



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MONOGRAFIA DE INVESTIGAÇÃO/RELATÓRIO DE ACTIVIDADE CLÍNICA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**OBTENÇÃO DE ADN EM DENTES SUBMETIDOS A CONDIÇÕES
EXTREMAS: ESTADO DA ARTE**

Tatiana Vanessa Gomes Carvalho De Freitas

Orientador

Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas

Co-orientador

Doutora Alexandra Sofia Pereira Teixeira

Porto 2012



MONOGRAFIA DE INVESTIGAÇÃO/RELATÓRIO DE ACTIVIDADE CLÍNICA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**OBTENÇÃO DE ADN EM DENTES SUBMETIDOS A CONDIÇÕES
EXTREMAS: ESTADO DA ARTE**

Tatiana Vanessa Gomes Carvalho De Freitas

Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Dentária
Da Universidade do Porto como requisito parcial para à
obtenção do título de Mestre em Medicina Dentária

Resumo

Introdução: O desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular e a sua aplicabilidade na Medicina Dentária Forense constituiu um grande avanço nas técnicas de identificação de cadáveres. Quando um corpo esteve submetido a condições ambientais extremas ou é encontrado num estado muito avançado de decomposição, as técnicas convencionais de identificação podem não ser executáveis. Os dentes pela sua natureza física e química são particularmente resistentes a estas condições adversas e, na maioria destas situações, são o que resta disponível para proceder à extracção de ADN e possibilitar a identificação. O objetivo deste trabalho consiste em fazer uma revisão bibliográfica sobre as técnicas de obtenção de ADN a partir de dentes que foram submetidos a condições extremas, fornecendo um conhecimento atual e detalhado sobre esta temática.

Material e métodos: Foi feita uma pesquisa de artigos científicos na base de dados eletrónica Pubmed, tendo sido selecionados artigos de revisão, *guidelines*, artigos de relato de caso e artigos de investigação escritos em inglês, português, francês e espanhol entre 2000 e 2011, limitados a sujeitos humanos.

Resultados: A pesquisa bibliográfica efetuada resultou na seleção de 49 artigos dos 329 encontrados. Destes foram incluídos 17 que preenchem todos os critérios de inclusão. Dos artigos lidos, percebe-se que existem três principais técnicas de extração de ADN e cinco marcadores genéticos aplicados na Medicina Dentária Forense.

Discussão: Nas situações em que o cadáver se encontra num estado avançado de decomposição, a obtenção de ADN a partir dos tecidos moles não é possível. Nestas situações uma alternativa viável são os dentes. A obtenção de material genético a partir dos tecidos dentários (polpa e dentina) é um processo laborioso, que conta com vários passos, sendo que no final se consegue amostras com qualidade suficiente para os fins de identificação. Actualmente, na Medicina Dentária Forense podem ser usados os SRT, SNP, Y-SRT, o gene da Amelogenina e o mtDNA, dependendo, entre outros fatores, do grau de deterioração da amostra. Para estabelecer a identidade da vítima, o resultado do seu exame genético é comparado com o de amostras colhidas junto de potenciais familiares ou de objetos pessoais que contenham amostras biológicas do individuo em causa para compara os resultados e retirar conclusões.

Conclusão: É possível extrair ADN em quantidade e qualidade suficiente a partir de dentes que foram submetidos a condições extremas para fins de identificação.

Palavras-chave: Medicina Dentária Forense, dente, polpa dentária, ADN, desastre em massa, análise de ADN, técnicas de extracção de ADN.

Abstract

Introduction: The development of molecular biology techniques and their applicability in forensic dentistry was a major breakthrough in the techniques of identifying corpses. When the body was subjected to extreme environmental conditions, or is found in a very advanced state of decomposition, conventional techniques of identification may not be enforceable. The teeth for its physical and chemical nature are particularly resistant to these adverse conditions and, in most of these situations, are what remains available to carry on with the extraction of DNA and allow the identification. The aim of this work is to make a literature review on techniques for obtaining DNA from teeth that were subjected to extreme conditions, providing a detailed and current knowledge on this subject.

Methods: It was performed a research of scientific articles in Pubmed electronic database, from where were selected review articles, guidelines, case report and research articles written in English, Portuguese, French and Spanish between 2000 and 2011, limited to human.

Results: The literature search resulted in the selection of 49 articles of 329 matches. Of these 17 were included who met all inclusion criteria. It is perceived that there are three main techniques for the extraction of DNA and five genetic markers used in Forensic Dentistry.

Discussion: In situation where the body is in an advanced state of decay, obtaining DNA from soft tissues is not possible. In these situations one alternative is the teeth. The acquisition of genetic material from the dental tissues (pulp and dentin) is a laborious process, which has several steps, but in the end we get samples of sufficient quality for identification purpose. At present, in Forensic Dentistry STR, SNP, Y-STR, amelogenin gene and mtDNA can be use, depending of the degree of deterioration of the sample. To establish the identity of the victim, the result of genetic test is compared with sample from potential family or personal items containing biological samples of the individual concerned to compare the results and draw conclusions.

Conclusion: It is possible to extract DNA with sufficient quality and quantity from teeth, that were subjected to extreme conditions, for identification purposes.

Keywords: Forensic Dentistry, teeth, dental pulp, DNA, mass disaster, DNA analysis, DNA extraction techniques.

Agradecimentos

Por toda a ajuda, atenção e consideração quero agradecer, em primeiro lugar, à minha orientadora, Professora Inês Caldas, e à minha co-orientadora, Professora Alexandra Teixeira.

À Rita, à Sofia e à Montezinho pela companhia ao longo desta caminhada, pelos bons momentos passados (e os que ainda virão), pelo apoio nos momentos mais difíceis e, acima de tudo, pela Amizade.

Aos meus Pais por esta oportunidade, pelo incentivo, paciência e compreensão. Sem a ajuda deles nada disto teria sido possível.

A todos muito obrigado!

Índice

Lista de abreviaturas	1
Introdução	2
<i>Métodos de identificação</i>	3
<i>Importância do exame dentário no processo de identificação</i>	4
<i>Biologia Molecular na identificação de cadáveres</i>	5
<i>Objetivo do trabalho</i>	6
Material e Métodos	7
Resultados	8
Discussão	11
<i>Recolha das amostras</i>	11
<i>Métodos de extração do material genético</i>	12
<i>Quantificação e amplificação</i>	14
<i>Determinação do perfil de identidade</i>	15
<i>Análise e interpretação dos resultados</i>	17
Conclusão	18
Bibliografia	19

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etileno-diamido tetra-acético

mtDNA – ADN mitocondrial

PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia de polimerases)

SNP - *Single-nucleotide polymorphism* (polimorfismo de um só nucleótido)

STR – *Short tandem repeat* (sequência curta de repetição)

VNTR – *Variable number tandem repeat* (sequência variável de repetição)

Introdução

A Medicina Dentária Forense é um ramo da Medicina Dentária que trata de factos e provas de natureza dentária para esclarecimento jurídico. Foi reconhecida como ciência em meados do século XIX com a criação da Sociedade de Medicina Legal e Criminologia em França e, em 1897, Davenport identificou pela primeira vez um cadáver através da dentição, na sequência de um incêndio que causou a morte de 129 pessoas no *Bazar de Charité* em Paris.⁽¹⁾ Em 1898, Oscar Amoedo escreveu o primeiro livro sobre Medicina Dentária Forense intitulado “L’Art Dentaire en Médecine Légale”. O primeiro curso de Medicina Dentária Forense foi lecionado em 1944 por Castroverde, em Cuba.^(1,2)

A Medicina Dentária Forense tem como principal objetivo auxiliar polícia, investigadores, advogados e juízes a recolher e interpretar provas de natureza dentária para a resolução dos mais diversos problemas judiciais, como a identificação de pessoas, determinação do sexo e da idade e outros fatores genéricos de identificação, interpretação de marcas de mordida e análise de impressões labiais (queilosopia). Através da análise da dentição e dos ossos maxilares é possível determinar a espécie, a afinidade populacional, o sexo e fazer uma estimativa da idade e da estatura. O Médico Dentista que atua neste processo tem de estar apto para descrever, interpretar e explicar os achados dentários.^(3,4,5,6,7)

A identificação de cadáveres em concreto é, desde sempre, uma preocupação da sociedade. É um processo que conta com a participação de equipas multidisciplinares altamente treinadas e preparadas tal. Este procedimento encontra-se particularmente comprometido em situações de acidentes e catástrofes naturais em que o número de mortos é muito elevado e os corpos não se encontram nas melhores condições de conservação, o que limita as técnicas de identificações possíveis de aplicar. No entanto, a identificação positiva de um corpo é fundamental por vários motivos, tanto de ordem legal (como por exemplo para a emissão do certificado de óbito) como emocionais que envolvem os familiares e amigos da vítima.^(7,8,9)

Métodos de identificação

As técnicas de identificação de cadáveres podem ser classificadas de um modo geral em dois grupos: as técnicas primárias que englobam a identificação através das impressões digitais, os registos dentários e a análise molecular (nomeadamente a análise de ADN) e as técnicas secundárias que abrangem as características que podem ser reconhecidas como típicas do indivíduo (tatuagens, sinais, cicatrizes, objetos pessoais, documentos), registos médicos (por exemplo o número de série de uma prótese) e dados antropológicos como o sexo, a idade e a etnia. As técnicas primárias são essenciais para permitir a identificação que pode ser classificada como positiva^{*}, possível[†], existência de evidência insuficiente[‡] ou negativa[§]. (1,6,8,10)

O processo de identificação tem por base o cruzamento de dados obtidos *antemortem* com dados recolhidos no cadáver (dados *postmortem*) – impressões digitais, registos dentários e ADN. Assim, um exame *postmortem* rigoroso, com a recolha do máximo de informação possível no cadáver, é essencial para uma correta identificação. Este exame inclui o exame radiográfico, o exame do hábito externo (incluindo recolha de impressões digitais), o exame dentário e a recolha de amostras de ADN. (1,8)

Através da autópsia é possível recolher informação sobre a extensão dos danos e das lesões, determinar a causa de morte e recolher amostras para análise, incluindo análise de ADN. O exame do hábito externo e o exame radiográfico permitem obter informações sobre a causa de morte e avaliar as lesões. As informações recolhidas podem depois ser comparadas com registos *antemortem*. A recolha de impressões digitais é um procedimento que faz parte do exame do hábito externo. Esta técnica é relativamente fácil de aplicar e muito eficaz no processo de identificação, desde que existam registos prévios e os tecidos moles permitam esta recolha. Porém, frequentemente, ou pela ausência de dados estabelecidos previamente, ou pela condição de conservação do próprio cadáver, aplicação desta técnica não é possível. (1,8,9)

* Quando os dados *postmortem* são coincidentes com os dados *antemortem* e não existem discrepâncias irreconciliáveis.

† Quando os dados são compatíveis mas não são suficientes para uma identificação positiva.

‡ Quando os dados não podem ser verificados, mas não existem discrepâncias irreconciliáveis.

§ Quando existem discrepâncias irreconciliáveis.

Importância do exame dentário no processo de identificação

Os dentes e os tratamentos dentários efetuados ao longo da vida de um indivíduo são considerados meios efetivos e eficazes no processo de averiguação da identidade. Pelo facto de serem maioritariamente constituídos por tecido duro e de se encontrarem protegidos dentro da cavidade oral por varias camadas de pele, tecido muscular, adiposo e ósseo, os dentes são resistentes à maioria das condições adversas que ocorrem em situações de catástrofes e acidentes, o que os torna uma fonte de informação útil. Devem no entanto ser manuseados com grande precaução, uma vez que nestas situações podem encontrar-se fragilizados. Quando submetidos a elevadas temperaturas, os ossos maxilares e os dentes ficam desidratados e as fibras de colagénio sofrem alterações, tornando as estruturas muito friáveis, o que implica a sua fixação para proteção antes do manuseamento. Também ocorrem alterações a nível da cor tanto dos tecidos biológicos como dos materiais restauradores, sendo que estas variações ainda que permitam estimar o intervalo de temperatura a que os tecidos estiveram submetidos, podem ser fonte de erro para o observador menos treinado. ^(1,8,9,10,11,12,13)

Os dados recolhidos através do exame da cavidade oral devem ser devidamente registados em impressos próprios. São avaliados os dentes presentes, os tratamentos efetuados e materiais usados nos mesmos, a presença de próteses dentárias removíveis e/ou fixas e as anomalias de forma e/ou número, lesões nos ossos maxilares e nos tecidos moles intra e perio-orais. Para cada dente observa-se e regista-se a presença de cáries, restaurações, coroas, restos radiculares, tratamentos endodônticos radicais, no caso de estar ausente se foi extraído *antemortem* ou perdido depois da morte, os materiais usados nas restaurações e superfícies envolvidas, bem como qualquer outra característica que se considere relevante. São também registadas as particularidades anatómicas como a cor, oclusão, desgastes das superfícies dentárias, condição dos tecidos periodontais, a presença de tártaro e qualquer outra situação que possa ser pertinente para a identificação. Todas as informações recolhidas no exame *postmortem*, quer através do exame clínico quer através de radiografias, fotografias e moldes, são posteriormente analisadas e comparadas com os registos *antemortem* existentes, de modo a tentar chegar a uma identificação. Quanto mais diversificados os tratamentos efetuados em vida, as alterações à normalidade e melhores os registos existentes, maior é a probabilidade de se conseguir uma identificação positiva. Deste cruzamento de informações podem ser retiradas três conclusões diferentes conforme o tipo de registos encontrados. Assim a identidade pode ser estabelecida unicamente através do exame da cavidade oral quando os registos revelam características que são

encontradas em menos de 1:10000 pessoas, pode ser provável quando são necessários mais dados para determinar a identidade ou possível quando os dados recolhidos são muito frequentes na população (mais de 1:100) e como tal são necessários dados suplementares que sustentem a identificação. ^(1,8,14,15,16,17)

Para determinar a identidade de um cadáver tendo por base os registos dentários *postmortem*, é imprescindível a existência de registos *antemortem* para viabilizar a comparação dos dados recolhidos com os dados previamente existentes e assim identificar os restos cadavéricos. No entanto, nem sempre os registos *antemortem* se encontram disponíveis ou, quando disponíveis, completos e atualizados o que pode levantar problemas no momento da análise dos resultados. Quando as discrepâncias entre os dados *antemortem* e os dados *postmortem* são elevadas o processo de identificação está dificultado, podendo até ser impossível identificar o corpo através destes registos. Independentemente do acesso aos registos *antemortem* e do estado em que os mesmos se encontram, o exame criterioso da cavidade oral e os respetivos registos *postmortem* devem ser feitos, de preferência por um Médico Dentista com experiência nesta área. ⁽¹⁸⁾

Biologia Molecular na identificação de cadáveres

A aplicação de técnicas da Biologia Molecular, nomeadamente a análise de ADN, na Medicina Legal e Ciências Forenses constituiu um grande avanço na evolução das técnicas de identificação. Foi em 1920 que, pela primeira vez, se usou a análise molecular para determinar a identidade, recorrendo para tal à análise de amostra sanguínea e determinação do respetivo grupo sanguíneo no sistema ABO. Em 1953, Watson e Crick descobriram a estrutura em dupla-hélice do ADN, o que representou um grande progresso na genética e permitiu o desenvolvimento de técnicas de identificação que têm por base as características individuais da sequência de ADN de cada indivíduo. ⁽¹⁹⁾ Em 1985, Jeffreys descobriu que na sequência de ADN existem regiões formadas por sequências altamente repetitivas de ADN, únicas para cada indivíduo (sequências VNTR). Desenvolveu, também, uma técnica que permite a identificação destas sequências utilizando um isótopo radioativo. Esta técnica é conhecida como *DNA fingerprinting*. Outro grande avanço na Biologia Molecular ocorreu também em 1985, quando pela primeira vez se descreveu uma técnica capaz de amplificar sequências específicas no material genético, o PCR. Desde então as técnicas foram evoluindo e atualmente contam-se inúmeras técnicas que passam

pela análise de ADN nuclear (STR e SNP), ADN mitocondrial, cromossoma Y e cromossoma X. (11,19)

Teoricamente, é possível obter ADN a partir de qualquer tecido do corpo, sendo que a quantidade e qualidade variam segundo a fonte de origem do mesmo. Embora os ossos e os dentes sejam os tecidos a partir dos quais se consegue extrair ADN em menores quantidades, são, muitas vezes, os únicos que, após situação morte violenta ou em que decorreu um longo período de tempo entre a morte e a recuperação do corpo ou em que o mesmo esteve submetido a condições ambientais extremas, permanecem íntegros para esta finalidade. Com o desenvolvimento da técnica de PCR, mesmo quando a quantidade de ADN presente na amostra é baixa, pode ser amplificada de modo a conseguir uma quantidade suficiente de material para análise. (11)

As aplicações da Biologia Molecular na Medicina Dentária Forense não se limitam à identificação de cadáveres. De facto, a análise de ADN também se aplica no processo de identificação de pessoas vivas, como na resolução de casos de agressão (análise de ADN na saliva de marcas de mordida). Para proceder à identificação de um corpo através do material genético, é necessário recolher amostras no cadáver e também em pertences do mesmo que contenham vestígios biológicos (escova de dentes ou do cabelo, por exemplo) para depois de analisadas as amostras fazer uma comparação direta e verificar se existe ou não correspondência. Em alternativa o material recolhido no cadáver pode ser analisado e comparado com o de algum familiar (pai, mãe, filhos ou irmãos) e assim estabelecer a relação familiar e a identificação. (9,20)

Objetivo do trabalho

O objetivo do presente trabalho consiste em fazer uma revisão da bibliografia existente sobre as técnicas de extração de ADN a partir dos tecidos dentários e as suas aplicações na Medicina Dentária Forense, avaliando deste modo se esta técnica de identificação é realmente efetiva e eficaz nas situações em que não é possível uma identificação positiva pelas restantes técnicas conhecidas.

Material e Métodos

Para esta revisão bibliográfica procedeu-se à pesquisa de artigos científicos na base de dados eletrónica Pubmed, publicados em inglês, francês, espanhol ou português entre 2000 e 2011. Usaram-se como palavras-chave os termos “*forensic dentistry*”, “*forensic dentistry AND dna*”, “*forensic dentistry AND mass disaster*”, “*teeth AND dna extraction*”, “*dental pulp AND dna extraction*”, “*dna AND mass disaster*”.

Foram incluídos artigos de revisão, artigos de investigação, *guidelines* e artigos de relato de caso que abordassem as técnicas de obtenção e de análise do material genético a partir dos dentes e a sua aplicabilidade na Medicina Dentária Forense. Apenas foram incluídos publicados entre 2000 e 2011, com trabalhos realizados em humanos.

Resultados

Da pesquisa bibliográfica efetuada, foram selecionados 49 artigos dos 329 resultantes da pesquisa, sendo que os restantes foram excluídos por não apresentarem o resumo disponível para leitura ou por não se encontrarem diretamente relacionados com o tema aqui desenvolvido. Destes 49 artigos selecionados, foram incluídos 17 que preenchiam todos os critérios de inclusão referidos. Os restantes 32 foram excluídos pelo facto de a informação que contemplam ser abordada noutros artigos mais recentes e como tal não serem relevantes. Os principais artigos usados na discussão encontram-se resumidos na tabela I.

Tabela I: Resumo dos artigos selecionados.

Autores	Título	Ano Publicação	Tipo de artigo	Resumo
Ubelaker DH ⁽¹¹⁾	“The forensic evaluation of burned skeletal remains: a synthesis”	2009	Artigo revisão	Com a evolução das técnicas melhorou a capacidade de identificação de cadáveres queimados, no entanto ainda existem algumas dificuldades.
Silva R et al ⁽¹²⁾	“Use of DNA technology in forensic dentistry”	2006	Artigo revisão	Os dentes representam uma boa fonte de ADN, existindo varias técnicas para a sua extracção.
Tsutsumi H et al ⁽²¹⁾	“Hypervariable region structure and polymorphism of mtDNA from dental pulp and family analysis”	2006	Artigo investigação	A análise de mtDNA obtido a partir da polpa dentária é eficaz e permite relacionar com a linhagem materna.
Iwamura E et al ⁽²²⁾	“Human identification and analysis of DNA in bones”	2004	Artigo revisão	As diferenças quantitativas e qualitativas na análise ADN estão relacionadas com os factores ambientais e não tempo.
Rohland N et al ⁽²³⁾	“Ancient DNA extraction from bones and teeth”	2007	Guidelines	
Prinz M et al ⁽⁹⁾	“DNA commission of international society for forensic genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DIV)”	2006	Guidelines (revisão)	
Westen A et al ⁽²⁵⁾	“Femur, rib and tooth sample collection for DNA analysis in disaster victim identification (DIV)”	2007	Guidelines	
Manjunath BC et al ⁽²⁶⁾	“DNA profiling and forensic dentistry – A review of the recent concepts and trends”	2011	Artigo revisão	Os dentes são excelente fonte de ADN quando comparados com os restantes tecidos. A evolução da tecnologia permitiu grandes avanços nas técnicas de identificação.
Ohira H et al ⁽²⁷⁾	“Effective appropriate use of dental remains and forensic DNA testing for personal identity confirmation”	2009	Relato de caso	A identificação através dos registos dentários é rápida e correcta. Pode ser associada à análise de ADN para confirmação dos resultados.

Utsuno H <i>et al</i> (28)	“Influence of template DNA degradation on the genotyping of SNPs and STR polymorphisms from forensic materials by PCR”	2004	Artigo investigação	O aumento da degradação do ADN diminui a qualidade do PCR. A redução do tamanho da sequência a amplificar é uma solução.
Phillips K <i>et al</i> (29)	“Acomparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated)”	2011	Comunicação	A extracção de ADN através do QIAcube é tão eficiente como o QIAGEN (manual) e o Chelex-100®.
Budowle B <i>et al</i> (32)	“Forensic aspects of mass disasters: Strategic considerations for DNA-based human identification”	2005	Artigo revisão	A análise de ADN revela-se vantajosa nas situações de catástrofes em massa. É processo laborioso mas que reproduz resultados fiáveis mesmo quando a amostra se encontra degradada.
Murakami H <i>et al</i> (31)	“Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples”	2000	Artigo investigação	A determinação do sexo recorrendo à técnica de PCR é considerada útil principalmente nos casos em o cadáver se encontra num estado de decomposição muito avançado.
Maruyama S <i>et al</i> (34)	“Polymorphism of LPL locus in Japanese and comparison of PCR amplification efficiency from degraded DNA between LPL locus and the D21S11”	2005	Artigo investigação	A redução do tamanho da sequência a ser amplificada por PCR permite melhores resultados quando o AND se encontra muito degradado
Kashyap VK <i>et al</i> (36)	“Deletions in the Y-derived melogenin gene fragment in the Indian popultion”	2006	Artigo investigação	O gene que codifica a Amelogenina pode ser usado com sucesso para a determinação do sexo e nas ciências forenses.
Hartman D <i>et al</i> (37)	“The contriution of DNA to the disaster victim identification (DIV) effort”	2010	Relato de caso	Identificação de cadáveres com recurso à tecnologia de ADN permite bons resultados, embora seja demorado. O estado em que se encontra o cadáver é importante para a recolha de amostras.
Hartman D <i>et al</i> (35)	“The importance of Guthrie cards and other medical sample for direct matching of disaster victims using DNA profiling”	2010	Relato de caso	O teste do pezinho e o resultado de biópsias são bons meios de comparação para a análise dos resultados dos testes de ADN.

Discussão

Os avanços na Biologia Molecular permitiram a evolução das técnicas de identificação. O recurso ao material genético constitui, sem dúvida, uma grande mais-valia neste processo, no entanto a sua obtenção em quantidade e qualidade suficientes nem sempre é tarefa fácil. Os dentes, tal como já foi referido, apresentam uma grande resistência, tanto física como química, às situações mais adversas, pelo que constituem uma boa fonte para a recolha de ADN nas situações em que o cadáver foi exposto a condições extremas de temperatura, humidade ou à ação de substâncias deteriorantes (como a ação microbiana, por exemplo). Nestas condições extremas, os tecidos moles sofrem grandes alterações, inviabilizando a sua utilização para recolha de material genético, tendo assim que se recorrer aos tecidos duros como os ossos e os dentes. Segundo alguns autores, consegue-se obter material genético em bom estado para identificação a partir de dentes que foram submetidos a temperaturas de 300°C e com o avanço das técnicas de extração e amplificação do ADN tem-se observado melhorias significativas nos resultados em situações mais extremas. O material genético pode ser obtido com relativa simplicidade e em quantidades suficientes a partir da polpa e/ou da dentina de qualquer porção do dente (da coroa, da raiz e/ou do ápice), sendo que é a partir do corpo da raiz que os resultados obtidos são os melhores. Outro fator importante a ter em conta, para além da quantidade e qualidade do material genético obtido, é a sua pureza, uma vez que as impurezas contaminam a amostra e inibem o PCR, impossibilitando assim a aplicação desta técnica. Para proceder à identificação de um cadáver com recurso à análise de ADN é necessário, em primeiro lugar, fazer a recolha da amostra, seguindo-se uma série de passos como o isolamento do material genético, a amplificação e quantificação ou a sequenciação do ADN e a análise dos resultados obtidos. ^(10,11,21,22,23,24)

Recolha das amostras

Tal como já foi referido é possível obter material genético tanto a partir da dentina como da polpa, sendo que é a partir do corpo da raiz que se conseguem maiores quantidades do mesmo. Devem ser escolhidos dentes íntegros, ou seja livres de cáries, fraturas e de qualquer tipo de tratamento e, de preferência, usar os caninos, incisivos centrais ou molares com câmaras pulpares amplas. No caso de crianças e jovens, os dentes que ainda apresentam os ápices abertos

não devem ser usados, pois encontram-se muito mais suscetíveis à ação de substâncias contaminantes e à consequente degradação do material genético. ⁽²⁵⁾

Na literatura são descritas várias técnicas com a finalidade de recolher as amostras de dentina e polpa para posterior extração do material genético, sendo que umas são mais conservadoras do que outras e que a quantidade de material obtido também varia segundo a técnica usada.

As amostras podem ser recolhidas através da secção do dente verticalmente do bordo incisal/face oclusal até ao ápice ou horizontalmente abaixo da junção esmalte-cimento de modo a preservar a coroa. A dentina é, de seguida, raspada obtendo-se assim um pó a partir do qual será possível extrair o material genético. O corte do dente na horizontal, para além de ser uma técnica mais conservadora, permitindo a preservação da coroa do dente, também possibilita fazer a extirpação da polpa dentária e, consequentemente, a sua utilização para obtenção de ADN. ^(26,27)

Uma outra forma de se conseguir amostras de tecido dentário para recolha de material genético é através da congelação do dente em azoto líquido. Após este processo o dente é triturado, conseguindo-se assim a amostra. A maior desvantagem desta técnica é o facto de o dente ficar completamente destruído. ⁽²⁶⁾

A escolha da técnica para a recolha das amostras de dentina e polpa para posterior extração do material genético prende-se, essencialmente, com a necessidade de preservar ou não o dente, uma vez que as quantidades de material obtido através de qualquer uma delas é suficiente para permitir a análise. O uso de técnicas mais conservadoras é sempre preferível, principalmente quando as amostras têm importância antropológica. É também fundamental que qualquer que seja a técnica, a sua aplicação seja nas melhores condições de esterilização para minimizar o risco de contaminação das amostras. ⁽²⁶⁾

Métodos de extração do material genético

A extração do material genético de uma amostra é sem dúvida um passo fundamental para permitir a análise e posterior identificação de um cadáver através do seu ADN. As técnicas de extração de ADN têm por base a lise celular para permitir a libertação de todo o conteúdo intracelular, seguindo-se a purificação do ADN, ou seja a eliminação de proteínas, polissacarídeos, lípidos, iões e moléculas orgânicas de baixo peso molecular que fazem parte do

conteúdo intracelular. No caso de amostras provenientes de cadáveres que não se encontram nas melhores condições de conservação, como nos casos de incêndios ou afogamentos, e em situações de catástrofes naturais ou acidentais, este processo pode estar severamente comprometido. Nestas situações, a maioria das vezes, a quantidade de material genético que se consegue é mínima e pode estar contaminado com substâncias que inibem a reação de PCR. Assim, é fundamental assegurar que a técnica selecionada para proceder à extração do ADN é eficiente para não comprometer os restantes passos do processo. ^(11,28)

O primeiro passo no processo de extração do material genético, quando a amostra provem da dentina ou do cimento radicular, consiste na descalcificação das amostras de tecido dentário. O método mais usado consiste em mergulhar as amostras em EDTA a 0,5 M, à temperatura ambiente durante um ou dois dias. Depois das amostras sofrerem descalcificação, segue-se a lise da membrana celular e, depois, a desnaturação e inativação das proteínas, recorrendo a substâncias quelantes e proteinases. Só depois de completar estes passos é que se segue a extração propriamente dita do ADN. A extração do material genético de uma amostra pode ser feita com recurso a diversas técnicas, umas mais sensíveis do que outras, sendo que as que são mais frequentemente usadas na Medicina Dentária Forense são o método orgânico, o método da sílica, *Chelex 100*® e *FTA paper*®. ^(11,27)

O método orgânico consiste na extração do ADN recorrendo a uma mistura de fenol e clorofórmio. Este método é altamente sensível, conseguindo-se extrair ADN de boa qualidade e em quantidade suficiente para a análise. Esta mistura é responsável pela desnaturação das proteínas. Esta solução é composta por duas fases, uma aquosa em que se encontra o ADN purificado e uma outra orgânica onde se encontram as proteínas desnaturadas. O ADN é depois precipitado com o etanol. As grandes desvantagens deste método são o facto de ser uma técnica laboriosa, o que requiere muito tempo de laboratório, o manuseamento de solventes orgânicos perigosos e apenas poder ser usada quando existe uma quantidade de amostras relativamente grande. ^(26,27)

O *QIAamp DNA Investigator Kit* é um *kit* comercial que permite a extração de ADN de forma eficaz em duas fases. Numa primeira fase provoca-se a lise celular combinando a ação enzimática com a ação mecânica e, numa segunda fase purifica-se o ADN recorrendo a uma membrana à base de sílica. A proteinase k é uma enzima que intervém no processo de digestão dos componentes celulares e que faz parte da composição deste *kit*, podendo também ser usada juntamente com o EDTA na fase de descalcificação. Depois de tratada a amostra com a

proteínase k, segue-se a extração e purificação do ADN com recurso à técnica das colunas à base de sílica. Este método permite melhores resultados do que o método orgânico na extração e purificação de ADN em dentes muito degradados, uma vez remove todas as substâncias inibidoras da amostra e no final obtém-se uma amostra de elevada qualidade. ^(26,27,29)

O *Chelex 100*® é outro *kit* comercial que tem como base uma resina quelante desenvolvida especificamente para a extração de ADN de amostras para posteriormente usar o PCR. Esta resina composta por co-polímeros de divinilbenzeno estireno contendo iões iminodiacetato que funcionam como quelantes para os iões metálicos polivalentes. No processo de extração do ADN a solução alcalina associada ao movimento provado pela ebulição provocam a lise celular e libertação do conteúdo intracelular ao qual os agentes quelantes e ligam imediatamente, protegendo assim o ADN da degradação. É um procedimento simples, rápido e que não implica o manuseamento de solventes orgânicos. Estudos referem que a extração de ADN a partir do tecido pulpar com recurso a esta técnica é tão eficiente como o método orgânico e que a extração, amplificação e sequenciação do ADN são possíveis em dentes incinerados. ^(26,29)

Quantificação e amplificação

O PCR é uma técnica da Biologia Molecular que permite amplificar pequenas quantidades de ADN, de tal modo que se conseguem quantidades de material suficientes para posterior sequenciação. Para tal é necessário uma *DNA polimerase* e um par de *Primers* específicos para a região que se pretende amplificar. Cada *primer* irá reconhecer uma região específica na sequência do ADN de cadeia simples, ligar-se a ela e ativar a polimerase de ADN, permitindo a replicação da sequência em causa e a sua consequente amplificação. No final do processo obtêm-se 2^n cópias iguais à sequência original, sendo que o n é o número de vezes que o processo de replicação foi repetido. ^(26,30,31)

O PCR é uma técnica altamente sensível e, como tal, a presença de qualquer contaminante pode inibir a reação. De modo a ultrapassar este obstáculo, a técnica foi refinada, dando origem ao *Real Time PCR* que tem um nível de deteção muito superior ao do PCR convencional. ^(32,33)

Determinação do perfil de identidade

A sequenciação de ADN é um método de identificação robusto, no entanto depende da quantidade e qualidade do ADN presente na amostra. Com a evolução das técnicas algumas destas dificuldades são ultrapassadas recorrendo a métodos mais sensíveis e automatizados.

Atualmente, os métodos mais utilizados recorrem à identificação precisa dos produtos amplificados por PCR. Os *short tandem repeat* (STR) são polimorfismos com elevado grau de discriminação. São zonas hipervariáveis na sequência de ADN, formadas por sequências repetitivas de fragmentos constituídos por duas a sete pares de bases. A análise dos STR é feita recorrendo a marcadores fluorescentes que se ligam ao produto do PCR e que são, depois, detetados na eletroforese por um laser e separados segundo o seu tamanho. Como são sequências de nucleótidos relativamente pequenas, são adequadas para a análise de ADN degradado, ao contrário dos VNTR antigamente usados. No processo de identificação, o polimorfismo é tanto mais valioso quanto maior a variação de alelos que o compõem, mais pequeno (menor número de pares de bases), maior a frequência de heterozigóticos e menor a sua frequência na população. É recomendado recorrer à análise de, no mínimo, doze *loci* para determinar a identidade de determinada vítima. À medida que o grau de degradação do material genético aumenta, a segurança nos resultados do PCR diminui. Uma forma de ultrapassar este problema será reduzir o tamanho da sequência que é submetida a amplificação por PCR. ^(9,11,26,28,34,38)

Em alternativa ao uso dos STR, quando o ADN genómico se encontra muito degradado, pode-se recorrer aos SNP. Estes polimorfismos resultam da variação de um único nucleótido (podendo por vezes gerar ou eliminar locais de clivagem para endonucleases de restrição. Estes polimorfismos podem ser analisados recorrendo a técnicas automatizadas ou à sua sequenciação. Para a aplicação das técnicas automatizadas são necessárias grades quantidades de ADN, o que constitui uma limitação na sua aplicação na Forense. ^(38,39) Os SNPs surgem como marcadores muito valiosos para a identificação de cadáveres em estados de decomposição muito avançados, porque as regiões que se pretende amplificar são muito pequenas. Estes polimorfismos são também úteis para determinar a linhagem, evolução e o fenótipo. Para além da sua aplicação na Medicina Forense, os SNPs também são usados no diagnóstico de certas patologias e no estudo genético da população. Esta opção é viável mesmo quando a amostra disponível é pequena, mas apenas pode ser usada para identificação quando o *loci* é suficientemente sensível e existem registos populacionais disponíveis. ^(9,11,26,32)

Quando a quantidade de ADN genómico que se consegue extrair de uma amostra é demasiado pequena ou se encontra muito degradada, uma alternativa viável ao uso do ADN nuclear é recorrer ao ADN mitocondrial. O ADN mitocondrial pode ser usado com segurança para a identificação de um cadáver e apresenta como vantagens o facto de existir um grande número de cópias (várias centenas) em cada célula e de ser muito resistente à degradação, tanto a causada pela presença de fatores ambientais adversos como pelo tempo decorrido entre a morte e a recolha da amostra, devido ao facto de ser circular. Em situações em que o cadáver se encontra num estado de decomposição muito avançado o ADN mitocondrial oferece resultados mais fiáveis do que o ADN genómico. Para além disto, como a sua transmissão hereditária e por via citoplasmática, de mãe para filho, pode ser usado com grande segurança para determinar a relação com a linhagem materna e assim permitir uma identificação positiva através do cruzamento dos dados obtidos na sequenciação do mtDNA da vítima com o de possíveis familiares, nomeadamente mãe ou um irmão. Apresenta-se muito útil em situações de desastres em massa fechados, ou seja em que a identidade das vítimas é conhecida mas os corpos encontram-se irreconhecíveis, como por exemplo nos acidentes de avião em que há uma lista de passageiros. A grande desvantagem desta técnica de identificação é custo associado, que é muito elevado devido à tecnologia avançada que esta técnica requer. ^(9,11,21,22,26,32)

O cromossoma Y é transmitido diretamente de pai para filho, o que o torna num meio de estudo viável para determinar a paternidade de determinado individuo. Os Y-STR podem ser efetivamente usados para a identificação de vítimas e principalmente nos testes de paternidade. Quando o presumível pai não está disponível para ser testado, pode-se recorrer ao ADN de um parente masculino e relacionado por via paterna como referência. ⁽³⁹⁾ A grande desvantagem, no caso da aplicação desta técnica na Medicina Dentária Forense, é o facto de não distinguir a linhagem paterna, uma vez que herdado diretamente do pai e não sofre mutações significativas durante várias gerações. Esta característica, no entanto, pode-se revelar numa vantagem quando o objetivo é analisar a proveniência geográfica ou o estudo da migração. ^(26,31,33)

A sequenciação do gene da Amelogenina é uma opção quando o objetivo é determinar o sexo. Este gene é responsável pela codificação de uma proteína essencial para a correta formação do esmalte dentário. Encontra-se localizado nos cromossomas sexuais (Xp22.1-Xp22.3 e Yp11.2) e apresenta variações tanto no comprimento como na sequência. Através da amplificação e quantificação recorrendo ao PCR é possível determinar o sexo, uma vez que a presença de dois produtos resultantes da amplificação significam que a amostra provem de um homem, sendo que

um dos produtos corresponde ao cromossoma X e o outro ao cromossoma Y. Quando após a amplificação se obtém apenas um produto a amostra provem de uma mulher. Esta variação no resultado da amplificação do gene permite determinar o sexo. (26,33,35)

Análise e interpretação dos resultados

Depois da sequenciação do ADN é necessário interpretar o resultado, comparando-o com outras amostras. Atualmente, vários *loci* são reconhecidos como suficientemente individualizantes para permitir a identificação de um corpo. No entanto, existem algumas limitações nesta técnica que devem ser consideradas na hora de retirar conclusões a partir dos resultados obtidos. Em primeiro lugar deve ser considerado o grau de degradação do material genético usado para a análise, uma vez que pode condicionar a sequenciação do ADN e permitir apenas a elaboração de um perfil parcial de ADN do indivíduo. A amostra recolhida no cadáver depois de analisada pode ser comparada com amostras recolhidas a partir de pertences do mesmo que contenham vestígios biológicos (por exemplo escova de dentes) ou com amostras recolhidas junto dos presumíveis familiares. No caso de a comparação ser feita com os resultados obtidos através dos objetos pessoais a identidade é estabelecida de uma forma direta, no entanto é necessário garantir que os objetos em causa pertencem mesmo ao cadáver que se pretende identificar. Por outro lado, a identidade pode ser determinada por relação indireta, através da análise de amostras de ADN recolhida nos familiares da vítima. Com qualquer um destes métodos podem ocorrer falhas, pelo que o ideal seria haver uma base de dados de ADN que permitisse estabelecer uma correspondência direta da amostra com um registo previamente existente. É também fundamental garantir a confidencialidade dos dados, uma vez que se tratam de dados sensíveis. (32,36,37)

Conclusão

A identificação humana é um dos principais objetivos da Medicina Forense. São conhecidas várias técnicas que podem ser aplicadas isoladamente ou em associação e que permitem a identificação positiva na generalidade dos casos. O problema surge quando na necoridentificação, o cadáver não se encontra nas melhores condições de conservação, quer pelo tempo que decorreu entre a morte e a exumação do corpo quer pelas condições ambientais as quais esteve submetido. É nestas situações que a Medicina Dentária Forense se revela uma grande mais-valia.

Os dentes pelas suas características físicas e químicas são mais resistentes às situações adversas de temperatura e humidade do que os tecidos moles. Como tal podem ser usados para a identificação da vítima, tanto através da análise da dentição e comparação dos registos *postmortem* com os registos *antemortem*, como para proceder à extração de material genético para análise.

Efetivamente é possível extrair quantidades suficientes de ADN a partir dos tecidos dênários para a análise do mesmo. Na generalidade, todas as técnicas atualmente conhecidas permitem a obtenção de resultados satisfatórios no processo de identificação, devendo os principais critérios de seleção ser o grau de decomposição do cadáver e a finalidade da análise. Em situações em que o estado de decomposição já se encontra muito avançado, a utilização do ADN mitocondrial revela-se uma boa alternativa, desde que existam amostras de familiares da linhagem materna disponíveis para a comparação. No caso em que apenas se pretende determinar o sexo será adequado analisar o resultado do PCR da amplificação do gene da Amelogenina.

Tendo em conta a complexidade do processo de identificação de um cadáver e as implicações que o mais pequeno erro pode ter neste processo, será apropriado que se sustente não apenas numa técnica, mas sim no cruzamento das informações recolhidas e das conclusões a partir delas retiradas, a nível das diversas áreas da Medicina Forense.

Bibliografia

1. Schuliar Y, Knudsen P. *Role of forensic pathologists in mass disasters*. Forensic Sci Med Pathol 2011.
2. Hanley H. *Some Aspects of Forensic Dentistry (report)*. Proc. Roy. Soc. Med., 1977; 70: 263-264.
3. Gnanasundaram N. *Tooth for truth (The glory of forensic dentistry)*. J Forensic Dent Sci. 2010; 2: 51-52.
4. Whittaker D. *Research in forensic odontology*. Annals of the Royal College of Surgeons of England 1982; 64.
5. Willems G, Clement J, Sweet D. *Forensic odontology special issue – September 2010*. Forensic Science International, 2010; 201: 1-2.
6. Avon SL. *Forensic Odontology: The Roles and Responsibilities of the Dentist*. J. Can. Med. Assoc., 2004; 70: 453-8.
7. Deadman WJ. *The Identification of Human Remains*. J. Can. Med. Assoc., 1964; 91.
8. Sweet D. *INETR POL DVI best-practice standards – An overview*. Forensic Science International, 2010; 201: 18-21.
9. Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons TJ, Sajantila A, Scheithauer R, Schmitter H, Schneider PM. *DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DIV)*. Forensic Science International: Genetics, 2007; 1: 3-12.
10. Hill AJ, Hewson I, LainR. *The role of the forensic odontologist in disaster victim identification: Lesson of management*. Forensic Science International, 2011; 205: 44-47.
11. Ubelaker DH. *The forensic evaluation of burned skeletal remains: A synthesis*. Forensic Science International, 2009; 183: 1-5.o
12. Silva RHA, Sales-Peres A, Oliveira RN, Oliveira FT, Sales-Peres SHC. *Use of DNA technology in forensic dentistry*. J Appl Oral Sci, 2007; 15: 156-61.
13. Patidar KA, Parwani R, Wanjari S. *Effects of high temperature on diferente restorations in forensic identification: Dental samples and mandible*. J Forensic Dent Sci, 2010; 2: 37-43.
14. Schuller-Gotzburg P, Suchanek J. *Forensic odontologists successfully identify tsunami victims in Phuket, Thailand*. Forensic Science International, 2007; 171: 204-207.
15. Minaguchi K, Maruyama S, Kasahara I, Nohira C, Hanaoka Y, Tsai T, Kiriyaama H, Takahashi N. *identification of unknown body using DNA analysis and dental characteristics in Chest X-ray photograph*. Bull Tokyo Dent Coll, 2005; 46: 145-153.

16. <http://iofos.eu/Quality-Ass/Report-IOFOS.htm>; consultado em Maio 2012.
17. <http://iofos.eu/Quality-Ass/Disasters-IOFOS.htm>; consultado em Maio 2012.
18. Skinner M, Alempijevic D, Stanojevic A. *In the absence of dental records, do we need forensic odontologists at mass grave sites?*. Forensic Science International, 2010; 201: 22-26.
19. Watson JD, Crick FH. *Molecular Structure of Nucleic Acids A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature, 1953; 4356: 737.
20. Carracedo A, Rodriguez-Calvo MS, Pestoni C, Lareu MV, Bellas S, Salas A, Barros F. *Forensic DNA analysis in Europe: current situation and standarization efforts*. Forensic Science International, 1997; 86: 87-102.
21. Tsutsumi H, Komuro T, Mukoyama R, Nogami H. *Hypervariable region structure and polymorphism of mtDNA from dental pulp and family aanalysis*. Journl of Oral Science, 2006; 48: 145-152.
22. Iwamura ESM, Soares-Vieira JA, Muñoz DR. *Human identification and analysis of DNA in bones*. Rev Hosp Clin Fac Med, 2004; 56:383-388.
23. Rohland N, Hofreiter M. *Ancient DNA extraction from bones and teeth*. Nature Publishing Group, 2007.
24. Schwark T, Heinrich A, von Wurmb-Schwark N. *Genetic identification of highly putrefied bodies using DNA from soft tissues*. Int J Legal Med, 2011; 125: 891-894.
25. Westwn AA, Gerretsen RRR, Maat GJR. *Femur, rib, and tooth sample collection for DNA analysis in disaster victim identification (DIV)*. Forensic Sci Med Pathol, 2008; 4: 15-21.
26. Manjunath BC, Chandrashekar BR, Mahesh M, Vatchala Rani RM. *DNAProfilng and forensic dentistry – A review of the recent concepts and trends*. Journal of Forensic an Legal Medicine, 2011; 18: 191-197.
27. Ohira H, Yamamuro Y, Kitagawa Y, Nakagawa K, Yamamoto I, Yamada Y. *Effective appropriate use of dental remains and forensic DNA testing for personal identity confirmation*. Legal Medicine, 2009; 11: 560-562.
28. Utsuno H, Minagughi K. *Influence of template DNA degradation on the genotyping of SNPs and STR polymorphisms from forensic materials by PCR*. Bull Tokyo dent Coll, 2004; 45: 33-46.
29. Phillips K, McCallum N, Welch L. *A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated)*. Forensic Science International: Genetics, 2012; 6: 282-285.
30. Yamamoto K. *Molecular biological studies on teeth, and inquest*. Forensic cience International, 1997; 80: 70-87.

31. Murakami H, Yamamoto Y, Yoshitome K, Ono T, Okamoto O, Shigeta Y, Doi Y, Miyishi S, Ishizu H. *Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples*. Acta Med Okayama, 2000; 54: 21-32.
32. Budowlw B, Bieber F, Eisenberg A. *Forensic aspects of mass disasters: Strategic considerations for DNA-based human identification*. Legal Medicine, 2005; 7: 230-243.
33. Dhnapal R, Sreenivasa BT, Naga SA, Soujanya P, Saraswathi TR. *Current trends in Forensic Genetics*. J Forensic Dent Sci, 2010; 2: 96-98.
34. Maruyama S, Minaguchi K. *Polymorphism of LPL Locus in Japanese and Comparison of PCR Amplification Efficiency from degraded DNA between LPL Locus and the D21S11*. Bull Tokyo Dent Coll, 2005; 46: 115-121.
35. Hartman D, Benton L, Morenos L, Beyer J, Spiden M, Stock A. *The importance of Guthrie cards and other medical samples for the direct matching od disaster victims using DNA profiling*. Forensic Science international, 2011; 205: 59-63.
36. Kashyap VK, Sahoo S, Sitalaximi T, Trivedi R. *Deletions in Y-derived amelogenin gene fragment in the Indian population*. BMC Medical Genetics, 2006.
37. Hartman D, Drummer O, Eckhoff C, Scheffer JW, Stringer P. *The contribution of DNA to the disaster victim identification (DIV) effort*. Forensic Science International, 2011; 205: 52-58.
38. Alberts B *et al*. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science Editors, 5th edition, 2008.
39. Goodwin W, Linacre A, Hadi S. *Lineage Markers: Forensic application of Y chromosome polymorphisms*. An Introduction to Forensic Genetics; JohnWiley & Sons Editors, 2nd edition, 2011, chpther 13: 162-164.