

Maria Teresa Antunes de Azevedo Xavier

DENTES TEMPORÁRIOS – UMA ABORDAGEM NA IDENTIFICAÇÃO FORENSE

Dissertação de Mestrado de Medicina Legal e Ciências Forenses

Orientação

Professor Doutor Francisco Corte-Real

A elaboração deste trabalho decorreu:

a) Serviço de Genética e Biologia Forenses – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Francisco Corte-Real, pela ajuda no planeamento e acompanhamento deste trabalho, pelo espírito crítico que me incutiu na interpretação dos resultados e pela forma distinta com que me honrou ao aceitar ser meu orientador.

À Professora Doutora Ana Teresa Corte-Real, pelo total apoio, disponibilidade e partilha de experiências, sem as quais teria sido impossível concretizar este projecto.

À Dra. M^a João Porto, por ter permitido a realização deste trabalho no laboratório do Serviço de Genética e Biologia Forenses – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses e pelo acompanhamento rigoroso que deu ao estudo.

À Professora Doutora Helena Figueiredo que, sempre incansável e disponível no exigente auxílio científico, valorizou de forma exemplar a parte histológica deste trabalho.

À Doutora Mónica Carvalho e Drs. Lisa Sampaio, Virgínia Lopes, Armando Serra, Vanessa Bogas, Ana Bento, Pedro Brito, Filipa Balsa, Patrícia Cunha, Marta São-Bento pelo modo caloroso como me receberam e tão prontamente se dispuseram a me ensinar e ajudar na estudo laboratorial.

Ao Prof. Doutor João Carlos Ramos, pela generosa partilha do seu conhecimento.

À Ana Luísa Costa, pela presença sempre constante nos momentos de maior angústia e aflição.

À Branca, Sara e M^a João, pela preciosa ajuda na correcção deste trabalho.

Por fim, ao meu Pai, pela transmissão do espírito irrequieto na procura do saber, superando as fraquezas e dificuldades com trabalho e perseverança.

Sumário

I – INTRODUÇÃO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2. CONSTITUIÇÃO, ESTRUTURA E ORIGEM DO ÓRGÃO DENTÁRIO

2.1 Composição, formação e estrutura dos dentes temporários

2.2 Dentina e polpa - complexo pulpo-dentinário

3. PROCESSO DE ESFOLIAÇÃO DA DENTIÇÃO TEMPORÁRIA

3.1. Cronologia de esfoliação dentária

4 . MARCADORES PARA IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA

4.1. Marcadores genéticos: STR

5. QUANTIFICAÇÃO

5.1. Quantificação por PCR em tempo real (qPCR)

6. ANÁLISE DE AMOSTRAS DEGRADADAS

6.1 Consequência do estudo de amostras degradadas

7. FACTORES QUE INFLUENCIAM A DEGRADAÇÃO DO ADN

7.1 Factores ambientais

7.2 Tempo

8. DENTES COMO FONTE DE ADN E SUA APLICAÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO FORENSE

9. AMOSTRAS DE REFERÊNCIA NA IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA

II – CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

1. ESTUDO EXPERIMENTAL

1.1 Introdução e objectivos

1.2 Material e métodos

1.3 Resultados

1.4 Discussão

1.5 Conclusões

III - PERSPECTIVAS FUTURAS

IV – BIBLIOGRAFIA

V – ANEXOS

VI – ÍNDICE

I – Introdução

1. Considerações gerais

A Genética Forense possibilita a identificação do indivíduo através da obtenção do seu perfil genético. Da sua área de intervenção fazem parte estudos filogenéticos, testes de parentesco, identificação genética individual, incluindo vítimas no contexto de desastres de massa (catástrofes naturais, guerras, como por exemplo) e identificação de suspeitos, vítimas ou vestígios no âmbito criminal. Esta área ganha particular importância quando as vítimas são crianças, uma vez que podem existir menos elementos individualizantes que possibilitem a identificação a partir de outros métodos – Dactiloscopia, Medicina Dentária Forense e análise morfológica.

Atendendo às características anátomo-fisiológicas dos dentes e às características físico-químicas dos tecidos que os compõem, torna-se possível a preservação dos seus elementos celulares no tempo e de factores ambientais, podendo constituir uma excelente fonte de ADN (ácido desoxirribonucleico). Apesar da vasta bibliografia disponível sobre este assunto, não foram encontrados estudos que analisem a possibilidade de um dente temporário constituir uma fonte de ADN para obtenção de um perfil genético (à excepção da identificação do gene da amelogenina para determinação do sexo).

Dada a importância da confrontação com um perfil de referência da vítima ou do suspeito, é pertinente encontrar fontes alternativas de ADN *antemortem* no contexto forense, designadamente quando se trata de crianças. O presente trabalho inclui, para além de uma revisão bibliográfica visando esta temática, um estudo experimental para avaliação genética dos dentes temporários esfoliados, no âmbito de uma possível identificação forense.

2. Constituição, estrutura e origem do órgão dentário

A odontogênese inicia-se com a formação da banda epitelial primária, cuja margem rapidamente se subdivide em dois processos: interno e externo. O processo externo, denominado por lâmina vestibular, irá dar origem à lâmina lábio-gengival (1) e o processo interno, designado por lâmina dentária, será responsável pela formação dos germens dentários (2).

O desenvolvimento dos germens dentários decorre segundo uma sequência de etapas, denominadas por: fase de gomo ou botão (a lâmina dentária apresenta zonas de maior actividade mitótica, surgindo pela oitava semana gestação dez condensações esféricas, que serão precursoras do órgão do esmalte, e cujo ectomesênquima subjacente apresenta uma maior condensação celular); fase de capuz (durante a qual se verifica uma intensa e desigual proliferação celular, adquirindo o órgão do esmalte a forma que outorga a denominação de capuz a esta fase; paralelamente, observa-se na sua concavidade uma proliferação celular, que dará origem à papila dentária e que, por sua vez, originará a polpa, as células odontoblásticas e a dentina); fase de campânula; fase de coroa (associada à formação do tecidos duros – amelogénese e dentinogénese) e fase de raiz (3).

O órgão dentário é composto pelo dente propriamente dito (constituído por esmalte, dentina e polpa), pelos tecidos responsáveis pela sua ancoragem ao alvéolo dentário (como sendo o ligamento periodontal, cemento, osso alveolar) e pelo tecido que o protege (gengiva) (4). Todos estes tecidos que circundam e suportam são denominados colectivamente por periodonto (5).

Macroscopicamente, o dente pode ser dividido em duas porções: a coroa e a raiz. A porção coronária, representada pela parte visível na cavidade oral, encontra-se totalmente revestida por esmalte. A porção radicular encontra-se inserida no processo alveolar, sendo revestida por cemento que, por sua vez, se interliga com o osso alveolar por tecido conjuntivo rico em feixes de fibras de colagénio, denominado por ligamento periodontal. O *core* do dente é constituído por dentina e polpa. Estes dois tecidos estão intimamente relacionados formando o complexo pulpo-dentinário. O tecido pulpar é constituído fundamentalmente por tecido conjuntivo laxo contendo elementos nervosos e vasculares (6).

A mucosa oral que recobre a parte superior da crista alveolar é denominada por gengiva, que na junção da coroa com a raiz (colo do dente) acima da crista alveolar, adquire um aspecto de rebordo resistente e protector ao redor do dente.

2.1 Composição, formação e estrutura dos dentes temporários

A dentição temporária apresenta algumas diferenças em relação à dentição permanente. No que concerne às características anatómicas, de um modo geral, os dentes vulgarmente designados por “dentes de leite” têm um menor comprimento, coroas mais pequenas e arredondadas, cíngulos evidentes na face lingual (que lhes conferem um aspecto globular) e uma região cervical mais volumosa com uma linha amelo-cementária bem marcada (7). Os dentes anteriores têm uma única raiz, de forma recta; já os posteriores são multirradiculares, com raízes ligeiramente curvas e divergentes, por forma a envolver o gérmen do dente definitivo durante o seu desenvolvimento. Comparativamente com as dos dentes definitivos, as raízes são também mais curtas, têm câmaras pulpares mais amplas, canais mais largos, podendo apresentar três a cinco cornos pulpares proeminentes (2).

O desenvolvimento dos dentes temporários processa-se de um modo semelhante ao dos permanentes, mas durante um período mais curto. O ciclo dos dentes decíduos completa-se ao fim de oito anos, identificando-se três etapas distintas: período de crescimento da coroa e raiz (um ano), período de maturação da raiz (três anos e meio) e, por último, período de reabsorção radicular e esfoliação (três anos e meio).

A estrutura dentinária é semelhante em ambas as dentições, no entanto existem algumas diferenças nas propriedades físicas que merecem destaque. Em relação à dureza, a zona central coronária e radicular dos dentes permanentes é mais dura, ao contrário do resto da dentina que tem rigidez semelhante (8). Atribui-se esta diferença a uma maior mineralização, embora existam alguns estudos que referem um grau de mineralização semelhante (2).

Julga-se que a maior permeabilidade registada na dentina e esmalte dos dentes temporários é devida à sua menor espessura; no caso particular dos primeiros

molares temporários é resultado da menor densidade de túbulos dentinários (2). A radiopacidade e a cor branco azulado dos molares decíduos devem-se à variação da componente mineral e espessura dos tecidos. Existe igualmente uma variabilidade nas propriedades micromecânicas: à medida que nos deslocamos da junção amelo-dentinária até à câmara pulpar, a dureza e o módulo de elasticidade declinam significativamente (9).

Quanto às propriedades químicas também não há grandes diferenças entre as duas dentições, embora não exista consenso na literatura no que diz respeito à concentração dos vários elementos (2). Alguns estudos referem, nos dentes temporários, uma menor concentração de cálcio e fósforo, enquanto outros não consideram significativa esta diferença. Em relação aos elementos berílio, lítio e estrôncio, existem em concentrações inferiores, ao contrário do cobalto, vanádio e cádmio, que se encontram em concentrações superiores (2).

2.2 Dentina e polpa - complexo pulpo-dentinário

No presente trabalho ir-se-á apenas descrever os tecidos dentários que constituíram a fonte de extracção de ADN dos dentes em estudo ou seja o complexo pulpo-dentinário.

Na maioria dos tratados de Histologia, a dentina e a polpa são abordadas separadamente, visto a primeira ser um tecido conjuntivo mineralizado e a última um tecido conjuntivo laxo. No entanto, estes tecidos estão intimamente relacionados, quer do ponto de vista embriológico (têm origem no ectomesênquima que forma a papila do gérmen dentário), morfológico (os prolongamentos dos odontoblastos encontram-se na dentina), fisiológico (o tecido pulpar nutre e reestrutura a dentina, por um lado, e a dentina protege a polpa, por outro) e, por isso, muito embora não seja consensual na literatura, designam-se frequentemente de complexo pulpo-dentinário (10, 11).

Com vista a uma melhor sistematização, a dentina e polpa irão ser descritas separadamente.

2.2.1. Dentina

2.2.1.1. Estrutura, composição e origem da dentina

O factor indutor do início do desenvolvimento do órgão dentário é, de facto, o epitélio oral, sendo rapidamente substituído pelo ectomesênquima, assumindo este um papel dominante na morfogénese e diferenciação subsequentes. Verifica-se a existência de uma interacção sequencial, recíproca e temporária entre estes tecidos, através de factores de crescimento, moléculas de sinalização, factores de transcrição e componentes da matriz extracelular.

O ectomesênquima subjacente ao órgão de esmalte em desenvolvimento forma a papila dentária. No estágio de capuz, as células que revestem a face côncava do órgão de esmalte e que estão em contacto com a papila começam a diferenciar-se em células altas e cilíndricas, denominadas por pré-ameloblastos. Estas células induzem, por sua vez, a diferenciação da camada mais periférica da papila dentária em pré-odontoblastos (futuras células produtoras de dentina). A interface entre os odontoblastos e os ameloblastos em formação marca a localização e forma da futura junção amelo-dentinária. À medida que decorre o processo de desenvolvimento, uma camada de matriz de dentina é depositada entre estes dois tipos de células, conduzindo à migração dos corpos celulares dos odontoblastos, deixando uma longa extensão citoplasmática – processo odontoblástico. Primeiramente, deposita-se como uma matriz orgânica constituída por colagénio (pré-dentina), cuja espessura varia entre 10-50 µm. Esta permanece sensivelmente constante durante toda a vida do indivíduo, em resultado da actividade contínua dos odontoblastos para compensar a parte da dentina que se mineraliza.

A primeira camada de dentina formada, mais próxima do esmalte (junção amelo-dentinária) e do cemento (junção amelo-cementária), é designada por dentina do manto. À medida que a matriz de dentina se vai formando, segundo um crescimento centrípeto, os odontoblastos desenvolvem um volumoso retículo endoplasmático rugoso e um complexo de Golgi proeminente. Durante a odontogénese, o prolongamento odontoblástico apresenta numerosas mitocôndrias (12) que, juntamente com terminações nervosas e fluido extracelular, constitui os túbulos dentinários (4). Assim, a dentina é constituída por túbulos dentinários, que a atravessam em toda a espessura e contêm os prolongamentos citoplasmáticos dos

odontoblastos alinhados na face interna da pré-dentina, que a produzem e depois a mantêm. Quaisquer alterações no fluxo dos fluidos presentes no interior dos túbulos dentinários, derivadas de alterações mecânicas, térmicas ou osmóticas, levam à estimulação dos odontoblastos (13).

A dentina é o segundo tecido mineralizado mais duro do organismo, mais do que o tecido ósseo e cemento e menos que o esmalte. O seu módulo de elasticidade impede a fractura do dente quando sujeito às forças de mastigação. As propriedades físicas advêm da sua composição, sendo constituída por 70% de matéria inorgânica (cristais de hidroxiapatite), 20% de matéria orgânica (colagénio, principalmente do tipo I, mas também do tipo III e IV) e água (1) .

2.2.1.2. Tipos de dentina

Conforme descrito anteriormente, a dentina é constituída por túbulos dentinários (que contêm os processos celulares e fluido intercelular) e pela dentina intertubular. A parede dos túbulos dentinários contém muito menor quantidade de colagénio e maior de cristais de hidroxiapatite, sendo designada por dentina peritubular (14).

Consoante a localização, origem, estrutura e período de formação, poder-se-á considerar a existência de dentina primária, secundária e terciária (reaccional ou reparadora).

Dentina primária

Compreende a dentina do manto (camada mais externa), que tal como referido anteriormente, é a primeira a formar-se, sendo caracterizada por conter fibras de colagénio mais espessas e pela ausência de dentina peritubular. A dentina do manto é sintetizada por odontoblastos em fase de diferenciação, sendo a mineralização da matriz levada a cabo pela formação de vesículas. Esta dentina conjuntamente com a camada mais interna de esmalte aprismático constituem a junção amelo-dentinária.

Uma vez completo o processo de maturação dos odontoblastos tem início a produção de matriz dentinária com uma forma e padrão de mineralização diferente

(glóbulos de dentina), designada por dentina circumpulpar (que envolve a câmara pulpar).

Entre o manto da dentina e a dentina circumpulpar, devido ao diferente processo de mineralização, surgem áreas interglobulares de dentina (áreas de calcificação deficiente). Estas áreas são muito evidentes, sobretudo a nível dos cortes obtidos por desgaste, formando uma fronteira entre o manto e a dentina circumpulpar.

Dentina secundária

A dentina secundária desenvolve-se após a conclusão da formação radicular e do dente entrar em contacto com o oponente, devendo-se a um processo contínuo mas lento de deposição de dentina pelos odontoblastos. Apresenta uma estrutura tubular, com a mesma relação entre o conteúdo orgânico e inorgânico, e uma distinta direcção dos túbulos dentinários. A maior deposição deste tipo de dentina surge no tecto e pavimento da câmara pulpar, resultando na alteração assimétrica do seu tamanho e forma, o que se designa por retracção pulpar.

Dentina terciária

A dentina terciária (denominada por reactiva ou reparadora, de acordo com a sua origem, formação, composição e estrutura) é produzida em resposta a um estímulo agressor, tal como atricção, lesão de cárie ou tratamento restaurador. Ao contrário da dentina primária e secundária, esta é gerada apenas pelas células afectadas pelo estímulo desencadeante, sendo a estrutura e quantidade também dependentes da resposta celular à intensidade e duração do estímulo. De um modo geral, os túbulos dentinários são mais irregulares e variáveis em número, podendo mesmo não existir.

2.2.1.3. Histologia da Dentina

Microscopicamente é possível identificar na dentina um conjunto de estruturas: túbulos dentinários, dentina peritubular, dentina intertubular, áreas interglobulares de dentina, para além das linhas de crescimento. Os processos dos

odontoblastos atravessam quase transversalmente a espessura da dentina, desde a junção amelo-dentinária até à polpa, formando estruturas com configuração em "S" e às quais se dá o nome de túbulos dentinários. Estes túbulos possuem numerosas ramificações que intercomunicam entre si, permitindo o movimento rápido do fluido dentinário e garantindo a difusão de nutrientes, julgando-se estarem relacionados com a dor e a sensibilidade dentária (14, 15). Com a idade, sofrem um processo de retracção, com subsequente obstrução dos canalículos devido essencialmente à deposição de cristais de fosfato de cálcio, não sendo certo o momento em que ocorre a total desintegração dos processos odontoblásticos (16).

Particularidades histológicas da dentição temporária

Atendendo à semelhança na morfologia e composição de ambas as dentições assumiu-se que teriam uma estrutura histológica similar, extrapolando-se os resultados obtidos nos dentes permanentes para os dentes decíduos; existem, no entanto, evidências que sugerem diferenças morfológicas e químicas entre as duas (17, 18).

Não sendo consensual na literatura, existe uma maior densidade de túbulos dentinários e de maior diâmetro na dentição decídua que, no caso dos dentes anteriores, poderá ser reflexo do aumento do número dos odontoblastos necessários ao desenvolvimento rápido destes dentes (19); apresentam abundantes ramificações dicotómicas próximas da junção amelo-dentinária, aumentando em número e diâmetro da junção amelo-dentinária até à polpa e logo diminuindo a espessura da dentina peritubular. Está também descrita a existência de canalículos dentinários gigantes, que se julga resultarem de um processo de necrose odontoblástica ou da alteração do processo da dentinogénese (19). São túbulos muito desenvolvidos que contêm no seu interior fibras de colagénio tipo I e III (alguns autores sugerem que as fibras de colagénio provêm das fibras de Von Korff), mas não contêm os processos odontoblásticos (2). Existe uma variação no trajecto destes canalículos podendo apresentar, além do trajecto sigmóide presente nos dentes definitivos, um modo recto, que se pensa provir da menor espessura de dentina entre a junção amelo-dentinária e a polpa.

Outro dado histológico que caracteriza os dentes temporários é a escassa, ou praticamente nula, presença de espaços interglobulares Czermak. Estes localizam-se predominantemente na dentina do manto, que se mineraliza por um mecanismo linear, ao contrário da dentina circumpulpar. É também possível observar nestes dentes espaços granulares na dentina superficial, na porção cervical (2).

2.2.2. Polpa

2.2.2.1. Estrutura, composição e origem

A polpa é um tecido conjuntivo laxo constituído por células, fibras, substância fundamental amorfa, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (20, 21).

As fibras de colagénio são inicialmente pouco abundantes na polpa de dentes jovens, ao contrário do conteúdo celular (nomeadamente células indiferenciadas). Esta proporção inverte-se progressivamente com a idade, diminuindo o potencial de reparação face a agressões (22).

A polpa ou tecido pulpar ocupa a parte central do dente, denominada por cavidade pulpar, que se divide em duas partes: uma parte coronária – câmara pulpar e uma parte radicular – canal radicular.

A câmara pulpar segue a forma anatómica da coroa do dente, com projecções denominadas por cornos pulpares por debaixo das cúspides, particularmente proeminentes na cúspide vestibular do pré-molar e na cúspide mesio-vestibular do molar. O canal radicular termina no *foramen* apical, que é atravessado por vasos e nervos e permite o contacto entre a polpa e o ligamento periodontal.

Inicialmente a papila dentária, da qual deriva a polpa, representa a quase totalidade do complexo pulpo-dentinário; porém, à medida que decorre a secreção e deposição rápida de dentina primária na coroa e raiz, observa-se uma diminuição do seu volume, ficando reduzida às dimensões características da fase eruptiva do dente.

2.2.2.2. Histologia da polpa

Histologicamente é possível distinguir quatro zonas bem delimitadas: zona odontoblástica (na periferia), zona acelular de Weil, zona rica em células e zona central (rica em vasos e nervos).

Na polpa, as células mais frequentemente observadas são os odontoblastos, os fibroblastos, as células ectomesenquimatosas indiferenciadas e os macrófagos ou outras células de defesa. De todas estas células, as mais facilmente identificáveis, por formarem uma camada contínua semelhante a uma camada epitelial, são os odontoblastos. Os seus núcleos celulares localizam-se na porção basal e os processos odontoblásticos percorrem quase toda a espessura da dentina (11, 22). O número de túbulos corresponde ao número de odontoblastos, que varia com o tipo de dente e localização no espaço pulpar (estima-se serem entre 59000 a 76000/mm³ na porção coronária e em menor número na porção radicular). A morfologia dos odontoblastos reflecte a sua actividade funcional, variando entre uma fase de síntese e uma fase quiescente. Numa fase activa é possível observar a presença de organelos celulares proeminentes (complexo de Golgi, retículo endoplasmático), um núcleo com vários nucléolos e cromatina dispersa. Trata-se de uma célula terminal, não sofrendo qualquer divisão celular ou diferenciação, que mantém a capacidade de formação de dentina ao longo do tempo de vida do dente.

Os fibroblastos são células características de qualquer tecido conjuntivo, existindo em maior número na zona rica em células e na porção coronária, tendo como função a formação e manutenção da polpa; apresentam um elevado número de organelos associados à síntese e secreção de proteínas. Com a idade, estas células adquirem uma forma fusiforme e um núcleo bastante condensado. Importa referir que estas células podem sofrer um processo de apoptose, especialmente na zona rica em células, que poderá ser indicador de algum tipo de *turnover* (1).

De forma similar é possível observar macrófagos na parte central da polpa, que quando observados ao microscópio óptico apresentam uma forma oval ou fusiforme, um núcleo escuro e áreas claras citoplasmáticas, que a microscopia electrónica identifica como sendo lisossomas responsáveis pela sua lise.

Os leucócitos polimorfonucleares podem, ocasionalmente, ser encontrados na polpa (4). É possível observar linfócitos T, mas são raros os linfócitos B. Os mastócitos apenas se encontram quando existe um processo inflamatório associado.

As células estaminais parecem representar somente 1-4% da população total e constituem um reservatório celular indiferenciado. São capazes de levar a

cabo um processo de auto-renovação, proliferação e diferenciação em várias linhagens celulares, como resposta a estímulos específicos. Encontram-se na zona celular e central da polpa e ao microscópio óptico têm um aspecto poliédrico, com um núcleo central e citoplasma de grandes dimensões. Tal como outros tipos celulares, este grupo diminui em número com a idade, o que se relaciona com a perda do potencial regenerativo da polpa. Nichos de células estaminais pós-natais foram identificados na polpa de dentes adultos, na polpa de dentes temporários esfoliados, no ligamento periodontal, na papila apical e no folículo dentário (23).

Particularidades histológicas das dentição temporária

Em geral, a histologia da polpa dos dentes temporários não difere consideravelmente da dos dentes definitivos jovens – ambos mantêm a mesma estrutura pulpar, pelo menos até fases avançadas de reabsorção (24). As diferenças encontradas resultam do facto da polpa destes dentes ter um tempo de vida mais curto e, por isso, as estruturas histológicas aí presentes não alcançam o mesmo grau de desenvolvimento que as dos dentes definitivos. Existem algumas particularidades que merecem destaque, nomeadamente: a camada celular odontoblástica é pseudo-estratificada, com cinco a sete camadas na parte coronária e uma a duas na parte radicular; a morfologia destas células é cubóide, podendo ter na coroa uma forma cilíndrica ou colunar, exceptuando zonas de atricção ou de dentina reparadora; a zona acelular de Weil é muito pouco evidente e a zona rica em células só se encontra na polpa coronária e não constitui uma camada única, conforme sucede nos dentes permanentes; a parte central da polpa é constituída por tecido conjuntivo laxo rico em vasos, nervos e células.

Verifica-se ainda, a partir de dentes temporários esfoliados, que as células tronco diferenciadas têm a capacidade para se converter num maior número de populações celulares, comparativamente à maioria das células estaminais (7).

No que respeita à vascularização observa-se a presença de anastomoses arterio-venosas na polpa radicular. Quanto à inervação, para além de haver maior número de terminações nervosas na coroa, regista-se maior densidade da rede nervosa na região cervical, sem comparação com a dentição definitiva (25)

3. Processo de esfoliação da dentição temporária

Os dentes temporários sofrem um processo de esfoliação decorrente da reabsorção fisiológica para permitir a erupção dos dentes permanentes. As células envolvidas neste processo são os fibroblastos, que começam por actuar como fibroclastos, os quais eliminam progressivamente a matriz extracelular do tecido pulpar, as fibras (fibrinólise) do ligamento periodontal, e os odontoclastos (2).

No início da reabsorção radicular dos dentes temporários não são visíveis alterações pulpares ou presença de odontoclastos. Os odontoblastos permanecem alinhados junto à pré-dentina, pelo menos até esta estar próxima do término e nunca antes de atingir 1 mm da junção amelo-cementária. De seguida, os odontoblastos iniciam a sua degenerescência e, em simultâneo, as células mononucleares (monócitos) emergem dos vasos pulpares e do ligamento periodontal, migrando para a superfície da pré-dentina, onde se fundem e dão origem aos odontoclastos, que só se tornam maduros quando se ligam à superfície em reabsorção. Os odontoclastos, tal como os osteoclastos, são células gigantes (podendo atingir um diâmetro até 100 µm), polinucleadas (com 30 ou mais núcleos de diferentes formas e tamanhos), com citoplasma vacuolado, que ocupam as lacunas de reabsorção nos tecidos duros e cuja face em contacto com a superfície em reabsorção adquire um aspecto de bordo espesso e rugoso. Em microscopia electrónica é possível observar este bordo, como uma extensa prega da membrana celular contendo uma série de invaginações de 2-3 µm de profundidade – microvilosidades. Adjacente a este bordo encontra-se uma zona clara do citoplasma, que apresenta total ausência de organelos, mas rica em filamentos constituídos por proteínas contrácteis de miosina e actina e que representa o aparelho de suporte à ligação dos odontoclastos. Estas células apresentam uma rede mitocondrial rica, bem como um avultado número de vacúolos (onde está presente a fosfatase ácida) concentrados no seu bordo espesso.

Os odontoclastos localizam-se na superfície radicular próxima do gérmen do dente definitivo, podendo também ser identificados no canal radicular e câmara pulpar adjacentes à pré-dentina (a variação da localização resulta do diferente padrão de reabsorção da dentição temporária) (26).

O processo de reabsorção ocorre com a ligação forte dos odontoclastos, através de *GAP junctions*, à superfície dos tecidos duros, perifericamente à zona clara. A criação de um compartimento estanque e independente (zona de vedação - *Sealing Zone-SZ*) isola o local de reabsorção, cujo bordo funciona como uma bomba de protões, garantindo no espaço extracelular a acidez necessária à dissolução mineral. Segue-se a libertação de lisossomas responsáveis pela digestão da matriz orgânica e de enzimas hidrolíticas nas lacunas de reabsorção, possibilitando a endocitose (27).

A reabsorção radicular dos dentes temporários é um processo fisiológico, que parece ser iniciado e regulado pelo retículo estrelado e pelo folículo dentário, através da libertação de citoquinas e factores de transcrição. O processo decorre de forma similar à reabsorção óssea, através da activação do sistema RANK-RANKL (o receptor de activação do factor nuclear kappa B – RANK – é uma proteína transmembranar presente na superfície dos odontoclastos e o ligando para o receptor – RANKL – é uma proteína transmembranar de 317 aminoácidos que pertence à superfamília TNF, *tumor necrosis factor*) (28, 29). As células que expressam o RANKL são as células do folículo, as células do estroma, os cementoblastos e os odontoblastos (embora estejam, praticamente, ausentes) (28, 30).

Kronfeld R sugeriu ser o folículo dentário o responsável pela reabsorção radicular da dentição temporária (31). Apesar de não se ter provado, acreditava-se e ainda se assume que, a pressão exercida pela erupção do dente permanente contribui para a diferenciação e activação dos odontoclastos. No entanto, estudos realizados por Marks SC e Cahill DR demonstraram ser o folículo dentário o responsável, mais do que o dente propriamente dito, pelo controlo do processo de erupção (32).

Assim, o processo de erupção, que envolve a reabsorção óssea e radicular dos dentes temporários, parece ser geneticamente programado e não dependente do movimento eruptivo do dente definitivo.

A determinado momento do processo eruptivo, as células do retículo estrelado segregam a proteína relacionada com hormona paratiroideia (33, 34) e a interleucina 1 α (35) que, por sua vez, se ligam a receptores vizinhos (função parácrina) expressos nas células do folículo. Por outro lado, as células do folículo estimuladas vão libertar factores recrutadores de monócitos, tais como factor

estimulador de colónias-1, proteína quimiotáctica-1 ou factor de crescimento endotelial vascular (35, 36).

Os monócitos migram da rede vascular adjacente para a região coronal do folículo. Num ambiente favorável, e em contacto com o RANKL, os monócitos fundem-se e diferenciam-se em osteoclastos/odontoclastos.

Os odontoclastos localizam-se, inicialmente, na superfície radicular externa reabsorvendo o cimento e a dentina radicular. Não se observa a presença de odontoclastos na polpa até estar praticamente concluída a reabsorção radicular, não se verificando qualquer alteração pulpar. De seguida, células inflamatórias crónicas, como linfócitos T e B, infiltram a polpa coronária e os odontoblastos começam a degenerar. Em paralelo verifica-se uma infiltração bacteriana pela junção gengivo-dentária responsável pela acumulação de células inflamatórias na polpa. No ambiente de reabsorção e sob a influência de diversas citocinas produzidas localmente, os linfócitos T começam a expressar o RANKL que interage com o RANK dos monócitos, induzindo a diferenciação e a activação dos pré-odontoclastos. Alternativamente, os fibroblastos e os odontoblastos pulpares também expressam, pontualmente, RANKL. A ligação entre o RANKL-RANK constitui um dos principais motores de arranque no processo da odontoclastogénese, imprescindível para a activação dos odontoclastos maduros (37).

Os odontoclastos começam por reabsorver algumas áreas da dentina coronária, enquanto nas restantes áreas permanecem odontoblastos. Durante a reabsorção da pré-dentina, observa-se um aumento do número de odontoclastos. Em fases tardias, os odontoclastos deixam de ser observados nas superfícies dentinárias reabsorvidas, porém estão presentes na polpa. No momento que precede a esfoliação, a superfície dentinária fica coberta por um tecido semelhante ao cimento. Em fases ainda mais avançadas, os odontoclastos podem mesmo reabsorver o esmalte (14).

A reabsorção tem início, numa primeira fase, no pavimento da câmara, mas logo se dispersa para as paredes e cornos pulpares (38, 39), até que os odontoclastos cessam a sua actividade, perdem a superfície rugosa, libertam-se da superfície de reabsorção (40) e o dente esfolia com alguns restos pulpares. Na ausência de reacção inflamatória julga-se que o principal mecanismo de degradação dos tecidos moles – polpa e ligamento periodontal – é a apoptose celular (26, 40).

A coroa de um dente esfoliado contém restos de polpa normal, que inclui tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e odontoblastos (7). No entanto, existem algumas diferenças entre um dente esfoliado anterior e posterior: um dente anterior, habitualmente, esfolia antes da total reabsorção radicular e, por isso, a camada odontoblástica permanece quase intacta; já num dente posterior, as raízes são total e a coroa parcialmente reabsorvidas, sendo a camada dos odontoblastos totalmente substituída por odontoclastos que reabsorvem a dentina primária e secundária. Este facto torna possível observar, através da translucidez do esmalte, o tecido conjuntivo vascular, dada a pequena espessura de dentina remanescente (40) (figs. 1 e 2).



Fig. 1 – Imagem da face externa da coroa de um dente temporário posterior esfoliado



Fig. 2 – Imagem da face interna da coroa de um dente temporário posterior

A reabsorção fisiológica dos dentes temporários não é um processo contínuo. Períodos activos sucedem a períodos intermitentes ou, até mesmo, a períodos de reparação. A reparação faz-se por células idênticas aos cementoblastos que formam uma matriz de colagénio com focos de mineralização, semelhante ao cimento celular, mas menos mineralizada (26, 40).

No que respeita à alteração de outras estruturas pulpares relacionadas com a reabsorção, nomeadamente vasos e nervos, o conhecimento é mais rudimentar. Rapp R *et al.* analisaram a inervação pulpar de 75 dentes temporários em diferentes etapas da reabsorção e registaram que, até ser atingida uma fase avançada, o mesmo padrão de inervação era mantido e só nessa altura se registava a fragmentação e diminuição da espessura neuronal, com consequente diminuição da densidade da rede de inervação, nomeadamente do plexo subodontoblástico (com menor número de fibras a atravessar a camada celular) (41).

Já no que concerne ao padrão de vascularização, não existe tanto consenso na comunidade científica. Sari *et al.* examinaram 14 caninos decíduos em diferentes fases de reabsorção radicular e relataram a presença de vascularização pulpar em todos os exemplares. Mais recentemente, Bolan M e Rocha MJ estudaram 19 dentes temporários, também em fase de reabsorção fisiológica, e registaram hiperémia e vasodilatação em alguns dos elementos da amostragem, que atribuíram ao provável aumento da difusão de nutrientes e eliminação de metabolitos, resultantes do acréscimo do metabolismo odontoblástico nas fases activas da reabsorção (24). Em aposição, Sari *et al.* sugeriram que seria apenas o reflexo do processo de reabsorção, como consequência do alargamento da região apical (42).

3.1. Cronologia de esfoliação dentária

A erupção dos dentes temporários, a reabsorção fisiológica, a esfoliação e a subsequente erupção dos dentes permanentes são processos que decorrem de forma ordeira, sequencial, dependente da idade (43) e, provavelmente, programada (37). A cronologia de esfoliação é um dos factores determinantes no desenvolvimento dentário uma vez que a sua sequência pode influenciar a ordem de erupção da dentição sucedânea (44).

No presente trabalho, com vista à determinação da idade das peças dentárias após a esfoliação, utilizou-se a tabela mais recente disponível na *Pubmed*, que data de 1982 (as restantes são de 1951 elaborada por Stones, de 1966 por Ohta e de 1975 por Barnard e Hoffmann) (45), baseada na observação de 1250 crianças de ambos os sexos, divididas em 10 grupos de 125 crianças cada, correspondentes aos grupos escolares compreendidos entre a idade pré-escolar e o 9º ano de escolaridade (45) (tabela 1).

A complexidade na determinação da idade de esfoliação dentária reside na dificuldade em identificar se a perda do dente decorreu do processo de reabsorção fisiológica, de reabsorção patológica ou da exodontia e, por isso, os critérios de inclusão de alguns dos estudos nem sempre são claros (46). No estudo de Clements EM *et al.* consideraram-se todos os dentes ausentes como esfoliados (47). Já no estudo desenvolvido por Stones H, *et al.* esse dado foi tido em consideração, mas a amostra era pequena (329 crianças com idades compreendidas entre 2 e 14 anos);

Fass EN não distinguiu as crianças do sexo masculino das do sexo feminino, tornando difícil a comparação dos resultados (48).

Tabela 1 – Tabela de cronologia da esfoliação dentária em função do gênero elaborada por Ripa LW.

Maxila	Tipo dente	M	F	Mandíbula	Tipo dente	M	F
	Incisivo central	6.8A	6.6A		Incisivo central	6.0A	5.6A
Incisivo lateral	7.6A	7.4A	Incisivo lateral	7.2A	6.9A		
Canino	11.3A	10.6A	Canino	9.8A	9.6A		
1º Molar	10.9A	10.5A	1º Molar	10.6A	10.2A		
2º Molar	11.7A	11.4A	2º Molar	11.6A	11.4A		

Legenda: F – feminino; M – masculino; A – anos

O processo de esfoliação dentária decorre entre os 6 e 12 anos, em duas fases principais: uma primeira fase, que corresponde à mudança dos incisivos e erupção dos 1º molares definitivos, e uma segunda fase, que corresponde à troca dos caninos e molares. Entre as duas etapas dá-se um interregno, denominado por período intertransitório, menor na mandíbula do que na maxila. Ambas as fases estão sincronizadas com o desenvolvimento dentário, sendo que primeiramente ocorre a erupção dos incisivos permanentes, seguida da erupção dos caninos e pré-molares. De um modo geral, os dentes inferiores esfoliam mais precocemente, à exceção dos 2º molares, que esfoliam em simultâneo em ambas as arcadas. Existe ainda dimorfismo sexual, uma vez que a esfoliação de todos os dentes no sexo feminino acontece prematuramente, quando comparada com a do sexo masculino (47), sendo a diferença mais significativa nos caninos, especialmente nos inferiores, sensivelmente de 10 meses (45).

A segunda dentição substitui a primeira numa sequência de erupção que apresenta grande variação entre populações, existindo vários estudos sobre a cronologia de calcificação e erupção de ambas as dentições (45). Uma das primeiras e mais utilizadas tabelas é a de Logan e Kronfeld, elaborada a partir de uma amostra de 25 crianças (49), que mais tarde foi modificada por Schour e Massler, e que durante vários anos foi considerada a tabela *standard* de cronologia de erupção (50) (tabela 2).

Tabela 2 – Cronologia do desenvolvimento da dentição permanente de Logan e Kronfeld (modificada por Schour e Massler)

	Dente	Início da calcificação	Coroa completa	Erupção	Raiz completa
Maxilar superior	Incisivo central	3-4M	4-5A	7-8A	10A
	Incisivo lateral	10-12M	4-5A	8-9A	11A
	Canino	4-5M	6-7A	11-12A	13-15A
	1º Pré-molar	1 ½ -1 ¾A	5-A	10-11A	12-13A
	2º Pré-molar	2-2 ½A	6-7A	10-12A	12-14A
	1º Molar	ao nascimento	2 ½-3A	6-7A	9-10A
	2º Molar	2 ½-3A	7-8A	12-13A	14-16A
	3º Molar	7-9A	12-16A	17-21A	18-25A

Maxilar inferior	Incisivo central	3-4M	4-5A	6-7A	9A
	Incisivo lateral	3-4M	4-5	7-8A	10A
	Canino	4-5A	6-7A	9-10A	12-14A
	1º Pré-molar	1 ¾-2	5-6A	10-12A	12-13A
	2º Pré-molar	2 ¼-2 1/2A	6-7A	11-12A	13-14A
	1º Molar	ao nascimento	2 ½-3A	6-7A	9.10A
	2º Molar	2 ½ -3A	7-8A	11-13A	14-15A
	3º Molar	8-10A	12-16A	17-21A	18-25A

Legenda: A – anos; M – meses

Mais recentemente, em 2009, surgiu um atlas de erupção e desenvolvimento dentário, elaborado por Sakher AlQahtani, baseado em dados recolhidos a partir de 72 esqueletos pré-natais e 104 pós-natais e ortopantomografias de 264 indivíduos do sexo feminino e do sexo masculino (com idades compreendidas entre 28 semanas de gestação e 23 anos de idade) (51) (tabela 3).

Tabela 3 – Cronologia do desenvolvimento da dentição permanente elaborada por Sakher AlQahtani.

	Maxila		Mandíbula	Mandíbula	
	Tipo dente	Idade		Tipo dente	Idade
Maxila	Incisivo central	7.5A	Mandíbula	Incisivo central	7.5A
	Incisivo lateral	9.5A		Incisivo lateral	7.5A
	Canino	12.5A		Canino	11.5A
	1º Pré-molar	11.5A		1º Pré-molar	11.5A
	2º Pré-molar	12.5A		2º Pré-molar	12.5A
	1º Molar	6.5A		1º Molar	6.5A
	2º Molar	13.5A		2º Molar	12.5A
	3º Molar	20.5A		3º Molar	20.5A

Legenda: A – anos.

4 . Marcadores para identificação genética

O dia-a-dia do laboratório de Genética Forense contempla o estudo de amostras biológicas de diferentes naturezas (sangue, sêmen, osso, dentes, entre outras), com vista à obtenção do perfil genético de um determinado indivíduo – conjunto de características hereditárias para um conjunto de marcadores genéticos, que se definem como polimorfismos de ADN de regiões não codificantes do genoma humano, detectáveis em qualquer amostra biológica que lhe pertença e expressos através de um código alfanumérico (52). Actualmente, a maioria das perícias utilizam o ácido desoxirribonucleico nuclear (ADNnu), podendo também utilizar-se o ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt), nomeadamente quando se beneficia da sua resistência à degradação temporal e do elevado número de cópias celulares (53, 54). As principais características que os distinguem são o tamanho, a estrutura e a herança uniparental materna do ADN mt que permite determinar a relação entre as várias gerações (52).

Até 1980, os casos de identificação criminal baseavam-se em análises serológicas dos polimorfismos proteicos, nos grupos sanguíneos (ABO) ou em alguns marcadores genéticos. Em 1985, Alec Jeffreys apresentou um estudo em que demonstrava ser possível identificar determinadas regiões do ADN, com elevada sensibilidade, através de moléculas radioactivas, produzindo um *fingerprint* de ADN (55). Nesse mesmo ano, este método foi utilizado, pela primeira vez, para resolução de um caso de imigração (56).

Atendendo a que 99.7% do genoma humano é comum a todos os indivíduos, restam apenas 0,3% que nos distinguem e estão repletos de sequências repetidas espalhadas pelos diversos cromossomas (57). Estas sequências repetidas de oligonucleótidos denominam-se genericamente por satélites, são constituídas por regiões de ADN não-codificante, têm tamanho variável entre indivíduos e localizam-se tipicamente nas regiões centroméricas dos cromossomas (58).

Estes *loci* hipervariáveis são designados em função do número e tamanho das suas unidades de repetição e podem ser classificadas em: minissatélites ou *variable number of tandem repeats* (VNTR), quando contêm entre 9-80 pares de

bases (pb) (59); microssatélites também denominados por *single sequence repeats* (SSR) ou *short tandem repeats* (STR) com 2-7 pb (58, 60).

Inicialmente eram utilizados os VNTR, mas o elevado consumo de tempo, amostra e dinheiro da técnica de Southern blot (*slot-blot*) levou ao seu abandono (só amostras de esperma e sangue eram analisadas). Com a descoberta da *polymerase chain reaction* (PCR) e a possibilidade de amplificar pequenas quantidades de ADN, alargou-se o âmbito da intervenção da Genética Forense que, aliada à utilização dos STR, revolucionou a identificação genética (61, 62).

4.1. Marcadores genéticos: STR

De todos os marcadores de ADN supracitados, os mais populares são os STR visto serem altamente polimórficos (sobretudo na variabilidade do número de repetições) (62, 63), terem um elevado poder discriminatório, uma elevada frequência de heterozigotia (acima de 90%) (62), originarem diferentes alelos com transmissão do tipo mendeliano (52), possuírem baixa frequência de mutações, serem facilmente amplificáveis por PCR e terem uma localização ubíqua, bem distribuída pelo genoma de praticamente todos os seres vivos. Comparativamente com os VNTR, os STR têm menor probabilidade de se fragmentar (são de menor dimensão) e dado o menor tamanho dos *amplicons* de STR (tipicamente o comprimento varia entre 100 e 400 pb) (64) necessitam de menores quantidades de ADN não degradado (63), o que representa uma vantagem na amplificação de amostras de ADN degradadas (65, 66).

As seqüências de STR são designadas pelo comprimento da unidade de repetição (57), podendo ser de mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleótidos, e unem-se em *tandem* (52). De todos os subtipos, os mais usados no âmbito da Genética Forense são os tetranucleótidos, em detrimento dos di- e trinucleótidos, uma vez que têm menor probabilidade de sofrer um fenómeno biológico denominado por *stutter* (dependente da localização do *locus* e que é cerca de 15% em oposição aos 30% dos outros subtipos); neste fenómeno, os alelos STR, ao serem amplificados por PCR, podem dar origem a *amplicons* com uma unidade de repetição a menos que o verdadeiro alelo, devido ao deslizamento da enzima polimerase, o que dificulta a interpretação dos resultados, especialmente quando se trata de misturas. Os de menor

tamanho, como o TPOX e o vWA, são mais adequados à análise de amostras degradadas, dependendo assim do tamanho dos STRs a eficiência da PCR (61, 67). Os penta e hexanucleótidos têm como inconveniente o facto de serem menos comuns no genoma humano, muito embora sejam empregues em alguns laboratórios (58).

Os STR podem assim ser classificados em função do tamanho da unidade de repetição, do número variável de unidades, mas também da composição da própria unidade de repetição. Designam-se por simples (ex: TPOX), quando a unidade de repetição é idêntica ao longo de toda a sequência, compostos (ex: vWA), quando apresentam duas ou mais unidades de repetição distintas e adjacentes, e complexos (ex: D21S11), quando exibem várias unidades de repetição, podendo ter diferente número de nucleótidos e sequência variável (58).

Nem todos os alelos dos marcadores STR contêm unidades de repetição completas, denominando-se por microvariantes os alelos que contêm unidades de repetição incompletas. O exemplo mais comum é o alelo 9.3 do *locus* TH01, que contém nove tetranucleótidos e uma unidade com três nucleótidos (58).

O perfil de um *locus*, para os marcadores genéticos autossómicos, pode ser representado por um ou dois alelos, denominando-se no primeiro caso de homocigótico e, no segundo de heterocigótico. O perfil genético de uma amostra corresponde, desta forma, à informação genética relativa aos genótipos de todos os *loci* analisados (52).

A técnica de PCR permitiu amplificar estas sequências polimórficas de ADN possibilitando, numa única reacção, analisar múltiplos *loci* (com elevada sensibilidade e poder discriminatório permite distinguir dois indivíduos, a partir de quantidades tão ínfimas como 1 ng de ADN) (60, 68), não sendo afectada pela variação interpopulacional da frequência dos alelos para cada *locus* (68). A obtenção de marcadores genéticos STR tornou-se o principal método de análise de ADN no contexto forense (58).

A existência de *kits* comerciais de amplificação dos marcadores STR acrescentou confiança aos resultados obtidos e assegurou a compatibilidade e consistência da nomenclatura entre laboratórios (dos *loci* examinados e nomenclatura dos alelos dos STR). Apesar de poderem existir ligeiras diferenças nos *ladders* e *primers* usados, isso não impede a concordância dos resultados (58).

5. Quantificação

Todas as fases são importantes, desde a colheita e preservação da amostra, extracção e quantificação de ADN, até a sequenciação do perfil genético, sendo cada etapa vital para a consecução de bons resultados.

A quantificação de ADN otimiza o processo de obtenção dos perfis de STR por PCR na medida em que permite eliminar qualquer amostra com quantidade de ADN insuficiente ou adequar a escolha do *kit* de amplificação à concentração de ADN presente. Para a maioria dos *kits* comerciais, a quantidade óptima de ADN varia entre 0.5 e 2.0 ng. A quantidade escassa leva à perda de alelos devido à amplificação estocástica, podendo originar uma falsa homozigotia no caso de um dos alelos não ser detectado - este fenómeno designa-se de *allele drop-out* (58).

Quando a quantidade de ADN está em excesso podem surgir artefactos espectrais e um aumento nos produtos *stutter* (58), levando a um aumento do tempo ou desafio na análise dos espectros obtidos. Torna-se, por isso, de primordial importância aferir a concentração de ADN presente na amostra de forma sensível e segura, através da quantificação prévia, por forma a ajustar o volume necessário da amostra a amplificar, garantindo a qualidade dos perfis obtidos (69), principalmente nos casos de amostras degradadas ou com baixo número de cópias de ADN (70, 71).

Nos últimos 50 anos, a evolução dos métodos de quantificação acompanhou a descoberta da complexidade da molécula de ADN, existindo vários métodos de quantificação de ADN disponíveis: espectrofotometria, *slot-blot*, PicoGreen, AluQuant, end-point PCR e PCR em tempo real. Nas técnicas de quantificação por espectrofotometria de fluorescência e ultravioleta são quantificadas pequenas quantidades de ADN, em que a concentração de uma solução é determinada através da densidade óptica após a absorção de comprimentos de onda de 260 nm ou da fluorescência emitida após a ligação de compostos, como o brometo de etídio, ao ADN (58). As principais desvantagens destes métodos residem na baixa sensibilidade da quantificação total do ADN presente, sem distinção entre ADN humano e não humano (dado importante na determinação da origem da amostra recolhida numa cena de crime) (72) podendo, inclusive, os resultados obtidos não serem específicos para o ADN (a presença de proteínas ou restos de fenol, utilizados em alguns métodos de extracção, podem resultar em falsos positivos), para além de

precisarem de grandes quantidades de amostra, o que no contexto forense constitui um problema acrescido (73). Para colmatar as limitações deste método surgiram a PCR em tempo real e técnicas de hibridização *slot-blot*.

A técnica de *slot-blot* constituiu o método mais comumente utilizado nos laboratórios forenses para quantificação do ADN genómico durante a década de 90. É específico para o ADN humano e de outros primatas, uma vez que emprega uma sonda de 40 pb que se liga ao *locus* D17Z1 existente no cromossoma 17. Tal como outros métodos de quantificação, trata-se de um método comparativo entre a intensidade dos sinais colorimétricos resultantes da amostra problema e amostras *standard* (obtidas a partir de várias diluições de uma amostra com concentração conhecida) feito visualmente e, conseqüentemente, dependente da subjectividade do analisador (58).

Com vista à automatização do processo, desde a extracção do ADN até à sua amplificação, continuaram a surgir novos métodos, nomeadamente o PicoGreen *microtiter plate assay*, que resulta da ligação de uma sonda fluorescente à cadeia dupla de ADN, permitindo a detecção de quantidades tão ínfimas quanto 250 pg; o principal inconveniente deste método reside na não especificidade para o ADN humano (58).

Os métodos descritos anteriormente tornaram-se obsoletos com o desenvolvimento da técnica de PCR em tempo real, no início dos anos 90 (74). Ao acoplar uma câmara de vídeo (CCD - *charged-coupled camera*) capaz de determinar a fluorescência emitida pelo fluorocromo, cada vez que este se liga a uma cadeia dupla recém-sintetizada, num espectro compreendido entre 500-550 nm, permitiu calcular o número de cópias do ADN, uma vez que é directamente proporcional ao valor total aferido (75).

5.1. Quantificação por PCR em tempo real (qPCR)

A quantificação do ADN por PCR em tempo real espelha a quantidade e qualidade do ADN extraído de determinada amostra, essencial na condução das etapas subsequentes, quer na decisão de estudo do ADN nuclear ou mitocondrial, quer na opção entre marcadores (60) ou na escolha do protocolo mais indicado, de modo a obter perfis completos com a menor quantidade de ADN possível (72).

Esta técnica tem como objectivo determinar a quantidade de ADN amplificável, uma vez que a degradação da amostra, a presença de inibidores, a quantidade insuficiente ou a combinação destes factores inibem a amplificação.

A literatura descreve várias metodologias no que diz respeito à qPCR nomeadamente, os métodos químicos de fluorescência: um composto fluorescente é adicionado à reacção podendo ter dois tipos de comportamento, dando origem às duas tecnologias mais usadas: SYBR[®] Green e TaqMan[®] (76). Na primeira abordagem, o fluorocromo (SYBR Green ou brometo de etídio) é altamente específico para a cadeia dupla de ADN, detectando a actividade da Taq polimerase e a formação de qualquer produto da PCR. A quantificação deve-se por isso, unicamente, à especificidade dos *primers*. Este sistema de quantificação é altamente sensível, apesar dos métodos fluorimétricos não serem adequados à quantificação de amostras em que se desconhece a fonte do ADN, uma vez que a detectam independentemente da origem animal, vegetal ou microbiológica (72, 77). A segunda abordagem resulta da monitorização da actividade da nuclease 5' Taq polimerase, que, ao clivar uma sequência *target* complementar à cadeia de ADN da amostra, emite uma fluorescência característica (78). Torna-se possível obter a quantificação absoluta da amostra apenas quando for conhecida a quantificação *standard*, a cópia da região *target* for de apenas um gene e a pipetagem precisa (79).

O método de qPCR para quantificação de ADN nuclear e mitocondrial foi validado pela primeira vez para casos forenses por Andreasson H *et al.* (80). Utiliza como região *target* o ADN do gene do retinoblastoma (RB1), que possui uma única cópia no cromossoma 13. Posteriormente, Niederstätter desenvolveu a qPCR modular para a quantificação absoluta de ADN mitocondrial e/ou nuclear com um controlo interno positivo opcional (81).

Numa tentativa de obter ensaios mais sensíveis surgiram técnicas baseadas na quantificação de múltiplas regiões *target* (*multi copy number target*), como as sequências Alu (73, 82). No entanto, a variação interindividual dos seus resultados pode ser maior, devido à variação do número de cópias destas regiões (72).

A Applied Biosystems desenvolveu o Quantifiler™ human kit, para amostras forenses, baseado na quantificação de uma única cópia do gene hTERT (telomerase reversa transcriptase) presente no cromossoma 5 e com um controlo positivo (72).

A elevada sensibilidade e especificidade, bem como a possibilidade de análise automática e simultânea de várias amostras num processo contínuo, fazem da PCR em tempo real o método de eleição na quantificação absoluta de ADN. Acrescendo ainda as características da TaqMan (emite fluorescência ao detectar as sequências *target* do ADN) e dos termocicladores (capazes de identificar os diferentes comprimento de onda em paralelo) é possibilitada a economia de tempo, dinheiro e da quantidade da amostra necessária (81).

Neste trabalho ir-se-á descrever com maior detalhe a tecnologia TaqMan®, visto tratar-se da metodologia empregue no kit de quantificação, a qual utiliza dois *primers* específicos de uma determinada sequência de ADN e uma sonda TaqMan® homóloga à região do fragmento de ADN a hibridizar, que se localiza entre os *primers* (83). Esta sonda tem ainda a particularidade de ter na extremidade 5' um fluorocromo *reporter* (FAM: 6-carboxifluoresceína), cujo espectro de emissão fluorescente emitido é absorvido pelo *quencher* (TAMRA: 6-carboxi-tetrametilrodamina - aceita a energia da molécula *reporter* e dissipa-a na forma de luz ou calor), que se encontra na extremidade 3' (fig. 3).

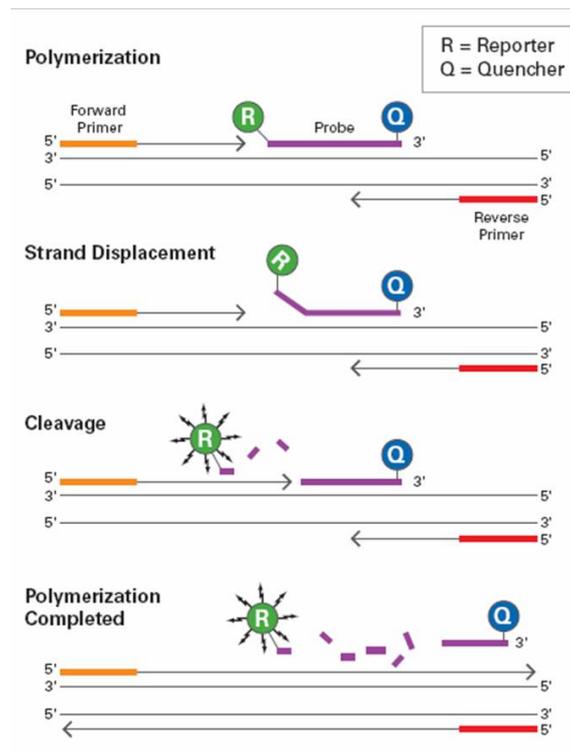


Fig. 3 – Representação esquemática da tecnologia TaqMan[®], durante as fases de polimerização, extensão de *primers* e hidrólise da sonda. Fonte: Retirado de http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx (acedido a 16/08/12)

No início da qPCR, a sonda está intacta e a proximidade física entre os dois fluorocromos conduz à supressão total ou praticamente total da fluorescência emitida pelo *reporter*, uma vez que ocorre a transferência de energia Förster entre dois (76). Durante o ciclo de PCR, à medida que decorre a fase de extensão, a Taq polimerase encontra a sonda, que a hidrolisa graças à sua actividade exonucleotídica 5' - 3'. A hidrólise separa o *quencher* da molécula fluorescente *reporter*, deixando de ocorrer de forma eficiente a transferência de energia entre ambos e tendo como consequência um aumento de emissão de fluorescência (até 518 nm) pelo *reporter*, que é detectada pela câmara CCD e se traduz numericamente no ABI Prism[®] em tempo real (83).

No decorrer dos ciclos da amplificação há um momento em que a fluorescência emitida ultrapassa um limiar arbitrário definido pelo *software* da qPCR, que é designado por *cycle threshold* (C_T), e dá início à fase exponencial da qPCR; toda a reacção de PCR apresenta três fases características: fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária (84). Este

período corresponde ao momento óptimo em que a relação entre o *input* de ADN e o resultado conseguido é mais consistente. Assim, a concentração da amostra é inversamente proporcional ao número de ciclos de amplificação necessários para que se atinja o limiar C_T e a emissão de fluorescência seja identificável (quanto menor o número de ciclos necessários para obter um nível de fluorescência detectável, maior a quantidade de ADN presente no início da reacção de PCR) (58).

6. Análise de amostras degradadas

A análise de amostras degradadas define-se como o estudo dos perfis obtidos a partir de valores de quantificação inferiores ao limiar estocástico, que garante uma interpretação fiável dos perfis (64), e que para Gill B *et al* e Butler JM está compreendido entre 20 pg e 100 pg (58, 85). Não há, no entanto, consenso entre os vários autores pesquisados e, como exemplo Caddy refere 200 pg como limite máximo do intervalo, por ser mais consistente na relação da quantidade de ADN/efeito estocástico (86). O limiar de referência é baseado, assim, na quantidade de ADN capaz de provocar um desequilíbrio exagerado na altura do pico, e é relativo ao *kit*, ensaio e metodologia utilizada, não sendo, por isso, possível aplicar o valor referência de 100 pg a todos os sistemas.

É possível melhorar a sensibilidade da sequenciação destas amostras através do aumento do número de ciclos da PCR, da redução do volume da PCR, do aumento da fluorescência da sonda, do aumento do grau de pureza ou da diminuição da condutividade da formamida, da purificação pós-PCR para remoção de iões que possam competir com o ADN antes da separação electrocinética e, por último, do aumento do tempo de injeção no sequenciador automático (64).

6.1 Consequência do estudo de amostras degradadas

Quanto menor for a concentração de ADN em relação ao valor óptimo de referência, maior o número de dificuldades que surgem na amplificação, entre os quais: efeitos estocásticos e dificuldade na determinação do limiar de detecção de um alelo. Outra consequência do estudo de amostras degradadas é o facto do

procedimento laboratorial não ser reproduzível, logo não ser possível avaliar o real erro e determinar o valor probatório das amostras (64, 87).

Efeitos estocásticos

Na análise de amostras degradadas é comum observarem-se, pelo menos, três artefactos típicos: presença de um alelo adicional resultante de uma contaminação esporádica – *drop-in*; perda de um alelo ou ambos derivada de efeitos estocásticos – *drop-out*; aumento dos produtos *stutter*, além do comum aumento de 5 a 10% do alelo nominal. Acresce ainda um desequilíbrio exacerbado nos picos dos alelos heterozigóticos (58).

Limiar de detecção

É importante determinar um valor mínimo (RFU - *Relative Fluorescent Units*) para análise de um determinado pico de um alelo, abaixo do qual é descartado ou analisado com grande precaução. Por regra este valor é estabelecido a partir de ensaios validados pelos próprios laboratórios, servindo de controlo estocástico. Acontece que, por definição, estas amostras já estão abaixo do limiar de interpretação estocástico e por isso não é possível encontrar um critério para o valor mínimo a ser considerado, permanecendo assim como uma das fragilidades do estudo de amostras degradadas (64).

Interpretação dos perfis

Os principais factores que afectam a robustez da análise dos perfis de amostras degradadas são os efeitos estocásticos e a sensibilidade da detecção, que colectivamente resultam no *drop-out* ou *drop-in* de alelos. Peter Gill frisa a importância de distinguir entre *drop-in* e contaminação grosseira: a primeira deve-se à incorporação ocasional de alelos independentes, enquanto a segunda se deve à contaminação por um determinado indivíduo ou origem desconhecida, não relacionada com a cena do crime (88).

Existem alguns indícios que são reveladores da presença de mistura de amostras como: a presença de três ou mais alelos ou a existência de dois alelos em

múltiplos *loci* e a discrepância significativa entre os dois picos num *locus*. Estes critérios convencionais de interpretação não são fiáveis em amostras degradadas, uma vez que existe a possibilidade dos perfis resultantes apresentarem características decorrentes da reduzida concentração de ADN e não resultantes da mistura (89).

Não reprodutibilidade da análise

Apesar da validade e utilidade das amostras degradadas não ser totalmente posta em causa pela comunidade científica, o inicial entusiasmo perante a possibilidade de resolução de casos com as alterações da técnica acima referidas esmoreceu. As principais limitações reveladas pelo aumento da sensibilidade da técnica são: a restrita reprodutibilidade dos perfis (o que constitui um dos tradicionais princípios sagrados da Genética Forense), o maior potencial de erro (quando comparado com os protocolos convencionais utilizados para a análise de STR), a exigência crítica de prévia quantificação por métodos suficientemente fiáveis e a dificuldade de interpretação de misturas (52).

7. Factores que influenciam a degradação do ADN

A maior parte da degradação *postmortem* do ADN ocorre por autólise, imediatamente após a morte do organismo, pela acção de nucleases endógenas que catalisam a hidrólise das ligações fosfodiéster da sua estrutura. O tamanho das moléculas obtidas a partir de amostras forenses ou arqueológicas está habitualmente compreendido entre 100-200 pb (90), o que sugere que a clivagem enzimática ocorre nas zonas de ligação mais vulneráveis situadas entre os nucleossomas. (91).

O resultado da hidrólise inerente à ligação fraca β -N-glicosídica entre a base orgânica e o anel de pentose do açúcar tem um efeito *major* na destruição do ADN, provocando, por um lado, a fragmentação das bases purínicas e pirimídicas levando à perda de informação da sequência primária e, por outro, as bases são susceptíveis à deaminação hidrolítica causando instabilidade na molécula de ADN.

Um dos principais factores responsáveis pela deterioração do ADN é a oxidação, uma vez que a formação de anéis de pirimidina saturados e a perda da ligação dupla entre o carbono 6 e 5 resulta em bases não codificantes.

Os factores ambientais e o intervalo *postmortem* influenciam a extracção do ADN e a sua amplificação por PCR (92), na medida em que provocam uma redução do tamanho dos fragmentos disponíveis, dificultando a detecção dos STRs (52). É, assim, de primordial relevância descrever, com base na bibliografia disponível, o modo como os factores ambientais (temperatura, humidade, luz), a presença de microrganismos (contaminação por bactérias e fungos) e o tempo afectam a degradação do ADN (93).

7.1 Factores ambientais

Temperatura

Baixas temperaturas favorecem a preservação do ADN, impedindo a proliferação de microrganismos. O calor origina perda de bases ou locais apurínicos ou apirimídicos no ADN.

Humidade

Verifica-se que as alterações hidrolíticas induzidas pela elevada percentagem de humidade estão mais relacionadas com a alteração da estrutura (levando a resultados inconsistentes na PCR), do que com a diminuição da quantidade total de ADN (94).

Luz

O efeito da radiação ultravioleta (UV) sobre o ADN deve também ser considerado, uma vez que resulta em ligações cruzadas entre resíduos de tiamina, o que constitui um elemento inibidor da PCR (91). As radiações UV produzem igualmente dímeros ciclobutanos (CPDs) (52).

Agentes biológicos

A presença de microrganismos conduz à degradação do ADN pela digestão e pela contaminação por ADN exógeno (91). Bactérias e fungos proliferam em condições de elevada temperatura e humidade sendo que, no caso do dente,

penetram na polpa dentária mesmo que este se encontre no interior do alvéolo, metabolizando praticamente a totalidade do ADN (95).

7.2 Tempo

A deterioração do ADN está assim dependente das condições ambientais e decorre ao longo do tempo. Não há consenso entre os vários autores consultados sobre o modo como o tempo influi na degradação do ADN. Colson I *et al* não verificaram qualquer correlação directa entre ambos (96), muito embora, e ainda que em condições óptimas, reacções químicas como a oxidação não possam ser travadas.

Os principais factores relacionados com a preservação do ADN serão sumarizados de seguida (tabela 4).

Tabela 4 – Condições óptimas de preservação do ADN. Fonte: Retirado de: Graham EAM, 2007.

Ausência de microrganismos:	a presença de microrganismos e seus metabolitos destrói a totalidade do ADN
Ausência de radiação ultravioleta:	a radiação ultravioleta afecta apenas a superfície dos tecidos
Ligação a superfícies minerais como a hidroxiapatite:	superfícies minerais estabilizam as moléculas de ADN
Rápida inumação após a morte:	a formação, libertação de gás e a ruptura dos tecidos moles acelera a contaminação por microrganismos
Tecidos duros:	protegem de agressões por agentes químicos e físicos
Baixas temperaturas:	desaceleram as reacções químicas e reduzem a contaminação microbiológica
Baixa temperatura de armazenamento:	as amostras deverão ser armazenadas durante um longo período de tempo a uma temperatura inferior a -20°C

8. Dentes como fonte de ADN e sua aplicação na identificação forense

A identificação forense tem o contributo de várias áreas: Medicina Dentária Forense (através da informação retirada de exames radiográficos, da ficha dentária, do registo clínico dos procedimentos e materiais usados e dos modelos de estudo, por forma a reconstituir o perfil dentário *antemortem*); Dactiloscopia (existem dois tipos de impressões digitais *antemortem*, as colhidas deliberadamente com vista à identificação, e as latentes colhidas nos pertences e por isso de origem incerta; sempre que o cadáver permite a recolha de impressões digitais *postmortem*, pode ser uma alternativa à Medicina Dentária Forense em crianças e jovens, uma vez que estes, frequentemente, carecem de registos dentários actualizados); análise do ADN (considerada o *gold standard* dos testes forenses) (97).

A identificação genética é o método eleito, em detrimento dos métodos tradicionais supracitados (98), sobretudo em situações de elevado estado de decomposição ou destruição do cadáver e em indivíduos jovens. Existem ainda áreas não científicas, como os métodos morfológicos (peso, altura) ou características individualizantes (tatuagens, sinais particulares, cicatrizes, *piercings*), métodos radiológicos (fracturas ósseas antigas, presença de corpos estranhos) e documentos pessoais, que auxiliam no processo de reconhecimento (99).

A identificação positiva resulta da comparação dos dados *antemortem* (colhidos junto de familiares e amigos e que permitem a reconstrução do perfil do desconhecido) com os dados *postmortem* (colhidos no cadáver e que possibilitam a identificação do seu perfil).

A Medicina Dentária Forense, em particular, é uma área bastante abrangente, uma vez que engloba a análise de mordeduras, a estimativa da idade, a avaliação de lesões resultantes de maus tratos, o estudo arqueológico e a identificação de vítimas.

Os dentes assumem um papel de destaque no contexto da identificação, dada a singularidade das suas características anatómicas e a elevada resistência física e química da sua estrutura (60, 99, 100). Constituem uma excelente fonte de ADN (101), muito útil na identificação de vítimas e na interpretação da cena do crime pelos investigadores, quando os corpos foram removidos, enterrados, queimados ou incinerados (102). A obtenção de ADN a partir de amostras degradadas ainda

permanece um desafio, devido à pouca quantidade de ADN endógeno, à contaminação bacteriana do meio *postmortem* e à presença de inibidores (103).

A configuração anatómica dos dentes garante a durabilidade dos seus tecidos (o esmalte, a dentina e o cimento envolvem a polpa, protegendo-a), mantendo condições ótimas de preservação do ADN nuclear e mitocondrial (104-106). Torna-se assim possível a aplicação de estudos moleculares, nomeadamente, a análise genómica para determinação do polimorfismo genético individual e do sexo (107), a determinação da idade através da racemização dos aminoácidos (108), bem como a realização de estudos bioquímicos, radiográficos e ultra-estruturais forenses (12).

São relativamente consensuais as vantagens da utilização dos dentes como fonte de ADN, particularmente em estudos arqueológicos, em detrimento de outras fontes, como o osso, uma vez que os factores ambientais induzem maior destruição nos tecidos ósseos do que nos dentários (107, 109) (a estabilidade do ADN no tecido ósseo deve-se à existência da hidroxiapatite que constitui o maior componente da matriz inorgânica dentária) (109). É relevante acrescentar que a maioria dos estudos que comprova que os dentes podem ser uma boa fonte de ADN nuclear ou mitocondrial, utiliza a maior quantidade possível de tecidos moles, incluindo polpa rica em células, tecidos periodontais, para além da dentina (processos odontoblásticos) e cimento (cementoblastos e cementócitos) (65, 110, 111), não sendo, no entanto, consensual qual dos tecidos dentários reúne as condições mais favoráveis à extracção de ADN para obtenção de perfis genéticos.

Gaytmenn R e Sweet D concluem, num estudo realizado em 2003, que a melhor fonte de ADN nos dentes definitivos é a porção radicular, dado conter polpa radicular, dentina e cementócitos (existentes no cimento celular). Já a porção coronária é constituída em grande parte por esmalte (tecido mineralizado acelular), não se tratando por isso de uma fonte viável de ADN (112).

Malaver PC e Yunis JJ em 2003, num estudo efectuado em 20 dentes (5 amostras de polpa, 20 de dentina e 20 de cimento) pertencentes a 20 corpos não identificados e que haviam sido enterrados em 1995 e exumados em 2000, concluíram que a polpa constituía o tecido dentário com melhores resultados de amplificação, desde que os dentes fossem preservados em condições que

permitissem a mumificação dos tecidos moles (baixa humidade e temperatura ambiente) (95). Hanaoka Y *et al*, em 1995, obtiveram valores de quantificação do ADN a partir da extracção da polpa superiores aos obtidos a partir da extracção dos tecidos duros (entre 3 e 40 μg) (113). Assim, a polpa é o tecido dentário com melhores resultados de amplificação. No entanto, e apesar de estar anatomicamente protegida por tecidos duros (111), é afectada por fenómenos putrefactivos até à sua total destruição, necessitando de condições atmosféricas ideais para que ocorra a mumificação. Deste modo, quando um dente é extraído e armazenado à temperatura ambiente ou se encontra móvel no alvéolo, os tecidos moles sofrem rapidamente desidratação, putrefacção ou destruição bacteriana (95).

Presecki e Brikc referem que o cemento e a dentina constituem as melhores fontes de ADN, comparativamente com outros tecidos dentários, uma vez que se mantêm nas melhores condições de preservação durante períodos de tempo mais longos, com menor risco de contaminação por ADN não humano (114). Estes tecidos apresentam resultados semelhantes, devido à presença dos cementoblastos e odontoblastos (rodeados por matriz mineral e, por isso, protegidos de condições ambientais adversas). No caso do cemento celular acresce o facto de possuir numerosas lacunas ocupadas por cementócitos, ficando menos exposto à degradação química e bacteriana. Isto é de capital importância em situações de identificação forense, após decorrido um longo período *postmortem*, uma vez que já terá sucedido a decomposição da polpa) (54).

A partir da bibliografia disponível não foi possível concluir qual dos tecidos de um dente temporário constitui a melhor fonte de ADN, visto na totalidade dos estudos existentes este ter sido extraído da polpa com vista à identificação do sexo do indivíduo. No estudo desenvolvido por Kumar e Hedge pretendeu-se avaliar a possibilidade de obtenção do sexo do indivíduo a partir de 20 dentes extraídos em fase de esfoliação com diferentes tempos de armazenamento – menos de 24 horas, mais de 1 mês e mais de 6 meses, atendendo ao facto de que a polpa dentária de um dente esfoliado/extraído sofre degeneração, necrose e putrefacção de modo sequencial, durante um período de tempo variável (100). Já Williams e Lewis, em 2004, estudaram o comportamento de dentes temporários quando sujeitos a temperaturas até 500°C e concluíram ser possível identificar o sexo por PCR (115).

No caso de um dente esfoliado, essa questão torna-se menos relevante, dado possuir apenas a porção coronária e pouca quantidade de tecido dentário remanescente, pois apesar de ser importante a quantidade de ADN disponível, é também preponderante a sua qualidade e pureza (116).

9. Amostras de referência na identificação genética

Na colheita de amostras *antemortem* é possível obter informação falsa e, por isso, a recolha de amostras de referência de ADN baseia-se preferencialmente na colheita de:

1. Perfis de familiares directos para identificação indirecta

Se possível, mais do que um, uma vez que múltiplos indivíduos aumentam a probabilidade de certeza no resultado (ex: probabilidade de identificação baseada no perfil de um pai/mãe da vítima é de 99.9%, baseada no de um filho legítimo é de 92.1%).

Amostras de referência familiares preferenciais:

- a) pais;
- b) pai, cônjuge, filho;
- c) filhos e cônjuge;
- d) pai e descende;
- e) descendentes (mais de dois);
- f) um irmão gémeo.

2. Amostras de sangue ou de biópsias recolhidas da possível vítima

Fonte ideal de amostras *antemortem*; devem ser recolhidas a partir de exames médicos ou similares, anteriores à morte ou desaparecimento, como por exemplo: gota de sangue do teste do pézinho.

3. Objectos pessoais da vítima

É fundamental garantir que os objectos em análise pertencem exclusivamente à vítima ou se são partilhados, deve ser determinada a identidade dessa segunda pessoa para posterior comparação.

Na tabela abaixo estão descritos alguns exemplos dos principais tipos de amostras de referência (tabela 5).

Tabela 5 - Quadro resumo das amostras de referência para obtenção de perfis de ADN *antemortem*. Fonte: Retirado de *Disaster victim identification guide* (acedido a 05/05/12)

Familiares	amostras de familiares directos como: pais, filhos, irmãos mais do que dois parentes (amostra de cônjuge e filho é suficiente)
Amostras directas	amostras de sangue periférico ou zaragoas bucais dentes temporários ou 3º molares extraídos amostras de banco de doação de medula amostras de sangue recolhidas do teste do pézinho testes de parentesco, bases de registo criminal cordão umbilical seco bancos de esperma
Objectos pessoais	amostras de tecidos armazenadas em blocos de parafina escovas de dentes lâminas de barbear escovas de cabelo/pentes batom copos usados auriculares óculos capacetes, chapéus, bonés relógios de pulso jóias

É possível classificar as amostras directas atendendo à qualidade do ADN obtido. A tabela seguinte apresenta alguns exemplos de fontes, de acordo com a sua qualidade (tabela 6).

Tabela 6 – Classificação da qualidade das amostras directas. Fonte: Retirado de Prinz M *et al.* 2007

Qualidade do ADN	Fontes comuns	Fontes menos comuns
Elevada	escovas de dentes máquinas ou lâminas de barbear escovas de cabelo ou pentes	banco de dadores de medula óssea amostras de sangue do teste do pézinho bases de registo criminal testes de parentesco amostras sanguíneas cordão umbilical seco amostras de tecidos preservadas em blocos de parafina
Média	pentas batom fronhas de almofada copos/canecas usados	capacetes, bonés, capacetes auriculares óculos canetas com marcas de dentes meias, camisolas cartas ou postais enviados
Baixa	relógios de pulso jóias toalhas casacos ganchos	cabelo próteses dentárias rolos de cabelo tesouras e limas de unhas

A comparação com amostras directas requer menor número de *loci* para validar a identificação, do que com perfis de familiares. É importante ressaltar que, no caso de se utilizarem objectos pessoais, não é possível garantir a cadeia de custódia até à sua recolha, nem as condições de preservação e, por isso, sempre que for exequível, o resultado deve ser confirmado com a análise de perfis de familiares, por forma a aumentar a confiança no resultado (98).

II – Contribuição pessoal

A componente de investigação desta dissertação compreendeu um estudo experimental para obtenção de perfis de ADN, com vista à identificação do indivíduo, a partir de dentes temporários esfoliados.

1. Estudo experimental

1.1 Introdução e objectivos

O estudo experimental consistiu em avaliar a utilização de dentes temporários esfoliados, no âmbito de uma identificação forense, seguindo os protocolos existentes no serviço de Genética e Biologia Forenses – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, para as várias etapas: extracção, quantificação e sequenciação do ADN, mas com a introdução de algumas adaptações específicas (figs. 4 e 5).

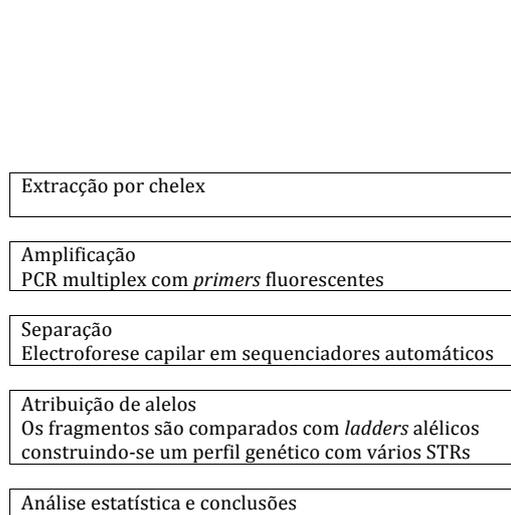


Fig. 4 – Fluxograma resumo das várias etapas no processo de identificação genética, a partir de amostras de referência.

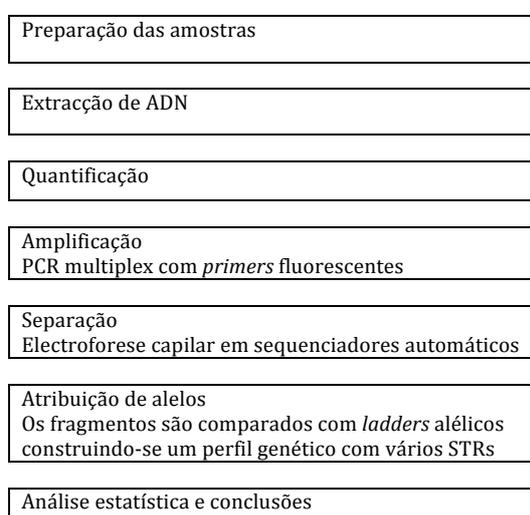


Fig. 5 – Fluxograma resumo das várias etapas no processo de identificação genética, a partir de amostras de tecidos dentários

Os objectivos principais que orientaram a elaboração do presente trabalho, podem resumir-se nas seguintes questões:

1. A metodologia de extracção de ADN para tecidos duros (QiAamp DNA Investigator da QIAGEN[®]) é aplicável aos dentes temporários esfoliados?

2. É possível obter um perfil completo (com pelo menos 15 marcadores STR e a amelogenina), a partir do ADN extraído de dentes temporários esfoliados?

3. Existe alguma diferença nos resultados da quantificação entre os grupos definidos tendo por base o tempo decorrido desde a esfoliação dentária ($<$ ou \geq 12 anos) e o género?

4. Existe alguma correlação entre o tempo de preservação da amostra e a quantidade de ADN obtida?

5. É possível obter um perfil genético fidedigno a partir de dentes temporários esfoliados?

1.2 Material e métodos

Retiraram-se de um grupo de 60 dentes temporários anteriores esfoliados (uma vez que constituem os dentes mais frequentemente guardados), 37 pertencentes a 22 indivíduos Europeus, de ambos os sexos, e com idade variável compreendida entre os 7 e os 36 anos. De cada indivíduo foi recolhida, como amostra de referência, uma zaragatoa bucal. O tempo de preservação dos dentes estava compreendido entre 1 e 27 anos (determinado pela diferença entre a idade do indivíduo e a idade média de esfoliação do respectivo dente),

Os critérios de inclusão para selecção da amostra foram: dentes temporários anteriores pertencentes a indivíduos caucasianos, guardados há menos de 27. Foram excluídos todos os dentes que apresentavam lesões de cárie, qualquer material restaurador, que tinham sido extraídos ou possuíam raiz e que haviam sido preservados num qualquer dos seguintes meios: água, álcool, água oxigenada, formol ou outro meio húmido.

As amostras foram entregues pelos dadores, desde Maio de 2009 a Outubro de 2010, na Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da

Universidade de Coimbra e armazenadas no serviço de Genética e Biologia Forense – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses.

1.2.1 Considerações éticas

Este projecto de investigação foi submetido a avaliação por parte da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, da qual obteve um parecer favorável à sua execução (anexo 1).

Cada indivíduo autorizou a sua participação no estudo. No caso de menores de 18 anos, foram autorizados pelo seu acompanhante adulto, de quem foi obtido o consentimento informado por escrito (anexo 2).

1.2.2 Condições de trabalho

1.2.2.1 Organização Laboratorial

Com vista ao controlo do risco de contaminação, os procedimentos laboratoriais foram executados seguindo as recomendações do grupo *European DNA Profiling Group* (EDNAP): na etapa de extracção incluiu-se um controlo negativo, na quantificação e na amplificação um controlo negativo e um positivo; na preparação, extracção, quantificação e amplificação, as amostras foram manipuladas em diferentes câmaras de fluxo laminar em áreas distintas de pré e pós-PCR (117); na desinfectação das superfícies, no final de cada fase, utilizou-se hipoclorito de sódio 10%, DNA awayTM, radiação UV (254 nm) durante 20-45 minutos; para a esterilização do material procedeu-se antecipadamente à sua degermação - imersão numa solução desinfectante, lavagem com hipoclorito de sódio, seguido de água destilada e esterilização em autoclave (plástico e vidro: 30 minutos de esterilização, 12 minutos de secagem a 105°C; metal: 15 minutos de esterilização, 12 minutos de secagem a 134°C).

Durante as diferentes etapas laboratoriais, os técnicos utilizaram barreiras de protecção como luvas, bata e máscaras descartáveis.

Obtiveram-se os perfis genéticos de todos os elementos da equipa que manipularam e que poderiam contaminar as amostras, por forma a garantir a correcta identificação dos dadores.

1.2.2.2 Preparação da peça dentária para posterior extracção de ADN

Antes de iniciar o protocolo de preparação da amostra dentária, garantiu-se a anonimização das amostras, seguindo-se a recolha das características morfológicas e macroscópicas, com vista à caracterização do dente. Uma das desvantagens da metodologia utilizada foi a total destruição da peça dentária impedindo a aplicação posterior de testes morfológicos, bioquímicos e radiográficos.

A desinfecção da peça dentária fez-se numa solução de hipoclorito de sódio a 3%, agitando suavemente durante 20 segundos, seguindo-se a passagem rápida por água desionizada e secagem à temperatura ambiente sobre papel absorvente. Apesar do hipoclorito de sódio ser o agente químico mais utilizado na descontaminação, não há acordo na literatura quanto ao tempo e tipo de exposição (118). Várias práticas têm sido preconizadas (119), como a imersão seguida ou não de lavagem com água, a passagem rápida com algodão embebido (120), ou ainda a imersão do pó (121). Uma vez que o poder oxidativo do hipoclorito de sódio destrói o ADN em poucos minutos (122), inclusive o ADN endógeno, torna-se essencial o controlo rigoroso do tempo (123) (o radioisótopo Cl-36 comprovou a destruição do ADN, aquando da exposição dos tecidos dentários ao hipoclorito de sódio, com a migração rápida dos iões cloro e hipoclorito em direcção à polpa) (118).

No presente estudo, dado tratar-se de amostras com limitada quantidade de ADN e a PCR ser altamente sensível à presença de inibidores, ADN contaminante e ADNases, que podem interferir ou até bloquear todo o processo de extracção (124), foi de primordial importância as condições do banho, de modo a evitar resultados falsos positivos (66, 120). O tempo e a concentração do hipoclorito de sódio foram assim ajustados ao facto de se tratar apenas da coroa de um dente temporário esfoliado.

Para preparação da superfície dentária usaram-se brocas de pedra de Arkansas, de utilização única, montadas em peça de mão. Embora não exista nenhum método totalmente eficaz na remoção de contaminantes (adquiridos durante a colheita, armazenamento e manipulação), é consensual que a presença da maioria dos contaminantes se encontra na superfície das amostras (125). Assim, esta etapa poderá melhorar a relação entre ADN endógeno e o ADN contaminante e a remoção do esmalte facilitar a extracção de ADN a partir da dentina (126).

Existem, actualmente, vários métodos de preparação das peças dentárias, para posterior isolamento do ADN, dos quais se destacam: acesso endodôntico, secção vertical ou secção horizontal ao nível do colo do dente, remoção da dentina com preservação da sua morfologia (127) e moagem total do dente (114). Neste trabalho, e dado tratar-se de dentes de dimensões reduzidas, optou-se pela redução a pó num moinho de nitrogénio. Começou por se seccionar longitudinalmente a coroa com disco diamantado esterilizado (figs. 6 e 7) (116), montado em peça de mão; para melhor remoção de restos pulpares necróticos ou impurezas utilizou-se um estilete (101), tentando preservar o complexo pulpo-dentinário; cada dente foi preparado individualmente em câmara de fluxo laminar (fig. 8).



Fig. 6 – Coroas dentárias de dentes anteriores decorrido o processo de esfoliação



Fig. 7 – Coroas dentárias seccionadas com disco diamantado



Fig. 8 – Preparação das amostras numa câmara de fluxo laminar



Fig. 9 – Imagem de moinho criogénico

Uma vez que a moagem não foi efectuada no mesmo dia da preparação, armazenou-se a peça num tubo de *ependorf*, devidamente identificado com número da amostra e data, para ser congelado em câmara frigorífica a -80°C .

Para a redução dos tecidos mineralizados a pó, inseriu-se cada amostra num vial, que se colocou no moinho criogénico (Freezer mill 6770[®] – fig. 9) (128) (o pó tem de ser fino para otimizar a extracção do ADN, uma vez que quanto mais fino for, maior é a libertação de ADN) (124). As desvantagens deste método residiram na total destruição da peça dentária, impedindo a devolução à família ou ao museu no caso de peças arqueológicas (129) e implicando caracterização morfológica prévia (57, 128), para além deste procedimento constituir mais uma etapa de manipulação da amostra, aumentando o risco de contaminação (130).

1.2.2.3 Extracção de ADN

Extracção de ADN do complexo pulpo-dentinário

A extracção tem como objectivo separar as moléculas de ADN dos restos celulares ou de outras proteínas existentes na célula. Decorre em três fases distintas: a ruptura celular ou lise, desnaturação proteica e inactivação (pela acção de quelantes e proteinases) e, por último, a extracção de ADN propriamente dita.

Existem várias técnicas e protocolos descritos no contexto da Genética Forense, não havendo nenhuma metodologia *standard*. Os mais comuns são: método orgânico (composto por clorofórmio e fenol, utilizado em moléculas de ADN com elevado peso molecular); Chelex 100 (método rápido, com baixo risco de contaminação, mas resultados insatisfatórios em amostras degradadas e armazenadas por longos períodos de tempo) (131); papel de FTA[™] (papel absorvente de celulose, com substâncias químicas que aceleram o processo); álcool isopropil (contém isopropanolol e amoníaco e constitui uma alternativa ao método orgânico); extracção a partir de uma fase sólida (o ADN liga-se selectivamente a um substrato, como a sílica, e é lavado com vários adstringentes de forma a purificar a molécula de ADN dos restos celulares e de outras proteínas) (58). Do último grupo destacam-se as colunas da QIAGEN[®], DNA IQ[™], PrepFiler[™].

Neste trabalho utilizou-se o *kit* QiAamp DNA Investigator da QIAGEN[®] (método de extracção por *salting-out*), considerado, por vários autores, o método de eleição na extracção de ADN para ser analisado em múltiplos *loci* (131) (a título de exemplo, foi utilizado pela ICMP – *International Commission of Missing Persons*, em

mais de 1800 amostras de osso e dente no maremoto asiático de 2004) (132). A partir deste método é possível extrair ADN genómico e mitocondrial de diferentes amostras, tais como zaragatoas bucais, cabelo, fluidos corporais, manchas de sangue e outros. A possibilidade de obtenção de ADN total a partir de amostras pequenas, com pouco volume ou depositadas em substratos ricos em contaminantes constitui uma das principais vantagens da utilização do referido método (57, 133).

Com vista ao controlo do risco de contaminação durante a manipulação das amostras, decidiu extrair-se o ADN em grupos de dez (130). Ao pó de cada amostra colocado num tubo *ependorf* e pesado previamente (peso até 100 mg dependendo da quantidade disponível) adicionou-se 360 μ L de *buffer* ATL (promove a lise e purificação do ácido nucleico) e 20 μ L de proteinase K (visa romper as paredes celulares). A acção do detergente e da proteinase garante a desnaturação e digestão proteica, resultando na ruptura das células e dissolução das membranas, permitindo a libertação dos ácidos nucleicos (58). Como controlo negativo da extracção colocaram-se os reagentes num tubo, de modo a detectar a presença de ADN exógeno. A incubação dos tubos selados ocorreu a 56°C durante 12 horas, ao final das quais se centrifugou para remover quaisquer bolhas de ar presentes.

Foi preparada, previamente, uma alíquota contendo para cada amostra 300 μ L de *buffer* AL e 1 μ L de ARN (ácido ribonucleico) *carrier* (torna a lise mais eficiente e é resultante da dissolução de 1 μ g de RNA para 300 μ L de *buffer* AL, segundo as indicações do fabricante). Foi distribuída pelas várias amostras, seguida de agitação por 10 segundos no vórtex, termo-agitação durante 10 minutos a 900 rpm (HLC Biotech[®] - fig. 10) e centrifugação a 14000 rpm (Scanspeed 1524[®]), durante 1 minuto. No final, transferiu-se o sobrenadante para um novo *ependorf* com pipeta descartável. Ao lisado adicionou-se 150 μ L de etanol a 100% (é importante para a ligação do ADN à membrana de sílica que nesta etapa se obtenha uma solução homogénea), seguida de nova centrifugação rápida para remoção de bolhas de ar. Finalmente, passou-se o lisado para uma coluna QiAamp, colocada antecipadamente num tubo de 2 ml, e seguiu-se a lavagem da membrana, de forma sucessiva, com 600 μ L de *buffer* AW1, 700 μ L de *buffer* AW2, 700 μ L de etanol a 100%. A introdução de cada reagente foi seguida da centrifugação a 800 rpm durante 1 minuto, confirmação da passagem da totalidade da solução e colocação da coluna num novo

tubo de 2 ml. Com intuito de secar totalmente a membrana, uma vez que o etanol poderá interferir com as etapas subsequentes, procedeu-se a nova centrifugação a 14000 rpm durante 3 minutos, nova transferência da coluna para um tubo *ependorf* de 1,5 ml e incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente. Por último, colocou-se 30 μ L de *buffer* ATE no centro da membrana, incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugou-se a 14000 rpm também por 1 minuto.



Fig. 10 – Banho em termo-agitação durante 10 minutos a 900 rpm (HLC Biotech®)

A transferência da amostra para diferentes colunas constitui uma das desvantagens deste procedimento, visto aumentar o risco de erro ou contaminação.

Neste trabalho, as amostras foram armazenadas em arca frigorífica a -20°C, evitando assim flutuações de temperatura e humidade relacionadas com a possibilidade de degradação do ADN.

Extracção de ADN das amostras de referência pelo método de Chelex 100

Este método foi descrito pela primeira vez em 1991, sendo amplamente utilizado na área da Genética Forense, dado possuir menor número de passos, comparativamente com outros métodos de extracção. Por outro lado, tem como desvantagem o facto de não ser tão eficiente na eliminação de inibidores da PCR (133).

O chelex é uma resina quelante com grande afinidade para iões polivalentes, como o magnésio, garantindo a inactivação das nucleases responsáveis pela deterioração do ADN.

Neste estudo, para a extracção de ADN a partir de amostras seguras, obteve-se dos mesmos dadores um esfregaço da mucosa jugal com zaragatoa (fig. 11). Cortou-se 3 mm de cada zaragatoa bucal para um tubo *ependorf*, devidamente identificado com número da amostra, data e método utilizado (entre cada utilização, procedeu-se à desinfecção da tesoura e pinça com hipoclorito de sódio a 7-8% – lixívia diluída em água destilada na proporção 1:2, seguida da secagem com papel absorvente), à qual se adicionou 1 ml de água desionizada e autoclavada (tendo o cuidado para não tocar no tubo) e permaneceu à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Seguidamente, centrifugou-se a 11400 rpm por 3 minutos, provocando a separação da solução em fases, o que permitiu decantar o sobrenadante e deixar o ADN com maior peso molecular no fundo do tubo (cerca de 50 μ L). Ao precipitado foi acrescentado 150 μ L de chelex 5% (em agitação para evitar a deposição da resina) e, por último, colocou-se no vórtex durante 5 a 10 segundos, seguido do banho à temperatura de 56°C (30 minutos) e fervura (8 minutos) – a temperatura de 100°C garante a desnaturação do ADN, a ruptura das membranas e a destruição das proteínas celulares (58). Foi novamente homogeneizado e centrifugado a 11400 rpm durante 2 minutos, com vista à deposição do chelex e restos celulares. Uma vez que a amplificação não decorreu no mesmo dia, a solução contendo ADN genómico foi congelada a uma temperatura de - 20°C, de forma a garantir a inactividade das nucleases (58).



Fig. 11 – Etapa de recolha das amostras de referência: esfregaço da mucosa jugal com zaragatoa

1.2.2.4 Quantificação

O procedimento utilizado foi o recomendado pela *DNA Advisory Board* (standard 9.4) (134), visando aferir a quantidade (73) e a qualidade do ADN extraído, antes de proceder às etapas subsequentes de análise do ADN, por forma a garantir a qualidade dos resultados, principalmente nos casos baseados em amostras degradadas ou com baixo número de cópias de ADN (70, 71).

Neste estudo utilizou-se o Quantifiler[®] Human DNA Quantification *kit* (Applied Biosystems[™]), como método de quantificação por qPCR, dado ser altamente específico para o ADN humano e graças à sua sensibilidade ser capaz de detectar quantidades tão ínfimas como 32 pg, num volume de 2 μ L de amostra (135).

Para a quantificação decorrem em paralelo e em simultâneo dois ensaios: no primeiro ocorre a amplificação da sequência de ADN (*primers* específicos para o ADN humano) e a detecção da sequência amplificada (sonda TaqMan[®] MGB marcada com o fluorocromo FAM[™] específica para o *locus* do hTERT) e um segundo ensaio, que constitui um *Internal Positive Control* (IPC), capaz de amplificar, através dos *primers* específicos para esta sequência, e detectar uma sequência de ADN não humana (sonda TaqMan[®] MGB marcada com o fluorocromo VIC[™]) introduzida com uma concentração precisa (83).

A utilização do IPC valida os resultados negativos, confirmando o desempenho de todos os componentes do sistema e indicando a presença de inibidores da PCR que conduzem à fragmentação do ADN (107). A simultaneidade da análise da quantificação do ADN da amostra e do IPC possibilita a detecção de amostras sem ADN genómico, quando não existe uma amplificação de ADN genómico e uma amplificação correcta do IPC, e a presença de inibidores da reacção de PCR, quando nenhuma amplificação é bem sucedida (135).

Preparou-se uma alíquota contendo para cada amostra 5.25 μ L de Quantifiler *human primer mix* e 6.25 μ L de Quantifiler PCR *reaction mix*. Esta mistura foi homogeneizada no vórtex e centrifugada. Distribuiu-se por cada um dos poços um volume de 11.5 μ L, ao qual se adicionou 1 μ L de ADN de cada amostra. No controlo positivo colocou-se um perfil conhecido (sequência de ADN *standard* com boa qualidade, de forma a possibilitar a identificação de qualquer falha no

procedimento) e no controlo negativo (uma amostra sem material biológico - *buffer* TE).

Selou-se cuidadosamente, com plástico adesivo transparente (Optical Adhesive Cover), a placa MicroAmp[®] Optical com a ajuda de um aplicador de plástico (Applied Biosystems[™]), de modo a evitar a evaporação durante a PCR. Agitou-se na centrifugadora de placas (Heraeus Labofuge 400 – fig. 12), para remoção de quaisquer bolhas existentes, para posteriormente ser quantificada por qPCR. Os *kits* utilizados foram desenvolvidos e validados para serem utilizados no ABI PRISM[®] 7000 (fig. 13) e ABI PRISM[®] 7900HT. O programa de amplificação consistiu numa etapa inicial de desnaturação a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60° por um minuto.



Fig. 12 – Centrifugadora de placas - Heraeus Labofuge 400



Fig. 13 – Imagem do ABI PRISM 7000, para a quantificação por PCR em tempo real

A análise dos dados foi realizada pelo *software* específico ABI Prism[®] 7000 Sequence Detections System (SDS), que calculou a quantidade de ADN presente em cada amostra.

1.2.2.5 Amplificação

No contexto da Genética Forense, em que a condição dos vestígios nem sempre é a desejável, a amplificação possibilitou a análise do ADN de forma sensível, rápida e dependente da quantidade ou qualidade da amostra. No âmbito da identificação, esta etapa precede a obtenção de perfis genéticos (136).

Dada a sensibilidade dos *kits* utilizados (como por exemplo: AmpF ℓ STR[®], Identifiler[™], AmpF ℓ STR[®] Identifiler plus[™], AmpF ℓ STR[®] NGM[™] e

AmpF ℓ STR[®] NGM SElect[™]), ao permitir a amplificação em poucos minutos de quantidades consideráveis de ADN, torna-se essencial o controlo do risco de contaminação cruzada (137, 138). Deve ser assegurado o risco de contaminação através do uso permanente de luvas com troca constante, encerramento de quaisquer tubos logo após a sua utilização para impedimento da libertação de aerossóis e manipulação dos reagentes com todo o cuidado necessário.

Em resumo, o sucesso desta técnica, independentemente do *kit* utilizado, depende dos seguintes elementos:

1. sequência de ADN genómico conhecida, idealmente de 100-500 nucleótidos;
2. *primers* – sequência de oligonucleótidos sintéticos capazes de se ligarem à cadeia de ADN e complementares à extremidade 3’;
3. ADN polimerase catalisadora da extremidade 5’ para 3’;
4. desoxiribonucleótidos trifosfato;
5. ciclo térmico composto por uma fase de desnaturação, de *annealing* e de extensão;
6. tubo de reacção química, fisicamente compatível com os ciclos de temperatura (137).

Amplificação de amostras seguras ou com muito ADN com os *kits* AmpF ℓ STR[®] Identifiler[™] e Amp ℓ FSTR[®] Identifiler[™] Plus

A etapa de preparação das amostras para PCR foi executada numa câmara de fluxo laminar, na sala pré-PCR, previamente descontaminada por radiação UV, bem como os tubos utilizados (*thin wall* 0.2 ml PCR tubes) (fig. 14).

Para este tipo de amostras seleccionaram-se os *kits* AmpF ℓ STR[®] Identifiler[™] e Amp ℓ FSTR[®] Identifiler[™] Plus (Applied Biosystems[™]), que amplificam os 13 marcadores de STR indicados pelo CODIS (*Combined DNA Index System*), mais dois - D2S1338 e D19S433 (a combinação destes 15 marcadores é consistente com as recomendações da maioria das bases de dados mundiais) (139, 140) (tabela 7).

O *kit* Amp ℓ FSTR[®] Identifiler[™] Plus é uma evolução do *kit* Amp ℓ FSTR[®] Identifiler[™], que acrescenta maior poder discriminatório, maior sensibilidade e

consistência aos resultados, com melhor *performance* perante inibidores da amostra e *primers* que minimizam a presença de artefactos nos electroferogramas (140).

Tabela 7 – Listagem dos marcadores de STRs que compõem os painéis – *standard* de instituições internacionais.
Fonte: Pinheiro MF, 2010

	EUA (CODIS)	EUROPA (European Standard Set UE ¹)	INTERPOL (Interpol Standard Set of Loci ISSOL)
CSF1PO	+		
FGA	+	+	+
TH01	+	+	+
TPOX	+		
VWA	+	+	+
D3S1358	+	+	+
D5S818	+		
D7S820	+		
D8S1179	+	+	+
D13S317	+		
D16S539	+	+	+
D18S51	+	+	+
D21S11	+	+	+
D2S1338		+	
D19S433		+	
D1S1656		+	
D2S441		+	
D12S391		+	
D22S1045		+	
D10S1248		+	
PENTA E			
SE33 ²			
PENTA D			
Amelogenina	+	+	+

¹ Resolução do Conselho da União Europeia 2009/C 296/01 de 30 de Novembro de 2009

² O marcador SE33 é de utilização obrigatória apenas na Alemanha

* Locus que não integra os *core loci*, mas que é de uso recomendado



Fig. 14 - Câmara de fluxo laminar, na sala pré-PCR para amostras seguras

O volume da amostra foi ajustado à concentração recomendada de ADN indicada no *kit*, tendo em conta os resultados da quantificação das amostras em estudo (a concentração recomendada para a utilização destes *kits* está compreendida entre 0.05-0.125 ng/ μ L, sendo o valor óptimo de 1 ng num volume máximo de 10 μ L). Para valores inferiores a 1 ng/ μ L diminuiu-se o volume de TE, aumentando o volume da amostra, de modo a perfazer o volume de 5 μ L. No caso de valores de

quantificação superiores a 1 ng/μL, a amostra foi diluída em água esterilizada, antes de adicionar os 4 μL de *buffer* TE (foi antecipadamente preparado através da mistura 10 mL of 1M Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mL of 0.5M EDTA e 990 mL de água destilada ou desionizada, distribuído em alíquotas e autoclavado). Cada amostra foi centrifugada previamente e o ADN retirado do sobrenadante (139, 140).

Para a amplificação das amostras de referência seguiu-se o mesmo protocolo, colocando 1 μL de volume da amostra.

Preparou-se a *master mix* (dado os volumes de cada reagente serem tão ínfimos, a preparação de uma alíquota garante a homogeneidade dos volumes distribuídos entre as amostras) (141), contendo para cada amostra 5.25 μL de *reaction mix* (MgCl₂, desoxiribonucleótidos trifosfato), 2.75 μL *primer set* (sequência sintética de oligonucleótidos que se liga à região periférica a amplificar) e 0.25 μL de Taq Gold (DNA polimerase - *Thermus aquaticus*, cuja condição é ser estável à temperatura de desnaturação do ADN e se tornar activa após um aquecimento inicial a 95°C durante 10 minutos). O volume total de 7.5 μL dos reagentes foi distribuído por cada um dos tubos MicroAmp[®] e adicionou-se o volume da amostra, no controlo negativo apenas TE e no controlo positivo 9947A (concentração igual a 0.1 ng/μL, de modo a perfazer um volume final 12.5 μL). Todas as amostras foram agitadas no vórtex durante 3 segundos, centrifugadas durante 20 segundos e colocadas no GeneAmp[®] PCR sistema 9700, seguindo o protocolo *standard* de 28 ciclos. Cada ciclo decorreu com temperaturas diferentes: 94°C (desnaturação do ADN – separação das cadeias), 60°C (*annealing* – os *primers* ligam-se à extremidade 3' da sequência de ADN a amplificar) e 72°C (replicação da cadeia de ADN pela ADN polimerase, utilizando os blocos de desoxirribonucleótidos trifosfato), sendo possível ao fim de 3 horas obter, sensivelmente, 67108864 cópias da sequência (tabela 8). Os alelos que compõem o *ladder* do *kit* de AmpF ℓ STR[®] Identifier[™], bem como o genótipo do controlo estão listados na tabela 9 (139, 140).

Tabela 8 – Programa de PCR executado

Incubação inicial	28 ciclos			Extensão final	Pausa final
	Desnaturação	<i>Annealing</i>	Extensão		
PAUSA	CICLOS			PAUSA	PAUSA
95° C 11 minutos	94° C 1 minuto	59° C 1 minuto	72° C 1 minutos	60° C 60 minutos	4° -25°C indefinido

Tabela 9 - Kits de AmpFSTR® Identifiler™ e AmpFSTR® Identifiler™ Plus com loci e respectivos alelos. Fonte: Retirado de http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041201.pdf e http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_076395.pdf (acedido a 18/08/12)

Designação do locus	Cromossoma	Alelos incluídos no ladder do Identifiler	Fluorocromo	Controlo de ADN 9947A
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™	13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		30
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 12
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC®	14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		8, 9.3
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11, 12
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		19, 23
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED™	14, 15
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17, 18
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		8
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		15, 19
Amelogenina	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET®	X
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		23, 24

Amplificação de amostras com pouco ADN com os kits AmpFSTR® NGM e AmpFSTR® NGM Select™

O kit AmpFSTR® NGM Select™ amplifica os 15 loci e o locus da amelogenina do AmpFSTR® NGM™, conjuntamente com o locus altamente polimórfico SE33. Ambos congregam o aumento da sensibilidade da técnica à nova formulação do buffer (com melhor performance em amostras que contenham inibidores da PCR) e loci mais concentrados em zonas do perfil com baixo peso molecular (142), o que permite a obtenção de perfis completos em amostras degradadas e/ou com pouca quantidade de ADN (143).

A etapa de preparação das amostras para PCR foi executada numa câmara de fluxo laminar, na sala pré-PCR. Preparou-se a *reaction mix* contendo para cada amostra 10 µL de *master mix* (enzimas, sais, dNTPs, *carrier* e 0.05% azida de sódio), 5 µL *primer set* (amplifica as regiões *target* do ADN), agitou-se fortemente no vórtex, centrifugou-se e repartiu-se 15 µL da mistura por cada tubo. No controlo negativo colocou-se 10 µL de TE e no positivo 10 µL de controlo 007 (concentração igual a 0.1 ng/µL, para atingir 1.0 ng de ADN total desejado). O volume das amostras foi determinado em função dos resultados da quantificação obtidos e atendendo à concentração de ADN indicada para este *kit* (0.10 ng/µL para 29 ciclos de PCR ou 0.05 ng/µL para 30 ciclo); uma vez que os resultados da quantificação foram todos inferiores a 0.0524 ng/µL, o volume final para todas elas foi de 10 µL.

Centrifugou-se a mistura durante 20 segundos para remoção de eventuais bolhas de ar existentes antes de colocar no termociclador, seguindo-se o programa de ciclos indicado na tabela (tabela 10). Os alelos que compõem o *ladder* dos *kits* AmpliFSTR® NGM™ e AmpliFSTR® NGM SElect™, bem como o genótipo do controlo estão listados na tabela 11 (134, 143).

No final do ciclo preservaram-se as amostras a uma temperatura entre -10 e -25°C. Se o período de armazenamento tivesse sido inferior a duas semanas, bastaria estar fora da luz e a uma temperatura compreendida entre 2 a 8°C.

Tabela 10 – Programa de PCR executado

Incubação inicial	29/30 ciclos		Extensão final	Pausa final
	Desnaturação	Annealing		
PAUSA	CICLOS		PAUSA	PAUSA
95º C 11 minutos	94º C 20 segundos	59º C 3 minuto	60º C 10 minutos	4º C ∞

Tabela 11 – Kits de Amp ϵ FSTR[®] NGM[™] e Amp ϵ FSTR[®] NGM SElect[™] com *loci* e respectivos alelos.
 Fonte: Retirado de: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_094068.pdf e
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_089008.pdf (acedido a 20/08/12)

Designação do <i>locus</i>	Localização cromossoma	Alelos incluídos no <i>ladder</i> do Identifiler	Fluorocromo	Controlo ADN 9947A
D10S1248	10q26.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	6-FAM [™]	12, 15
vWA	12p13.31	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		14, 16
D16S539	16q24.1	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		9, 10
D2S1338	2q35	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		20, 23
Amelogenina	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	VIC [®]	X, Y
D8S1179	8q24.13	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19		12, 13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		28, 31
D18S51	18q21.33	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		12, 15
D22S1045	22q12.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	NED [™]	11, 16
D19S433	19q12	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2		14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		7, 9.3
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		24, 26
D2S441	2p14	9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16	PET [®]	14, 15
D3S1358	3p21.31	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19		15, 16
D1S1656	1q42.2	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3		13, 16
D12S391	12p13.2	14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		18, 19
SE33*	6	4.2, 6.3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20.2, 21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35, 35.2, 36, 37		17, 25.2

* Presente apenas no kit Amp ϵ FSTR[®] NGM SElect[™]

1.2.2.6 Detecção dos polimorfismos STRs

Os marcadores de STR obtidos a partir da PCR têm de ser separados, de forma a distinguir cada um dos alelos. Cada alelo heterozigótico é separado em função do seu peso molecular, possibilitando a obtenção de perfis genéticos.

O processo da electroforese ocorre uma vez que os grupos fosfato perdem um radical H^+ , ficando as moléculas de ADN carregadas negativamente e, quando sujeitas à corrente eléctrica, afastam-se do eléctrodo negativo (cátodo), migrando em direcção ao eléctrodo positivo (ânodo). Existem dois tipos de electroforese: electroforese em gel e capilar. Neste procedimento utilizámos este último método, cujas principais vantagens são: permitir a análise em simultâneo de várias amostras, necessitar de pequenas quantidades de amostra e por último o processo de separação decorrer em minutos, graças à elevada voltagem aplicada (58).

As amostras foram transferidas para os capilares, do ABI Prism[®] 3130 Genetic Analyzer, com cerca de 36 cm de comprimento e 50 μm de diâmetro que contém no seu interior um meio viscoso de um polímero de polidimetilacrilamida (POP-6 - *Performance Optimized Polymer 6*, formulação mais concentrada comparativamente com POP-4) (144-146) capaz de separar de 1 a 400 nucleótidos. Os fragmentos de ADN amplificados, marcados com fluorocromos, e o *standard* interno migram, quando são sujeitos à corrente eléctrica (15 Kv) por 5 a 10 segundos e passam numa janela detectora, onde um laser de árgon-ion de 488 nm excita os fluorocromos ligados à extremidade 5' da cadeia. O comprimento de onda da fluorescência emitido permite detectar e dimensionar os fragmentos de ADN (75), que são agrupados em função das quatro cores correspondentes aos quatro fluorocromos (6-FAM[™] para o azul com menor comprimento de onda, VIC[™] para o verde, NED[™] para o amarelo e PET[™] para o vermelho), convertendo-se num gráfico. Apesar de cada um dos fluorocromos produzir um máximo de fluorescência para cada comprimento de onda, pode sempre ocorrer, entre fluorocromos, algum *overlap* na emissão do espectro.

O electroferograma obtido para cada amostra é analisado por um *software* que determina o tamanho de cada alelo, baseado no *standard* interno (contém fragmentos de ADN com tamanhos conhecidos) (144). A identificação do perfil genético resulta da comparação, para cada STR, do alelo obtido da amostra e o

alelo presente no *ladder* (constituído pelos alelos frequentes nas populações estudadas). O perfil genético obtém-se, assim, pela combinação dos genótipos de todos os *loci*, que deve ser interpretado seguindo critérios de orientação na análise dos electroferogramas.

Neste trabalho, os marcadores com limite da análise <50 RFU foram analisados com cuidado acrescido, quando as amostras não correspondiam às de referência, o limite estocástico mínimo considerado foi de 150 RFUs (147). Os perfis foram considerados completos, quando apresentavam a totalidade dos marcadores presentes em cada um dos *kits*, e perfis incompletos quando apresentavam marcadores ausentes (que correspondiam, normalmente, aos de maior peso molecular) ou desequilíbrio acentuado nos dois alelos para um locus heterozigótico.

Deteção de STRs amplificados com os *kits* AmpF ℓ STR[®] Identifiler[™] e Amp ℓ FSTR[®] Identifiler[™] Plus

Para a deteção dos polimorfismos de STRs preparou-se uma mistura contendo para cada amostra 12 μ L de HiDI[™] formamida desionizada (Applied Biosystems[™]), 0.5 μ L de um *standard* interno Gene-Scan-120 LIZ 500 *standard* (Applied Biosystems[™]), que contém 16 fragmentos de tamanho compreendido entre 35 e 500 pb (35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490, 500 nucleótidos), está marcado com fluorocromo de cor diferente e corre em simultâneo com cada amostra para calibrar o seu tamanho (144, 148). O volume de 12.5 μ L foi distribuído por cada um dos poços, ao qual se adicionou 1 μ L do produto amplificado.

A formamida é uma solução desnaturante, capaz de romper as pontes de hidrogénio entre as cadeias complementares dos produtos da PCR, interagindo melhor com o meio (149). Esta diluição provoca duas situações: a elevada concentração da formamida mantém, por um lado, as cadeias de ADN desnaturadas e, por outro, impede que os iões cloro e metanoato compitam com o ADN, já que diminui, por diluição, a força iónica, facilitando a electrocinética da injeção das amostras (149).

O *ladder* foi colocado em primeiro lugar na placa, no ABI Prism[®] 3130 Genetic Analyzer, para calibrar a migração do ADN (condição necessária à fiabilidade da análise das amostras) e os controlos positivo e negativo em último.

Inicialmente, as amostras foram sujeitas a uma temperatura de 95°C, durante 3 minutos, para promover a desnaturação das cadeias. A corrida decorreu durante 30 minutos a uma temperatura constante de 60°C, facto importante para a elevada precisão e resolução do processo (146). Os dados recolhidos foram analisados no ABI Prism 3130 GeneScan Analysis *software*, para obtenção do electroferograma, a partir do qual se recolheu o perfil genético.

Detecção de STRs amplificados com os *kits* Amp[®] FSTR[®] NGM e Amp[®] FSTR[®] NGM SElect[™]

Preparou-se uma alíquota contendo para cada amostra 0.5 µL GeneScan[™] 600 LIZ[™] *size standard* V2.0 marcado com fluorocromo de cor diferente (contém fragmentos de tamanho variável: 60, 80, 100, 114, 120, 140, 160, 180, 200, 214, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 314, 320, 340, 360, 380, 400, 414, 420, 440, 460) e 9.5 µL de HiDi[™] formamida. Agitou-se no vórtex, na centrifugadora, para seguidamente se distribuir por cada um dos poços da placa (MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction) 10 µL da mistura e 1 µL do produto da PCR ou *ladder*, no controlo negativo apenas formamida, antes de dar início ao programa de electroforese.

1.3 Resultados

Os resultados obtidos foram inseridos num ficheiro de Microsoft Excel e posteriormente analisados estatisticamente com recurso ao programa IBM SPSS® Statistics, versão 19.

Caracterização geral da amostra

Foram analisados 37 dentes temporários, 21 pertencentes à arcada superior e 16 à arcada inferior. Quanto ao tipo de dente analisado, 17 eram incisivos centrais, 4 incisivos laterais e 16 caninos (tabela 12).

A escolha de dentes anteriores como amostra deveu-se ao facto de se tratarem dos dentes mais comumente guardados pelas famílias.

Tabela 12 – Caracterização da amostra quanto ao tipo de dente analisado

Tipo de dente	Incisivo central	Incisivo lateral	Canino	Total (n)
Arcada superior	12	4	5	21
Arcada inferior	5	0	11	16
Total	17	4	16	37

O tempo de preservação das amostras foi determinado atendendo à idade média dos dentes temporários, segundo a tabela de esfoliação dentária, elaborada por Ripa LW *et al.* e a idade do indivíduo (45).

Para facilitar a análise estatística formaram-se grupos com intervalos de tempo de 5 anos (tabela 14).

Tabela 13 – Caracterização da amostra: Género

Género	Número de amostras
Masculino	6
Feminino	31

Tabela 14 – Caracterização da amostra quanto ao tempo

Tempo de preservação	Número de dentes
]0-5]A	5
]5-10]A	0
]10-15]A	18
]15-20]A	13
]20-25]A	0
]25A	1

Legenda: A – anos

Como se pode observar, 48,6 % (n=18) dos dentes estudados apresentavam um tempo de preservação estimado entre 10 e 15 anos e 35,1% (n=13) entre 15 e 20 anos, donde se conclui que a maioria da amostra apresenta um tempo de preservação superior a 12 anos e pertence ao género feminino (tabelas 13 e 14).

Os resultados abaixo descritos constituirão a base de resposta às questões colocadas enquanto hipóteses em estudo.

Questão 1 – No presente estudo qual a percentagem de perfis completos obtidos a partir do ADN extraído de dentes temporários?

Os perfis genéticos, obtidos a partir da amostra em estudo (n=37), foram analisados segundo critérios de validação dos marcadores. Assim, consideraram-se os perfis completos sempre que apresentavam a totalidade dos marcadores presentes em cada um dos *kits*, e perfis incompletos quando apresentavam marcadores ausentes, tal como referido no material e métodos (150).

Como se pode observar na tabela 15 obteve-se um perfil genético incompleto em 4 casos (10,8%), a partir dos dentes analisados, e um perfil genético completo em 33 casos (89,2%) (com um intervalo de confiança a 95% para a obtenção de perfis completos compreendido entre 86,0% e 92,4%).

Tabela 15 – Frequência e percentagem dos perfis genéticos obtidos

Perfis completos	n	%
não	4	10.8
sim	33	89.2
total	37	100

Questão 2 – É possível obter um perfil genético fidedigno a partir de dentes temporários?

Foi efectuada a comparação entre os perfis genéticos obtidos a partir das amostras de referência (zaragatoas bucais) e dos dentes esfoliados, tendo sido possível confirmar 84,8% (n=28) dos perfis genéticos (tabela 16).

Tabela 16 –Tabela de comparação dos perfis genéticos obtidos a partir dos dentes temporários e das amostras de referência

	Sim	Não	Total
Comparação dos perfis genéticos (amostras de referência / dente)	28	5	33

Questão 3 – Como se distribui a quantificação do ADN no grupo de amostras com perfis completos?

Na análise descritiva da quantificação do ADN foram consideradas apenas as amostras das quais resultaram perfis de ADN completos (n=33), já que o contrário foi considerado insucesso na análise (64).

O valor mínimo da quantificação de ADN extraído a partir dos dentes analisados foi de 0,0017 ng/μL e o valor máximo foi de 154.680 ng/μL. Apesar da quantidade média de ADN obtida ter sido de 23.068 ng/μL, a mediana foi de 4.828 ng/μL, o que significa que 50% da amostra em estudo apresentava valores de quantificação de ADN inferiores a este valor (tabela 17, gráfico 1).

Através da análise do gráfico sublinha-se a existência de dois *outliers* correspondentes às amostras 4 e 8, com os valores 154.68 e 100.71 ng/μL, respectivamente.

Tabela 17 – Análise descritiva da quantificação da ADN

Análise descritiva Quantificação ADN (ng/μL)	Resultados
média	23.068
mediana	4.828
desvio padrão	34.545
intervalo interquartil	35.339
valor máximo	154.680
valor mínimo	0.0017

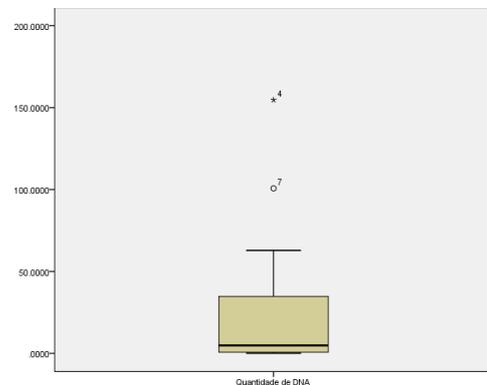


Gráfico 1 – Boxplot relativo à quantificação do ADN (ng/μL) no grupo de dentes com perfis completos (n=33)

No entanto, considerando que o valor óptimo de referência (*cut-off*) da quantificação de ADN para a maioria dos *kits* comerciais utilizados é de 0.1ng/μL, verifica-se que em 21,6 % (n=8) dos casos não foi possível obter um quantificação superior.

Questão 4 – Existe alguma diferença nos resultados da quantificação entre os grupos definidos tendo por base o tempo decorrido desde a esfoliação dentária (< ou ≥ 12 anos) e o género?

Foram comparados os resultados da quantificação entre género e entre os grupos definidos pelo intervalo de tempo decorrido desde a esfoliação (tabela 18, gráficos 2 e 3).

Tabela 18 – Resultados do teste de Mann-Whitney para as variáveis em estudo (tempo decorrido desde a esfoliação dentária e o género)

Grupos em estudo	N	U	<i>p-value*</i>
Intervalo de tempo: < ou ≥ 12 anos	33	116	0.492
Género: masculino/feminino	33	60	0.616

**teste de Mann-Whitney*

Não se verificam diferenças significativas entre os grupos tempo de preservação: < ou ≥ 12 anos (*p-value*: 0.492) e também entre grupos sexo masculino e sexo feminino (*p-value*: 0.616).

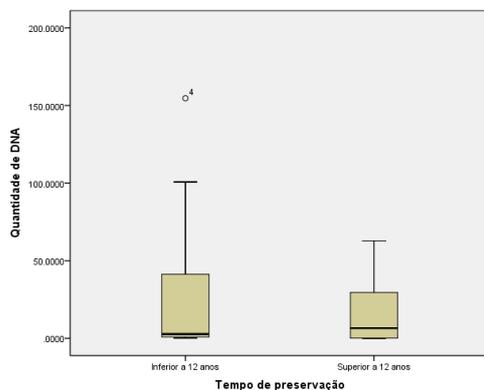


Gráfico 2 - *Boxplot* relativo ao tempo decorrido desde a esfoliação dentária (< ou ≥ 12 anos) (n=33)

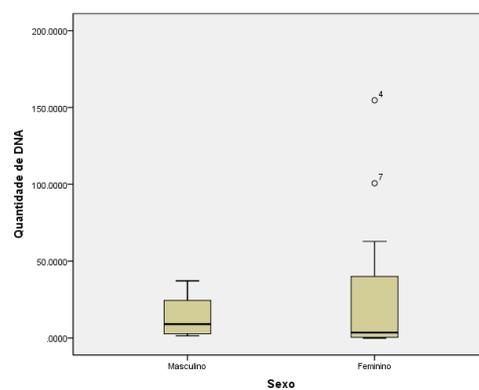


Gráfico 3 - *Boxplot* relativo ao género (n=33)

Questão 5 – Existe alguma correlação entre o tempo de preservação da amostra e a quantidade de ADN obtida?

Apenas se consideraram os resultados de quantificação acima de 0.1ng/μL (os sistemas *multiplex* funcionam na máxima eficiência com uma quantidade de ADN igual a 1 ng e 28-30 ciclos de amplificação). Abaixo deste valor

são necessárias metodologias de PCR e pós-PCR que aumentem a sensibilidade da sequenciação (64, 85, 151).

Pelo coeficiente de Pearson verificou-se que as duas variáveis, o tempo e quantificação de ADN têm uma correlação fraca e são inversamente proporcionais. Baseado no conhecimento do período de armazenamento, é possível prever com precisão a quantidade do ADN em 7.4% dos casos (tabela 19).

Tabela 19 – Correlação entre o tempo de preservação das amostras e quantidade de ADN obtida

	Média	Desvio padrão	N
Resultados da quantificação (ng/μL)	26.240	35.747	29
Tempo de preservação (anos)	11.835	4.811	29

	r^2	correlação Pearson	<i>p-value</i>
Quantidade de ADN / tempo	0.074	-0.271	0.077

1.4 Discussão

Neste estudo foi possível obter perfis completos em 89.2% das amostras, com um intervalo de confiança de 95% compreendido entre 86.0% e 92.4%. Nos perfis incompletos não foram encontrados marcadores suficientes para validar as amostras, à exceção das amostras 51 e 52 (anexo 3).

Na análise dos perfis foram considerados marcadores inferiores a 50 RFU, uma vez existirem amostras de referência, os alelos encontrarem-se bem definidos, com picos nítidos e ausência de ruído. Se se tratasse de amostras reais poder-se-ia aumentar o tempo, a quantidade da amostra ou repetir a amplificação.

Os valores de quantificação das amostras em estudo são superiores a 0,1ng/μL em 78.4% (correspondentes a 29 amostras), viabilizando a amplificação com os *kits* utilizados. Os resultados obtidos na quantificação do ADN podem dever-se à presença de odontoclastos, células gigantes e polinucleares (com 30 ou mais núcleos). Estas células são responsáveis pelo processo de esfoliação dentária, sendo facilmente observadas em cortes histológicos. Uma vez que se localizam em concavidades ou lacunas (lacunas tipo de Howship) presentes nas superfícies dentinárias, podem permanecer preservadas de factores ambientais (figs. 15 e 16).

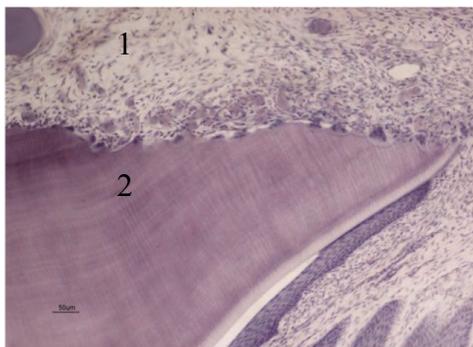


Fig. 15 – Aspecto em microscopia de luz de um dente em fase de esfoliação dentária (1 – polpa; 2 – dentina), pondo em evidência a presença de numerosos odontoclastos nas suas respectivas lacunas. Corte histológico de material descalcificado corado com HE (Hematoxilina/Eosina), com ampliação de 10x no original. Imagem gentilmente cedida pelo Instituto de Histologia e Embriologia da FMUC.

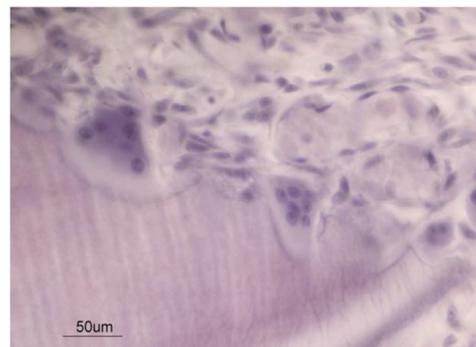


Fig. 16 – Aspecto em microscopia de luz de odontoclastos presentes em lacunas tipo de Howship na dentina. Corte histológico de material descalcificado corado com HE, com ampliação de 20x no original. Imagem gentilmente cedida pelo Instituto de Histologia e Embriologia da FMUC.

Decorrente da esfoliação, o dente pode ainda conter tecido pulpar intacto mesmo após se ter dado a desintegração/apoptose dos odontoclastos e, paralelamente, a deposição de um tecido tipo cimento pelas células pulpares (1). Acresce ainda a possibilidade deste processo ocorrer de forma relativamente traumática, podendo da estrutura dentária constar parte da porção radicular, levando a um acréscimo da quantidade dos tecidos dentários presentes e, eventualmente, influenciando os resultados da quantificação de ADN obtidos a partir das amostras em estudo.

Não é consensual na literatura o modo como os factores ambientais e o tempo afectam ou influenciam os resultados da quantificação do ADN. Pötsch, em 1992, obteve valores de quantificação compreendidos entre 6-50 μg a partir de 48 dentes armazenados em diferentes condições ambientais e intervalos de tempo variáveis. Destes grupos faziam parte: dentes extraídos e armazenados à temperatura ambiente durante seis semanas e quatro anos; dentes recolhidos de casos forenses (três de corpos queimados, dois de corpos putrefactos e três de corpos que sofreram morte violenta); dez dentes de fragmentos de mandíbula armazenados à temperatura ambiente, durante 15 anos após acidente aéreo. Foi-lhe possível constatar que os valores de quantificação não dependiam do tipo de dente ou das características do dador (idade, sexo), bem como do tempo ou das condições de preservação (110). Já Hanaoka, em 1995, conseguiu valores de quantificação de ADN entre 3-40 μg , a partir da polpa de 50 dentes, não encontrando qualquer correlação com o tempo de armazenamento (113).

Em 1999, Schultes conseguiu amplificar marcadores de STR do cromossoma Y presentes em restos ósseos e sedimento de dentes com 1500 anos e depreendeu não ser o tempo o factor determinante visto não existir uma relação directa entre este factor e a deterioração do ADN, mas sim as condições ambientais de preservação, ainda que não seja possível travar o processo de degradação química, mesmo em circunstâncias óptimas (152, 153).

A noção de que o tempo não constitui o factor decisivo é corroborada pelos vários casos de achados arqueológicos, nos quais foi possível amplificar o ADN presente nas peças dentárias, tornando viável a identificação do sexo e a sequenciação parcial do perfil do indivíduo em causa (101, 107).

A degradação do ADN resultante da deaminação espontânea, da hidrólise das pontes glicosídicas, da metilação, da hidroxilação e dimerização da timina induzida pela radiação ultravioleta (109), está relacionada com o aumento do tempo *postmortem* e conduz à diminuição da quantidade do ADN disponível (94). O efeito do processo de degradação na morfologia e integridade molecular dos tecidos dentários não é totalmente conhecido e, apesar de existirem grupos a estudar a degradação das biomoléculas do tecido ósseo durante o intervalo *postmortem*, não é possível extrapolar as suas conclusões para os dentes dado tratar-se de tecidos morfológica e bioquimicamente distintos, ainda que ambos sejam tecidos mineralizados (109). A diminuição da quantidade de ADN endógeno com o aumento do tempo *postmortem* foi também a conclusão obtida por Kitayama (130).

No presente estudo, constatou-se uma correlação tendencialmente significativa entre a quantificação do ADN e o tempo decorrido desde a esfoliação do dente, relacionando-se de modo inversamente proporcional (*p-value*: 0.077, coeficiente de Pearson: - 0.271). Os resultados da quantificação obtidos estiveram compreendidos entre 0.0017 e 154.68 ng/μL.

Foi verificada a existência de dois *outliers* (amostras 4 e 8), cujos resultados foram, respectivamente, 154.68 ng/μL e 100.71 ng/μL; este facto pode ter estado relacionado com a remoção incompleta e posterior desidratação do conteúdo pulpar ou provir da própria qualidade do ADN presente nas amostras (anexo 4).

Na amostra 23, armazenada há 11.4 anos, o valor da quantificação conseguido foi de 0.0034 ng/μL, resultando num perfil incompleto de ADN (os 5 marcadores ausentes correspondem aos STRs de maior peso molecular – D16S539, D2S1338, D18S51, FGA, D12S391). No entanto, das amostras 24 e 25, de igual dador, armazenadas há 11.4 e 15.4 anos respectivamente, obtiveram-se valores de quantificação de 0.0017 e 0.0524 ng/μL e a obtenção completa dos perfis genéticos. A razão da discrepância dos resultados pode dever-se a uma variação na qualidade, mais do que na quantidade de ADN presente. No caso particular da amostra 24, e quando em comparação com a amostra 23, apesar da primeira evidenciar menor valor de quantificação, não existir qualquer diferença no que respeitou o tempo e condições de armazenamento, resultou num perfil completo para o *kit* AmpℓFSTR® NGM SElect™ (anexo 4).

Sendo a quantificação um método não totalmente preciso, é importante sublinhar a não reprodutibilidade dos resultados obtidos, isto é, a repetição da análise conduz, por norma, a valores aproximados, mas não necessariamente iguais. Desta forma, e conseqüentemente, revela-se importante a avaliação global e comparativa dos valores da quantificação das várias amostras referentes a um mesmo indivíduo.

No caso da fonte de ADN proceder de tecidos dentários existe, ainda, uma variação dependente do local da sua extracção (nos dentes definitivos a maior quantidade está concentrada no ápex e na coroa dentária) (112). No presente estudo, por se utilizarem apenas dentes temporários esfoliados somente se procedeu à extracção da porção coronária.

Relativamente à avaliação dos perfis resultantes de valores de quantificação $< 0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ em 8 amostras (anexo 3) (codificadas com os números 23, 24, 25, 44, 46, 49, 51, 52), obtiveram-se perfis completos em 4 delas; da amostra 46, cujo valor de quantificação foi igual a $0.061 \text{ ng}/\mu\text{L}$, foi possível conseguir um perfil completo, utilizando o *kit* Amp ℓ FSTR[®] Identifiler[™] - Applied Biosystems[™] como *kit* de amplificação; para as restantes, os *kits* de amplificação escolhidos, foram o Amp ℓ FSTR[®] NGM e Amp ℓ FSTR[®] NGM SElect[™], atendendo à sua *performance* na análise de amostras degradadas/contaminadas. Neste último grupo foi possível obter um perfil completo nas amostras 24, 25 e 44 (anexos 2 e 3).

Em Genética Forense a degradação de amostras pode ser devida a vários factores, entre os quais a presença de inibidores, o baixo número de cópias de ADN e, ainda, a degradação/lesão do ADN (52). Não se podem considerar amostras degradadas, apesar do valor de quantificação ser inferior a $0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$, quando é possível aplicar metodologias convencionais para a obtenção de perfis (como sucedeu com a amostra 46).

A vantagem da utilização de amostras directas deve-se a um menor número de *loci* necessários para validar a identificação. Dentro deste grupo, a utilização de dentes (na literatura consultada está descrita a identificação genética a partir de 3º molares e dentes temporários extraídos) beneficia ainda das condições favoráveis à preservação do ADN (101). Assim, os dentes temporários esfoliados podem constituir uma amostra de referência alternativa.

Limitações do estudo

No presente trabalho verificou-se que uma das limitações da utilização dos dentes temporários esfoliados como amostras de referência é o facto de não ser possível assegurar com certeza a sua origem, podendo pertencer a um outro dador, como um irmão, conduzindo a um processo de identificação erróneo (caso das amostras 17, 20, 30, 40, 41).

Uma limitação relativa deste estudo é a total destruição da peça dentária, impedindo *a posteriori* a sua análise morfológica. No caso particular dos dentes temporários, a avaliação das características anatómicas não tem grande utilidade na identificação do indivíduo jovem (em que faltam elementos morfológicos identificativos), dada a mutabilidade na mudança das duas dentições (não é fácil precisar a ficha dentária de uma criança, particularmente em fase de dentadura mista), o menor dimorfismo sexual, comparativamente com a dentição definitiva e estes dentes carecerem de elementos anatómicos individualizantes (154).

1.5 Conclusões

Em conclusão, relativamente às questões elaboradas como objectivos deste trabalho, e respeitando as limitações inerentes a este tipo de estudos, poderemos afirmar que:

A. Os resultados deste estudo permitem concluir que é possível obter perfis completos, com pelo menos 15 marcadores de STR e amelogenina, a partir de dentes temporários esfoliados.

B. Podem constituir uma amostra fidedigna, uma vez ter sido possível confirmar os perfis genéticos resultantes dos dentes temporários com as amostras de referência.

III - Perspectivas futuras

Após a revisão da literatura e da realização do estudo, é possível afirmar que os dentes temporários esfoliados podem ser uma alternativa como amostra de referência, no âmbito da identificação genética forense. No entanto, e uma vez que estas amostras se encontram muitas vezes degradadas, poder-se-iam utilizar marcadores com menor peso molecular, como por exemplo: miniSTRs e SNPs, que possibilitariam uma análise mais completa e fidedigna deste tipo de amostras (64).

Através do envelhecimento artificial das amostras, seria interessante saber qual o intervalo de tempo limite, a partir do qual não se consegue obter perfis completos, com os *kits* utilizados.

IV – Bibliografia

1. Nanci A. Dentin-pulp complex. Ten Cate's Oral Histology: development, structure and function. . 6th ed: Elsevier Health Science; 2003.
2. Ferraris G MC. Histologia y Embriologia Bucodental. Madrid: Editorial Medica panamericana; 1999.
3. Thesleff I TM. Tooth organogenesis and regeneration. StemBook 2009 [serial on the Internet]. 2009; (15/05/12): Available from: <http://www.stembook.org/node/551>.
4. Ramos JC. Protecções Pulpares Directas. Avaliação histológica e clínica. Coimbra: Coimbra University; 2007.
5. Wheeler PR Burkitt HG DV. Wheather Histologia Funcional. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan S.A.; 1994.
6. Tilotta F, Brousseau P, Lepareur E, Yasukawa K, de Mazancourt P. A comparative study of two methods of dental pulp extraction for genetic fingerprinting. Forensic Sci Int. 2010 Oct 10;202(1-3):e39-43.
7. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):5807-12.
8. Avery JK SP, Avery N. Structure and function of the teeth 3rd ed. New York: Thieme Publishers; 2001.
9. Angker L, Swain MV, Kilpatrick N. Micro-mechanical characterisation of the properties of primary tooth dentine. J Dent. 2003 May;31(4):261-7.
10. Goldberg M, Six N, Decup F, Buch D, Soheili Majd E, Lasfargues JJ, et al. Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. Adv Dent Res. 2001 Aug;15:91-5.
11. Mjor IA, Sveen OB, Heyeraas KJ. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. Quintessence Int. 2001 Jun;32(6):427-46.
12. Smith BC, Fisher DL, Weedn VW, Warnock GR, Holland MM. A systematic approach to the sampling of dental DNA. J Forensic Sci. 1993 Sep;38(5):1194-209.
13. Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. J Biol Chem. 2006 Sep 29;281(39):29002-10.
14. Katchburian E AV. Histologia e Embriologia Oral. Texto - Atlas - Correlações Clínicas. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
15. Grayson WM, Jr. Dentin: Microstructure and characterization. Quintessence Int. 1993;24(9):606-17.
16. Mornstad H, Pfeiffer H, Yoon C, Teivens A. Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. Int J Legal Med. 1999;112(2):98-100.
17. Agematsu HW, H.; Yamamoto, H.; Fukayama, M.; Kanazawa, T.; Miake, K.; . Scanning electron microscopic observations of microcanals and continuous zones of interglobular dentin in human deciduous incisal dentin. Bull Tokyo Dent Coll. 1992;31:163-73.

18. Bordin-Aykroyd S, Sefton J, Davies EH. In vitro bond strengths of three current dentin adhesives to primary and permanent teeth. *Dent Mater.* 1992 Mar;8(2):74-8.
19. Sumikawa DA, Marshall GW, Gee L, Marshall SJ. Microstructure of primary tooth dentin. *Pediatr Dent.* 1999 Nov-Dec;21(7):439-44.
20. Nanci AP. Dentin-pulp complex. In: Mosby, editor. *Ten Cate's Oral Histology: development, structure and function* 2003.
21. Gentner MR, Meyers IA, Symons AL. The floor of the pulp chamber following pulpotomy. *J Clin Pediatr Dent.* 1991 Fall;16(1):20-4.
22. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Sep;98(3):376-9.
23. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009 Sep;88(9):792-806.
24. Monteiro J, Day P, Duggal M, Morgan C, Rodd H. Pulpal status of human primary teeth with physiological root resorption. *Int J Paediatr Dent.* 2009 Jan;19(1):16-25.
25. Egan CA, Bishop MA, Hector MP. An immunohistochemical study of the pulpal nerve supply in primary human teeth: evidence for the innervation of deciduous dentine. *J Anat.* 1996 Jun;188 (Pt 3):623-31.
26. Harokopakis-Hajishengallis E. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. *J Oral Sci.* 2007 Mar;49(1):1-12.
27. Tanaka T, Morioka T, Ayasaka N, Iijima T, Kondo T. Endocytosis in odontoclasts and osteoclasts using microperoxidase as a tracer. *J Dent Res.* 1990 Mar;69(3):883-9.
28. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int.* 2002 Jul;71(1):45-52.
29. Wang Z, McCauley LK. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Dis.* 2011 Mar;17(2):129-42.
30. Yao S, Ring S, Henk WG, Wise GE. In vivo expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. *Arch Oral Biol.* 2004 Jun;49(6):451-6.
31. R K. The resorption of the roots of deciduous teeth. *Dent Cosmos.* 1932;74:103-20.
32. Marks SC, Jr., Cahill DR. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Arch Oral Biol.* 1984;29(4):311-22.
33. Suda N, Kitahara Y, Hammond VE, Ohyama K. Development of a novel mouse osteoclast culture system including cells of mandibular body and erupting teeth. *Bone.* 2003 Jul;33(1):38-45.
34. Nakchbandi IA, Weir EE, Insogna KL, Philbrick WM, Broadus AE. Parathyroid hormone-related protein induces spontaneous osteoclast formation via a paracrine cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20;97(13):7296-300.
35. Wise GE, Yao S, Zhang Q, Ren Y. Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin in vitro by rat dental follicle cells and its implications for tooth eruption. *Arch Oral Biol.* 2002 Mar;47(3):247-54.

36. Yao S, Liu D, Pan F, Wise GE. Effect of vascular endothelial growth factor on RANK gene expression in osteoclast precursors and on osteoclastogenesis. *Arch Oral Biol.* 2006 Jul;51(7):596-602.
37. E. H-H. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. *Journal of Oral Science.* 2007;49(1):1-12.
38. Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Suzuki I, Deguchi T, Suzuki K. Odontoclastic resorption at the pulpal surface of coronal dentin prior to the shedding of human deciduous teeth. *Arch Histol Cytol.* 1992 Jul;55(3):273-85.
39. Sahara NO, N.; Toyoki, A; Ashizawa, Y; Degushi, T; Sukuki, K. Odontoclastic resorption of the superficial nonmineralized layer of pre dentine in the shedding of human deciduous teeth. *Cell Tissue Res* 1994;277.
40. Bhaskar SN OJ. *Orban's Oral histology and embryology.* 11th ed. Manila: St Louis: Mosby; 1991.
41. Rapp R, Avery JK, Strachan DS. The distribution of nerves in human primary teeth. *Anat Rec.* 1967 Sep;159(1):89-103.
42. Sari S, Aras S, Gunhan O. The effect of physiological root resorption on repair potential of primary tooth pulp. *J Clin Pediatr Dent.* 1999 Spring;23(3):227-33.
43. Gupta R, Sivapathasundharam B, Einstein A. Eruption age of permanent mandibular first molars and central incisors in the south Indian population. *Indian J Dent Res.* 2007 Oct-Dec;18(4):186-9.
44. Stones HH, Lawton FE, Bransby ER, Hartley HO. Time of eruption of permanent teeth and time of shedding of deciduous teeth. *Br Dent J.* 1951 Jan 2;90(1):1-7.
45. Ripa LW, Leske GS, Sposato AL, Simon GA, Moresco TV. Chronology and sequence of exfoliation of primary teeth. *J Am Dent Assoc.* 1982 Oct;105(4):641-4.
46. Becker HM, Glass RL, Shiere FR. Exfoliation of the deciduous teeth during the ages of mixed dentition. *J Dent Res.* 1972 Mar-Apr;51(2):498-502.
47. Clements EM, Davies-Thomas E, Pickett KG. Age at which the deciduous teeth are shed. *Br Med J.* 1957 Jun 29;1(5034):1508-10.
48. Fass EN. A chronology of growth of the human dentition. *ASDC J Dent Child.* 1969 Nov-Dec;36(6):391-401.
49. Garn SM, Lewis AB, Polacheck DL. Variability of tooth formation. *J Dent Res.* 1959 Jan-Feb;38(1):135-48.
50. McDonald RE AD, Dean JA. *Dentistry for the child and adolescent.* 8th ed. Maryland Heights: Mosby Elsevier; 2007.
51. AlQahtani SJ, Hector MP, Liversidge HM. Brief communication: The London atlas of human tooth development and eruption. *Am J Phys Anthropol.* 2010 Jul;142(3):481-90.
52. Pinheiro MFT. *Genética Forense.Perspectivas da Identificação Genética.* Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa; 2010.
53. Anslinger K, Weichhold G, Keil W, Bayer B, Eisenmenger W. Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med.* 2001;114(3):194-6.
54. Pfeiffer H, Steighner R, Fisher R, Mornstad H, Yoon CL, Holland MM. Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. *Int J Legal Med.* 1998;111(6):309-13.

55. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. 1985 Mar 7-13;314(6006):67-73.
56. Jeffreys AJ, Brookfield JF, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*. 1985 Oct 31-Nov 6;317(6040):818-9.
57. Manjunath BC, Chandrashekar BR, Mahesh M, Vatchala Rani RM. DNA profiling and forensic dentistry--a review of the recent concepts and trends. *J Forensic Leg Med*. 2011 Jul;18(5):191-7.
58. Butler J. *Fundamentals of Forensic DNA typing*. Maryland: Elsevier; 2009.
59. Kurosaki K, Matsushita T, Ueda S. Individual DNA identification from ancient human remains. *Am J Hum Genet*. 1993 Sep;53(3):638-43.
60. da Silva RH, Sales-Peres A, de Oliveira RN, de Oliveira FT, Sales-Peres SH. Use of DNA technology in forensic dentistry. *J Appl Oral Sci*. 2007 Jun;15(3):156-61.
61. Tsukada K, Takayanagi K, Asamura H, Ota M, Fukushima H. Multiplex short tandem repeat typing in degraded samples using newly designed primers for the TH01, TPOX, CSF1PO, and vWA loci. *Leg Med (Tokyo)*. 2002 Dec;4(4):239-45.
62. Cotton EA, Allsop RF, Guest JL, Frazier RR, Koumi P, Callow IP, et al. Validation of the AMPFISTR SGM plus system for use in forensic casework. *Forensic Sci Int*. 2000 Aug 14;112(2-3):151-61.
63. Clayton TM, Whitaker JP, Fisher DL, Lee DA, Holland MM, Weedn VW, et al. Further validation of a quadruplex STR DNA typing system: a collaborative effort to identify victims of a mass disaster. *Forensic Sci Int*. 1995 Nov 30;76(1):17-25.
64. Budowle B, Eisenberg AJ, van Daal A. Validity of low copy number typing and applications to forensic science. *Croat Med J*. 2009 Jun;50(3):207-17.
65. García AAM, I.; Pestoni, C.; Lareu, M. V.; Rodriguez-Calvo, M. S.; Carracedo, A. Effect of environmental factors on PCR-DNA analyses from dental pulp. *Int J Legal Medicine*. 1996;109:125-9.
66. Alonso A, Andelinovic S, Martin P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E, 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*. 2001 Jun;42(3):260-6.
67. Yoshida K, Sekiguchi K, Kasai K, Sato H, Seta S, Sensabaugh GF. Evaluation of new primers for CSF1PO. *Int J Legal Med*. 1997;110(1):36-8.
68. Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis*. 1999 Jun;20(8):1682-96.
69. Haque KA, Pfeiffer RM, Beerman MB, Struewing JP, Chanock SJ, Bergen AW. Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnol*. 2003 Oct 28;3:20.
70. Alonso A, Martin P, Albarran C, Garcia P, Primorac D, Garcia O, et al. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. *Croat Med J*. 2003 Jun;44(3):273-80.
71. Andreasson H, Nilsson M, Budowle B, Lundberg H, Allen M. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Sci Int*. 2006 Dec 1;164(1):56-64.

72. Nielsen K, Mogensen HS, Hedman J, Niederstatter H, Parson W, Morling N. Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Sci Int Genet.* 2008 Jun;2(3):226-30.
73. Nicklas JA, Buel E. Development of an Alu-based, QSY 7-labeled primer PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *J Forensic Sci.* 2003 Mar;48(2):282-91.
74. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992 Apr;10(4):413-7.
75. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).* 1993 Sep;11(9):1026-30.
76. Oliveira AR. *Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real.* Lisboa: Universidade de Lisboa; 2009.
77. Nicklas JA, Buel E. Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *J Forensic Sci.* 2003 Sep;48(5):936-44.
78. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 15;88(16):7276-80.
79. Andreasson H. *Sensitive Forensic DNA anylisis. Application of Pyrosequencing and real-time PCR Quantification:* Uppsala University; 2005.
80. Andreasson H, Gyllensten U, Allen M. Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Biotechniques.* 2002 Aug;33(2):402-4, 7-11.
81. Niederstatter H, Kochl S, Grubwieser P, Pavlic M, Steinlechner M, Parson W. A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA. *Forensic Sci Int Genet.* 2007 Mar;1(1):29-34.
82. Sifis ME, Both K, Burgoyne LA. A more sensitive method for the quantitation of genomic DNA by Alu amplification. *J Forensic Sci.* 2002 May;47(3):589-92.
83. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-94.
84. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.
85. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int.* 2000 Jul 24;112(1):17-40.
86. Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, Budowle B. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci.* 2001 May;46(3):647-60.
87. Gill P, Kirkham A, Curran J. LoComationN: a software tool for the analysis of low copy number DNA profiles. *Forensic Sci Int.* 2007 Mar 2;166(2-3):128-38.

88. Gill P, Buckleton J. A universal strategy to interpret DNA profiles that does not require a definition of low-copy-number. *Forensic Sci Int Genet.* 2010 Jul;4(4):221-7.
89. Budowle BH, DL; Smerick, J.B; Smith, J.A; . Low Copy number - consideration and caution: Available from: http://www.promega.com/~media/files/resources/conference_proceedings/ishi12/oral_presentations/budowle.ashx?la=en.
90. Rodrigues LV, Vasconcelos AC, Campos PA, Brant JM. Apoptosis in pulp elimination during physiological root resorption in human primary teeth. *Braz Dent J.* 2009;20(3):179-85.
91. Graham EAM. DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Sci Med Pathol.* 2007;3:221-5.
92. Wurmb-Schwark NH, M.; Wiesbrock, U.; Schroeder, I.; Ritz-Timme, S.; Oehmichen, M. . Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones. *Legal Medicine.* 2003;5:S169-S72.
93. Bender K, Farfan MJ, Schneider PM. Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Sci Int.* 2004 Jan 28;139(2-3):135-40.
94. Burger J, Hummel S, Hermann B, Henke W. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis.* 1999 Jun;20(8):1722-8.
95. Malaver PC, Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croat Med J.* 2003 Jun;44(3):306-9.
96. Colson IB BJ, Vercauteren ;, Sykes B. *Ancient Biomol.* 1997;1:109-17.
97. Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet.* 2004 Oct;5(10):739-51.
98. Budowle B, Bieber FR, Eisenberg AJ. Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. *Leg Med (Tokyo).* 2005 Jul;7(4):230-43.
99. Hinchliffe J. Forensic odontology, Part 1. Dental identification. *Br Dent J.* 2011 Mar 12;210(5):219-24.
100. Kumar MG, Hegde AM. Sex identification from exfoliated primary teeth--a PCR study. *J Clin Pediatr Dent.* 2005 Fall;30(1):19-21.
101. Sivagami AV, Rao AR, Varshney U. 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.* 2000 May 15;110(2):107-15.
102. Pretty IA, Sweet D. A look at forensic dentistry--Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. *Br Dent J.* 2001 Apr 14;190(7):359-66.
103. Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet.* 2007 Jun;1(2):191-5.
104. Milos A, Selmanovic A, Smajlovic L, Huel RL, Katzmarzyk C, Rizvic A, et al. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croat Med J.* 2007 Aug;48(4):486-93.
105. Evison MP, Smillie DM, Chamberlain AT. Extraction of single-copy nuclear DNA from forensic specimens with a variety of postmortem histories. *J Forensic Sci.* 1997 Nov;42(6):1032-8.

106. Pfeiffer H, Huhne J, Seitz B, Brinkmann B. Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int J Legal Med.* 1999;112(2):142-4.
107. Ricaut FX, Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B. STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *Forensic Sci Int.* 2005 Jun 30;151(1):31-5.
108. Ohtani S, Ito R, Yamamoto T. Differences in the D/L aspartic acid ratios in dentin among different types of teeth from the same individual and estimated age. *Int J Legal Med.* 2003 Jun;117(3):149-52.
109. Dobberstein RC, Huppertz J, von Wurmb-Schwark N, Ritz-Timme S. Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *Forensic Sci Int.* 2008 Aug 6;179(2-3):181-91.
110. Potsch L, Meyer U, Rothschild S, Schneider PM, Rittner C. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *Int J Legal Med.* 1992;105(3):139-43.
111. Schwartz TR, Schwartz EA, Mieszerski L, McNally L, Kobilinsky L. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci.* 1991 Jul;36(4):979-90.
112. Gaytmenn R, Sweet D. Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *J Forensic Sci.* 2003 May;48(3):622-5.
113. Hanaoka Y, Inoue M, Tsai TH, Minaguchi K. [Fundamental and practical study for DNA analysis using tooth as a source of DNA]. *Nihon Hoigaku Zasshi.* 1995 Feb;49(1):1-10.
114. Presecki ZB, H.; Primorac, D.; Drmic, I. Methods of preparing the tooth for DNA isolation. *Acta Stomatol Croat.* 2000;34:21-4.
115. Williams D, Lewis M, Franzen T, Lissett V, Adams C, Whittaker D, et al. Sex determination by PCR analysis of DNA extracted from incinerated, deciduous teeth. *Sci Justice.* 2004 Apr-Jun;44(2):89-94.
116. Corte-Real A AL, Anjos MJ, Carvalho M, Vide MC, Corte-Real F, Vieira DN. The DNA extraction from the pulp dentine complex of both with and without carious. *International Congress Series 2006*;1288:710-2.
117. Schneider PM. Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Sci Int.* 2007 Jan 17;165(2-3):238-43.
118. Dissing JK, M.A.; Friis, C. On the elimination of extraneous DNA in fossil human teeth with hypochlorite. *Journal of Archaeological Science.* 2008;35:1445-52.
119. Hofreiter M VL. Ancient human DNA: phylogenetic applications. *Encyclopedia of the Human Genome* [serial on the Internet]. 2003 06/04/11]: Available from: http://www.eva.mpg.de/primat/pdf/Genetics_twelve.pdf.
120. Kemp BM, Smith DG. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int.* 2005 Nov 10;154(1):53-61.
121. Kolman CJ, Tuross N. Ancient DNA analysis of human populations. *Am J Phys Anthropol.* 2000 Jan;111(1):5-23.
122. Prince AM, Andrus L. PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* 1992 Mar;12(3):358-60.
123. Malmstrom H, Svensson EM, Gilbert MT, Willerslev E, Gotherstrom A, Holmlund G. More on contamination: the use of asymmetric molecular behavior to identify authentic ancient human DNA. *Mol Biol Evol.* 2007 Apr;24(4):998-1004.
124. Rohland N, Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques.* 2007 Mar;42(3):343-52.

125. Gilbert MTPH, A.J.; Willerslev, E.; Tuner-Walker, G.; Collins, M. Insights into the processes behind the contamination of degraded human teeth and bone samples with exogenous sources of DNA. *International journal of Osteoarchaeology*. 2006;16:156-64.
126. Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc*. 2007;2(7):1756-62.
127. Edson SMR, J.P.; COble, M.D.: Naming the dead - Confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Science Review*. 2004;16:64-90.
128. Sweet D, Hildebrand D. Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding. *J Forensic Sci*. 1998 Nov;43(6):1199-202.
129. Pinchi V, Torricelli F, Nutini AL, Conti M, Iozzi S, Norelli GA. Techniques of dental DNA extraction: Some operative experiences. *Forensic Sci Int*. 2011 Jan 30;204(1-3):111-4.
130. Kitayama T, Ogawa Y, Fujii K, Nakahara H, Mizuno N, Sekiguchi K, et al. Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method. *Leg Med (Tokyo)*. 2010 Mar;12(2):84-9.
131. Greenspoon SA, Scarpetta MA, Drayton ML, Turek SA. QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. *J Forensic Sci*. 1998 Sep;43(5):1024-30.
132. Davoren J, Vanek D, Konjhodzic R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J*. 2007 Aug;48(4):478-85.
133. Castella V, Dimo-Simonin N, Brandt-Casadevall C, Mangin P. Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. *Forensic Sci Int*. 2006 Jan 6;156(1):70-3.
134. DNA Advisory Board Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories. 2009 [16/08/12]; Available from: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/dabqas.htm>.
135. Green RL, Roinestad IC, Boland C, Hennessy LK. Developmental validation of the quantifiler real-time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples. *J Forensic Sci*. 2005 Jul;50(4):809-25.
136. Edwards MCG, R.A. Multiplex PCR: Advantages, Development and Applications. *Genome Res*. 1994;3:65-75.
137. Bloch W. A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry*. 1991 Mar 19;30(11):2735-47.
138. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 1989 May 18;339(6221):237-8.
139. AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit User's guide 2012. Available from: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/document_s/generaldocuments/cms_041201.pdf.
140. AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User's Guide 2012: Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_076395.pdf.
141. Ballantyne KN, van Oorschot RA, Muharam I, van Daal A, John Mitchell R. Decreasing amplification bias associated with multiple displacement amplification and short tandem repeat genotyping. *Anal Biochem*. 2007 Sep 15;368(2):222-9.

142. Parsons TJ, Huel R, Davoren J, Katzmarzyk C, Milos A, Selmanovic A, et al. Application of novel "mini-amplicon" STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet.* 2007 Jun;1(2):175-9.
143. AmpFSTR® NGM SElect™ PCR Amplification kit User Guide 2011: Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_089008.pdf.
144. Butler JM, Buel E, Crivellente F, McCord BR. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis.* 2004 Jun;25(10-11):1397-412.
145. Slater GW, Desruisseaux C, Hubert SJ, Mercier JF, Labrie J, Boileau J, et al. Theory of DNA electrophoresis: a look at some current challenges. *Electrophoresis.* 2000 Dec;21(18):3873-87.
146. Wenz H, Robertson JM, Menchen S, Oaks F, Demorest DM, Scheibler D, et al. High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Res.* 1998 Jan;8(1):69-80.
147. Puch-Solis R, Kirkham AJ, Gill P, Read J, Watson S, Drew D. Practical determination of the low template DNA threshold. *Forensic Sci Int Genet.* 2011 Nov;5(5):422-7.
148. Sgueglia JB, Geiger S, Davis J. Precision studies using the ABI prism 3100 genetic analyzer for forensic DNA analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2003 Aug;376(8):1247-54.
149. McCord B. Troubleshooting capillary electrophoresis systems. Profiles in DNA [serial on the Internet]. 2003: Available from: http://www.promega.com/~media/files/resources/profiles_in_dna/602/troubleshooting_capillary_electrophoresis_systems.pdf?la=en.
150. Crespillo M LJ, Paredes MR, Barrio PA. Criterios mínimos recomendados para la Aceptación y Evaluación de Perfiles Mezclas. 2012 [02/07/12]; Available from: http://www.gep-isfg.org/documentos/RecomedGHEPMIX1_2012.06.28.pdf.
151. Gill P. Application of low copy number DNA profiling. *Croat Med J.* 2001 Jun;42(3):229-32.
152. Schultes T, Hummel S, Herrmann B. Amplification of Y-chromosomal STRs from ancient skeletal material. *Hum Genet.* 1999 Feb;104(2):164-6.
153. Hoss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Paabo S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.* 1996 Apr 1;24(7):1304-7.
154. Chaudhary MK, V; Patil, S; Gawande, M; Km, zS. Sexual dimorphism in deciduous dentition: a Lilliput effect. *Webmed Central Dentistry.* 2011;2(8).

V – Anexos

Anexo 1 – Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

XV - 4 J

COMISSÃO DE ÉTICA
FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA
COIMBRA

Naceu a opn
27/8/09
plam

Ao Comiss. Etica para parecer.
31/07/09
O Presidente do C. Científico da FMUC

Ex.ma Senhora
Prof. Doutora Catarina Resende de Oliveira
Presidente do Conselho Científico
Faculdade de Medicina
Universidade de Coimbra

Aprovado pela Comissão
Coordenadora do C.C
em 09/09/2009
O Presidente do C.C da FMUC

DEM/Pos-G/ 272 /2009 2009-07-24

Assunto: Modelos 1 e 2 - Maria Teresa Antunes de Azevedo Xavier

Para os devidos efeitos, junto enviamos a V. Ex.ª os **originais** do Modelo 1 - referente à proposta de orientadores, e do Modelo 2 - referente à proposta de projecto de dissertação, da aluna do Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses, de que é coordenador o Senhor Professor Duarte Nuno Vieira,

- **Maria Teresa Antunes de Azevedo Xavier.**

Uma vez que as propostas cumprem todos os requisitos exigidos, informamos V. Ex.ª de que nada temos a opor.

Com os melhores cumprimentos *ps*
Ao Gabinete

Ra
O Responsável pela Unidade de Ensino Pós-Graduado,
Data 24/09/09

h
Director da Direcção de Educação Médica

h. Ribeiro
Prof. Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro

ENTRADAS
FACULDADE DE MEDICINA
Conselho Científico
Data 28/07/09
N.º 1270

mjm

UNIVERSIDADE DE COIMBRA
FACULDADE DE MEDICINA
Direcção de Educação Médica
Entrada 2009/09/21
Doc. N.º 545

Rua Largo
3004-504 - Coimbra
P-Portugal

Tel.: +351 239 857 755
Fax.: +351 239 857 757
E-Mail: demc.pos@fmed.ucp.pt

Anexo 2 – Consentimento informado



CONSENTIMENTO INFORMADO

TÍTULO do ESTUDO

Dentes temporários – Uma abordagem na identificação genética forense

LOCAIS ONDE DECORRERÁ

- Instituto de Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

INVESTIGADORES

Maria Teresa Xavier, Prof. Doutor Francisco Corte-Real

OBJECTIVOS

Este trabalho terá como objectivo

- estudar os dentes temporários, no âmbito da análise genética, considerando a possibilidade de serem amostras com valor probatório para uma identificação.

RISCOS para o PACIENTE

Não existem quaisquer riscos para o paciente na participação do estudo.

DIREITO a RECUSA

Os pacientes podem recusar a participação no estudo em qualquer altura, sem prejuízo próprio.

DIREITO a PRIVACIDADE

Os resultados deste estudo serão alvo de tratamento estatístico e posterior inclusão em tese de Mestrado, podendo ainda ser divulgados e publicados cientificamente; no entanto, a privacidade dos pacientes será sempre protegida uma vez que as identidades dos intervenientes não serão de forma alguma divulgadas.

ASSINATURAS

Este estudo foi discutido com o paciente e seu progenitor/ tutor e todas as questões colocadas foram esclarecidas. Quaisquer questões adicionais acerca do estudo deverão ser dirigidas aos investigadores enumerados anteriormente.

Concordo com os termos acima descritos e ficarei com uma cópia deste consentimento em meu poder.

Data:

Assinatura do progenitor/ tutor

Assinatura da criança se maior 10 anos

Assinatura de testemunha

Assinatura do investigador

Anexo 3 – Resumo dos marcadores presentes em cada um dos perfis

Nº	DS179	DS181	DS20	CSF1PO	DS138	TH01	DIS317	DIS519	DIS138	DIS433	wWA	TPOX	DIS51	amel	DS818	TGA	DIS1248	DIS51	D22S1045	DIS433	DIS441	DIS1656	D2S91	SE33	Kit
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
8	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
9	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
10	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
11	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
17	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
18	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
19	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
20	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
21	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
23	A	A	-	-	A	A	-	A	A	-	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	P	P	A	-	1
24	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
25	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
27	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
28	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
29	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
30	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
32	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
35	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
36	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
37	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
39	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
40	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
41	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
44	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
45	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
46	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
47	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
49	A	A	-	-	A	A	-	A	A	-	A	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	-	1
51	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1
52	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	1

Legenda:
 AmpcFSTR® Identifier™
 AmpcFSTR® Identifier™ Plus
 AmpcFSTR® NGM™
 AmpcFSTR® NGM SElect™,
P – marcador presente
A – marcador ausente
(-) – não consta no kit

Anexo 4 – Resumo dos resultados obtidos no estudo experimental

Nº da amostra	Quantificação ng/uL	Perfil completo*	Identificação do dador‡
1	1.3327	S	S
2	2.7168	S	S
3	24.4426	S	S
4	154.6798	S	S
5	60.7017	S	S
6	34.7947	S	S
7	45.3404	S	S
8	100.7136	S	S
9	37.2192	S	S
10	0.1642	S	S
11	58.6534	S	S
17	9.0329	S	N
18	0.8752	S	S
19	0.9136	S	S
21	0.6103	S	S
23	0.0034	N	S
24	0.0017	S	S
25	0.0524	S	S
27	2.2302	S	S
28	0.2819	S	S
29	0.1685	S	S
30	0.7246	S	N
32	22.6259	S	S
35	27.5629	S	S
36	53.3700	S	S
37	1.4772	S	S
39	62.8215	S	S
40	29.5216	S	S
41	8.2901	S	N
44	0.0423	S	N
45	13.0642	S	S
46	0.0610	S	S
47	4.8279	S	S
49	0.0011	N	S
51	0.0192	N	S
52	0.0416	N	S

* É considerado perfil completo, quando apresenta a totalidade dos marcadores para o respectivo *kit*.

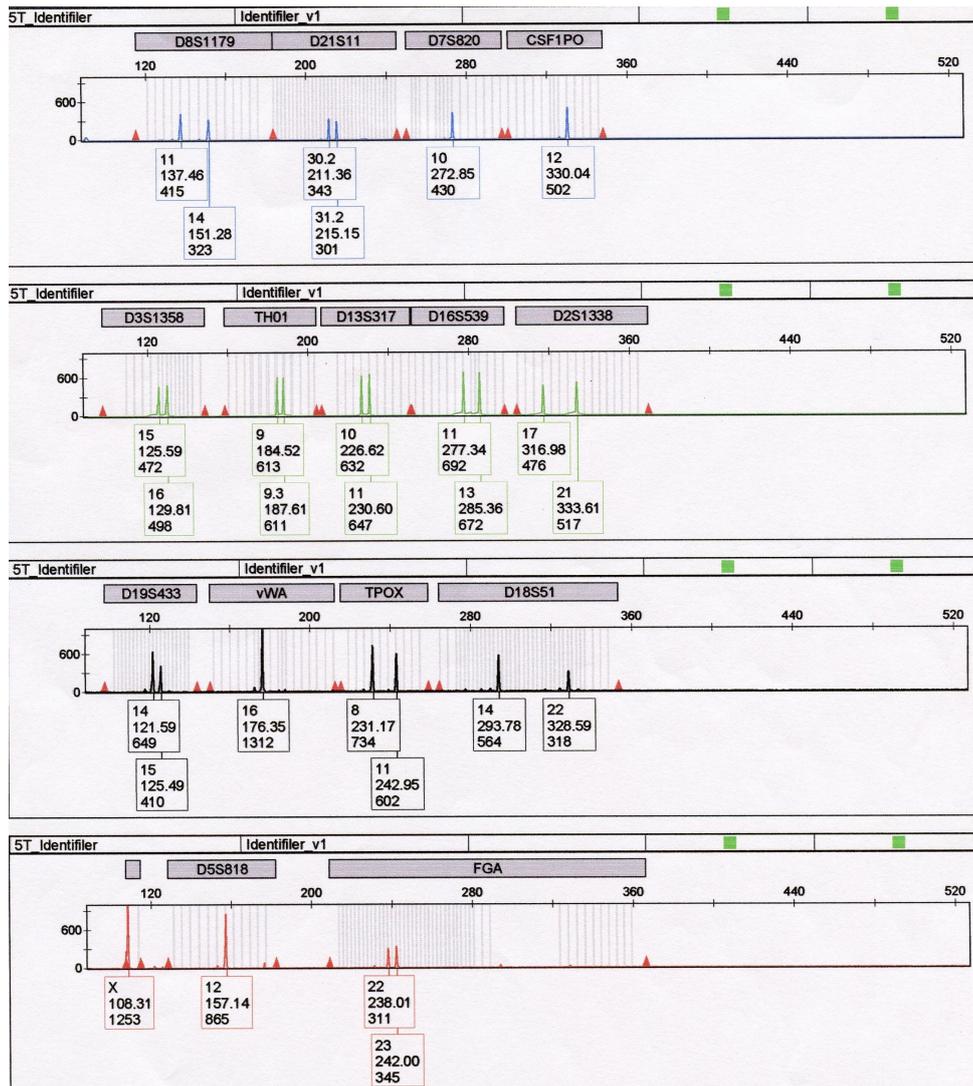
‡ Confirmação do dador, uma vez que há correspondência entre os perfis obtidos a partir do dente temporário e da amostra de referência-

Legenda:

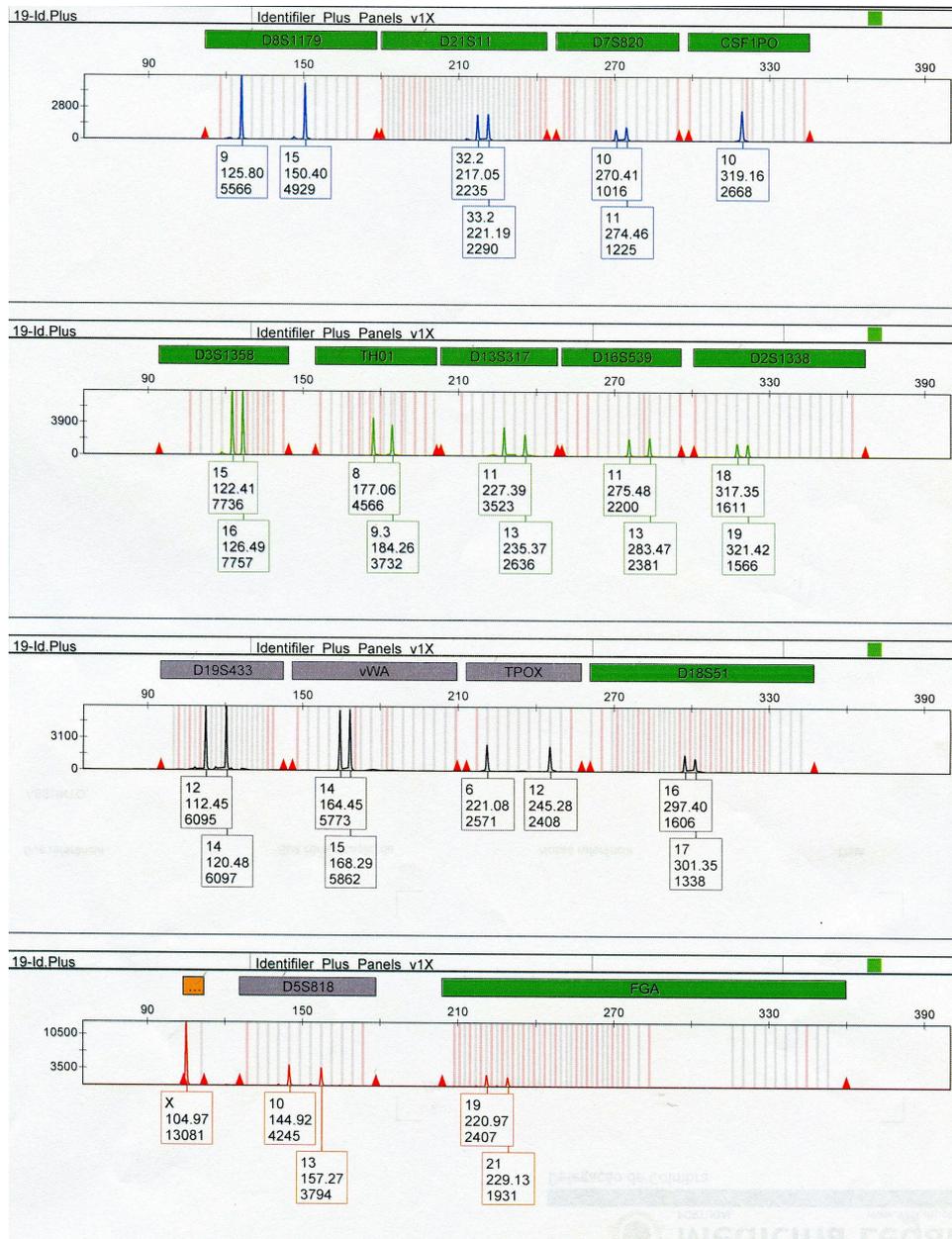
	Amp ℓ FSTR® Identifier™ - Applied Biosystems™
	Amp ℓ FSTR® Identifier™ Plus
	Amp ℓ FSTR® NGM™
	Amp ℓ FSTR® NGM SElect™,

Anexo 5 – Perfis genéticos obtidos a partir dos kits AmpliFSTR® Identifier™, AmpliFSTR® Identifier™ Plus, AmpliFSTR® NGM™, AmpliFSTR® NGM Select™ - Applied Biosystems™

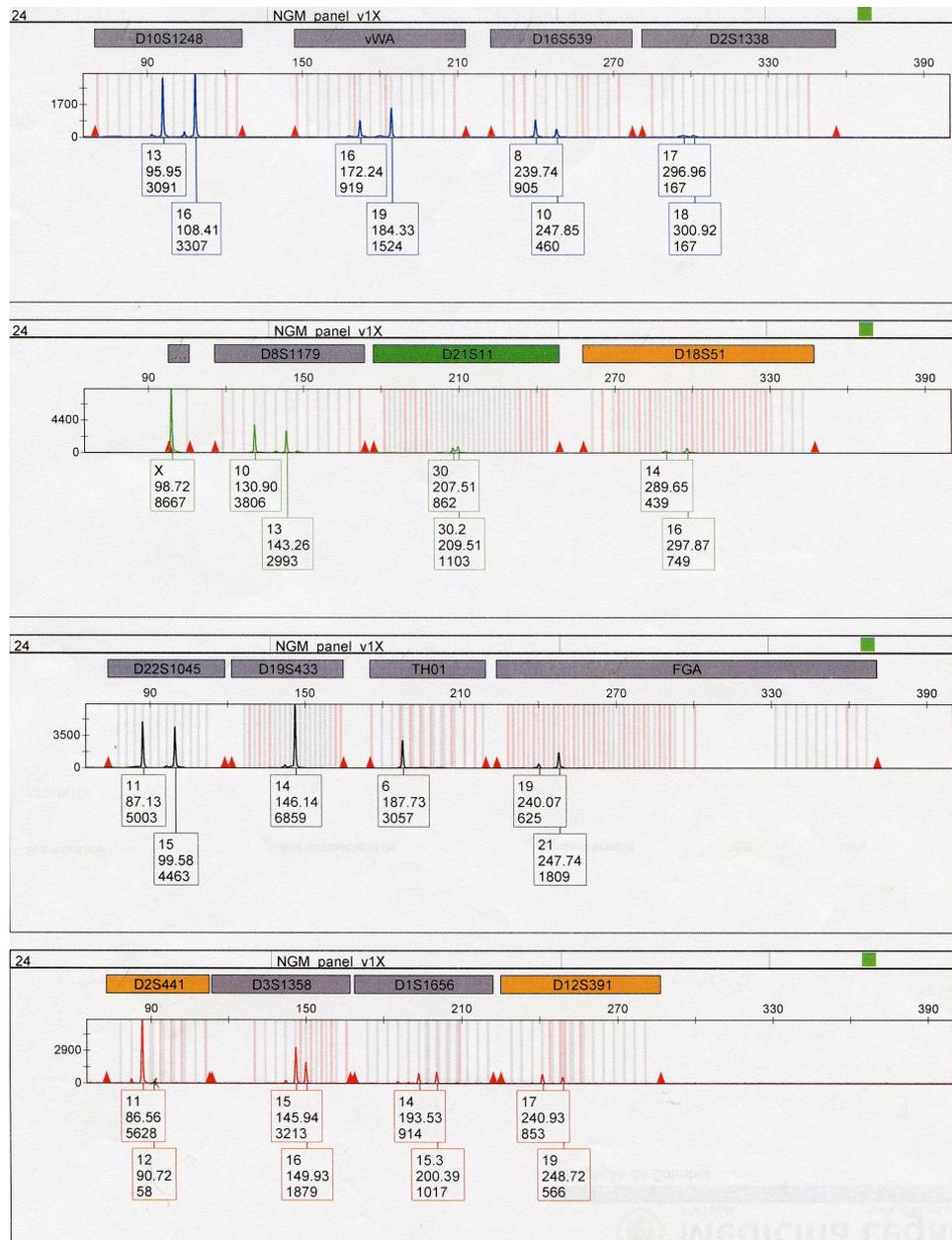
Electroferograma obtido a partir kit amplificação AmpliFSTR® Identifier™



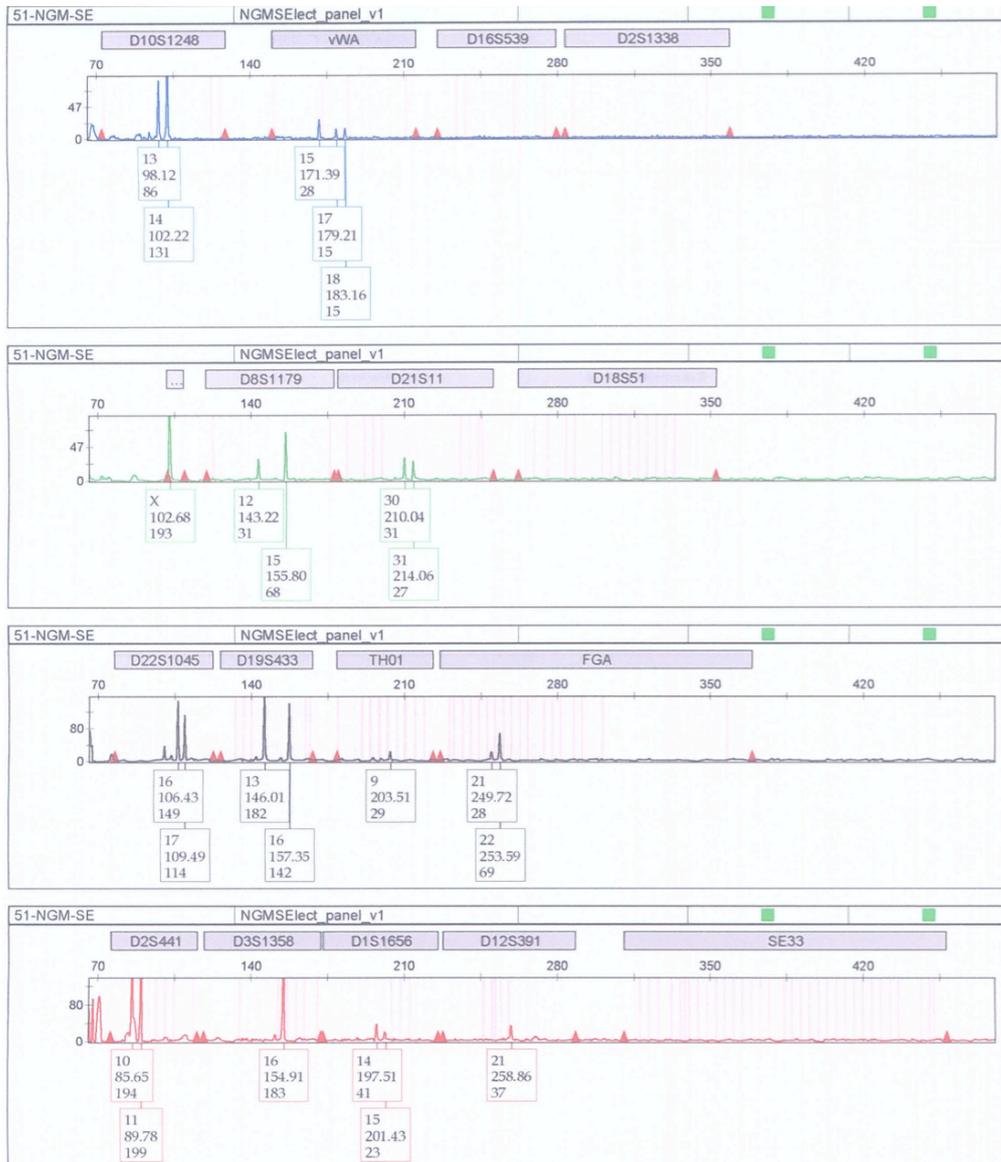
Electroferograma obtido a partir *kit* amplificação Amp ϕ FSTR[®] Identifier[™] Plus



Electroferograma obtido a partir *kit* amplificação AmpliFSTR® NGM™



Electroferograma obtido a partir do kit Amp ϕ FSTR[®] NGM Select[™]



Anexo 6 – Tabela de siglas químicas e abreviaturas

Sigla / Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN mt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADN nu	Ácido desoxirribonucleico nuclear
ARN	Ácido ribonucleico
CCD	<i>Charged-coupled camera</i>
CODIS	<i>Combined DNA Index System</i>
C _T	<i>Cycle threshold</i>
EDNAP	<i>European DNA profiling group</i>
HE	Hematoxicilina/Eosina
hTERT	Telomerase reversa transcriptase
IPC	<i>Internal Positive Control</i> (controlo do sistema interno)
LCN	<i>Low copy number</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qPCR	PCR em tempo real
POP ₄	<i>Performance optimized polymer 4</i>
POP ₆	<i>Performance optimized polymer 6</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa B</i> Receptor de activação do factor nuclear kappa B
RANKL	<i>Ligand (RANK)</i> Ligando (RANK)
RFU	<i>Relative fluorescent unit</i>
SGM	<i>Second generation multiplex</i>
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSR	<i>Single sequence repeats</i>
STR	<i>Short tandem repeats</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
UV	radiação ultravioleta
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>

Anexo 7 – Índice de figuras, tabelas e gráficos

Índice de figuras

Figura 1 – Imagem da face externa da coroa de um dente temporário posterior esfoliado

Figura 2 – Imagem da face interna da coroa de um dente temporário posterior esfoliado

Figura 3 – Representação esquemática da tecnologia TaqMan[®], durante as fases de polimerização, extensão de *primers* e hidrólise da sonda. Fonte: Retirado de http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx (acedido a 16/08/12)

Figura 4 – Fluxograma resumo das várias etapas no processo de identificação genética, a partir de amostras de referência

Figura 5 – Fluxograma resumo das várias etapas no processo de identificação genética, a partir de amostras de tecidos dentários

Figura 6 – Coroas dentárias de dentes anteriores, após decorrido o processo de esfoliação

Figura 7 – Coroas dentárias seccionadas longitudinalmente com disco diamantado esterilizado

Figura 8 – Preparação das amostras numa câmara de fluxo laminar

Figura 9 – Imagem do moinho criogénico (Freezer mill 6770[®])

Figura 10 – Banho em termo-agitação durante 10 minutos a 900 rpm (HLC Biotech[®])

Figura 11 – Etapa de recolha das amostras de referência: esfregaço da mucosa jugal com zaragatoa

Figura 12 – Centrifugadora de placas - Heraeus Labofuge 400

Figura 13 – Imagem do ABI PRISM[®] 7000, para a quantificação por PCR em tempo real

Figura 14 – Câmara de fluxo laminar, na sala pré-PCR para amostras seguras

Fig. 15 – Aspecto em microscopia de luz de um dente em fase de esfoliação dentária (1 – polpa; 2 – dentina), pondo em evidência a presença de numerosos odontoclastos nas suas respectivas lacunas. Corte histológico de material descalcificado corado com HE (Hematoxilina/Eosina), com ampliação de 10x no original. Imagem gentilmente cedida pelo Instituto de Histologia e Embriologia da FMUC.

Fig. 16 – Aspecto em microscopia de luz de odontoclastos presentes em lacunas tipo de Howship na dentina. Corte histológico de material descalcificado corado com HE, com ampliação de 20x no original. Imagem gentilmente cedida pelo Instituto de Histologia e Embriologia da FMUC.

Índice de tabelas

Tabela 1 – Tabela de cronologia da esfoliação dentária em função do género

Tabela 2 – Cronologia do desenvolvimento da dentição permanente de Logan e Kronfeld (modificada por Schour e Massler)

Tabela 3 – Cronologia do desenvolvimento da dentição permanente elaborada por Sakher AlQahtani

Tabela 4 – Condições óptimas de preservação do ADN

Tabela 5 – Quadro resumo das amostras de referência para obtenção de perfis de ADN *antemortem*

Tabela 6 – Classificação da qualidade das amostras directas

Tabela 7 – Listagem dos STRs que compõem os painéis – *standard* de instituições internacionais

Tabela 8 – Programa de PCR executado

Tabela 9 – *Kits* de AmpFℓSTR® Identifiler™ e AmpFSTR® Identifiler™ Plus com *loci* e respectivos alelos

Tabela 10 – Programa de PCR executado

Tabela 11 – *Kits* de AmpFSTR® NGM™ e AmpFSTR® NGM Select™ com *loci* e respectivos alelos

Tabela 12 – Caracterização da amostra quanto ao tipo de dente analisado

Tabela 13 – Caracterização da amostra quanto ao género dos dadores

Tabela 14 – Caracterização da amostra quanto ao tempo de preservação dos dentes

Tabela 15 – Frequência e percentagem dos perfis genéticos obtidos

Tabela 16 – Tabela de comparação dos perfis genéticos obtidos a partir dos dentes temporários e das amostras de referência

Tabela 17 – Análise descritiva da quantificação da ADN obtida a partir da amostra

Tabela 18 – Resultados do teste de Mann-Whitney para as variáveis em estudo (tempo decorrido desde a esfoliação dentária e o género).

Tabela 19 – Correlação entre o tempo de preservação das amostras e quantidade de ADN obtida

Índice de gráficos

Gráfico 1 – *Boxplot* relativo à quantidade de ADN (ng/μL) na amostra estudada (n=33)

Gráfico 2 – *Boxplot* relativo ao tempo decorrido desde a esfoliação dentária (< ou ≥ 12 anos) (n=33)

Gráfico 3 – *Boxplot* relativo ao género (n=33)

Anexo 8 – Apresentações relativas a este trabalho

Artigo

Xavier M, Bento A, Costa A, Corte-Real A, Anjos M, Corte-Real F, et al. Primary teeth as DNA reference sample in disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int.* 2011: e381-382.

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 3 (2011) e381–e382



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS



Primary teeth as DNA reference sample in disaster victim identification (DVI)

Maria Xavier^{a,*}, Ana Bento^b, Ana Costa^a, Ana Corte-Real^a, Caroline Veloso^b, Lisa Sampaio^b, Maria Anjos^b, Vanessa Bogas^b, Francisco Corte-Real^a

^aFaculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

^bForensic Genetic Service, Center Branch, National Institute of Legal Medicine, I.P., Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2011

Accepted 16 September 2011

Keywords:

Disaster victim identification

DNA

Deciduous teeth

ABSTRACT

The identification of disaster victims through the use of DNA analysis is an integral part of DVI response, regardless of the scale and nature of the disaster. DNA analysis is performed to assist in the identification of victims through kinship (familial matching to relatives) or direct (self source sample) matching of DNA profiles. The exfoliated primary teeth can be an alternative self-sample used as an antemortem record for direct matching in DVI context.

The main purpose of the study is to evaluate the possibility of DNA extraction in primary teeth with probative value for identification, despite being stored for long periods of time (until 18 years).

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A mass disaster is an unexpected event, which can happen anywhere and usually without advance warning, producing serious injury and death to a high number of people. These events can involve natural (earthquakes, flooding or tornadoes) or non-natural catastrophes [1], such as accidental disasters (aircraft and train crashes, derailments, building fires), or with an intentional reason like terrorism (direct attacks on significant places, and bombing of populated areas, including suicide attacks and deployments of chemical and biological weapons).

Forensic identification is essential for humanitarian reasons, but also for civil or criminal investigative needs and is fundamentally based on dentistry, dactyloscopy, anthropology, radiology and genetics, with the main purpose to contribute to the positive identification of victims. DNA analysis is one of the primary methods of identification and an integral part of DVI response, in particular the use of short tandem repeat (STR) markers (minimum set of 12 loci plus Amelogenin [1]). For a DNA profile it is necessary a sample collection from the deceased body or body parts in order to compare to the reference samples. The DNA matching can be based on profiles from relatives (first degree relatives, if possible more than one), self-samples (blood cards, bone marrow donor program) or belongings (hair brushes, combs, lipstick). The direct reference samples more commonly available are tooth and hair brushes, manual razors or clinical samples [1], however, primary teeth can probably be an alternative reference sample, attending to the facts that many communities have the habit of keeping the

exfoliated teeth as a memento and that dentin–pulp complex is well-protected within the pulp cavity.

2. Material and methods

2.1. Samples

A total of 18 anterior primary teeth were collected from 9 people (2 per person) after been stored for a period of time between 2 and 18 years. An informed consent was obtained from all the donors. Each tooth was decontaminated with sodium hypochlorite 3%, 20" to remove DNA contaminants and PCR inhibitors; sectioned longitudinally (for a better access to the pulp chamber) and the enamel was removed. Cryogenic grinding was performed with a 6700-freezer mill to reduce the tooth into powder and increase the surface area to biochemical agents. Buccal epithelial swabs (reference samples) were collected from the same 9 individuals.

2.2. DNA extraction

All 9 samples (100 mg of 2 teeth powder per sample) were extracted using the QiAamp DNA Investigator (QIAGEN[®]) under conditions specified by the manufacturer (this kit purifies genomic DNA from a small sample, volumes or sizes, such as teeth).

The DNA was extracted from the reference samples using the chelex[®] 100 method.

2.3. DNA quantification

Total DNA quantification was undertaken on 2 µL of each extracted sample using the Quantifiler[™] Human Identification

* Corresponding author. Tel.: +351 93 949 807; fax: +351 239 402 910.
E-mail address: xavier.teresa@gmail.com (M. Xavier).

Table 1
Quantification and DNA profiling results for the teeth samples.

Sample ^a	Stored period	Quantifier results			AmpF/STR [®] Identifier [™] results	
		Ct	IPC	DNA (ng/ μ L)	Autosomal STRs	Amelogenin
1T	14.5	28.63	28.36	1.3327	Complete ^b	Male
2T	1.5	27.8	28.17	2.7168	Complete ^b	Male
3T	2.5	25.24	27.52	24.4426	Complete ^b	Male
4T	2.5	23.09	27.73	154.6798	Complete ^b	Female
5T	14.5	24.18	27.71	60.7017	Complete ^b	Male
6T	12.0	24.83	27.38	34.7497	Complete ^b	Female
7T	1.5	24.52	27.4	45.3404	Complete ^b	Female
8T	4.5	23.59	27.49	100.7136	Complete ^b	Female
9T	11.5	24.75	27.92	37.2198	Complete ^b	Male

^a 9 people with 2 teeth per sample.

^b Complete DNA profile 15 autosomal loci.

Human kit (Applied Biosystems[®]) was performed on 7000 real-time PCR system (Applied Biosystems[®]).

2.4. DNA profiling

DNA profiling was achieved using the AmpF/STR[®] Identifier[™] (Applied Biosystems) at the following loci: D8S117, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin gene for sex identification, D5S818 and FGA. Amplification was performed on 9600 PCR Thermocycler (Applied Biosystems[®]). The amplified products were separated and visualized on a 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems[®]), with allele designation completed with GeneMapper[®] ID software version 3.2 (Applied Biosystems[®]).

The DNA profile obtained each tooth sample was compared with the respective reference sample to look for direct matches.

3. Results

The obtained results from the DNA quantification were greater than 1 ng/1 μ L, which validates all the polymorphisms of the kit (Table 1).

4. Conclusion

There are two types of reference samples usually collected for DNA comparison with mass disaster remains: appropriate family references and direct references. At present, the simplest and most

efficient method of DNA identification is to match each STR locus of victim's profile to a direct antemortem sample of the victim. The personal belongings (toothbrushes and combs) have been widely used with the disadvantage of attribution errors, the exfoliated teeth can be an alternative as a reference sample, attending to the facts that many communities have the habit of keeping these teeth as memento and that the dentin–pulpal complex is well protected within the pulp cavity, being preserved with time.

In all 9 cases of this pilot study, the results obtained from the reference buccal swabs were in agreement with the results obtained from primary teeth. The achieved DNA quantity (between 1.33 and 154 ng/ μ L) revealed that temporary teeth, stored for less than 18 years, can be a powerful tool for genetic analysis, especially as reference sample in DVI.

Role of funding

None

Conflict of interest

None declared.

Reference

- [1] M. Prinz, A. Carracedo, W.R.-ET-AL Mayr, DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI), Forensic Sci. Int. Genet. 1 (1) (2007) 3–12.

Comunicação livre

Comunicação livre: “Primary teeth as a source of DNA – an alternative approach for victim identification?” – I.O.F.O.S. Meeting on Forensic Odontology. 2010

Pósteres

Primary Teeth: a Source of DNA for Victim Identification

American Academy of Pediatric Dentistry meeting. 2012

Primary teeth as DNA reference sample in disaster victim identification (DVI)

International Society of Forensic Genetics meeting. 2011

Dentes temporários como fonte de ADN – método alternativo na identificação de vítimas? – XIX Congresso Anual da Ordem dos Médicos Dentistas. 2010

VI – Índice

I – INTRODUÇÃO	3
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	3
2. CONSTITUIÇÃO, ESTRUTURA E ORIGEM DO ÓRGÃO DENTÁRIO	4
2.1 Composição, formação e estrutura dos dentes temporários	5
2.2 Dentina e polpa - complexo pulpo-dentinário	6
2.2.1. Dentina	7
2.2.2. Polpa	11
3. PROCESSO DE ESFOLIAÇÃO DA DENTIÇÃO TEMPORÁRIA	14
3.1. Cronologia de esfoliação dentária	18
4 . MARCADORES PARA IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA	21
4.1. Marcadores genéticos: STR	22
5. QUANTIFICAÇÃO	24
5.1. Quantificação por PCR em tempo real (qPCR)	26
6. ANÁLISE DE AMOSTRAS DEGRADADAS	29
6.1 Consequência do estudo de amostras degradadas	29
7. FACTORES QUE INFLUENCIAM A DEGRADAÇÃO DO ADN	31
7.1 Factores ambientais	32
7.2 Tempo	33
8. DENTES COMO FONTE DE ADN E SUA APLICAÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO FORENSE	34
9. AMOSTRAS DE REFERÊNCIA NA IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA	37
II – CONTRIBUIÇÃO PESSOAL	40
1. ESTUDO EXPERIMENTAL	40

1.1 Introdução e objectivos	40
1.2 Material e métodos	41
1.2.1 Considerações éticas	42
1.2.2 Condições de trabalho	42
1.3 Resultados	60
1.4 Discussão	65
1.5 Conclusões	70
III - PERSPECTIVAS FUTURAS	71
IV – BIBLIOGRAFIA	72
V – ANEXOS	81
VI – ÍNDICE	97