

# Análisis proteómico de la estructura del esmalte dental humano para la determinación del sexo en investigaciones forenses. Revisión narrativa

## *Proteomic analysis of human tooth enamel structure for sex determination in forensic investigations. Narrative review*

Presentado: 2 de enero de 2024  
Aceptado: 2 de septiembre de 2024  
Publicado: 28 de diciembre de 2024

Roe Mío López Toribio,<sup>ORCID</sup> Nancy Elizabeth Castañeda Eugenio,<sup>ORCID</sup> Digna Amabilia Manrique de Lara Suárez<sup>ORCID</sup>

Cátedra de Metodología de la Investigación, Escuela de Posgrado, Universidad Nacional "Hermilio Valdizán", Píllco Marca, Huánuco, Perú

### Resumen

La capacidad de asignar sexo biológico a restos óseos humanos es un requisito fundamental en la medicina forense. Una de las mayores preocupaciones del ordenamiento jurídico es alcanzar el reconocimiento de un elemento o individuo involucrado en un delito, para lo cual el perito forense juega un papel fundamental. La odontología forense implica la aplicación de la odontología al sistema legal. Si bien se puede utilizar la secuenciación de ADN, su uso es limitado por la secuenciación del mismo en muestras antiguas, su contaminación, su alto costo y la preservación limitada del ADN nuclear. Se necesita un método más sencillo, más fiable y aplicable de forma consistente.

Las características dentales están consideradas como uno de los principales rasgos de identificación según las directrices de INTERPOL. Por lo tanto, la proteómica es un método que

proporciona una forma nueva, aparentemente simple y relativamente económica de determinar el sexo sin riesgo de contaminación. Las proteínas pueden conservarse en el tejido duro de los dientes (esmalte) durante decenas de miles de años. El método proteómico utiliza dos formas sexualmente distintas de la proteína amelogenina en el esmalte dental, detectables mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas: la isoforma de la proteína amelogenina Y está presente en el tejido dental del esmalte sólo en los hombres, mientras que la isoforma X se puede encontrar en ambos sexos. Con estos antecedentes, se presenta aquí una revisión sobre la aplicación de la biología forense desde el punto de vista de la odontología legal.

**Palabras clave:** Determinación del sexo, esmalte dental, odontología forense, péptidos, restos humanos.

### Abstract

The ability to assign biological sex to human skeletal remains is a fundamental requirement in forensic medicine. One of the biggest concerns of the legal system is to achieve the recognition of an element or individual involved in a crime, for which the forensic expert plays a fundamental role. Forensic odontology involves the application of dentistry to the legal system. Although DNA sequencing can be used, its use is limited by DNA sequencing in ancient samples, its contamination, its high cost and the limited preservation of nuclear DNA. A simpler, more reliable, and consistently applicable method is needed.

Dental characteristics are considered one of the main identifying characteristics according to INTERPOL guidelines. Therefore, proteomics is a method that provides a new,

apparently simple, and relatively inexpensive way to determine sex without risk of contamination. Proteins can be preserved in the hard tissue of teeth (enamel) for tens of thousands of years. The proteomic method uses two sexually distinct forms of the amelogenin protein in dental enamel, detectable by liquid chromatography-mass spectrometry: the amelogenin Y protein isoform is present in dental enamel tissue only in men, while the X isoform can be found in both sexes. With this background, a review of the application of forensic biology from the point of view of legal odontology is presented here.

**Keywords:** Forensic odontology, human remains, peptides, sex determination, tooth enamel.



Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.

## Introducción

La odontología forense (OF) tiene muchos campos de estudio donde se superponen los marcos legal y odontológico. Se trata de una expansión de la odontología que, en el ámbito jurídico, gestiona la evaluación y documentación real de los registros dentales, así como el cuidado y examen adecuado de la identificación de individuos a través del análisis de sus dientes y estructuras bucales.<sup>1</sup> El sexo es una característica primaria fundamental para el análisis de restos óseos humanos en contextos arqueológicos y médico-legales. Se utilizan diversas técnicas que permiten determinar otras características importantes de identificación, como la edad al morir y la estatura, incluida la proteómica para determinar el sexo correspondiente a cada uno de los restos encontrados.<sup>2</sup> La proteómica es un método que proporciona una forma nueva, aparentemente simple y relativamente económica de determinar el sexo sin riesgo de contaminación. Las proteínas pueden conservarse en el tejido duro de los dientes (esmalte) durante decenas de miles de años.<sup>3</sup> Los perfiles precisos en la determinación del sexo son fundamentales para reconstruir sociedades pasadas en términos de demografía, identidad y epidemiología, y también son esenciales en contextos médico-legales para identificar individuos (por ejemplo, en desastres masivos). En los adultos, el sexo se puede determinar con relativa precisión, generalmente estimada entre un 80 y un 95%, dependiendo de factores como la preservación del esqueleto y el grado de dimorfismo sexual dentro de la muestra.<sup>4</sup> Uno de los factores limitantes clave de los análisis osteológicos hasta la fecha ha sido la incapacidad de determinar de manera confiable el sexo de los individuos a partir de las características esqueléticas, debido a que antes de los 18 años se presentan cambios cuantitativos y cualitativos por la hipertrofia e hiperplasia de los tejidos del cuerpo y la diferenciación celular para mejorar la capacidad funcional.<sup>5</sup> Se han intentado numerosos métodos, generalmente aplicando estudios de las características morfológicas y métricas de la mandíbula, la dentición y el ilion infantiles y juveniles.<sup>2,5</sup> Sin embargo, ningún método ha demostrado ser suficientemente fiable cuando se ha probado en muestras esqueléticas documentadas.<sup>6</sup> Según las directrices de identificación de víctimas de catástrofes (IVC) de INTERPOL, se considera que el análisis de los perfiles de ADN, el estudio de las huellas dactilares y la OF son los tres métodos principales de identificación.<sup>7</sup>

El objetivo de este artículo es revisar la literatura sobre el método proteómico para la determinación

biológica más certera del sexo en restos humanos mediante la identificación de isoformas de proteína. Este método consiste en analizar proteínas y péptidos como la amelogenina ligada a los cromosomas sexuales, que tiene un papel estructural en el esmalte dental y puede determinarse mediante la aplicación de la espectrometría de masas por cromatografía líquida de nanoflujo (nanoLC-EM). El esmalte dental es el tejido más duro del cuerpo humano y sobrevive excepcionalmente bien a la inhumación, incluso cuando el resto del esqueleto o el ADN de la fracción orgánica se han descompuesto. Por lo tanto, este método es prometedor para determinar de manera confiable el sexo biológico de humanos de cualquier edad utilizando un tejido corporal que tiene más probabilidades de sobrevivir intacto.<sup>2</sup> Es mínimamente destructivo, económico y confiable. Actualmente es aplicable en el contexto forense, como por ejemplo en la identificación de personas en casos de desastres masivos, en la evaluación de la edad y la identificación de sospechosos. Para elaborar esta revisión se utilizaron resultados extraídos manualmente de artículos indexados a las bases de datos Scopus, PubMed, Google Académico y EBSCO para los siguientes términos: estimación del sexo, estudios dentales, antropología dental, genética forense y amelogenina. Se consideraron revisiones bibliográficas, estudios aleatorios, guías, revisiones sistemáticas y metaanálisis publicados desde 2013 a 2023, en inglés, español, chino mandarín y francés.

## Desarrollo

La determinación del sexo es fundamental para muchas investigaciones arqueológicas, antropológicas y del ámbito de la odontología forense. Esta determinación tiene tres enfoques posibles: osteológico, genómico o proteómico.<sup>8</sup> Los dos primeros enfoques son los considerados métodos tradicionales, pero el proteómico es un método relativamente nuevo, al que los científicos prestan cada vez más atención. El uso de métodos proteómicos en paleontología (la llamada "paleoproteómica") está creciendo rápidamente en el último periodo y se espera que pueda ser útil para muchas aplicaciones generales y para conectar la biología molecular, la paleontología, la arqueología, la paleoecología y la historia. Warinner *et al.*<sup>9</sup> han realizado varios estudios en la década de 1990 sobre proteínas antiguas individuales muy abundantes de nuestros antepasados. La paleoproteómica es un campo en desarrollo con múltiples

aplicaciones, incluida la identificación taxonómica de huesos y conchas altamente fragmentados y la resolución filogenética de especies extintas, así como la exploración de la alimentación pasada a partir del cálculo dental, los revestimientos cerámicos de alimentos y las características de enfermedades previas.

Desde este punto de vista, la proteína analizada con mayor frecuencia es el colágeno tipo I, que es una proteína estable y rígida, como se demostró en un estudio de 2007, al determinar el colágeno tipo I en huesos de *Tyrannosaurus rex* de 68 millones de años de antigüedad.<sup>10,11</sup> Sin embargo, la capacidad de detectar e identificar proteínas en tejidos antiguos ha aumentado significativamente en los últimos años. Esto permite utilizar proteínas no sólo para su identificación en tejidos, sino también para la resolución de una variedad de problemas, como la interacción con los alimentos, con el medio ambiente, los animales y los humanos y, desde la perspectiva de esta revisión, para la determinación del sexo. Además, la investigación proteómica ha ganado importancia en la arqueología y la investigación forense.<sup>12</sup>

Es importante señalar las diferencias en el uso de los términos sexo y género. A menudo se intercambian en conversaciones, documentación y literatura científica, aunque no son sinónimos y la confusión en su uso está aumentando. El concepto biológico de sexo difiere fundamentalmente del concepto social de género, y los dos términos no son intercambiables.<sup>13</sup>

Naturalmente, el enfoque de género es un tema popular en la sociedad contemporánea, tal como lo refleja la comisión europea en su informe titulado "Innovaciones de género. Cómo el análisis de género ayuda a la investigación", y treinta años de investigación han demostrado que los prejuicios sexuales y de género son dañinos y costosos para la sociedad.<sup>14</sup>

### **Determinación proteómica del sexo a través del esmalte dental**

En la actualidad, los métodos proteómicos nos permiten identificar variaciones menores en la composición de proteínas (cualitativa y cuantitativa) provocadas por una multiplicidad de factores, incluidos la dieta, el envejecimiento, la crianza y el sexo.<sup>15</sup> Por lo tanto, la proteómica es una técnica nueva, aparentemente sencilla y relativamente económica de determinar el sexo sin riesgo de contaminación. El esmalte es un lugar donde las proteínas pueden mantenerse durante decenas de miles de años.

Para la investigación arqueológica, antropológica o forense, es necesario considerar tejidos resistentes a la degradación causada por efectos a largo plazo,

fenómenos agresivos de descomposición del suelo y daños físicoquímicos externos. Para estos fines, el tejido ideal es el esmalte dental, ya que es uno de los tejidos más calcificados en los organismos mamíferos y puede proteger los dientes durante decenas de miles de años.<sup>16</sup> Los dientes están protegidos por una cerámica nanocompuesta resistente contra los efectos físicos (mecánicos) y químicos capaces de alterarlos. Las amelogeninas proteicas regulan la formación de microcristales durante el desarrollo del esmalte; sin embargo, se degradan específicamente durante la maduración de los dientes.<sup>17</sup> Los genes de amelogenina en humanos se encuentran en los cromosomas X e Y (AMELX y AMELY, respectivamente). Las proteínas codificadas por estos genes tienen una secuencia de aminoácidos diferente. El resultado de la presencia de estos dos genes en los cromosomas X e Y es la presencia de proteínas dependientes del sexo: AMELX para las mujeres y AMELY para los hombres.<sup>18</sup> Durante la maduración del esmalte, las proteínas se degradan (procedimiento proteolítico), por lo que el esmalte dental maduro es rico en diversos fragmentos peptídicos de proteínas constituidas.<sup>16</sup> Es importante recordar que la amelogenina es una molécula relativamente pequeña, altamente concentrada en la matriz extracelular.<sup>19</sup> Estos péptidos se originan principalmente a partir de la amelogenina. Como resultado, los péptidos libres de las amelogeninas dependientes del sexo (AMELX y AMELY) son una buena opción para determinar el sexo. Si se busca una vía universal para identificar el sexo de todos los mamíferos, es imprescindible tener en cuenta que el gen AMELX en el cromosoma X y AMELY en el cromosoma Y no se presentan en todas las familias de mamíferos; se encuentran en Homínidae, Suidae y Bovidae, pero sólo un AMELX se encuentra en las especies de roedores.<sup>19</sup>

Fincham *et al.*<sup>20</sup> señalan en su investigación de 1991 que un diagnóstico de diferencias en las proteínas del esmalte humano permite diferenciar especies según el sexo. Inclusive Porto *et al.*<sup>21,22</sup> descubrieron proteínas del esmalte en busca de péptidos dependientes del sexo. Estos últimos autores aplicaron grabado de toda la corona, tratamiento enzimático (tripsina) y análisis mediante espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF/TOF) para la extracción y análisis de proteínas. Encontraron los péptidos de amelogenina aminoterminales en una muestra antigua (momia, 800-1100). También encontraron un péptido (WYQSIRPPYP) específico para la isoforma X de amelogenina, pero ningún péptido es-

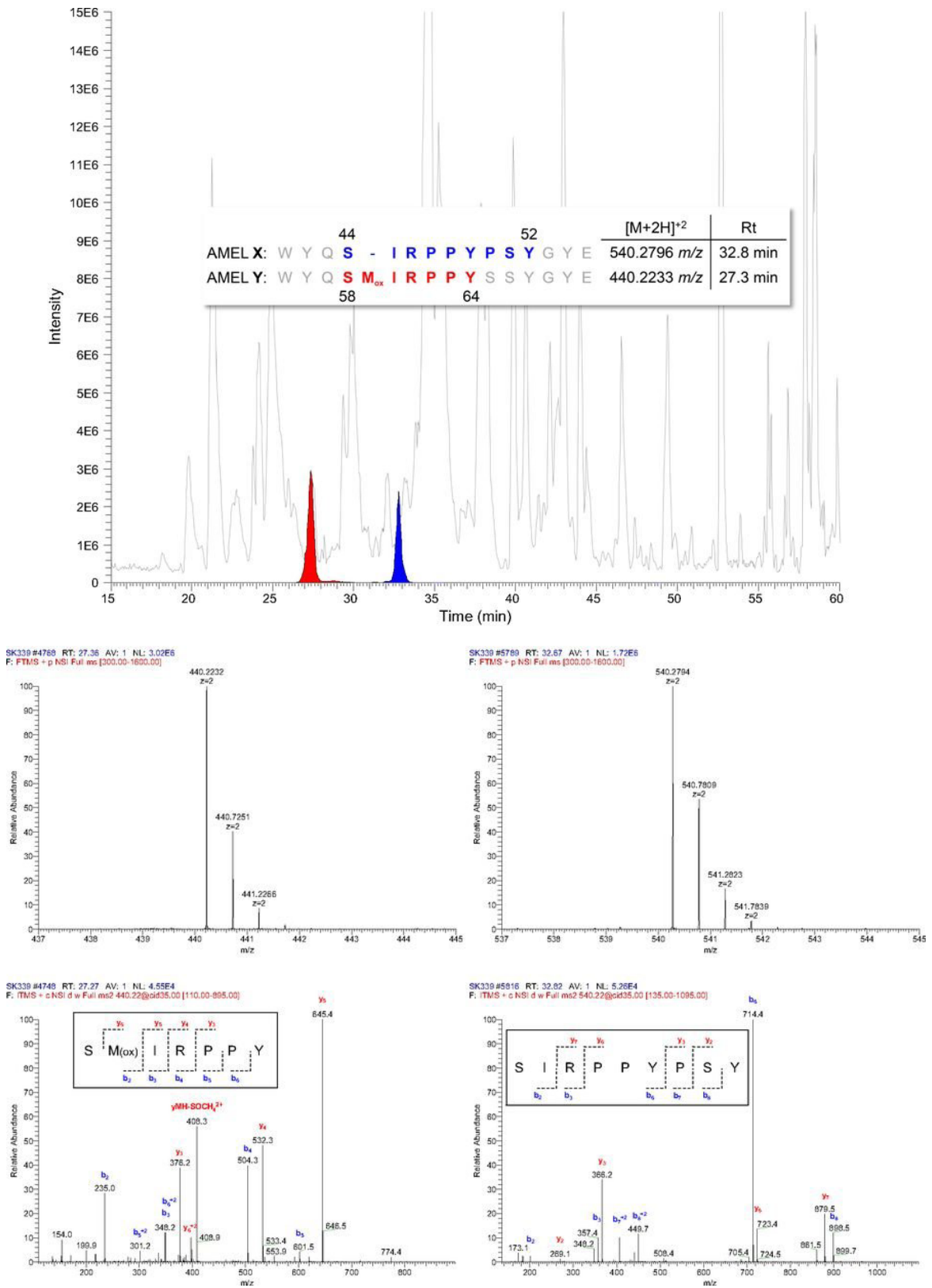
pecífico para la isoforma Y. Sin embargo, los autores no especificaron el sexo de las muestras.<sup>21</sup> Aunque el método MALDI-TOF/TOF es adecuado para el análisis de proteínas y péptidos, la espectrometría de masas por cromatografía nanolíquida (nLC-MS/MS) es el método a elegir debido a su mayor sensibilidad para la detección e identificación de péptidos. El espectrómetro de masas (MS) es un método microanalítico que permite la identificación de compuestos desconocidos, la cuantificación de compuestos conocidos y la explicación de la estructura y las propiedades químicas de las moléculas; y la cromatografía líquida de nanoflujo (nanoLC/MS) es una técnica adecuada para proteómica, para separar proteínas purificadas por afinidad que tienen modificaciones postraduccionales, por ejemplo en proteómica funcional.<sup>23</sup>

Stewart *et al.*<sup>24</sup> publicaron por primera vez en 2016 el grabado específico de dientes individuales para identificar amelogeninas sensibles al sexo del esmalte. Este procedimiento (con algunas ligeras modificaciones) ahora se usa comúnmente para la extracción de péptidos del esmalte. El método consta de dos partes: el grabado y la extracción para determinar el sexo de restos humanos utilizando péptidos de esmalte dental recuperados.<sup>25</sup> Los primeros dientes se trataron mecánicamente (mediante fresa dental) y fueron limpiados de todas las impurezas macroscópicas. La limpieza prosiguió con el lavado con agua, y luego el procedimiento continuó en la tapa de un tubo de microcentrífuga independiente (dejando un menisco convexo que sobresalía por encima del labio cuando el diente bajaba hacia la tapa). La corona del diente se lavó con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% durante 5 minutos, se lavó dos veces con H<sub>2</sub>O y se grabó con ácido clorhídrico (HCl) al 10% (v/v) durante 2 minutos. Este primer grabado fue descartado. En seguida se realizó un segundo grabado de 2 minutos y se retuvo como solución de grabado. La siguiente etapa fue la extracción mediante el uso de puntas de pipeta (ZipTip) cargadas con resina C18 (Millipore, MA, EE.UU.). Anteriormente, se adicionó tres veces con acetonitrilo al 100% y luego tres veces con ácido fórmico al 0,1% (vol/vol). Cada extracción fue descartada. Los péptidos se unieron al ZipTip pipeteando diez veces hacia arriba y hacia abajo. La pipeta se lavó seis veces con ácido fórmico al 0,1% (vol/vol). Para eliminar los analitos del adsorbente, se utilizó un disolvente llamado eluyente con 4 µl de acetonitrilo al 60% y ácido fórmico al 0,1%. Se liofilizó y se disolvió en 12 mililitros de ácido fórmico al 2% en agua y se analizó mediante

espectrometría de masas por cromatografía líquida de nanoflujo (nanoLC/MS) de fase inversa (con un gradiente similar al que se usa con frecuencia en la separación de péptidos, cuando se utiliza agua y acetonitrilo con 0,1% de ácido trifluoroacético como disolventes). El espectrómetro de masas (MS) era un orbitrap híbrido lineal con trampa de iones (Orbitrap XL, Thermo Scientific) y cromatografía líquida de nanoflujo (nanoLC/MS). Esta técnica es adecuada para proteómica para separar proteínas purificadas por afinidad que tienen modificaciones postraduccionales, por ejemplo, en proteómica funcional. Se seleccionaron los péptidos AMELY(58-64; SM(ox) IRPPY ([M + 2H]<sup>2+</sup>, m/z 440,2233) péptido y AMELX-(44-52; SIRPPYPSY ([M + 2H]<sup>2+</sup>, m/z 540,2796). En estas regiones se encuentran diferencias dimórficas entre la amelogenina X y la amelogenina Y. Uno de los péptidos identificados es AMELY (58-64), que tiene más metionina que la secuencia alineada de AMELX. Parecía que el péptido AMELX tenía una abundancia menor en comparación con el péptido AMELY en una de las muestras (SK130) y se utilizó un péptido de la amelogenina X, el AMELX (44-52), que tenía una intensidad iónica similar a la de AMELY (58-64), para asignar claramente el sexo (fig. 1).

Los autores de la investigación también compararon la influencia de la digestión con tripsina en la identificación de proteínas y péptidos. La tripsina aumentó la variedad de péptidos, pero no se observaron diferencias significativas en las proteínas “sexuales” (proteínas específicas del esmalte) cuando se compararon las muestras tratadas con tripsina y las no tratadas.<sup>24</sup>

Se utilizó la misma guía para la estimación del sexo de los llamados “Amantes de Módena”, dos adultos que fueron enterrados tomados de la mano y hallados en un cementerio italiano perteneciente a la Antigüedad tardía (probablemente entre los siglos IV y VI).<sup>26</sup> Los autores extrajeron los péptidos (después del grabado de los dientes) y el sistema analítico utilizado fue cromatografía líquida de ultra alto rendimiento-espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS, Q Exactive MS de Thermo Scientific). Además del péptido SM (ox) IRPPY (m/z 440,2233), utilizaron al menos otros dos péptidos que contienen metionina exclusivos de AMELY, como SMIRPPY (m/z 432,2258). El péptido está compuesto por los aminoácidos serina, metionina, isoleucina, arginina, prolina y tirosina, el m/z corresponde a una relación masa/carga específica para este péptido. Los fragmentos “b” se generan a partir del extremo



**Figura 1.** Un cromatograma representativo de pico base (300–1600 m/z) creado a partir de la muestra SK339 de Fewston. Los dos péptidos dimórficos de la amelogenina son AMELX (44-52) y AMELY (58-64). Los cromatogramas iónicos reconstruidos para cada uno de estos (a 4 ppm) se muestran en rojo y azul, respectivamente, con MS de barrido completo y MS/MS correspondiente. (Imagen tomada de Stewart *et al.*<sup>25</sup> bajo Licencia Creative Commons 4.0 (CC BY-NC-ND)).

N-terminal, incrementando con cada aminoácido añadido, en tanto que los fragmentos “y” se generan a partir del extremo C-terminal, incrementando con cada aminoácido añadido, así mismo, la identificación de los fragmentos “b” e “y” en el espectro MS/MS permite confirmar la secuencia del péptido. La M(ox)IRPPY (m/z 396,7073) está compuesto por los aminoácidos isoleucina, arginina, prolina, y tirosina, donde M(ox) indica que la metionina está oxidada, el m/z, corresponde a una relación masa/carga específica para este péptido. En todos los individuos encontraron AMELY dentro de su proteoma del esmalte, un marcador fuerte del sexo masculino, excepto uno (3\_CM12-2), que fue clasificado como femenino por osteología. Se trataba de un adulto joven (de alrededor de 20 años) al momento de su muerte, por lo que se sugirió que la clasificación incorrecta del esqueleto se debió a su edad y al bajo grado relacionado de sexualización de los distritos dimórficos. Todos coincidieron en la distinción de los ejemplares según el sexo, es decir, en la determinación de AMELY. Sorprendentemente, los “Amantes de Módena” eran hombres.

El mismo método se utilizó con éxito para investigar la morbilidad y mortalidad relacionadas con el sexo en 30 personas no adultas en un sitio italiano de la Alta Edad Media (siglo VII).<sup>27</sup> Los autores concluyeron que este método es eficaz para la investigación arqueológica y para la medicina forense.<sup>27</sup> También se utilizó con éxito para determinar el sexo a partir de dientes temporales y permanentes de no adultos (incluidos sujetos perinatales) de sitios arqueológicos en Inglaterra (siglos I-II y siglos XVIII-XIX).<sup>28</sup>

Nuevamente se aplicó el mismo método<sup>26,27</sup> para la determinación del sexo de los jinetes de la Alta Edad Media (siglo VII).<sup>29</sup> La determinación del sexo mediante el método proteómico concordó con la determinación osteológica y arqueológica cuando, en muchos casos, sólo el análisis proteómico era considerado aceptable para la estimación del sexo.

Las técnicas de grabado descritas anteriormente se estudiaron para su optimización utilizando tres procedimientos de tratamiento con HCl 1,5 M: 3 incubaciones secuenciales de 10 minutos.<sup>16</sup> Las muestras se desalinizaron en sulfonato de estirenodivinilbenceno de fase inversa (SDB-RPS, StageTips) antes del análisis en el sistema nLC-MS/MS, utilizando el espectrómetro de masas (Q Exactive Plus). Desde el punto de vista de la estimación del sexo, recomiendan un grabado de 10 minutos. El método fue validado en un conjunto de 23 piezas dentales humanas recuperadas en contextos arqueológicos, en compa-

ración con dos métodos diferentes de estimación del sexo: el morfológico y el arqueológico (basado en ritos de entierro). Los tres métodos coincidieron, excepto en un caso (cuando el método arqueológico era opuesto a los morfológicos y proteicos).<sup>16</sup> Además de los métodos morfológicos, la determinación del sexo mediante este método de grabado ácido también se describió para la estimación del sexo de individuos prepúberes de la época de la Italia romana (siglos I-IV) y de la Galicia tardorromana (siglos IV-V).<sup>30</sup>

Haas *et al.*<sup>31</sup> utilizaron análisis osteológicos, proteómicos e isotópicos para evaluar un entierro humano de 9000 años de antigüedad en el sitio de las tierras altas de los Andes, específicamente en la región de Perú, significativo porque revelaron información crucial sobre las poblaciones tempranas en América del Sur. Estos análisis indican que este primer cazador era una mujer adulta joven, hallazgo que contradice la teoría del hombre cazador.

Para el análisis proteómico, se cortó un pequeño trozo de esmalte (20 mg) de los dientes, se lo hizo polvo y se lo desmineralizó con HCl 1,2 M. Después de la reducción (proceso químico en el que un grupo alquilo se agrega o reemplaza a una molécula de sustrato orgánico) y la alquilación (reacción química en la que un grupo alquilo se agrega a una molécula orgánica), las muestras se trataron con tripsina, que es una enzima peptidasa que hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas para formar péptidos y aminoácidos. El siguiente paso fue la extracción en SepPak C18, una marca comercial de cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) que contienen una fase estacionaria de octadecilsilano (C18), que asimismo es un sorbente que tiene una selectividad excepcional y una desalación excelente de péptidos. Los péptidos se analizaron mediante espectrómetro de masas (nLC-MS/MS, Thermo ScientificQ-Exactive Plus Orbitrap). Se utilizó la detección de múltiples péptidos para la identificación de AMELX y AMELY.<sup>31</sup>

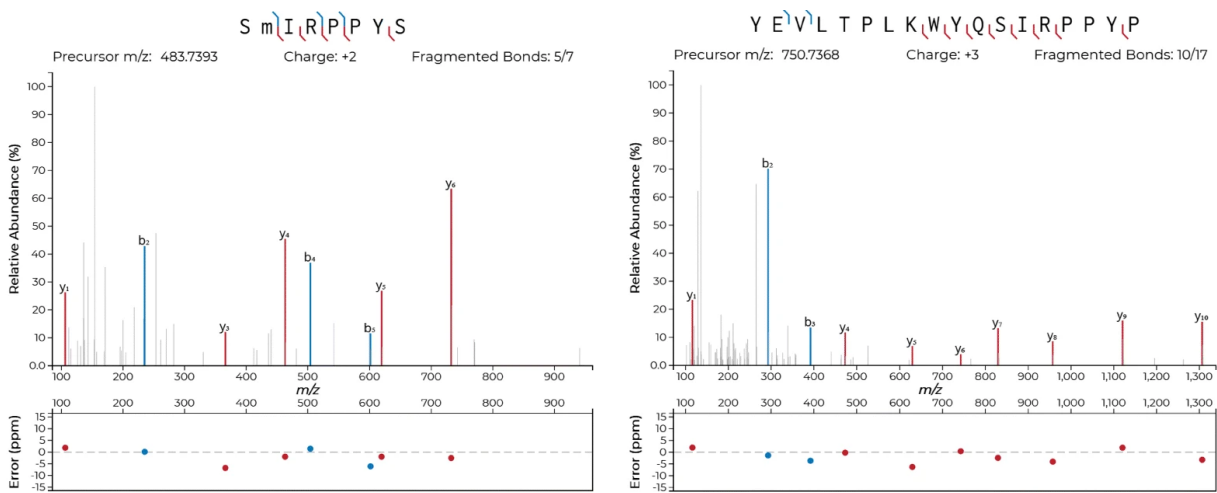
Otros autores también desarrollaron dos métodos rápidos, de entre 1 y 3 minutos, para la estimación del sexo sin el paso de separación.<sup>32</sup> Ambos métodos se basan en FIA (análisis de inyección de flujo) utilizando espectrometría de masas de alta resolución (Q Exactive Orbitrap MS, Thermo Scientific) o MS en tándem (Xevo TQ-S de Waters, Milford). Son métodos rápidos para asignar el sexo a restos humanos prehistóricos utilizando el esmalte dental. Los péptidos analizados fueron nuevamente SM (ox) IRPPY y SIRPPYPSY, con una preparación de la muestra igual a la anterior. Las ventajas de estos métodos son

la rapidez (1 minuto por muestra) y la posibilidad de utilizar espectrómetros de masas (MS/MS) de baja resolución, es decir, instrumentos de costo relativamente bajo.<sup>32</sup>

También se describieron otros péptidos de amelogenina como péptidos de diagnóstico utilizando un sistema nanoLC acoplado a un espectrómetro de masas orbitrap Q Exactive.<sup>33,34</sup> La preparación de la muestra fue, en principio, la misma que en el método de Stewart *et al.*<sup>25</sup> y se eligieron péptidos de alta puntuación de esta lista que contenían la secuencia objetivo de ambas isoformas relacionadas con el sexo. La puntuación MaxQuant ID fue de 77,7 y 130, la puntuación idotp media fue de 0,9825 y 0,9983 y la tolerancia de masa fue de 5 ppm. Los péptidos de diagnóstico seleccionados fueron SM (ox) IRPPYS ([M+2H]<sup>2+</sup> = 483,7393 m/z) y YEVLTPLKWYQSIRPPYP ([M+3H]<sup>3+</sup> = 750,7368 m/z) (fig. 2). Este método se aplicó con éxito para estimar el sexo de un niño (de 5 a 6 años) asesinado en la Edad del Bronce Temprano en Schleinbach, Austria (c. 1950-1850 a.C.),<sup>33</sup> así como para una clasificación sexual exitosa de 70 (de entre 75) niños menores de 12 años al momento de su muerte enterrados en los cementerios de la Edad del Bronce Temprano en Franzhausen I, Austria (c. 2050-1680 a.C.). La coincidencia entre los resultados arqueológicos y los basados en péptidos fue muy alta (62 de 63 individuos, 98,4%) cuando se trataba del sexo femenino, según la posición y orientación del cuerpo.<sup>34</sup>

Otro enfoque para el análisis de muestras arqueológicas se describió para individuos de la Edad del Hierro (2000-1000 a.C.) del ambiente tropical (noroeste de Tailandia).<sup>35</sup> Fue posible identificar 212 proteínas. Los análisis se realizaron con el sistema nLC-MS/MS (OrbitrapVelos, Thermo Electron, Bremen, Alemania), utilizando múltiples métodos de monitoreo de reacciones para la identificación de dos péptidos AMELX (TALVLTPLK y WYQSIRPPYPSY(G)) y un péptido AMELY (IALVLTPLK). Con respecto a la preparación de la muestra, el esmalte del diente se trituró, se trató con HCl 1,5 M, se redujo, se alquiló y se escindió con tripsina.<sup>35</sup>

Froment *et al.*<sup>36</sup> utilizaron otra extracción de proteína/péptido para analizar dientes humanos de 5000 años de antigüedad. En principio, pulverizaron dientes enteros, los desmineralizados en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y las proteínas fueron desnaturadas, lisadas, lavadas y alquiladas. Finalmente, las proteínas fueron tratadas con tripsina. Para el análisis de péptidos, se utilizó nanoLC acoplado a Orbitrap Fusion MS (Thermo Scientific) valiéndose del enfoque de MS, que es una técnica analítica utilizada para medir la relación masa/carga (m/z) de iones, además dirigida a analizar la posibilidad de un método proteómico y monitorización de reacciones paralelas (PRM), una técnica poderosa y precisa en la espectrometría de masas, particularmente valiosa en el campo de la proteómica para la cuantificación y análisis detallado de proteínas y péptidos



**Figura 2.** El espectro de fragmentos MS/MS del péptido SM (ox) IRPPYS (AMELY) se ve en la imagen. Al desglosar lo que ocurre durante la espectrometría de masas en tándem, se observa que el péptido proviene de la proteína AMELY (amelogenina, gen localizado en el cromosoma Y). En este péptido SM (ox) se indica que el residuo de metionina (M) está oxidado, IRPPYS son los demás aminoácidos del péptido y los errores de masa correspondientes en ppm se encuentran a la izquierda. En el espectro de fragmentos de MS/MS del péptido YEVLTPLKWYQSIRPPYP (AMELX) los péptidos se fragmentan principalmente en los enlaces peptídicos para formar iones de fragmento. Los iones de fragmento comunes son b-iones (que contienen el extremo N-terminal) e y-iones (que contienen el extremo C-terminal) que se ubica a la derecha, junto con los errores de masa correspondientes en ppm (Imagen tomada de Rebay-Salisbury *et al.*<sup>33</sup> bajo Licencia Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY-NC)).



en muestras complejas. Además, es un método de cuantificación específico que emplea espectrómetros de masas híbridos de alta resolución. Demostraron el éxito para determinar el sexo de cada muestra del método desarrollado PRM de proteómica dirigida utilizando los péptidos TALVLTPLK (m/z 478,3130) para AMELX e IALVLTPLK (m/z 474,3325) para AMELY marcados con isótopos. Podría representar un método basado en proteínas alternativo al análisis genético para estimar el sexo en situaciones en las que el ADN no se puede explotar, especialmente en muestras muy antiguas.

Existe cierta probabilidad de que el método que utiliza AMELX y AMELY pueda producir resultados inexactos debido a la presencia de baja frecuencia de variantes de delección de AMELY o versiones raras del gen AMELY (amelogenina Y). En algunas poblaciones la amelogenina es una proteína codificada en los cromosomas sexuales.<sup>37</sup> Sin embargo, después del análisis de muchos proyectos genómicos, se concluyó que la probabilidad de una estimación falsa del sexo es baja y que la eliminación de AMELY no debería afectar la estimación rutinaria del sexo biomolecular.<sup>38</sup>

El proteoma dental más antiguo probablemente se estudió en el homínido del Pleistoceno temprano y medio (*Homo antecessor*) y en el diente de *Homo erectus*.<sup>39</sup> Para la extracción de proteínas/péptidos, los autores utilizaron tres métodos: i) desmineralización con HCl sin alquilación ni digestión enzimática, ii) el sedimento después de la reducción, alquilación y digestión del sedimento después de la desmineralización con endoproteinasa LYS-C y tripsina y iii) desmineralización con ácido trifluoroacético (TFA) sin alquilación ni digestión enzimática. La primera y tercera extracción dieron una recuperación de péptidos más extensa que la segunda. Los péptidos se analizaron mediante nLC-MS/MS usando un espectrómetro de masas Q-Exactive HF o HF-X (Thermo Fisher Scientific). Se describió que la longitud promedio de un péptido disminuye con la edad de la muestra de esmalte. Las proteínas específicas del esmalte se identificaron como ameloblastina, MMP20 y amelogeninas (AMELX para las mujeres y AMELX y AMELY para los hombres). En los dientes de *Homo antecessor*, se encontraron secuencias peptídicas específicas de AMELY (como SM (ox) IRPPY), por lo que se concluyó que era hombre.<sup>39</sup> Es importante mencionar que *Homo antecessor* es una especie humana arcaica extinta, registrada en España, que vivió hace aproximadamente entre 1,2 a 0,8 millones de años durante el Pleistoceno temprano.

## Conclusiones

La determinación del sexo suele ser importante para las investigaciones en todas las disciplinas de medicina forense. Los métodos proteómicos son relativamente jóvenes, están creciendo rápidamente y tienen aplicaciones en muchas áreas científicas. Actualmente se utilizan tres: la osteología, la genética y la proteómica. En el método proteómico para la determinación del sexo se utiliza la proteína amelogenina en forma X e Y (AMELX y AMELY). Se estableció como un método que supera al osteológico y al genómico por resultar más valioso, sensible y relativamente simple y rápido. La principal ventaja de este método es que utiliza péptido dental.<sup>40</sup> El esmalte es uno de los tejidos más calcificados del organismo mamífero y por este motivo es relativamente resistente a la degradación provocada por efectos a largo plazo, fenómenos de descomposición agresivos en el suelo, daños físicos y químicos externos. Se ha demostrado que los péptidos o proteínas del esmalte pueden permanecer en su estado original durante decenas o cientos de miles de años.

Por lo tanto, se concluye que el método proteómico para la determinación del sexo utilizando isoformas de amelogenina podría ser usado con éxito en investigaciones forenses, en especial en la disciplina de odontología, y podría superar o complementar a otros métodos utilizados anteriormente.




### Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés en relación con este artículo científico.

### Fuentes de financiamiento

Este artículo fue financiado exclusivamente por los autores.

### Identificadores ORCID

RMLT  0009-0001-3367-4920  
NECE  0000-0002-3016-663X  
DAMLS  0000-0003-4488-252X

## Referencias

1. Malik SD, Pillai JP, Malik U. Forensic genetics: Scope and application from forensic odontology perspective. *J Oral Maxillofac Pathol* 2022;26:558-63. [https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp\\_341\\_21](https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_341_21)
2. Gowland R, Thompson TJU. *Human identity and identification*. Cambridge, Cambridge Univ Press, 2013. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139029988>



3. Mikšík I, Morvan M, Brůžek J. Peptide analysis of tooth enamel - A sex estimation tool for archaeological, anthropological, or forensic research. *J Sep Sci* 2023;46:e2300183. <https://doi.org/10.1002/jssc.202300183>
4. Cox M, Mays S. *Human Osteology in Archaeology and Forensic Science*, 1<sup>ra</sup> ed., Cambridge, Univ Press, 2000.
5. Buikstra JE, Ubelaker DH. *Standards for data collection from human skeletal remains: Proceedings of a seminar at the Field Museum of Natural History*. Fayetteville, Arkansas Archeological Survey Research Series, 1994, pp. 272.
6. Lewis ME. *The bioarchaeology of children: perspectives from biological and forensic anthropology*. Cambridge, Cambridge Univ Press, 2007. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542473>
7. Yasar ZF, Durukan E, Buken E. The knowledge level of dentists in Turkey about their potential role on the disaster victims identification (DVI) team. *Disaster Med Public Health Prep* 2019;13:533-8. <https://doi.org/10.1017/dmp.2018.111>
8. Buonasera T, Eerkens J, de Flamingh A, Engbring L, Yip J, Li H, *et al.* A comparison of proteomic, genomic, and osteological methods of archaeological sex estimation. *Sci Rep* 2020;10:11897. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68550-w>
9. Warinner C, Korzow Richter K, Collins MJ. Paleoproteomics. *Chem Rev* 2022;122:13401-46. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00703>
10. Schweitzer MH, Suo Z, Avci R, Asara JM, Allen MA, Arce FT, *et al.* Analyses of soft tissue from *Tyrannosaurus rex* suggest the presence of protein. *Science* 2007;316:277-80. <https://doi.org/10.1126/science.1138709>
11. Asara JM, Schweitzer MH, Freimark LM, Phillips M, Cantley LC. Protein sequences from Mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry. *Science* 2007;316:280-5. <https://doi.org/10.1126/science.1137614>
12. Hendy J. Ancient protein analysis in archaeology. *Sci Adv* 2021;7:eabb9314. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb9314>
13. Garofalo EM, Garvin HM. "Chapter 4 - The confusion between biological sex and gender and potential implications of misinterpretations", en: Klaes AR (ed.). *Sex estimation of the human skeleton*, Academic Press, 2020, pp. 35-52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815767-1.00004-3>
14. European Commission: Directorate-General for Research and Innovation. *Gendered innovations: how gender analysis contributes to research. Report of the expert group "Innovation through gender"*. Luxembourg, Publications Office of the European Union, 2013. <https://doi.org/10.2777/11868>
15. Miller I, Gianazza E, Eberini I. Encore – Sex dependency of the proteome. *J Proteomics* 2020;212:103579. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103579>
16. Ziganshin RH, Berezina NY, Alexandrov PL, Ryabinin VV, Buzhilova AP. Optimization of method for human sex determination using peptidome analysis of teeth enamel from teeth of different biological generation, archeological age, and degrees of taphonomic preservation. *Biochemistry (Mosc)* 2020;85:614-22. <https://doi.org/10.1134/S0006297920050107>
17. Jäger M, Eckhardt A, Pataridis S, Broukal Z, Dušková J, Mikšík I. Proteomics of human teeth and saliva. *Physiol Res* 2014;63:S141-54. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932702>
18. Salido EC, Yen PH, Koprivnikar K, Yu LC, Shapiro LJ. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 1992;50:303-16.
19. Gil-Bona A, Bidlack FB. Tooth enamel and its dynamic protein matrix. *Int J Mol Sci* 2020;21:4458. <https://doi.org/10.3390/ijms21124458>
20. Fincham, AG, Bessem CC, Lau EC, Pavlova Z, Shuler C, Slavkin HC, *et al.* Human developing enamel proteins exhibit a sex-linked dimorphism. *Calcif Tissue Int* 1991;48:288-90. <https://doi.org/10.1007/BF02556382>
21. Porto IM, Laure HJ, Tykot RH, de Sousa FB, Rosa JC, Gerlach RF. Recovery and identification of mature enamel proteins in ancient teeth. *Eur J Oral Sci* 2011;119:83-7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00885.x>
22. Porto IM, Laure HJ, de Sousa FB, Rosa JC, Gerlach RF. New techniques for the recovery of small amounts of mature enamel proteins. *J Archaeol Sci* 2011;38:3596-604 <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.08.030>
23. Yi L, Piehowski PD, Shi T, Smith RD, Qian WJ. Advances in microscale separations towards nanoproteomics applications. *J Chromatogr A* 2017;1523:40-8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.055>
24. Stewart NA, Molina GF, Mardegan Issa JP, Yates NA, Sosovicka M, Vieira AR, *et al.* The identification of peptides by nanoLC-MS/MS from human surface tooth enamel following a simple acid etch extraction. *RSC Adv* 2016;6:61673-9. <https://doi.org/10.1039/C6RA05120K>
25. Stewart NA, Gerlach RF, Gowland RL, Gron KJ, Montgomery J. Sex determination of human remains from peptides in tooth enamel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114:13649-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714926115>
26. Lugli F, Di Rocco G, Vazzana A, Genovese F, Pinetti D, Cilli E, *et al.* Enamel peptides reveal the sex of the Late Antique 'Lovers of Modena'. *Sci Rep* 2019;9:13130. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49562-7>
27. Lugli F, Figus C, Silvestrini S, Costa V, Bortolini E, Conti S, *et al.* Sex-related morbidity and mortality in non-adult individuals from the Early Medieval site of Valdarò (Italy): the contribution of dental enamel peptide analysis. *J Archaeol Sci Rep* 2020;34:102625. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102625>
28. Gowland R, Stewart NA, Crowder KD, Hodson C, Shaw H, Gron KJ, *et al.* Sex estimation of teeth at different developmental stages using dimorphic enamel peptide analysis. *Am J Phys Anthropol* 2021;174:859-69. <https://doi.org/10.1002/ajpa.24231>
29. Gasparini A, Lugli F, Silvestrini S, Pietrobelli A, Marchetta I, Benazzi S, *et al.* Biological sex VS. archaeological gender: Enamel peptide analysis of the horsemen of the Early Middle age necropolises of Campochiaro (Molise, Italy). *J Archaeol Sci Rep* 2022;41:103337. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2021.103337>
30. Avery LC, Prowse TL, Findlay S, de Sererville-Niel CC, Brickley MB. Pubertal timing as an indicator of early life stress in Roman Italy and Roman Gaul. *Am J Biol Anthropol* 2023;180:548-60. <https://doi.org/10.1002/ajpa.24680>

31. Haas R, Watson J, Buonasera T, Southon J, Chen JC, Noe S, *et al.* Female hunters of the early Americas. *Sci Adv* 2020;6:eabd0310. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd0310>
32. Casas-Ferreira AM, del Noyal-Sánchez M, Arroyo ÁE, Vázquez JV, Pérez-Pavón JL. Fast methods based on mass spectrometry for peptide identification. Application to sex determination of human remains in tooth enamel. *Microchem J* 2022;181:107645. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107645>
33. Rebay-Salisbury K, Janker L, Pany-Kucera D, Schuster D, Spannagl-Steiner M, Waltenberger L, *et al.* Child murder in the Early Bronze Age: proteomic sex identification of a cold case from Schleinbach, Austria. *Archaeol Anthropol Sci* 2020;12:265. <https://doi.org/10.1007/s12520-020-01199-8>
34. Rebay-Salisbury K, Bortel P, Janker L, Bas M, Pany-Kucera D, Salisbury RB, *et al.* Gendered burial practices of early Bronze Age children align with peptide-based sex identification: a case study from Franzhausen I, Austria. *J Archaeol Sci* 2022;139:105549. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2022.105549>
35. Wasinger VC, Curnoe D, Bustamante S, Mendoza R, Shoocongdej R, Adler L, *et al.* Analysis of the preserved amino acid bias in peptide profiles of Iron Age teeth from a tropical environment enable sexing of individuals using amelogenin MRM. *Proteomics* 2019;19:1800341. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800341>
36. Froment C, Hourset M, Sáenz-Oyhéréguy N, Mouton-Barbosa E, Willmann C, Zanolli C, *et al.* Analysis of 5000 year-old human teeth using optimized large-scale and targeted proteomics approaches for detection of sex-specific peptides. *J Proteomics* 2020;211:103548. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103548>
37. Parker GJ, Yip JM, Eerkens JW, Salemi M, Durbin-Johnson B, Kiesow C, *et al.* Sex estimation using sexually dimorphic amelogenin protein fragments in human enamel. *J Archaeol Sci* 2019;101:169-80. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2018.08.011>
38. Parker GJ, Buonasera T, Yip JM, Eerkens JW, Salemi M, Durbin-Johnson B, *et al.* AMELY deletion is not detected in systematically sampled reference populations: a reply to Štampfelj. *J Archaeol Sci* 2021;130:105354. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2021.105354>
39. Welker F, Ramos-Madrigal J, Gutenbrunner P, Mackie M, Tiwary S, Rakownikow Jersie-Christensen R, *et al.* The dental proteome of *homo antecessor*. *Nature* 2020;580:235-8. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2153-8>. Epub 1 de abril 2020.
40. Brůžek J, Mikšík I, Kotěrová AP, Morvan M, Kaupová SD, Santos F, *et al.* Undertaking the biological sex assessment of human remains: The applicability of minimally-invasive methods for proteomic sex estimation from enamel peptides. *J Cult Herit* 2024;66:204-14. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2023.11.021>

#### Cómo citar este artículo

López Toribio RM, Castañeda Eugenio NE, Manrique de Lara Suárez DA. Análisis proteómico de la estructura del esmalte dental humano para la determinación del sexo en investigaciones forenses. Revisión narrativa. *Rev Asoc Odontol Argent* 2024;112:e1121252. <https://doi.org/10.52979/raoa.1121252.1250>

Contacto:

**ROE MIO LÓPEZ TORIBIO**  
 miolopeztoribio@hotmail.com