

ESTIMACIÓN DE LA EDAD MEDIANTE LA RACEMIZACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS EN TEJIDOS DENTALES

AGE ESTIMATION BY AMINO-ACIDS RACEMIZATION ON DENTAL TISSUES

Gutiérrez López J.¹

Vicente González S.²

¹Graduado en Odontología.

²Profesor Contratado Doctor.

Área de Medicina Legal y Forense.

Universidad de Salamanca.

España.

Correspondencia: jegulo@usal.es

Resumen: La estimación de la edad de una persona contribuye a su identificación. Dentro de los diversos métodos tenemos los bioquímicos como la racemización de los amino-ácido o el radiocarbono 14. La racemización del ácido aspártico permite establecer una relación entre los enantiómeros de ácido aspártico L/D llegando a estimar la edad de un individuo con un margen de ± 3 años, permitiendo una estimación de la edad mucho más certera que procedimientos que emplean el estudio morfológico. El ácido aspártico es ideal para el establecimiento del ratio de racemización ya que es el primero que racemiza y en mayor cantidad. En esta revisión de la literatura se estimará la utilidad de la racemización del ácido aspártico en el establecimiento de la edad de restos humanos, así como los diferentes métodos y procedimientos para la obtención de este aminoácido.

Palabras clave: estimación de la edad, dientes, racemización de aminoácidos.

Abstract: Age estimation contributes to human identification. Exist different biochemicals methods like amino acid racemization or radiocarbon 14. Aspartic acid racemization allows to establish a relationship between the enantiomers of L / D acid that could be used to estimate death age with a margin of ± 3 years. This method is more certain than morphological study in age estimation. Aspartic acid is the best choice to the establish racemization ratio because is the first to racemize and in greater quantity. In this review of the literature, it is estimated the usefulness of aspartic acid racemization in age estimation in human remains, as well as the various methods and procedures for obtaining this aminoacid.

Key words: Age estimation, teeth, amino acid racemization.

INTRODUCCIÓN

La estimación de la edad de una persona contribuye en gran medida a la identificación de la misma, por eso es un procedimiento de gran importancia. Además facilita el estudio y la comparación de restos humanos esqueletizados¹.

Existen diversos métodos para el establecimiento de la edad cronológica de los cadáveres. Durante la infancia y el desarrollo humano se recomienda la utilización de métodos morfológicos y basados en el desarrollo para el establecer la edad. En cambio, cuando se trata de restos de adultos los diferentes métodos empleados puede diferir bastante entre sí.

El estudio de los aminoácidos que conforman las proteínas puede ser empleado para la estimación de la edad y para ello nos podemos basar en la oxidación, la isomerización o en la racemización de los mismos².

La utilización de la racemización del ácido aspártico (AAR) para estimar la edad consiste en determinar la relación de sus enantiómeros L y D. La correlación entre la relación de ambas formas y la edad del diente puede permitir estimar la edad de un individuo con tan solo un error de ± 3 años³.

También hay que tener en cuenta que la racemización de los aminoácidos junto con la comparación de radiocarbono y la resonancia de spin electrónico (ESR) también permite la datación de los restos, aunque es poco fiable debido a la posible contaminación de las muestras con el ambiente, además de los procesos degradativos que sufren los

aminoácidos con el tiempo⁴. La técnica del carbono-14 permite estimar la edad en un rango de 1.6 años, siendo útil en la estimación de la edad de personas nacidas después de 1943, ya que el esmalte tarda 12 años en formarse y el pico del isótopo fue en 1955. Pero debido a su complejidad técnica y necesidad de medios no se aplican de manera rutinaria en la estimación de la edad, necesitando además estudios a largo plazo, y la comprobación de las diferencias geográficas presentes en diferentes poblaciones⁵.

El objetivo de este artículo es revisar los aspectos básicos de la estimación de la edad mediante la racemización de los aminoácidos en tejidos dentales y la puesta al día de protocolos y métodos.

EL DIENTE Y LA RACEMIZACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

Los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas de nuestro organismo tienen una estructura levógira (L). La racemización es un proceso espontáneo y gradual en el cual una solución enantiomérica pura se mezcla con su enantiómero, ya sea L o (D). La presencia de aminoácidos D en el organismo suele darse en procesos patológicos a excepción de algunos tejidos como el diente, el cristalino o los discos vertebrales⁶.

La dentina del diente, al estar protegida, no está casi influida por agentes externos que alteren este proceso. Al tratarse de una estructura con un metabolismo muy lento la forma D del ácido aspártico (Asp), se acumula de manera progresiva con el proceso de envejecimiento de manera espontánea a partir de los residuos de asparagina, mediante la vía de la succinamida⁷. Además la dentina está recubierta por el esmalte, que la protege de los factores externos, así como de la contaminación⁸.

Al aplicar la racemización de los aminoácidos para la estimación de la edad hay que tener en cuenta la posibilidad de degradación de los mismos con el paso del tiempo, lo que es importante en amplios periodos post-mortem, ya que la fiabilidad para la estimación de la edad se reduce.

Además, en la degradación de los aminoácidos influye el medio en el cual se encuentran los restos, ya que en climas templados, a una temperatura media de 10.5°C en enterramiento, la alteración de los aminoácidos es prácticamente inexistente durante 50 años. En cambio, en climas cálidos aumenta provocando errores en la correlación con la edad.

La alteración de los aminoácidos del colágeno de la dentina, a diferencia del ADN de otras estructuras o tejidos corporales, depende menos de condiciones climáticas tales como la humedad, el pH o la temperatura⁹.

ELECCIÓN DEL ÁCIDO ASPÁRTICO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA EDAD

La racemización de los aminoácidos se ha utilizado principalmente en la datación arqueológica.

La utilización del Asp para la estimación de la edad se debe a que es el aminoácido que más rápido racemiza. Además, como demostró Arany y cols. en 2010, comparando las correlaciones entre los enantiómeros D y L del ácido aspártico (Asp), del glutamato (Glu) y la alanina (Ala), el Asp presentó la mejor correlación con la edad ($r=0.98$) mientras que el Glu $r = 0.84$ y Ala ($r = 0.85$)⁸.

MUESTRAS Y ELECCIÓN DEL TEJIDO DENTAL

Inicialmente los aminoácidos se obtenían del esmalte y posteriormente se fueron obteniendo de la dentina y del cemento. Se ha estudiado la correlación entre los ratios de L/D respecto a la edad y el mejor resultado se obtuvo con la dentina, seguido del cemento y por último con el esmalte. En la actualidad, los aminoácidos se obtienen principalmente de la dentina, ya que la racemización es mayor y más rápida.

En cuanto a las zonas de la dentina, tanto la dentina lingual como vestibular presenta diferentes grados de racemización por lo que se recomiendan cortes transversales, para realizar un análisis más completo¹⁰.

En 1995, Ohtani y cols. en un estudio utilizando muestras del cemento dental, obtuvieron unos ratios de las formas L/D para el ácido aspártico semejantes a los de la dentina; además observaron que tanto si se obtenía cemento de la zona cervical del diente (cemento acelular) como de la central de la raíz (cemento celular), los resultados eran semejantes, mostrándose así que la racemización es entre cemento celular o acelular¹¹.

Más recientemente, Sakuma y cols. en 2012, realizaron un estudio comparativo entre la utilización del Asp obtenido de una muestra de dentina y otra del diente, observando que la correlación fue mayor en la muestra de dentina que en la del diente completo. Esto se debe a que en la muestra del diente se incorporó Asp del cemento dental, ya que la cantidad en esmalte es muy pequeña. El cemento dental está en desarrollo durante toda la vida del individuo, en mayor medida que la dentina, lo cual influyó en una menor correlación respecto a la edad. Aunque la correlación era menor en la muestra de diente entero, ambas correlaciones eran aceptables, pero el autor afirma que es necesario realizar más estudios al respecto debido a la pequeña muestra del estudio¹².

Sakuma y cols. en 2015 realizaron un estudio en el cual valoraban la utilidad de los dientes rosas como muestra y observaron que tienen el mismo grado de correlación que en dientes normales. Los dientes rosas se cree que se producen por la infiltración de hemoglobina de la pulpa dental en los túbulos dentinarios, siendo frecuente en casos de muerte por sumersión o asfixia¹³.

En casos de cuerpos quemados no hay mucha información sobre la validez de este método para estimar la edad. En 1998 Ohtani observó en dos casos de cuerpos quemados que, siempre que el calor no modifique el color del diente, es decir que no altere excesivamente la composición de los aminoácidos del colágeno, se podría estimar correctamente la edad. Las altas temperaturas durante largas exposiciones alteraría la correlación correcta con la edad, mientras que, por otro lado, con temperaturas bajas durante mucho tiempo la hidrólisis de las proteínas sería menor permitiendo una estimación más acertada¹⁴.

En cuanto a la elección del diente para la obtención de las muestras Othani realizó un estudio en el cual valoraba qué tipo de diente presenta mejor correlación con la estimación de la edad. Los dientes que se encuentran más profundamente en la cavidad oral tienen una mayor racemización debido a una mayor temperatura. A pesar de que el segundo molar era el que más enantiómeros D tenía, el que mejor correlación presentó fue el primer molar, siguiendo el primer premolar, incisivo lateral, canino, incisivo central, segundo molar y segundo premolar. Además, la racemización aumenta de corona a raíz siguiendo el proceso formativo dental¹⁵.

En 1994 otro estudio realizado por Ohtani, utilizando como muestras dientes deciduos, comprobó que podrían ser utilizados para la estimación de la edad al igual que los dientes de un adulto, aunque la correlación es menor que en dientes permanentes¹⁶. Habitualmente para el establecimiento de la edad durante el periodo de desarrollo dental activo se utilizan métodos morfológicos como el de Nolla o Demirjian, pero ambos están sujetos a variaciones según la población étnica sobre la que se aplique¹⁷.

PROTOCOLOS Y MÉTODOS

Se han estudiado y desarrollado diferentes métodos para la obtención del ácido aspártico, así como protocolos para la optimización de los mismos.

En 2010 Othani y cols establecieron un protocolo para obtener el ratio L/D de AAR, preparando las muestras mediante la sección de la dentina vestibulolingualmente para obtener secciones de 1 mm. Estas secciones se lavan secuencialmente en baño de ultrasonidos con ácido clorhídrico 0,2 M, agua destilada (3 veces), etanol y éter, durante 5 min cada lavado. Posteriormente la dentina se tritura en un mortero y se recogen entre 5 y 10 mg de dentina para la

prueba. Una vez preparada la muestra se obtienen los ratios L/D mediante cromatografía de gases. Es fundamental establecer unas condiciones adecuadas para obtener los ratios mediante esta técnica analítica⁷.

Es necesario tener en cuenta que no siempre la AAR va a servir para la estimación de la edad. La dentina, que es el tejido de elección para este procedimiento, suele sufrir pocas alteraciones, pero solo suele ser fiable en la obtención de los L/D aminoácidos en intervalos post-mortem de más de 20 años. Existen residuos de ácido aspártico en el entramado de colágeno, que racemiza completamente en un siglo a una temperatura de 37.8°C, por lo que puede alterar la fiabilidad en la estimación de la edad de la persona al fallecer. A pesar de que la composición del esmalte es prácticamente inorgánica, durante la formación de los prismas del esmalte quedan entre ellos proteínas atrapadas. Aunque el material presente en esmalte fuese orgánico la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución permitiría realizar un análisis correcto de las formas L/D de AAR¹⁸.

En 2008 Griffin y cols. propusieron un método no destructivo que permite el estudio del diente en pruebas posteriores como podría ser una análisis morfológico, aunque los resultados no fueron completamente satisfactorios. En este proceso se obtienen los amino-ácidos del esmalte aplicado un grabado ácido sobre la superficie, previamente limpiada con ácido clorhídrico. Aun así, el estudio realizado muestra valores de aminoácido más elevados de lo esperado, posiblemente por la posible contaminación de la superficie del diente. Los investigadores sostienen que al tratarse de muestras obtenidas del siglo XII esta contaminación pudo realizarse durante el proceso de enterramiento, por lo que la técnica podría tener mejores resultados en dientes actuales. Además las muestras obtenidas de esmalte más profundo, tras varios grabados ácidos muestran mejores resultados. Macroscópicamente la superficie del esmalte no sufre alteraciones, pero microscópicamente se crean en la superficie pequeñas rugosidades, abrasiones incluso cracks, lo que podría provocar la contaminación de la dentinas para estudios posteriores. Aun así, se necesitan más estudios para determinar su total utilidad¹⁹.

Griffin, en su estudio para determinar los picos L/D de los enantiómeros, utilizó la técnica de cromatografía líquida, mientras que Ohtani utilizó cromatografía de gases. Para Benedova la cromatografía de líquidos presenta ciertas ventajas, como menor tiempo para la obtención de los resultados, pero también algunas desventajas como la necesidad de mayor cantidad de muestras¹⁴. Además, la preparación de las muestras variará notablemente dependiendo del procedimiento para el análisis de las mismas y del tipo de tejido para su obtención^{18,19}.

ESTIMACIÓN DE LA EDAD

Para realizar la estimación de la edad se emplean la siguiente ecuación:

$$KR = a \times edad + b$$

en la que KR es el coeficiente de racemización, que se obtiene de:

$$KR = \ln \left[\frac{1 + L/D}{1 - L/D} \right]$$

siendo D y L los picos integrados de los respectivos enantiómeros del ácido aspártico.

En la primera ecuación los parámetros *a* y *b* son obtenidos mediante regresión lineal a partir de muestras previas tomadas de dientes de los cuales se conoce la edad, y obteniendo la KR que será utilizada como variable dependiente. La *a* representa la tasa constante de racemización del aminoácido, y la *b* el punto de corte en el eje²⁰.

Para calcular la tasa de racemización es importante la elección de un lugar de consenso para la toma de las muestras, ya que si hay una variación entre los lugares de obtención entre las muestras conocidas y de las que se quieren analizar, habrá un mayor error en la estimación de la edad. Así ocurre, por ejemplo, entre corona y raíz, ya que el inicio

de la racemización es posterior en la raíz que en la corona, ya que su formación es posterior²¹.

En 2002, Ritz-Timme determinó que no había influencia genética o de poblaciones étnicas a la hora de aplicar la racemización del Asp para la estimación de la edad²².

Además, la velocidad de racemización prácticamente es invariable con respecto a los diferentes grupos étnicos como explicó Ohtani en 2011, que utilizó la ecuación de Arrhenius para comparar muestras de población japonesa y escandinava²¹.

CONCLUSIONES

La estimación de la edad a partir de la AAR ofrece mejores resultados que los métodos morfológicos tradicionales en los casos en los que se ha completado la erupción dental.

El uso de AAR del Asp permite obtener una estimación de la edad de manera fiable aunque el procedimiento aún está sujeto a debate.

Esta fiabilidad depende de muchos factores como las muestras indubitadas, el diente de la muestra, las condiciones ambientales a las que ha estado expuesto, así como los procedimientos analíticos para obtener el ratio L/D de los enantiómeros.

No existen protocolos normalizados internacionalmente para este procedimiento, aunque hay algunos que se usan mayoritariamente.

Las muestras principalmente se toman de la dentina de dientes unirradiculares como incisivos, caninos y premolares inferiores, por presentar la mayor tasa de correlación entre la AAR y la edad del sujeto.

No existen estudios *in vitro* con elevado tamaño muestral, ni tampoco revisiones sistemáticas de la literatura por lo que se necesitaría profundizar en ello.

Se trata de un procedimiento complejo, que necesita una gran cantidad de medios técnicos por lo que no está muy difundida su aplicación.

La combinación de la técnica del radiocarbono 14 en combinación con la racemización de aminoácidos ofrecen valiosa información. Por un lado el radiocarbono 14 permitiría estimar la edad de nacimiento de un individuo, y por otro, la racemización de los aminoácidos establecer la edad del fallecimiento.

REFERENCIAS

1. Meinel A et al. Comparison of the validity of three dental methods for the estimation of age at death. *Forensic Science International* 2008;78:96-105.
2. Yekkala R et al. Racemization of aspartic acid from human dentin in the estimation of chronological age. *Forensic Science International*. 2006;159:89-94.
3. Sue Black, Jason Payne-James and Anil Aggrawal. Age Evaluation and Odontology in the Living. En: Taylor J, Blenkinsop M. *Age Evaluation and Odontology in the Living*. John Wiley & Sons, Ltd; 2010, pp. 176-201.
4. Grün R. Direct dating of human fossils. *Am J Phys Anthropol* 2006;131(S43):2-48.
5. Spalding KL, Buchholz BA, Bergman LE, Druid H, Frisen J. Forensic: age written in teeth by nuclear tests. *Nature* 2005;437:333-4.
6. Lewis JM, Senn DR. Dental age estimation. En: Senn DR y Weems RA, editors. *Manual of Forensic Odontology*. 5th ed. New York: ASFO; 2013, pp. 1-40.
7. Ohtani, S, Yamamoto T. Age estimation by amino acid racemization in human teeth. *Journal of Forensic Science*. 2010;55(6):1630-1633.
8. Arany S, Ohtani S. Age Estimation by Racemization Method in Teeth: Application of Aspartic Acid, Glutamate, and Alanine. *Journal of Forensic Science*. 2010;55(3):701-705.

9. Dobberstein R, Huppertz J, Wurmb-Schwark N, Ritz-Timme S. Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: Implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *Forensic Science International*. 2008;179(2):181-191.
10. Arany S, Ohtani S, Yoshioka N, Gonmori K. Age estimation from aspartic acid racemization of root dentin by internal standard method. *Forensic Science International*. 2004;141(2):127-130.
11. Ohtani S, Sugimoto H, Sugeno H, Yamamoto S, Yamamoto K. Racemization of aspartic acid in human cementum with age. *Archives of Oral Biology*. 1995; 40(2): 91-95.
12. Sakuma A, Ohtani S, Saitoh H, Iwase H. Comparative analysis of aspartic acid racemization methods using whole-tooth and dentin samples. *Forensic Science International*. 2012;223:198-201.
13. Sakuma A, Saitoh H, Ishii N, Iwase H. The effects of racemization rate for age estimation of pink teeth. *Journal of Forensic Science*. 2015;60(2):450-452.
14. Ohtani S, Sugeno H, Marumo T, Yamamoto K. Two cases of age estimation from teeth of burned body using amino acid racemization. *The Japanese journal of legal medicine*. 1989;43(2):191-197.
15. Ohtani S, Ito R, Yamamoto T. 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*. 2003;117(3):149-152.
16. Othani S. Age estimation by aspartatic acids racemization in dentin of deciduos teeth. *Forensic Science International*. 1994;68(2):77-82.
17. Gutiérrez López J, Vicente González S. La relevancia de la Odontología Forense en grandes catástrofes [Trabajo de Grado]. Salamanca: Universidad de Salamanca, Facultad de Medicina; 2016. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10366/132259>.
18. Griffin RC, Moody H, Penkman KE, Collins MJ. The application of amino acid racemization in the acid soluble fraction of enamel to the estimation of the age of human teeth. *Forensic Science International*. 2008;175(1):11-16.
19. Griffin RC, Moody H, Penkman KE, Fagan MJ, Curtis N, Collins MJ. A new approach to amino acid racemization in enamel: testing of a less destructive sampling methodology. *Journal of Forensic Science*. 2008;53(4):910-916.
20. Benešová T, Honzátko A, Pilin A, Votruba J, Flieger M. A modified HPLC method for the determination of aspartic acid racemization in collagen from human dentin and its comparison with GC. *Journal of Separation Science*. 2004; 27:330-334.
21. Ohtani S, Yamamoto T. Comparison of age estimation in Japanese and Scandinavian teeth using amino acid racemization. *Journal of Forensic Science*. 2011;56(1):244-247
22. Ritz-Timme S, Rochholz G, Stammert R, Ritz H. Biochemical age estimation: genetic and cultural (ethnic) influences on aspartic acid racemization in dentine. *Rechtsmedizin* 2002;12:203-206.