



Universidade de Cuiabá

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas
Área de Concentração Biociências**

HEITOR SIMÕES DUTRA CORRÊA

**CEMENTO DENTÁRIO COMO FONTE DE DNA NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA
FORENSE**

Cuiabá, 2015

HEITOR SIMÕES DUTRA CORRÊA

**CEMENTO DENTÁRIO COMO FONTE DE DNA NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA
FORENSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Integradas da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas – Área de Concentração: Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luis Miranda Pedro
Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Aguirre Guedes

Cuiabá, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Dados Internacionais para Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecária Elizabete Luciano / CRB1-2103

C824c Corrêa, Heitor Simões Dutra

Cimento Dentário Como Fonte de DNA na Identificação Humana Forense./ Heitor Simões Dutra Corrêa. Cuiabá-MT, 2015.
45p.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas da Universidade de Cuiabá - UNIC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas – Área de Concentração: Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luis Miranda Pedro

1.Introdução. 2.Revisão da Literatura. 3.Metodologia. 4.Resultados. 5.Discussão.
6.Conclusão. 7.Referências.

CDU 616.314

HEITOR SIMÕES DUTRA CORRÊA

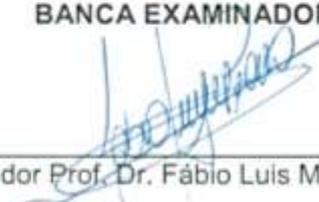
CEMENTO DENTÁRIO COMO FONTE DE DNA NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA FORENSE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Integradas da Universidade de Cuiabá – UNIC, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas – Área de Concentração: Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luis Miranda Pedro.

Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Aguirre Guedes.

BANCA EXAMINADORA


Orientador Prof. Dr. Fábio Luis Miranda Pedro


Membro Titular Prof. Dr. Alvaro Henrique Borges


Membro Externo Prof^a. Dr^a. Flávia Galindo Silvestre

Cuiabá, ____ de _____ de 2015.

Conceito Final: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus professores pelos ensinamentos e críticas construtivas, em especial aos professores doutores Fábio Luís Miranda Pedro, Álvaro Henrique Borges e Evanice Marçal Menezes, pela paciência e contribuições.

Aos meus colegas de mestrado e de trabalho pelos momentos de aprendizagem e discussão de ideias que contribuíram muito para o crescimento deste trabalho.

À minha mãe pelo incansável auxílio e pelos ensinamentos.

Aos meus queridos familiares e amigos pelo apoio e suporte, paciência e por acreditarem em mim, em especial ao meu pai e à minha madrinha.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a formação deste trabalho.



RESUMO

RESUMO

CORRÊA, HSD. **Cimento dentário como fonte de DNA na identificação humana forense**. 2015. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas) Programa de Pós Graduação, Universidade de Cuiabá – UNIC, Cuiabá.

Quando não é possível estabelecer a inequívoca identidade de um corpo humano encontrado, métodos científicos de identificação humana são empregados. Geralmente inicia-se pela análise papiloscópica. Caso esta não seja possível, realiza-se a análise por odontologia-legal. Se as análises anteriores não forem suficientes para estabelecer a identidade, realiza-se a análise de DNA, por ser este um exame mais caro e demorado. O objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo alternativo de extração de DNA, a partir de dentes, que possui o cimento como alvo, visando contribuir na resolução de casos de identificação humana forense. Neste estudo foi realizada a análise genética de 20 (vinte) dentes coletados de 20 (vinte) corpos humanos não identificados a partir da amostragem de uma região específica do dente (centímetro final do ápice radicular) após a desmineralização do espécime. Esta amostra foi utilizada na extração de DNA através do método orgânico seguido de concentração e purificação em membrana microcon, foi realizada a amplificação de microssatélites (STRs) autossômicos por PCR utilizando-se de kits comerciais e foi feita a análise de fragmentos de DNA por eletroforese capilar. Após as análises realizadas, foram obtidos perfis genéticos completos para 95% dos indivíduos (19 de 20), enquanto 5% apresentou perfil genético incompleto (1 de 20). Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o protocolo alternativo ora apresentado é capaz de extrair DNA em quantidade e qualidade suficientes para a produção de um perfil genético em casos de identificação humana forense com uma taxa de sucesso de 95% para perfis genéticos completos.

Palavras-chave: ciências forenses; dentes; cimento; extração de DNA; identificação humana.



ABSTRACT

ABSTRACT

CORRÊA, HSD. **Tooth cementum as a DNA source in forensic human identification.** 2015. 45f. Dissertation (Master of Integrated Dental Sciences) Graduate Program, University of Cuiabá - UNIC, Cuiabá.

When it is not possible to establish the positive identity of an encountered human body, scientific methods for human identification are employed. Fingerprint analysis is usually the first choice. In case this analysis is not possible, forensic odontology analyses are made. If the before mentioned analyses are not enough for positive identification, DNA analysis is carried out, since it is more expensive and takes longer. The objective of this study was to validate an alternative protocol for DNA extraction from teeth that has cementum as a target, looking to contribute to the resolution of forensic human identification cases. In this study, 20 (twenty) teeth from 20 (twenty) unidentified human bodies were analyzed through the sampling of a specific region of the tooth (final centimeter of the root apex) after the demineralization of the specimen. This sample was used for DNA extraction through the organic method followed by concentration and purification on microcon membranes. Autosomal microsatellite (STR) amplification was accomplished by PCR with the use of commercial kits and DNA fragment analysis was performed by capillary electrophoresis. After the analyses were performed, full genetic profiles were obtained from 95% of the individuals (19 out of 20), while 5% showed an incomplete genetic profile (1 out of 20). The results obtained in the present study show that the alternative protocol here presented is capable of extracting DNA in sufficient quantity and quality for the production of a genetic profile in forensic human identification cases at a success rate of 95% for full genetic profiles.

Key words: forensic sciences; teeth; cementum; DNA extraction; human identification.



LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
aDNA	DNA antigo
AMP-FLP	Amplified fragment length polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado)
CGH	Comparative genomic hybridization (Hibridização genômica comparativa)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FISH	Fluorescence in situ hybridization (Hibridização fluorescente in situ)
g	Força-G
INTERPOL	Polícia internacional
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
n ^o	Número

°C	Graus Célsius
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
POLITEC	Perícia Oficial e Identificação Técnica
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEB	Stain Extraction Buffer (Tampão de extração de manchas)
SLP	Single locus probe (sonda de locus único)
STR	Short Tandem Repeat
Tris-HCl	Hidrocloreto de tris(hidroximetil) aminometano



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade de marcadores obtidos para cada amostra de dente
Tabela 2	Histórico dos casos



SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
3	METODOLOGIA	25
4	RESULTADOS	29
5	DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÃO	37
7	REFERÊNCIAS	39



1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Quando corpos humanos são encontrados sem vida, a causa da morte pode ser natural, acidental, proposital (suicídio) ou devido a ações de outras pessoas (homicídio). Em uma pequena proporção desses casos, a identidade do indivíduo pode ser desconhecida (APPS et al., p. 8).

A identificação forense de vítimas é essencial por razões humanitárias, bem como em investigações civis e criminais. A identificação de um cadáver pode ser baseada em análises odontológicas, impressões digitais e/ou análise do DNA (RAIMANN et al., 2012). De acordo com a INTERPOL, os métodos primários e mais confiáveis de identificação humana são: análise de cristas de fricção (como impressões digitais), odontologia legal comparativa e análise de DNA (INTERPOL, p. 18).

No entanto, a identificação humana pode ser difícil quando o cadáver é antigo, se encontra completamente destruído, em putrefação, esqueletização, carbonização ou vítima de afogamento. Nestes casos, os elementos usados na análise datiloscópica e odontológica podem se modificar devido à degradação, limitando as possibilidades de um resultado conclusivo. Tendo em vista esse cenário, especialistas forenses se voltam à análise do DNA (RAIMANN et al., 2012).

A recuperação de DNA a partir de tecido muscular é mais simples e conveniente do que a de ossos (PHENGON et al., 2008). Entretanto, em casos forenses de identificação humana, frequentemente os únicos tecidos viáveis para análise de DNA são os tecidos mineralizados: ossos e dentes, tendo em vista que os tecidos moles se decompõem muito mais rapidamente (HIGGINS et al., 2013).

Ossos e dentes, embora semelhantes na aparência, possuem morfologia e bioquímica completamente diferentes (DOBBERSTEIN et al., 2008). No entanto, os protocolos de extração de DNA forense a partir dessas amostras é o mesmo. Este protocolo envolve dois passos principais: pulverização da amostra de dente ou osso em nitrogênio líquido e desmineralização em solução contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (ROMEIKA & YAN, 2013).

Nesse sentido, é necessário o estabelecimento de protocolos de extração de DNA específicos para dentes ou para o tecido dentário mais rico em DNA ao invés de espelhar os protocolos para tecido ósseo. Busca-se, com isso, minimizar o processamento de tecidos muito mineralizados e pobres em DNA (esmalte e

dentina) e a coextração de substâncias inibidoras da reação de PCR (reação em cadeia da polimerase), como cálcio e colágeno (HIGGINS & AUSTIN, 2013; HIGGINS et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foi realizar análises genéticas em dentes coletados de cadáveres humanos não identificados com o intuito de se validar uma metodologia alternativa de extração de DNA, específica para dentes, baseada na desmineralização de todo o espécime.



2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IDENTIFICAÇÃO HUMANA

O fim do conflito na antiga Iugoslávia entre 1992 e 1995 foi marcado pela estimativa de 40 mil indivíduos desaparecidos. Para buscar uma solução ao problema dos indivíduos desaparecidos, a Comissão Internacional de Pessoas Desaparecidas (ICMP) foi criada em 1996 logo após a reunião do G-7 em Lyon, na França (MILOS et al., 2007). No mesmo sentido, nos Estados Unidos há milhares de remanescentes esqueletizados não identificados integrando casos pendentes de pessoas desaparecidas (NELSON & MELTON, 2007).

A identificação de remanescentes humanos pode ter importantes ramificações éticas, legais, sociais e políticas. Quando a morte se deve a atos de guerra, opressão política ou homicídio, a identificação de vítimas pode tanto estabelecer a culpabilidade dos responsáveis e fornecer aos sobreviventes, informações a respeito de seus familiares (GINTHER et al., 1992).

Devido à dinâmica social das sociedades modernas, sempre há famílias procurando por pessoas desaparecidas. Além disso, não é raro o recebimento de cadáveres não identificados e remanescentes humanos nos Institutos de Medicina Legal (IWAMURA et al., 2004).

A necessidade de identificação humana se dá por vários motivos. Alguns são relacionados ao direito civil, como: a necessidade de emissão da declaração de óbito, o direito familiar à sucessão dos bens, o direito de propositura de ações judiciais por danos sofridos, além do direito ao recebimento de benefícios (pensões, pecúlios etc...). Com a morte, extinguem-se o poder familiar, o vínculo conjugal, os contratos personalíssimos, o usufruto entre outros (JOBIM, 2006, p. 106-107).

Os motivos sociológicos para se proceder a identificação de um indivíduo são: o inquestionável direito à identidade, comum a todos os seres humanos, mesmo após a morte, conforme a Declaração universal dos Direitos do Homem (JOBIM, 2006, p. 107).

Na esfera criminal, a necessidade de identificação humana vem do auxílio às investigações criminais. Aquele que investiga precisa primeiro responder quem é a vítima para depois responder quem é o autor (JOBIM, 2006, p. 106).

A análise de remanescentes humanos pode ser muito informativa no estabelecimento da identidade. Historicamente, remanescentes humanos eram comparados a registros odontológicos ou radiografias. Há algumas décadas atrás, quando um corpo era encontrado em um determinado nível de decomposição em que as estruturas faciais estavam destruídas, os remanescentes se encontravam muito fragmentados, registros *antemortem* não existiam ou não eram informativos (por exemplo: não existiam impressões digitais, registros odontológicos não eram informativos ou comparações radiológicas eram inúteis), provavelmente a confirmação da identidade não era possível (GINTHER et al., 1992; HOCHMEISTER et al., 1991).

Várias técnicas forenses são usadas hoje em dia para se identificar um cadáver humano, dependendo das circunstâncias e estado dos remanescentes encontrados. Dos métodos de identificação mais comuns, a comparação de digitais e de arcadas dentárias de corpos humanos depende obrigatoriamente de registros prévios, anteriores a morte (*antemortem*), que possam ser comparados com os achados no corpo (dados *postmortem*). Uma das vantagens dos exames de DNA é que estes não dependem de dados *antemortem* oriundos da vítima (ALONSO et al., 2001).

2.2 ODONTOLOGIA FORENSE

A odontologia forense pode ser definida como o ramo especializado da odontologia que aplica seu conhecimento à resolução de casos criminais. As principais áreas da odontologia forense são: determinação do sexo e estimativa da idade de um indivíduo, queiloscopia e palatoscopia, análise de marcas de mordidas e identificação humana (RAI & KAUR, 2013, p.1).

Tradicionalmente, na odontologia forense aplicada à identificação humana, são feitas comparações entre registros odontológicos *postmortem* e *antemortem* (presença de preenchimentos, tratamentos endodônticos, coroas ou pontes, estudos radiológicos para verificar os achados clínicos, a presença de mal oclusões ou fraturas dentárias, entre outros) para determinar se os registros correspondem ao mesmo indivíduo. Estas técnicas são menos utilizadas hoje em dia devido ao

aumento da eficiência e disponibilidade de técnicas de biologia molecular (ATA-ALI & ATA-ALI, 2014).

A identificação odontológica pode ocorrer de duas formas principais. Primeiro, o exame realizado mais frequentemente é a identificação comparativa, utilizada para estabelecer que os remanescentes de um corpo humano e a pessoa representada por registros odontológicos *antemortem* são o mesmo indivíduo (PRETTY & SWEET, 2001). Segundo, nos casos em que registros *antemortem* não estão disponíveis e não existem pistas relacionadas à possível identidade, o odonto-legista completa um perfil odontológico sugerindo características do indivíduo capazes de afunilar as pesquisas dos registros *antemortem* (SWEET & DIZINNO, 1996 In PRETTY & SWEET, 2001).

2.3 ANÁLISE DE DNA

A análise odontológica forense é uma abordagem necessária para a identificação individual em situações como remanescentes esqueletizados, corpos carbonizados ou vítimas de desastres em massa. Uma vez que o tecido duro do dente fisicamente protege a polpa, que é um tecido de alta densidade celular, os dentes fornecem uma fonte de DNA adequada ao propósito de identificação humana forense. Anteriormente à tipagem genética, a identificação odontológica individual geralmente ocorria através de comparação da dentição da vítima com registros *antemortem*. A identificação física possui a limitação de que os registros *antemortem* nem sempre estão disponíveis (GARCIA et al., 1996).

A análise genética tem sido frequentemente empregada pela comunidade forense, com sucesso, há quase 30 anos, sendo o padrão ouro em identificação humana. Este tipo de análise auxilia na identificação de indivíduos e tem se tornado uma ferramenta indispensável na investigação criminal, identificação de vítimas de desastres em massa e testes de paternidade (IP et al., 2014; THOMPSON et al., 2012 In CAPUTO et al., 2013).

A análise do DNA usando a técnica de PCR é uma ferramenta que permite a identificação de pessoas desaparecidas, o que não era possível antes de 1980. Desde então, o advento de tecnologias cada vez mais sofisticadas permitiu a análise de poucas cópias de DNA nuclear e DNA mitocondrial (EDSON et al., 2004).

De um modo em geral, os passos envolvidos na rotina de um laboratório de DNA forense podem ser separados em pré-laboratório, laboratório e pós-laboratório. A fase pré-laboratório envolve a avaliação do caso. A fase de laboratório inclui a extração de DNA, quantificação de DNA, amplificação do DNA, eletroforese capilar e tipagem genética. A interpretação dos resultados, inserção de perfis genéticos em bancos informatizados e a elaboração do laudo pericial são consideradas etapas pós-laboratório (ROMEIKA & YAN, 2013).

2.4 FUNDAMENTOS DA ANÁLISE DE DNA

2.4.1 O DNA

O DNA genômico é encontrado no núcleo de cada célula do corpo humano (exceto glóbulos vermelhos do sangue entre outros) e representa a principal fonte de DNA na maioria das aplicações forenses. Além do DNA genômico, as células contêm DNA mitocondrial (mtDNA). A principal vantagem do mtDNA é que existem muitas cópias dele em cada célula, devido ao grande número de mitocôndrias presentes na maioria das células. Dessa forma, em casos em que o DNA genômico encontra-se muito degradado, o mtDNA pode estar presente em quantidade suficiente. A desvantagem é que o mtDNA possui padrão de herança materno, da mãe para todos seus filhos e filhas. Isso significa que, com exceção de mutações, as sequências de mtDNA analisadas serão idênticas entre irmãos e seus familiares maternos (PRETTY & SWEET, 2001).

mtDNA é uma ferramenta poderosa em casos de pessoas desaparecidas devido a sua persistência em material esqueletizado por séculos, talvez milênios. Uma única amostra de referência materna é tudo o que é necessário para comparação com remanescentes esqueletizados. Os familiares maternos elegíveis podem ser próximos ou distantes na árvore familiar do indivíduo desaparecido (NELSON & MELTON, 2007).

2.4.2 MARCADORES GENÉTICOS

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um código químico encontrado em todas as células do corpo de um indivíduo. Embora aproximadamente 99,9% desta

sequência de códigos seja idêntica para todos os seres humanos, os cientistas forenses estão apenas interessados em estudar o 0,1% restante do código genético que é único de cada indivíduo. O método atual de escolha para análise de DNA forense é a análise de marcadores chamados de *short tandem repeats* (STRs). Este método possui inúmeras vantagens, no entanto, não funciona bem com amostras em que o DNA se encontra muito degradado (ROMEIKA & YAN, 2013).

Um marcador STR possui pequenas sequências (2 a 6 pares de bases) que se repetem, uma ao lado da outra, várias vezes. O tamanho total de um marcador STR gira em torno de 100 a 400 pares de bases (BUTLER, 2005).

2.5 ANÁLISE GENÉTICA EM AMOSTRAS PÓS-MORTE

Após a morte, tem início uma complexa série de processos bioquímicos e patológicos que resultam em uma considerável alteração da estrutura e composição do corpo humano (ZHOU & BYARD, 2011). A degradação do DNA em amostras biológicas se inicia rapidamente após a morte com a fragmentação do DNA causada por atividade de nucleases endógenas e ataque hidrolítico (ALAEDDINJ et al., 2010 *in* NAZIR et al., 2011). Conforme a autólise progride, todas as organelas celulares e DNA nuclear se degradam em suas partes constituintes menores (BOY et al., 2003).

Baixa umidade, baixa temperatura e ausência de microorganismos favorecem a preservação do DNA. Condições ambientais favoráveis como essas podem desacelerar os danos químicos e físicos, permitindo a detecção e análises de todos os tipos de DNA após milhares de anos (IWAMURA et al., 2004).

No entanto, a identificação genética pode ser complicada devido a longos intervalos de tempo entre o momento da morte e a realização dos exames. A decomposição ou destruição dos tecidos moles pode fazer com que reste apenas ossos e dentes para análise (GINTHER et al., 1992).

Enquanto estudos mostram que o DNA persiste em remanescentes antigos, a análise genética de ossos e dentes arqueológicos é mais viável que a de remanescentes de tecido mole, já que os tecidos duros são muito mais abundantes e geralmente melhor preservados (HAGELBERG & CLEGG, 1991).

Há mais de duas décadas atrás, sangue e tecido mole eram as fontes primárias de DNA para identificação genética (GINTHER et al., 1992). Porém, o DNA

pode se degradar rapidamente no sangue e tecido mole de cadáveres, mesmo em períodos *postmortem* curtos. O osso, por outro lado, é um tecido mais estável e, por vezes, a única evidência física remanescente de um corpo humano. (HOCHMEISTER et al., 1991).

Apenas certas áreas de remanescentes esqueletizados pré-históricos podem ser utilizados com sucesso na extração de DNA. Os ossos consistem de tecido esponjoso e tecido compacto. O tecido ósseo compacto é constituído de uma estrutura densa que quando preservada sob condições favoráveis contém substâncias orgânicas suficientes das quais pode-se extrair o DNA (SCHOLZ & PUSCH, 1997).

Nas áreas da pesquisa antropológica e forense, é possível a obtenção de DNA a partir de qualquer tecido. No entanto, os dentes oferecem uma boa fonte de DNA para a identificação de remanescentes esqueletizados. Estas amostras biológicas são escolhidas devido a sua alta resistência à ação externa de agentes físicos e químicos, motivo pelo qual são mais bem preservados em relação a outros tecidos. Os tecidos duros da dentição humana são capazes de resistir à degradação e decomposição, mesmo muito tempo após a perda dos outros tecidos (GUPTA et al., 2014; GARCIA et al., 1996).

Devido à resistência dos tecidos duros dos dentes às ações ambientais como incineração, imersão, trauma ou decomposição, o tecido pulpar é uma fonte excelente de DNA, importante para identificação humana através de marcadores genéticos polimórficos (POTSCH et al., 1992; ATA-ALI & ATA-ALI, 2014). No entanto, a polpa dentária, sendo um tecido conjuntivo altamente vascularizado, é a primeira parte do dente a ser degradada (CORTE-REAL et al., 2012).

2.6 OS DIFERENTES TECIDOS DENTÁRIOS COMO FONTE DNA

Os dentes são uma fonte excepcional de DNA, por vezes a única fonte viável. Em um dente, o DNA existe tanto em células que compõem a polpa dentária (fibroblastos, macrófagos, linfócitos entre outros) como naquelas presentes no cimento e na dentina (cementoblastos e odontoblastos). Este último conjunto de células é envolto por uma matriz mineralizada, que constitui um elemento protetivo

contra qualquer degradação ambiental, favorecendo uma melhor preservação do DNA (HERVELLA et al., 2015).

Até mesmo dentes históricos, como espécimes de museu, podem ser uma boa fonte de DNA mesmo após serem autoclavados e armazenados a temperatura ambiente (WANDELER et al., 2003).

Através da recente história da genética forense, faz-se uma revisão acerca do conhecimento científico no que diz respeito à utilização dos diferentes tecidos dentários como fontes de DNA na identificação humana.

WOODWARD et al. (1994) começavam a assumir, em seu estudo, que a polpa/interior do dente seria a região mais rica em DNA preservado. O autor sugere que dentes não possuem os inibidores comumente presentes no tecido mole.

SIVAGAMI et al. (2000) dizem que no tecido mineralizado do dente o DNA está presente apenas em quantidades muito pequenas e que os métodos para recuperar este DNA não foram eficientes ou de bom custo-benefício.

Em 2001, ALONSO et al. começam a inferir que a qualidade do DNA extraído de dentes é geralmente superior do que o de ossos.

Em um estudo muito interessante, GAYTMENN & SWEET (2003) seccionaram transversalmente 250 dentes em 4 pedaços (ápice da coroa, corpo da coroa, corpo da raiz e ápice da raiz) com o intuito de se identificar a região que possuía mais DNA preservado. Os autores concluíram que há DNA em quantidade e qualidade suficientes no corpo da raiz, ápice da raiz e corpo da coroa para a identificação humana. No entanto, os dentes utilizados no estudo foram extraídos de voluntários e congelados, não são amostras forenses, bem como não era objetivo do estudo informar qual tecido dentário contribuiu como fonte de DNA.

Em seu estudo, HERNANDEZ et al. (2003) concluem que, já que a quantidade de DNA de dentes íntegros e fraturados é a mesma, a dentina é a maior fonte de DNA e não a polpa, em dentes antigos, não havendo menção ao cimento.

Em 2003, MALAVER & YUNIS seccionaram e pulpectomizaram dentes de corpos não identificados para processar a polpa, a dentina e o cimento separadamente. Os autores afirmam que até então, o cimento não havia sido testado como fonte de DNA. A polpa deu os sinais mais fortes de quantificação de DNA, e os sinais da dentina e cimento foram similares. Os pesquisadores acreditam que as células do ligamento periodontal que permaneceram aderidas ao cimento foram responsáveis pela quantidade similar de DNA à dentina. Os mesmos dizem

também que odontoblastos e cementoblastos presos à matriz mineralizada estão protegidos e se tornam fontes de DNA preservado. Apenas DNA mitocondrial foi analisado.

WILLIAMS et al. (2004) estudaram o efeito da exposição de dentes decíduos a incineração de 100 a 500°C por 15 minutos no DNA das amostras. Diz que a polpa do dente contém uma rica fonte de DNA possível de análise genética, mas que a mesma pode representar a única fonte de DNA útil ao cientista forense.

SAMPIETRO et al. (2006) analisaram dentes do período neolítico que ainda se encontravam incrustados no osso alveolar de corpos não identificados. Apenas a raiz dos dentes foi pulverizada e foi obtida sequência completa para a região HVR1 do DNA mitocondrial em 15 amostras. Em outras 6 amostras foi obtido sequência parcial e em 2 amostras não foi obtida sequência.

Num estudo feito por CORTE-REAL et al. (2008) foi analisado o sucesso na extração de DNA a partir de dentes submetidos a tratamento endodôntico em que o tecido da polpa e a camada interna da dentina foram removidos e substituídos por termoplástico e cimento. Os dentes foram seccionados longitudinalmente com disco de diamante, o preenchimento endodôntico foi removido e o tecido duro restante pulverizado em moinho criogênico.

No estudo acima, das dez amostras analisadas, oito produziram perfil STR completo e as outras duas, perfil de DNA mitocondrial. Todas foram compatíveis com as amostras de referência dos doadores. Os autores dizem que inicialmente se pensava que apenas a polpa pudesse ser utilizada como fonte de DNA em dentes, e esperavam obter apenas perfil de DNA mitocondrial neste estudo. O autor atribui os perfis genéticos autossômicos obtidos ao deslocamento dos odontoblastos na dentina para o interior dos túbulos dentinários devido às fortes pressões hidráulicas durante o processo de tratamento endodôntico. Não há menção ao cimento.

Em um pertinente artigo de revisão, HIGGINS & AUSTIN (2013) recomendam a amostragem de dentes molares, pré-molares e incisivos, nesta ordem, para utilização em identificação humana por análise genética. Os autores consideram que quanto mais canais radiculares presentes no dente, mais DNA é obtido (3, 2 ou 1 canal). Os pesquisadores dizem ser necessário o estabelecimento de protocolos específicos para cada tecido dentário, ou para o(s) tecido(s) mais ricos em DNA.

Em um recente estudo, HIGGINS et al. (2013) analisaram molares extraídos de voluntários, não expostos a condições tafonômicas. O cimento foi amostrado

seletivamente com uso de bisturi, através de raspagem do dente não desmineralizado, e foi obtido perfil genético nuclear completo para todas as amostras. Os autores dizem que os tecidos mineralizados do dente não haviam sido, de nenhuma forma, alvo de amostragem seletiva para obtenção de DNA nuclear em estudos anteriores.

ATA-ALI & ATA-ALI (2014) afirmam que, em muitos casos, o dente pode ter sido obturado endodonticamente ou pode não ter tecido pulpar. O dente também pode ter sido contaminado por microrganismos ou por DNA não humano. Nesses casos a dentina e o cimento são usados na extração de DNA.

HERVELLA et al. (2015) dizem que cementoblastos e odontoblastos presos à matriz mineral são uma melhor fonte de DNA preservado que células no tecido mole da polpa.

2.6.1 ESMALTE

O esmalte do dente é o tecido mais duro do corpo humano, e os dentes permanecem por um longo período após a morte. A matriz externa mineral do esmalte dentário é particularmente resistente à degradação ambiental (GINTHER et al., 1992; MURAKAMI et al., 2000).

O esmalte do dente tem origem ectodérmica e é o tecido mais mineralizado do corpo humano. Sua composição é de 96% do peso composto de material inorgânico e 4%, material orgânico e água. Além disso, é uma estrutura acelular, avascular e sem nervos (CORTE-REAL et al., 2006; GUTIERREZ-SALAZAR & REYES-GASGA, 2003).

2.6.2 DENTINA

O dente, essencialmente a dentina, é uma fonte de muito valor para a identificação de um indivíduo em casos forenses. Os odontoblastos maduros estão alinhados formando uma única camada de células colunares, com processos odontoblásticos direcionados ao exterior (dentina) e o corpo celular de frente ao interior (polpa). Os processos odontoblásticos na dentina são parcialmente preservados das agressões do ambiente (CORTE-REAL et al., 2006).

A dentina pode ser usada como excelente fonte de DNA mitocondrial em casos forenses onde corpos em decomposição, esqueletizados ou dentes isolados precisam ser identificados, sendo que na dentina o componente inorgânico (mineral) chega a 70% do peso do tecido (GUTIERREZ-SALAZAR & REYES-GASGA, 2003; PFEIFFER et al., 1998).

2.6.3 POLPA

O esmalte dentário envolve uma polpa interior macia com células ricas em DNA. Os tecidos dentários duros que envolvem a câmara pulpar conferem um relativo isolamento à polpa e parecem protegê-la fisicamente, bem como ao seu DNA da degradação biológica. A hidroxiapatita, componente significativo do dente, se liga e estabiliza quimicamente o DNA. No ambiente único da câmara pulpar, o DNA parece extremamente estável em relação ao DNA em outros componentes celulares (GINTHER et al., 1992; PFEIFFER et al., 1999).

A polpa dentária consiste de um tecido que contém nervos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos. As células da polpa possuem formato estrelado irregular e núcleo em localização variável (POTSCH et al., 1992). Por outro lado, a polpa do dente se decompõe rapidamente mesmo sendo protegida por tecidos duros (SCHWARTZ et al., 1991 In PFEIFFER et al., 1998).

2.6.4 CEMENTO

A composição do cimento é parecida com a do osso: aproximadamente 50% hidroxiapatita e 50% proteínas colágeno e proteínas não colágeno. Muito pouco se sabe sobre as células responsáveis pela formação do cimento, os cementoblastos. Até recentemente, o cimento permaneceu um tecido pobremente descrito a nível celular e molecular. Ao contrário da dentina e do esmalte, onde existem diferenças claras nas proteínas presentes nestes tecidos e os fatores que regulam suas funções quando comparadas com osso, o cimento parece conter fatores em comum com aqueles associados com ossos a ser, do ponto de vista do desenvolvimento, controlado por fatores similares (SAYGIN et al., 2000).

Microscopia óptica e eletrônica permitiram que o cimento fosse classificado em cinco diferentes subtipos baseados na presença (celular) ou ausência (acelular) de células e a fonte de fibras de colágeno (extrínscica ou intrínscica). Todos estes subtipos são bem diferentes dos ossos, uma vez que o cimento não possui nervos, vasos sanguíneos e exibe pouco ou nenhum remodelamento. Mesmo com essas diferenças, o cimento é muito semelhante ao osso. Por exemplo, as doenças que afetam as propriedades dos ossos, geralmente alteram as propriedades do cimento também (SAYGIN et al., 2000).

Na maioria dos dentes, o cimento acelular, que é praticamente desprovido de células, se localiza em direção à superfície externa do dente. O cimento celular, que contém uma densa massa de cementócitos, geralmente se direciona ao interior do dente. A espessura do cimento varia de região para região de um mesmo dente, e entre dentes diferentes de um mesmo indivíduo. A proporção entre cimento celular e acelular nos dentes de um indivíduo é praticamente constante, como se cada pessoa tivesse um padrão individual de estrutura do cimento (NAKAGAKI et al., 1988).

Segundo STEIN & CORCORAN (1990), há dois tipos de cimento: celular e acelular, sendo que a raiz do terço apical do dente é frequentemente celular. De acordo com a pesquisa realizada por estes mesmos autores, a distância média observada da abertura do forame apical até a junção cementodentinária foi de 0,724 mm; a espessura média observada do cimento foi de 0,492 mm. Os autores acreditam que a espessura do cimento aumente com a idade do indivíduo.

2.7 EXTRAÇÃO DO DNA

Quando os tecidos do corpo se encontram apodrecidos, a estrutura do esmalte, dentina e complexo pulpar persistem. No entanto, é necessário extrair o DNA dos tecidos calcificados (PRETTY & SWEET, 2001).

A maioria dos métodos de extração de DNA são criados para amostras contendo tecido fresco, células intactas e DNA de alto peso molecular (ROHLAND & HOFREITER, 2007a). A pesquisa com DNA antigo compartilha um problema em comum com a pesquisa forense: a quantidade de DNA endógeno disponível nas amostras é geralmente limitada. Portanto, técnicas de extração que recuperam o

máximo de DNA possível de uma amostra são cruciais (ROHLAND & HOFREITER, 2007b).

Investigadores recentemente têm se concentrado no dente humano como fonte potencial de DNA para estudos forenses uma vez que a cavidade pulpar e seu conteúdo celular estão protegidos da invasão bacteriana e decomposição pelo tecido duro que envolve o dente (BOY et al., 2003).

Amostras biológicas são compostas de várias outras substâncias e não apenas de DNA. Para se realizar uma análise genética, deve-se extrair apenas o DNA da amostra, descartando todo o resto (proteínas e demais componentes celulares). A presença de proteínas, entre outras substâncias, pode impedir que o DNA seja analisado (BUTLER, 2005).

2.7.1 EXTRAÇÃO ORGÂNICA

A extração orgânica, ou extração por fenol/clorofórmio é o método mais antigo de extração de DNA. Este método de extração é considerado o mais eficiente para extração de DNA de alto peso molecular. Para a realização deste método, várias substâncias são adicionadas a uma solução tampão e a amostra é incubada a 56 °C por várias horas. Algumas dessas substâncias são: o detergente SDS e a enzima proteinase K, que irão romper as membranas celular e nuclear, liberando todo o conteúdo celular no meio aquoso, bem como quebrar/digerir as proteínas (BUTLER, 2005).

Após a etapa anterior de digestão, é adicionada uma solução contendo fenol e clorofórmio às amostras, que, por diferenças químicas, não se misturam à solução tampão, formando duas fases: a fase aquosa (contendo o DNA) e a fase orgânica (contendo fenol, clorofórmio e demais impurezas orgânicas). Alguns protocolos envolvem a passagem da fase aquosa por uma membrana para filtrar/purificar o DNA, enquanto outros envolvem a precipitação do DNA contido na fase aquosa através da adição de álcool (BUTLER, 2005).

2.7.2 EXTRAÇÃO COM RESINA CHELEX

Chelex 100 é uma resina quelante que possui alta afinidade por íons metálicos polivalentes. A resina Chelex é composta de copolímeros de estireno divinilbenzeno contendo íons iminodiacetato pareados, que agem como grupos quelantes (WALSH et al., 1991).

A presença da resina Chelex durante a fervura previne a degradação do DNA ao quelar íons metálicos que podem agir como catalisadores na degradação do DNA em altas temperaturas em soluções de baixa força iônica (SINGER-SAM et al., 1989 In WALSH et al., 1991).

Os protocolos adaptados para amostras forenses envolvem a fervura de suspensões de células em uma suspensão de Chelex a 5%, seguido de amplificação de uma fração do sobrenadante por PCR. O pH alcalino das suspensões de Chelex (pH 10-11) e a exposição a temperaturas de 100 °C resultam em lise das membranas celulares e desnaturação do DNA. O método de Chelex não é compatível com análise por RFLP (WALSH et al., 1991).

2.7.3 EXTRAÇÃO DO DNA NOS TECIDOS MINERALIZADOS

A taxa de degradação de remanescentes humanos varia bastante com os diferentes insultos ambientais (clima, estação, microambiente bacteriano e animais). Após um período relativamente curto, tecidos moles podem ser perdidos devido a ação de bactérias e atividade animal, enquanto tecidos ósseos são muito mais estáveis. O DNA contido nos ossos é mais estável que o DNA nos tecidos moles, e é encontrado nos osteócitos, que secretaram osso ao redor de si mesmos se tornando mais ou menos isolados (HOCHMEISTER et al., 1991).

Todos os tecidos calcificados de organismos vertebrados contêm proteínas na matriz extracelular, geralmente uma rede de suporte constituída de colágeno, que organizam íons de cálcio e íons fosfato em uma fase mineral estruturada. A similaridade dos tecidos calcificados baseados em colágeno é consistente com o papel geral destes compostos biológicos de fornecer suporte estrutural rígido e proteção para os tecidos moles (NANCI, 1999).

O isolamento de DNA a partir de ossos humanos frescos e, especialmente, exumados, geralmente requer condições individualizadas durante o processo de

isolamento. Os mesmos fatores que favorecem a proteção do DNA por centenas de anos, tornam a obtenção deste DNA um procedimento complexo e complicado. Em primeiro lugar, o osso é um tecido conjuntivo duro com alto conteúdo de cálcio. Segundo, após a morte, durante a degradação das proteínas e da mineralização, o DNA se liga à hidroxiapatita e forma um composto conhecido como bioapatita. Por esses motivos, a descalcificação é geralmente aceita como uma etapa necessária para a efetiva extração do DNA, sendo o EDTA o agente descalcificante mais amplamente utilizado (ZOLEDZIEWSKA et al., 2002).

Uma vez que os osteócitos estão no interior de uma matriz calcificada, o acesso ao DNA dos osteócitos durante o processo de extração pode ser difícil. Para aumentar a obtenção de DNA, busca-se remover íons de cálcio durante o processo de extração (HOCHMEISTER et al., 1991).

Com a desmineralização das amostras de ossos e dentes, a matriz composta de hidroxiapatita é dissolvida, permitindo que as células sejam digeridas. Após a digestão, o DNA pode ser extraído usando-se da técnica de extração orgânica (ROMEIKA & YAN, 2013).

A maioria dos protocolos para extração de DNA para ossos e dentes são baseados na incubação da amostra pulverizada em tampão de extração contendo EDTA. O EDTA tanto desmineraliza o osso (dependendo da sua concentração no tampão e o volume de tampão utilizado) quanto inativa DNAsas ao quelar cátions bivalentes como magnésio e cálcio (LOREILLE et al., 2007).

Ossos exumados contêm apenas quantidades mínimas de DNA geralmente bastante degradado, sendo que alguns agentes descalcificantes podem favorecer uma degradação ainda maior do DNA (ZOLEDZIEWSKA et al., 2002).

2.7.3 A DESMINERALIZAÇÃO DA AMOSTRA COMO PRÉ-TRATAMENTO PARA A EXTRAÇÃO DO DNA

A descalcificação como pré-tratamento da amostra de osso pode ser útil para a limpeza preliminar da superfície da amostra (ZOLEDZIEWSKA et al., 2002). As variáveis descritas na literatura como capazes de acelerar o processo de descalcificação são: temperatura, agitação, vácuo e corrente elétrica. A escolha do agente descalcificante também influencia na velocidade de descalcificação (VERDENIUS & ALMA, 1958).

KIVIRANTA et al. (1980) relataram que a velocidade da desmineralização aumentou levemente com o aumento da temperatura, pH mais ácido ou mais alcalino e volume de solução descalcificante. A espessura das amostras de ossos e a concentração de agente descalcificante afetaram a velocidade de desmineralização de forma mais intensa. A agitação ou o volume de solução desmineralizante não afetaram a velocidade de descalcificação, exceto quando o volume era muito pequeno. Os agentes descalcificantes acídicos exerceram um efeito descalcificante mais intenso que o EDTA.

A vantagem do EDTA é provavelmente devido a seu modo de ação: funciona em pH neutro, agindo como um agente quelante tetradentado. Um mol de EDTA se liga a um mol de cálcio, formando um complexo considerado estável. O alvo do EDTA são os cristais de hidroxiapatita. Ácidos minerais e orgânicos, fracos e fortes, bem como tampões acídicos, são agentes descalcificantes eficientes. Quanto mais forte o ácido, maior seu poder desmineralizante. Agentes quelantes, como o EDTA, removem o cálcio do osso de maneira mais lenta. Por outro lado, desmineralizantes acídicos causam distorção das fibras de colágeno e problemas com colorações histológicas. Por não apresentar essas desvantagens, e por preservar a integridade estrutural do tecido, o EDTA se tornou amplamente utilizado, principalmente com propósito de pesquisa (KIVIRANTA et al., 1980).

Um composto comum usado para descalcificação, o EDTA não degrada os tecidos e possibilita a obtenção de excelentes micrografias eletrônicas de transmissão mesmo após longos períodos de imersão. Soluções ácidas fortes, como ácido nítrico, diminuem o tempo de descalcificação mas causam danos aos tecidos que podem ser observados até mesmo por microscopia óptica (MADDEN & HENSON, 1997).

É necessário amolecer o tecido ósseo através da remoção dos minerais. Isso é alcançado pelo tratamento com substâncias que reagem com cálcio: ácidos para formar sais de cálcio solúveis ou agentes quelantes para sequestrar íons de cálcio (ALERS et al., 1999).

Usar agentes quelantes para descalcificação, como EDTA, pode driblar os problemas encontrados na desmineralização com ácidos fortes. A descalcificação com EDTA tem pouco ou nenhum efeito sobre os tecidos, atuando apenas nos minerais. Após a descalcificação com EDTA, as amostras podem ser submetidas a análise por PCR, uma vez que este processo preserva tanto o DNA quanto o mRNA

e sítios antigênicos. Tratamento prolongado com ácidos fortes aparentemente causa hidrólise do DNA, o que não ocorre com o uso de EDTA porque este último processo ocorre a pH próximo de neutro. A utilização de EDTA como agente descalcificante de forma rotineira tem a desvantagem de necessitar de um longo tempo de incubação. No entanto, diferentes métodos de utilização do EDTA (com forno microondas entre outros) podem reduzir de forma considerável o tempo de descalcificação (ALERS et al., 1999).

SHIBATA et al. (2000) recomendam o uso de solução de Morse (10% citrato de sódio e 22,5% ácido fórmico) como solução descalcificante de rotina por causa de seu mínimo tempo de incubação e boa preservação de morfologia do tecido e integridade de RNA. Soluções baseadas em EDTA necessitam de um longo período de tempo para a completa descalcificação. Deve-se otimizar as condições de descalcificação por causa de seu efeito degradante.

A descalcificação de rotina utilizando ácido fórmico a 5% pode preservar o DNA de forma satisfatória para alguns tipos de estudos moleculares como FISH e CGH. No entanto, a descalcificação com EDTA parece ter melhores chances na recuperação de DNA a partir de amostras de ossos (BROWN et al., 2002).

SINGH et al. (2013) diz que são limitados os estudos que tentaram avaliar sistematicamente o efeito de agentes descalcificantes na integridade de ácidos nucleicos. O estudo avaliou o efeito de vários agentes descalcificantes na quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos recuperados de biópsias de osso. Agentes descalcificantes contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e ácido fórmico, sozinhos ou em combinação, apresentaram maior preservação de DNA e RNA (ácido ribonucleico) em quantidade e integridade. Os pesquisadores estimam que estes agentes descalcificantes preservem por volta de 64 vezes mais DNA e RNA do que os agentes descalcificantes mais fortes.

2.8 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Antes do estabelecimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a análise genética envolvia clonagem do DNA, sendo que as dificuldades técnicas de se clonar o DNA a partir de restos de organismos antigos foram superadas após o desenvolvimento da PCR (SAIKI et al., 1985 In HAGELBERG &

CLEGG, 1991). A tecnologia atual envolve a amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com o intuito de geração de um perfil genético (IP et al., 2014). A PCR é um método através do qual se amplifica pequenas quantidades de sequências-alvo relativamente pequenas de DNA usando oligonucleotídeos (primers) de sequência específica e DNA polimerase termoestável (Taq polimerase). A PCR não requer DNA de alto peso molecular para que ocorra a amplificação, sendo que apenas a sequência-alvo precisa estar intacta. Dessa forma, a PCR consegue amplificar DNA parcialmente degradado e/ou desnaturado. A PCR tem grande potencial para beneficiar a análise de amostras de casos forenses em que a quantidade e peso molecular do DNA pode ser menor do que o preconizado para análise através de outros métodos (WALSH et al., 1991).

Para que a PCR produza resultados confiáveis, o segmento de DNA de interesse tem que estar bem preservado (SALAMON et al., 2005). Uma única cópia intacta de uma sequência alvo do DNA é o suficiente para a reação de PCR, fazendo desta técnica uma ferramenta ideal para as ciências forenses e para os estudos com DNA antigo, uma vez que ela pode ser utilizada em amostras biológicas contendo DNA degradado ou em muito pouca quantidade (HAGELBERG & CLEGG, 1991).

A identificação genética geralmente analisa variações em regiões altamente polimórficas do DNA nuclear (GINTHER et al., 1992). O alvo da PCR são regiões do DNA chamadas *short tandem repeats* (STRs), com tamanhos de 100 a 480 pares de bases. Essas regiões estão bem distribuídas por todo o genoma humano, são altamente polimórficas e capazes de gerar um perfil genético mesmo partindo de quantidades muito pequenas de material biológico (IP et al., 2014).

A polpa do dente é um tecido altamente útil na análise genética com propósito de identificação. Polimorfismos genéticos amplificados por PCR podem ser analisados a partir da polpa de dentes sujeitos a condições ambientais adversas. O tamanho do fragmento amplificado é crucial. Portanto, marcadores STR possuem vantagens sobre outros marcadores como AMP-FLPs e SLPs (GARCIA et al., 1996).

2.9 DESAFIOS NA ANÁLISE DE DNA FORENSE

Ossos e dentes são normalmente a evidência física de presença humana ou animal que duram por mais tempo em sítios arqueológicos, e também são as fontes de amostras mais amplamente usadas para estudos com DNA antigo (aDNA) (GILBERT et al., 2005). A análise genética de remanescentes humanos esqueletizados nem sempre é bem sucedida e geralmente apenas os casos em que se obtém sucesso são relatados (PFEIFFER et al., 1999).

Alguns fatores reduzem o poder dos testes de DNA. Em cadáveres, o DNA se degrada muito rapidamente, até mesmo em pouco tempo após a morte. A degradação de tecidos moles é particularmente evidente após pequenos intervalos de tempo, uma consequência do rápido crescimento de bactérias, natural em cadáveres em decomposição, especialmente naqueles expostos a temperaturas altas em países tropicais como o Brasil (IWAMURA et al., 2004).

DNA de alto peso molecular, aquele que pode ser analisado, está presente em pouca quantidade nas amostras pós-morte, devido à degradação do material genético. Fatores exógenos como microrganismos, humidade e muitos compostos orgânicos aos quais os corpos foram expostos também reduzem a quantidade de DNA informativo disponível (IWAMURA et al., 2004).

Os remanescentes humanos podem ser encontrados imediatamente ou muitos anos depois da morte, sendo que a quantidade de restos humanos encontrados varia de corpos inteiros a apenas alguns fragmentos. Dessa forma, alguns casos podem ser extremamente difíceis de serem resolvidos (APPS et al., p. 9).

No mesmo sentido, as amostras biológicas em casos forenses se encontram em estado de decomposição, o que traz uma série de impedimentos às tentativas de análises dos cientistas forenses. A análise de amostras comprometidas, como aquelas expostas a condições ambientais severas, remanescentes esqueletizados de pessoas desaparecidas ou remanescentes humanos oriundos de desastres em massa podem resultar em perfis genéticos parciais ou ausência de perfil genético (IP et al., 2014).

Os diferentes contextos ambientais a que remanescentes humanos são submetidos varia bastante e a qualidade e quantidade de DNA obtida a partir de cada amostra reflete as diferentes exposições a fatores externos como: temperatura,

radiação ultravioleta, humidade, exposição a animais, insetos e microorganismos, diferentes tipos de solo, imersão completa ou parcial em água, contato com fogo entre outros (MILOS, et al., 2007).

DNA nuclear pode se degradar rapidamente, deixando apenas poucos números de cópias de DNA molde degenerado para amplificação de microssatélites. Além disso, a degradação pode reduzir significativamente o número de amostras apropriadas para análise genética (WANDELER et al., 2003).

Análise genética de ossos pode ser considerada imprevisível mesmo com a otimização dos métodos (VON WURMB-SCHWARK et al., 2003).

O DNA moderno contaminante compete com o DNA endógeno, da amostra, na reação de PCR podendo gerar resultados falso positivos e/ou aberrantes (KEMP & SMITH, 2005).

Devido aos baixos níveis de DNA endógeno, dano ao DNA por ações ambientais, bacterianas e pós-morte, bem como a presença em potencial de inibidores presentes no ambiente que são extraídos junto com o DNA, a recuperação de informações a partir do DNA de espécimes degradados ainda pode representar um grande desafio (LOREILLE et al., 2007).

2.10 PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA À PARTIR DE DENTES

Em 1990 foi publicado o primeiro artigo descrevendo um protocolo para a extração de DNA a partir de dentes e ossos antigos (150 a 5500 anos). Até então, só se realizava extração de DNA de tecido mole mumificado. O protocolo descrito envolvia a pulverização da amostra usando nitrogênio líquido, extração orgânica e concentração em membrana Microcon[®] (HANNI et al., 1990).

Desde então, os protocolos forenses de extração de DNA a partir de tecidos mineralizados envolvem, basicamente, a pulverização da amostra com a subsequente digestão do pó obtido, não havendo protocolo específico para dentes. No que diz respeito ao processamento de dentes, todo o espécime é pulverizado, tornando este tipo de amostra muito mais prático do que ossos (HERVELLA et al., 2015).

Em 1994, WOODWARD et al. publicaram protocolo de extração de DNA antigo a partir de tecido mole e dente usando resina Chelex[®].

SIVAGAMI et al. (2000) descreveram uma técnica para extração de DNA de dentes que envolve ultrassonicação do pó de dentes previamente seccionados longitudinalmente e pulpectomizados e diz que até o momento os métodos para se recuperar DNA do tecido mineralizado dos dentes não eram eficientes ou de bom custo-benefício.

ALONSO et al. (2001) realizaram extração de DNA de dentes e ossos de 8 a 50 anos de idade. As amostras de dentes foram trituradas em freezer mill ou marteladas entre placas de aço para o processo de pulverização. Foi feita extração orgânica e concentração em membrana Microcon®.

HERNANDEZ et al. (2003) confirmam que a extração de DNA de dentes usando placas de aço é barata e eficiente.

Em um artigo de revisão da literatura, HIGGINS & AUSTIN (2013) disseram ser necessário o estabelecimento de protocolos específicos para cada tecido dentário, ou para o(s) tecido(s) mais ricos em DNA, ao invés de espelhar os protocolos específicos para tecido ósseo.

No mesmo ano foi publicado um protocolo específico para ser utilizado em amostras de dentes, (HIGGINS et al., 2013) sendo que os autores afirmaram que até o momento nenhum estudo havia explorado em nenhuma profundidade a amostragem seletiva de tecidos dentários mineralizados com o intuito de extração de DNA nuclear. A extração de DNA realizada neste estudo consistiu em raspagem do cimento radicular com o uso de lâminas de bisturi descartáveis obtendo-se um pó.

Por fim, HERVELLA et al. (2015) avaliaram, recentemente, métodos não destrutivos para recuperação de DNA de dentes (perfuração oclusal, perfuração cervical e corte cervical) com o intuito de acessar a cavidade pulpar, ao invés do mais utilizado método de pulverização. Os autores constataram que através de um corte cervical pôde-se obter maior quantidade de DNA. O problema com este método é que eles requerem instrumentos e prática específicos.



3 METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), CAAE nº 40749414.4.0000.5165, através do Parecer nº 955.335.

Todas as etapas da pesquisa aconteceram no Laboratório de DNA Forense da POLITEC, em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. A POLITEC – Perícia Oficial e Identificação Técnica, é o único órgão público estadual responsável por perícias oficiais criminais.

O Laboratório de DNA Forense de Mato Grosso possui salas distintas para preparo de amostras, extração de amostras de referência, extração de amostras questionadas, pré-PCR, PCR e pós-PCR entre outras.

Foi feita uma força tarefa para a realização de 20 casos de rotina de identificação humana recebidos pelo Laboratório de DNA Forense. Os critérios de inclusão dos casos integrantes deste estudo foram: os casos a serem analisados seriam os mais antigos a contar da data de recebimento no laboratório; e os casos deveriam possuir no mínimo um dente como uma das amostras coletadas da vítima a ser identificada. Os critérios de exclusão foram casos que não possuíam amostras de possíveis familiares ou casos em que os cálculos estatísticos não foram conclusivos (inferior a 15 mil) para a identificação do indivíduo.

As amostras de dentes encontravam-se armazenadas em freezers verticais convencionais no interior de lacres de plástico fechados. Acredita-se que as amostras de dentes tenham sido coletadas por Peritos Criminais ou técnicos em necropsia sem prévio treinamento específico.

3.1 Análise genética

Todas as etapas em laboratório foram realizadas com o uso de paramentação adequada. Primeiramente, as amostras de dentes integrantes de cada caso tiveram seus recipientes (coletores universais descartáveis de 50 mL) devidamente identificados. Em alguns casos as amostras de dentes encontravam-se no interior do osso alveolar de fragmentos de mandíbula ou maxila ou crânios inteiros. Nestes casos os dentes foram extraídos pelas próprias mãos do pesquisador. Na maioria dos casos os elementos dentários encontravam-se soltos no interior de seus lacres fechados. Não houve qualquer forma de pré-tratamento das amostras. As amostras

foram individualmente colocadas no interior de seus respectivos recipientes, foi adicionado aproximadamente 20 mL de solução de EDTA 0,5 M, pH 8, o recipiente foi tampado e deixado sobre a bancada a temperatura ambiente.

A solução de EDTA era trocada diariamente e registrada a data da troca sobre a tampa. Após, aproximadamente, sete dias, foi possível realizar a excisão do centímetro final do ápice radicular. O procedimento foi feito com o auxílio de lâmina de bisturi descartável e estéril sobre placa de petri descartável. Logo após a excisão do ápice radicular, o mesmo foi fatiado e picado, com auxílio do bisturi, em fragmentos muito pequenos. Os fragmentos foram transferidos a um tubo eppendorf de 2 mL devidamente identificado. Foram adicionados 300 µL de Tampão de Extração de Manchas (Stain Extraction Buffer – SEB contendo 10 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA, 2% de SDS, pH 8) e 20 µL de Proteinase K (20mg/mL).

As amostras foram submetidas a vortex por 10 segundos e breve centrifugação (spin) por 10 segundos. As amostras foram incubadas a 56°C em banho maria *overnight* e após aproximadamente 18 horas foi adicionado mais 20 µL de Proteinase K. As amostras retornaram à incubação por mais 2 a 3 horas.

Após a digestão, mais 10 segundos de vortex seguidos por 10 segundos de spin.

A cada amostra foi adicionado 300 µL de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1, v/v) seguido de vortex por 10 segundos em velocidade máxima. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, as fases aquosas das amostras foram submetidas à concentração/purificação em membrana Microcon[®] YM-100 (Millipore Corporation), conforme recomendações do fabricante.

Foi, primeiramente, filtrada a fase aquosa a 489 g, até a secagem, (aproximadamente 25 minutos) e após, foi feita uma lavagem da membrana com 300 µL de água ultra pura também a 489 g até a secagem (aproximadamente 25 minutos). O DNA retido na membrana foi eluído por ressuspensão com auxílio de pipeta e 40 µL de água ultra pura. O DNA eluído foi transferido a um novo tubo eppendorf de 1,5 mL e armazenado em congelador convencional (-4°C) até o início da próxima etapa.

Foi realizada a amplificação de microssatélites autossômicos (STRs) através de reação de PCR utilizando-se dos kits comerciais NGM[™] ou Identifiler[®] Plus (Life

Technologies) e com auxílio de termociclador Veriti™ (Life Technologies) sob parâmetros de amplificação recomendados pelo fabricante.

Quando não foi obtido perfil autossômico completo a partir de marcadores STR convencionais, realizou-se a amplificação de miniSTRs através do kit comercial Minifiler™ (Applied Biosystems) e termociclador Veriti™ (Life Technologies) segundo recomendações do fabricante. Cada amplificação foi acompanhada de seus respectivos controles positivos e negativos.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese capilar em analisador genético ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) ou 3500 (Life Technologies) conforme recomendações do fabricante, e os perfis genéticos foram interpretados com o auxílio dos programas 3130 Genetic Analyzer Avant Data Collection Software v2.0 e *GeneMapper*® ID Software v3.2 e 3500 Genetic Analyzer Avant Data Collection Software v2.0 e *GeneMapper*® ID-X Software v3.2, respectivamente.

Para a comprovação da autenticidade do perfil obtido, para cada indivíduo não identificado, foi feita a extração de DNA de outra amostra do mesmo indivíduo, oriunda de outro tecido (músculo ou sangue coletados durante necropsia) ou de amostras provenientes de familiares.



4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos para os 20 dentes são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Quantidade de marcadores obtidos para cada amostra de dente

Nº	Quantidade de marcadores	Tipo de dente	Observação	Perfil genético
01	15 de 15	Molar		Completo
02	15 de 15	Molar	Uma das raízes apresentava-se fraturada	Completo
03	15 de 15	Pré-molar		Completo
04	15 de 15	Molar		Completo
05	15 de 15	Incisivo		Completo
06	15 de 15	Molar	O dente apresentava-se fraturado longitudinalmente	Completo
07	15 de 15	Molar		Completo
08	15 de 15	Incisivo		Completo
09	15 de 15	Pré-molar		Completo
10	15 de 15	Pré-molar		Completo
11	15 de 15	Pré-molar		Completo
12	15 de 15	Canino		Completo
13	15 de 15	Incisivo		Completo
14	9 de 15	Canino, incisivo e molar		Incompleto
15	15 de 15	Molar		Completo
16	15 de 15	Canino		Completo
17	15 de 15	Molar		Completo
18	15 de 15	Canino		Completo
19	15 de 15	Canino		Completo
20	15 de 15	Molar		Completo

A tabela acima demonstra que das 20 amostras analisadas, 19 apresentaram perfil genético completo (95%) e 1 apresentou perfil genético incompleto (5%). Em relação ao número de marcadores, obteve-se sucesso na amplificação de 98% dos marcadores (294 de 300), uma média de 14,7 marcadores de 15 analisados.

Tendo em vista a obtenção de um perfil parcial para a amostra nº 14, foi realizada a amplificação de miniSTRs, o que não foi o suficiente para a genotipagem de nenhum dos marcadores não obtidos anteriormente devido à extensa degradação da amostra.

Tabela 2 – Histórico dos casos

Nº	Quantidade de marcadores	Histórico	Perfil genético
01	15 de 15	Ossada humana encontrada sobre vegetação em zona rural, vítima de traumatismo crânio-encefálico devido a projétil de arma de fogo	Completo
02	15 de 15	Ossada encontrada em terreno baldio em zona urbana, vítima de traumatismo crânio-encefálico devido à projétil de arma de fogo, desaparecido em 26/12/2013	Completo
03	15 de 15	Cadáver em avançado estágio de putrefação encontrado às margens de rodovia	Completo
04	15 de 15	Ossada humana encontrada sobre vegetação em zona rural, vítima de traumatismo crânio-encefálico devido a projétil de arma de fogo	Completo
05	15 de 15	Ossada encontrada às margens de via pública, vítima estava desaparecida há aproximadamente 70 dias	Completo
06	15 de 15	Ossada encontrada em zona urbana	Completo
07	15 de 15	Nada consta	Completo
08	15 de 15	Nada consta	Completo
09	15 de 15	Nada consta	Completo
10	15 de 15	Nada Consta	Completo
11	15 de 15	Nada consta	Completo
12	15 de 15	Cadáver encontrado às margens de rodovia, em avançado estágio de putrefação	Completo
13	15 de 15	Nada consta	Completo
14	9 de 15	Cadáver encontrado em zona rural	Incompleto
15	15 de 15	Cadáver encontrado em avançado estágio de decomposição em zona rural, sob um pouco de terra e uma tábua	Completo
16	15 de 15	Ossada encontrada às margens de rodovia vítima de ação do fogo (carbonização)	Completo
17	15 de 15	Cadáver encontrado em avançado estágio de decomposição em terreno baldio	Completo
18	15 de 15	Corpo encontrado em avançado estágio de decomposição, tendo sido inumado por aproximadamente 5 meses e exumado para realização de exame de DNA	Completo
19	15 de 15	Vítima de acidente automobilístico com carbonização do corpo	Completo
20	15 de 15	Vítima de acidente automobilístico com carbonização do corpo	Completo



5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A otimização da extração do DNA (para obter a maior quantidade de DNA alvo na melhor qualidade possível) é uma estratégia importante para se aumentar a reprodutibilidade da análise genética de marcadores STR em amostras contendo DNA degradado (SCHMERER, 2001).

Através do presente estudo, buscou-se como alvo da extração de DNA a região do cimento dentário com maior densidade de células (ápice radicular). Além disso, segundo HIGGINS et al. (2013), o cimento não é afetado negativamente por doenças dentárias ou idade do indivíduo. No mesmo sentido, há autores que afirmam que a estabilidade dos núcleos existentes na polpa dentária não se mantém por mais de catorze dias, uma vez que se trata de tecido mole (DUFFY et al., 1991).

Como não existem estudos que avaliam a presença de células nucleadas preservadas nos diferentes tecidos dentários em amostras de dentes coletadas pós-morte, realizamos um estudo histológico piloto em 8 amostras de dentes coletados de 8 corpos humanos não identificados e em apenas uma amostra foram observados núcleos de células preservados na polpa. As demais amostras apresentaram polpa extensivamente necrosada e apenas remanescentes celulares, enquanto todas apresentaram células preservadas no cimento (dados não publicados).

Estes resultados estão de acordo com MENON et al. (2011) que afirmaram que em dentes pós-morte o cimento apresentou bom estado de conservação sem expressivas alterações histológicas, enquanto a polpa apresentou células apenas em alguns casos.

ADLER et al. (2011) acham surpreendente o fato de que pouco se sabe sobre as quantidades relativas de DNA nos diferentes tecidos e regiões do dente. Os autores dizem que o cimento tem sido amplamente ignorado como fonte de DNA mesmo contendo células mineralizadas: cementoblastos e cementócitos. Além disso, os autores acreditam que não só há variação na quantidade de DNA em diferentes tecidos dentários, mas também nas diferentes regiões dos dentes. O presente estudo mostra que é possível a utilização deste novo protocolo de forma eficiente em todos os tipos de dentes (incisivos, caninos, pré-molares, molares inferiores e superiores).

À primeira vista, pode-se pensar que o demorado processo de desmineralização de uma amostra constitui um retrocesso tecnológico nas técnicas de extração de DNA, uma vez que é possível pulverizar uma amostra de dente ou osso muito mais rapidamente. No entanto, o protocolo ora apresentado pode ser justificado pela alta taxa de eficiência. Além disso, não há estudos que tenham avaliado o potencial de degradação do DNA em amostras pós-morte de ossos ou dentes proveniente do ato de pulverização.

Alguns protocolos alternativos de extração de DNA utilizam sucessivas lavagens de solução de EDTA para desmineralizar o pó de osso obtido. Após, o pó de osso desmineralizado é utilizado na extração de DNA. LOREILLE et al. (2007), constatou que na situação acima DNA é descartado com cada troca de solução de EDTA. Na pesquisa ora apresentada, não é possível inferir que o processo de desmineralização promove o descarte do DNA que estava contido na amostra tendo em vista a ausência de estudos que avaliam a perda de DNA, da amostra para a solução, decorrente do processo de desmineralização em dentes inteiros.

Em um estudo similar a este, RAIMANN et al. (2012) analisaram 26 dentes de cadáveres em decomposição através de 4 protocolos levemente diferentes envolvendo pulverização das amostras de dente. A taxa média de sucesso de seu protocolo mais eficiente para cada uma das amostras foi a obtenção de 11,2 marcadores de 15 analisados, comparados com a média de 14,7 marcadores de 15 analisados obtidos no presente estudo.

Para confirmar a eficiência deste protocolo, é necessário a comparação sistemática com outros protocolos atualmente utilizados com amostras forenses de dentes, tendo-se em mente que autores relatam uma grande flutuação na quantidade de DNA entre dentes diferentes de um mesmo indivíduo bem como em dentes correspondentes de indivíduos distintos.

Um dos métodos de extração de DNA estudados foi o descrito por HOCHMEISTER et al. (1991) e que envolvia a pulverização dos dentes a um fino pó, lavagem de vários gramas deste pó em solução contendo EDTA por 4 dias com trocas diárias e utilização do pó descalcificado na extração do DNA. O outro método de extração de DNA utilizado neste estudo foi o pó de dente obtido diretamente através do método orgânico convencional (PFEIFFER et al., 1999).

Em seu estudo, PFEIFFER et al. (1999) concluíram que dentes, mesmo com alto grau de destruição, são uma fonte lucrativa de DNA. Concluíram também, que

fragmentos de DNA com mais de 500 pares de bases não poderiam ser amplificados com sucesso em materiais provenientes de corpos em decomposição ou esqueletizados e antigos, bem como a etapa de descalcificação do pó de dente obtido anterior à extração de DNA obteve resultados inferiores ao protocolo sem prévia descalcificação das amostras.

FISHER et al. (1993 In PFEIFFER et al., 1999) investigaram o efeito da prévia descalcificação em amostras de osso e também concluíram que a descalcificação não apenas pode ser omitida no processo de extração de DNA como a obtenção de DNA era 2 vezes maior quando o mesmo protocolo sem prévia descalcificação era realizado.

O primeiro artigo a relatar a análise genética a partir de ossos com o intuito de identificação humana baseou-se em um método de descalcificação de 15 gramas de fino pó de osso antes da extração de DNA (HOCHMEISTER et al., 1991).

No estudo feito por POTSCH et al. (1992) a quantidade total de DNA obtido a partir de um único dente variou de 6 a 50 microgramas de DNA. A maior parte era constituída de DNA degradado, e um forte borrão de ácidos nucleicos de baixo peso molecular foi observado nos eletroferogramas. A quantidade de DNA obtido não dependeu do tipo de dente, idade ou sexo do doador. Não houve influência significativa das condições de armazenamento ou períodos de tempo.

WANDELER et al. (2003) acreditam que a maior quantidade de tecido na polpa de um dente de raposa jovem, que é responsável pelo seu crescimento, determina a maior quantidade de DNA a partir dessas amostras.

WICKHAM et al. (2000) estudaram o sucesso na extração de DNA a partir de biopsias trefinas de medula óssea fixadas, descalcificadas e incluídas em parafina e puderam amplificar fragmentos de DNA com mais de 600 pares de bases. Os pesquisadores atribuíram o sucesso da técnica ao uso de EDTA como agente descalcificante e à eficiência do kit comercial de extração de DNA utilizado.

Quantidades similares de DNA foram obtidas usando os três métodos analisados no estudo de GARCIA et al. (1996): trituração do dente inteiro, acesso endodôntico convencional e secção transversal do dente.

POTSCH et al. (1992) observaram que quando os alvéolos são afrouxados e o microambiente mantém o dente úmido, a polpa sofre putrefação, mas quando o ambiente permite que a polpa se mumifique, o DNA pode ser extraído e a qualidade é suficiente para análise por PCR.

Segundo GARCIA et al. (1996), resultados melhores são esperados de corpos inumados do que em casos experimentais devido ao fato de que o forame apical não está protegido pelo ligamento periodontal e osso alveolar, facilitando a entrada de bactérias e outros agentes.

O tecido pulpar dentário se encontra bem protegido na cavidade pulpar contanto que o dente esteja firmemente fixado aos ossos alveolares. Quando os dentes foram extraídos e armazenados a temperatura ambiente, pesquisadores observaram uma rápida desidratação do tecido pulpar. Essa dessecação é considerada uma explicação para a surpreendente boa integridade do DNA recuperado na maioria dos casos, uma vez que os processos necróticos ou putrefativos são interrompidos conforme o tecido seca (POTSCH et al., 1992).



6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que o protocolo alternativo ora apresentado para análise genética de dentes baseada em uma etapa de desmineralização de todo o espécime antes da realização de extração de DNA, é capaz de extrair DNA em quantidade e qualidade suficientes para a produção de um perfil genético em casos de identificação humana forense com uma taxa de sucesso de 95% para perfis genéticos completos. Mesmo no caso de obtenção de perfil genético parcial, foi possível realizar a identificação da vítima.



7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ADLER, C. J. et al. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. **Journal of Archaeological Science**, v. 38, n. 5, p. 956-964, 2011.

ALAEDDINJ, R. et al. In NAZIR, M. S.; SMITH, Judith Alexis; GOODWIN, W. DNA degradation in post-mortem soft muscle tissues in relation to accumulated degree-days (ADD). **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 3, n. 1, p. e536-e537, 2011.

ALERS, Janneke C. et al. Effect of bone decalcification procedures on DNA in situ hybridization and comparative genomic hybridization: EDTA is highly preferable to a routinely used acid decalcifier. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 703-709, 1999.

ALONSO, A. et al. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. **Croat. Med. J.**, v. 42, n. 3, p.260-266, 2001.

APPS, J. et al. Two sides of the same coin: missing and unidentified people. In: MALLETT, X.; BLYTHE, T.; BERRY, R (eds.). **Advances in forensic human identification**. Boca Raton: CRC Press, 2015. p. 3-20.

ATA-ALI, Javier; ATA-ALI, Fadi. Forensic dentistry in human identification: A review of the literature. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 6, n. 2, p. e162, 2014.

BOY, Sonja C.; BERNITZ, Herman; VAN HEERDEN, Willie FP. Flow cytometric evaluation of postmortem pulp DNA degradation. **The American journal of forensic medicine and pathology**, v. 24, n. 2, p. 123-127, 2003.

BROWN, R. S. D. et al. Routine acid decalcification of bone marrow samples can preserve DNA for FISH and CGH studies in metastatic prostate cancer. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 1, p. 113-115, 2002.

BUTLER, John M. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**. 2 ed. Academic Press, 2005.

CAPUTO, Mariela et al. A DNA extraction method of small quantities of bone for high-quality genotyping. **Forensic Science International: Genetics**, v. 7, n. 5, p. 488-493, 2013.

CORTE-REAL, A. et al. The DNA extraction from the pulp dentine complex of both with and without carious. In: **International Congress Series**. Elsevier, 2006. p. 710-712.

_____. Genetic identification in endodontic treated tooth root. **For Sci. Int.: Gen Sup Series**, v. 1, n. 1, p.457-458, 2008.

_____. The tooth for molecular analysis and identification: a forensic approach. **The Journal of forensic odonto-stomatology**, v. 30, n. 1, p. 22-28, 2012.

DOBBERSTEIN, R.C. et al. Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. **Forensic Sci. Int.**, v. 179, p.181-191, 2008.

DUFFY, J. B.; SKINNER, M. F.; WATERFIELD, J. D. Rates of putrefaction of dental pulp in the Northwest coast environment. **Journal of forensic sciences**, v. 36, n. 5, p. 1492-1502, 1991.

EDSON, Suni M. et al. Naming the Dead-Confronting the Realities of the Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains. **Forensic Science Review**, v. 16, n. 1, p. 63-88, 2004.

FISHER, D.L. et al. In PFEIFFER, H. et al. Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. **International journal of legal medicine**, v. 112, n. 2, p. 142-144, 1999.

GARCIA, A. Alvarez et al. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. **International journal of legal medicine**, v. 109, n. 3, p. 125-129, 1996.

GAYTMENN, R; SWEET, D. Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. **J. Forensic Sci.**, v. 48, n. 3, 2003.

GILBERT, M. Thomas P. et al. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. **Journal of Archaeological Science**, v. 32, n. 5, p. 785-793, 2005.

GINTHER, Charles; ISSEL-TARVER, Laurie; KING, Mary-Claire. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. **Nature genetics**, v. 2, n. 2, p. 135-138, 1992.

GUPTA, Priya et al. Human Age Estimation from Tooth Cementum and Dentin. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 8, n. 4, p. ZC07, 2014.

GUTIÉRREZ-SALAZAR, Maria del Pilar; REYES-GASGA, Jorge. Microhardness and chemical composition of human tooth. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 367-373, 2003.

HAGELBERG, Erika; CLEGG, John B. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 244, n. 1309, p. 45-50, 1991.

HANNI, C. et al. Amplification des fragments d'ADN mitochondrial à partir de dents et d'os humains anciens. **C. R. Acad. Sci. III.**, Paris, v. 310, n. 9, p.365-370, 1990.

HERNANDEZ, A. et al. Mitochondrial DNA analysis of ancient human teeth from a XVIth century archeological excavation. In: **International Congress Series**. Elsevier, 2003, p.601-604.

HERVELLA, M. et al. Nondestructive Methods for Recovery of Biological Material from Human Teeth for DNA Extraction. **J. Forensic Sci.**, v. 60, n. 1, p.136-141, 2015.

HIGGINS, D. et al. Targeted sampling of cementum for recovery of nuclear DNA from human teeth and the impact of common decontamination measures. **Investig. Genet.**, v. 4, n. 1, p.18, 2013.

HIGGINS, D.; AUSTIN, J.J. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. **Sci. Justice**, v. 53, n. 4, p.433-441, 2013.

HOCHMEISTER, Manfred N. et al. Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. **J. Forensic Sci**, v. 36, n. 6, p. 1649-1661, 1991.

INTERPOL. **INTERPOL Disaster Victim Identification Guide**. 2014. 127 p. Disponível em: <<http://www.interpol.int/INTERPOL-expertise/Forensics/DVI-Pages/DVI-guide>> Acesso em: 08/02/2015.

IP, S.C.Y. et al. Forensic DNA typing strategy of degraded DNA on discarded cigarette ends using the AmpFISTR® Identifiler®, Identifiler® Plus and Minifiler™ PCR amplification kits. **Sci. Justice**, v. 54, n. 4, p.311-315, 2014.

IWAMURA, Edna Sadayo Miazato; SOARES-VIEIRA, José Arnaldo; MUÑOZ, Daniel Romero. Human identification and analysis of DNA in bones. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 59, n. 6, p. 383-388, 2004.

JOBIM, Luiz Fernando; COSTA, Luís Renato da Silveira; SILVA, Moacyr da. **Identificação Humana**: identificação pelo DNA; identificação médico-legal; perícias odontológicas. 2005.

KEMP, Brian M.; SMITH, David Glenn. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. **Forensic science international**, v. 154, n. 1, p. 53-61, 2005.

KIVIRANTA, I. et al. The rate of calcium extraction during EDTA decalcification from thin bone slices as assessed with atomic absorption spectrophotometry. **Histochemistry**, v. 68, n. 2, p. 119-127, 1980.

LOREILLE, Odile M. et al. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. **Forensic Science International: Genetics**, v. 1, n. 2, p. 191-195, 2007.

MADDEN, Victoria J.; HENSON, Miriam M. Rapid decalcification of temporal bones with preservation of ultrastructure. **Hearing research**, v. 111, n. 1, p. 76-84, 1997.

MALAVAR, P.C.; YUNIS, J.J. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. **Croat. Med. J.**, v. 44, n. 3, p.306-309, 2003.

MENON, Livia Maria Liberali; PRADO, Karina Fittipaldi Bombonato; SILVA, Ricardo Henrique Alves da. Avaliação histológica da dentina e do cimento após diferentes tempos de inumação: estudo in vitro. **RSBO (Online)**, v. 8, n. 2, p. 131-137, 2011.

MILOS, A. et al. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. **Croat Med J**, v. 48, p. 486-93, 2007.

MURAKAMI, Hiroki et al. Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples. **Acta Medica Okayama**, v. 54, n. 1, p. 21-32, 2000.

NAKAGAKI, H. et al. Fluoride distribution and histological structure of human cementum. **Archives of oral biology**, v. 33, n. 4, p. 257-264, 1988.

NANCI, Antonio. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. **Journal of structural biology**, v. 126, n. 3, p. 256-269, 1999.

NELSON, Kimberlyn; MELTON, Terry. Forensic Mitochondrial DNA Analysis of 116 Casework Skeletal Samples*. **Journal of forensic sciences**, v. 52, n. 3, p. 557-561, 2007.

PFEIFFER, H. et al. Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. **International journal of legal medicine**, v. 111, n. 6, p. 309-313, 1998.

_____. et al. Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. **International journal of legal medicine**, v. 112, n. 2, p. 142-144, 1999.

PHENGON, P. et al. Analysis of DNA from degraded tissue. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 1, n. 1, p. 439-441, 2008.

PÖTSCH, L. et al. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. **International journal of legal medicine**, v. 105, n. 3, p. 139-143, 1992.

PRETTY, I. A.; SWEET, D. forensic dentistry: A look at forensic dentistry–Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. **British Dental Journal**, v. 190, n. 7, p. 359-366, 2001.

RAI, B.; KAUR, J. **Evidence-based forensic odontology**. Berlin: Springer Science & Business Media, 2012. 213 p.

RAIMANN, P.E. et al. Procedures to recover DNA from pre-molar and molar teeth of decomposed cadavers with different post-mortem intervals. **Arch. Oral Biol.**, v. 57, n. 11, p.1459-1466, 2012.

ROHLAND, Nadin; HOFREITER, Michael. Ancient DNA extraction from bones and teeth. **Nature protocols**, v. 2, n. 7, p. 1756-1762, 2007.

_____. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. **Biotechniques**, v. 42, n. 3, p. 343, 2007.

ROMEIKA, Jennifer M.; YAN, Fei. Recent Advances in Forensic DNA Analysis. **Journal of Forensic Research**, 2013.

SAIKI, R.K. et al In HAGELBERG, Erika; CLEGG, John B. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 244, n. 1309, p. 45-50, 1991.

SALAMON, Michal et al. Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 13783-13788, 2005.

SAMPIETRO, M.L. et al. Tracking down human contamination in ancient human teeth. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n. 9, p.1801-1807, 2006.

SAYGIN, Nazan E.; GIANNOBILE, William V.; SOMERMAN, Martha J. Molecular and cell biology of cementum. **Periodontology 2000**, v. 24, n. 1, p. 73-98, 2000.

SCHMERER, Wera M. Optimized DNA extraction from ancient human bones improves the reproducibility of STR genotyping of highly degraded ancient DNA. **Technical Tips Online**, v. 6, n. 1, p. 41-45, 2001.

SCHOLZ, Michael; PUSCH, Carsten. An efficient isolation method for high-quality DNA from ancient bones. **Technical Tips Online**, v. 2, n. 1, p. 61-64, 1997.

SCHWARTZ, T.R. et al. In PFEIFFER, H. et al. Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. **International journal of legal medicine**, v. 111, n. 6, p. 309-313, 1998.

- SHIBATA, Yasuaki et al. Assessment of decalcifying protocols for detection of specific RNA by non-radioactive in situ hybridization in calcified tissues. **Histochemistry and cell biology**, v. 113, n. 3, p. 153-159, 2000.
- SILVA, R.H. et al. Human identification analysis using PCR from the root portion of dental elements under different conditions of temperature and exposure time. **R.S.B.O.**, v. 9, n. 1, p.67-73, 2012.
- SINGER-SAM, J. et al. In WALSH, P. Sean; METZGER, David A.; HIGUCHI, Russell. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, n. 4, p. 506-513, 1991.
- SINGH, V.M. et al. Analysis of the effect of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies. **Ann. Diagn. Pathol.**, v. 17, n. 4, p.322-326, 2013.
- SIVAGAMI, A.V. et al. A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian population. **Forensic Sci. Int.**, v. 110, n. 2, p.107-115, 2000.
- STEIN, Thomas John; CORCORAN, John F. Anatomy of the root apex and its histologic changes with age. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 69, n. 2, p. 238-242, 1990.
- SWEET, D. & DIZINNO, J.A. In PRETTY, I. A.; SWEET, D. forensic dentistry: A look at forensic dentistry—Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. **British Dental Journal**, v. 190, n. 7, p. 359-366, 2001.
- THOMPSON, R. et al. In CAPUTO, Mariela et al. A DNA extraction method of small quantities of bone for high-quality genotyping. **Forensic Science International: Genetics**, v. 7, n. 5, p. 488-493, 2013.
- VERDENIUS, H. H. W.; ALMA, L. A quantitative study of decalcification methods in histology. **Journal of clinical pathology**, v. 11, n. 3, p. 229-236, 1958.
- VON WURMB-SCHWARK, Nicole et al. Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones. **Legal Medicine**, v. 5, p. S169-S172, 2003.
- WALSH, P. Sean; METZGER, David A.; HIGUCHI, Russell. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, n. 4, p. 506-513, 1991.
- WANDELER, P. et al. Patterns of nuclear DNA degeneration over time—a case study in historic teeth samples. **Mol. Ecol.**, v. 12, n. 4, p.1087-1093, 2003.
- WICKHAM, C. L. et al. Amplification of PCR products in excess of 600 base pairs using DNA extracted from decalcified, paraffin wax embedded bone marrow trephine biopsies. **Molecular Pathology**, v. 53, n. 1, p. 19, 2000.
- WILLIAMS, D. et al. Sex determination by PCR analysis of DNA extracted from incinerated, deciduous teeth. **Sci. Justice**, v. 44, n. 2, p.89-94, 2004.
- WOODWARD, S.R. et al. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. **PCR Methods Appl.**, New York, v. 3, n. 4, p.244-247, 1994.
- ZHOU, Chong; BYARD, Roger W. Factors and processes causing accelerated

decomposition in human cadavers—an overview. **Journal of forensic and legal medicine**, v. 18, n. 1, p. 6-9, 2011.

ŻOŁĘDZIEWSKA, Magdalena; GRONKIEWICZ, Stanisław; DOBOSZ, Tadeusz. Comparison of various decalcifiers in preparation of DNA from human rib bone. 2002.