbein P, Reichert I, Verhoff MA, Bödeker RH, Kähling C, Wilbrand JF, Schaaf H, Howaldt HP, May A (2014) Estimation of legal age using calcification stages of third molars in living individuals. *Science & Justice* 54:447-450. doi: 10.1016/j.scijus.2014.08.005

Sweet D, Hildebrand D (1998) Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding. *Journal of Forensic Sciences* 43:1199-1202. doi: 10.1016/S1353-1131(99)90233-X

## T

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* 117:232-234. doi: 10.1007/s00414-003-0376-5

Takubo K, Aida J, Izumiya-Shimomura N, Ishikawa N, Sawabe M, Kurabayashi R, Shiraishi H, Arai T, Nakamura K (2010) Changes of telomere length with aging. *Geriatrics & Gerontology International* 10 Suppl 1:S197-S206. doi: 10.1111/j.1447-0594.2010.00605.x

Takubo K, Izumiya-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, Oshimura M, Nakamura K (2002) Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Experimental Gerontology* 37:523-531. doi: 10.1016/S0531-5565(01)00218-2

Tanner J, Whitehouse R, Marshall W, Healy MJR, Golstein H (1975) Assessment of skeletal maturity and prediction of adult height (TW2 method). Londres: Academic Press.

Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M (2010) A practical approach to RT-qPCR-publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50:S1-S5. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005

Thevissen PW, Fieuws S, Willems G (2010) Human third molars development: comparison of 9 country specific populations. *Forensic Science International* 201:102-105. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.04.054

Torres Serrano AR (2002) Crecimiento y desarrollo. *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación* 14:54-57.

Treviño-Tijerina MC, Valenzuela-Garach A, Elizondo-Pereo RA, Cerda-Flores RM, Vargas-Villarreal J, González-Salazar F (2016) Age estimation of teenagers from Monterrey (Mexico) by the evaluation of dental mineralization after multi-slice helical computed tomography. *Australian Journal of Forensic Sciences* 48:138-149. doi: 10.1080/00450618.2015.1034777

Tsuji A, Ishiko A, Takasaki T, Ikeda N (2002) Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Science International* 126:197-199. doi: 10.1016/S0379-0738(02)00086-5

Turner-Walker G (2008) The chemical and microbial degradation of bones and teeth. En: *Advances in human palaeopathology*, pp 1-29. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd.

## V

Valenzuela A (marzo, 2004) La estimación de la edad en sujetos adultos: implicaciones médico legales de la ampliación de la minoría de edad penal a 21 años. Ponencia presentada en las Jornadas sobre la Determinación de la Edad en Menores Indocumentados, San Sebastián, España.

Valenzuela A, Martín-de las Heras S, Mandojana JM, Luna JD, Valenzuela M, Villanueva E (2002) Multiple regression models for age estimation by assessment of morphologic dental changes according to teeth source. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 23:386-389. doi: 10.1097/01.PAF.0000040711.27222.30

Vera E, Blasco MA (2012) Beyond average: potential for measurement of short telomeres. *Aging* 4:379-392. doi: 10.18632/aging.100462

Vertucci FJ, Anthony RL (1986) A scanning electron microscopic investigation of accessory foramina in the furcation and pulp chamber floor of molar teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 62:319-326. doi: 10.1016/0030-4220(86)90015-0

Villanueva Cañadas E, Castilla Gonzalo J (2004) Identificación en el cadáver. En: *Medicina legal y toxicología*, pp 1300-1309. Barcelona: Masson.

## W

Waite ER, Collins MJ, Ritz-Timme S, Schutz HW, Cattaneo C, Borrmann HI (1999) A review of the methodological aspects of aspartic acid racemization analysis for use in forensic science. *Forensic Science International* 103:113-124. doi: 10.1016/S0379-0738(99)00081-X

Walker NJ (2002) A technique whose time has come. *Science* 296:557-559. doi: 10.1126/science.296.5567.557

Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciu P, Cech TR, Lei M (2007) The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445:506-510. doi: 10.1038/nature05454

Wang F, Stewart JA, Kasbek C, Zhao Y, Wright WE, Price CM (2012) Human CST has independent functions during telomere duplex replication and C-strand fill-in. *Cell Reports* 2:1096-1103. doi: 10.1016/j.celrep.2012.10.007

Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jöckel KH, Erbel R, Mühleisen TW, Zenke M, Brümmendorf TH, Wagner W (2014) Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biology* 15:R24. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r24

Wu P, van Overbeek M, Rooney S, de Lange T (2010) Apollo Contributes to G Overhang Maintenance and Protects Leading-End Telomeres. *Molecular Cell* 39:606-617. doi: 10.1016/j.molcel.2010.06.031

## X

Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, Sun W, O'Connor MS, Songyang Z (2007) TPP1 is a homologue of ciliate TEBP- $\beta$  and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* 445:559-562. doi: 10.1038/nature05469

Xu C, Qu H, Wang G, Xie B, Shi Y, Yang Y, Zhao Z, Hu L, Fang X, Yan J, Feng L (2015) A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model. *Scientific Reports* 5:17788. doi: 10.1038/srep17788

## Y

Yamamoto T, Li M, Liu Z, Guo Y, Hasegawa T, Masuki H, Suzuki R, Amizuka N (2010) Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. *Odontology* 98:102-109. doi: 10.1007/s10266-010-0134-3

Yang F, Jacobs R, Willems G (2006) Dental age estimation through volume matching of teeth imaged by cone-beam CT. *Forensic Science International* 159 Suppl:S78-S83. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.02.031

Yi SH, Jia YS, Mei K, Yang RZ, Huang DX (2015) Age-related DNA methylation changes for forensic age-prediction. *International Journal of Legal Medicine* 129:237-244. doi: 10.1007/s00414-014-1100-3

Yi SH, Xu LC, Mei K, Yang RZ, Huang DX (2014) Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic age-prediction. *Forensic Science International Genetics* 11:117-125. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.03.006

## Z

Zapico SC, Ubelaker DH (2013) Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences. Estimation of age-at-death. *Ageing Research Reviews* 12:605-617. doi: 10.1016/j.arr.2013.02.002

Zaug AJ, Podell ER, Nandakumar J, Cech TR (2010) Functional interaction between telomere protein TPP1 and telomerase. *Genes & Development* 24:613-622. doi: 10.1101/gad.1881810

Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, Makowska Ż, Pałeczka A, Kucharczyk K, Płoski R, Branicki W (2015) Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International Genetics* 17:173-179. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.001

Zhao Y, Abreu E, Kim J, Stadler G, Eskiocak U, Terns MP, Terns RM, Shay JW, Wright WE (2011) Processive and distributive extension of human telomeres by telomerase under homeostatic and nonequilibrium conditions. *Molecular Cell* 42:297-307. doi: 10.1016/j.molcel.2011.03.020

Zhao Y, Sfeir AJ, Zou Y, Buseman CM, Chow TT, Shay JW, Wright WE (2009) Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell* 138:463-475. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.026

Zhao Z, Pan X, Liu L, Liu N (2014) Telomere length maintenance, shortening, and lengthening. *Journal of Cellular Physiology* 229:1323-1329. doi: 10.1002/jcp.24537

Zhu XD, Niedernhofer L, Kuster B, Mann M, Hoeijmakers JH, de Lange T (2003) ERCC1/XPF Removes the 3' Overhang from Uncapped Telomeres and Represses Formation of Telomeric DNA-Containing Double Minute Chromosomes. *Molecular Cell* 12:1489-1498. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00478-7

Zubakov D, Liu F, Kokmeijer I, Choi Y, van Meurs JB, van IJcken WF, Uitterlinden AG, Hofman A, Broer L, van Duijn CM, Lewin J, Kayser M (2016) Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Science International Genetics* 24:33-43. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.05.014

