

IDENTIFICAÇÃO EM MEDICINA DENTÁRIA FORENSE

ANA CORTE-REAL
DUARTE NUNO VIEIRA
COORDENAÇÃO

IMPRESA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
COIMBRA UNIVERSITY PRESS

Capítulo VIII

Identificação genética

Marcadores genéticos utilizados na Identificação
Técnicas analíticas de rotina num laboratório forense
Os tecidos dentários
O dente na análise genética
Amostras degradadas versus amostras seguras
As impressões labiais na análise genética

Ana Corte-Real
Maria João Porto

RESUMO:

A peça dentária é um material de análise do ADN, tendo em conta os fatores ambientais inerentes da realidade forense. Pretende-se com este capítulo salientar que, pelas suas características morfo-histo-funcionais, o ADN está localizado no dente como o “mosquito no âmbar”. A dentina integrada no complexo dentino-pulpar e os elementos celulares do cimento dentário encontrados na matriz dentinária, mantêm a sua integridade em relação às agressões do meio exterior, nomeadamente quando estamos perante vestígios biológicos com um elevado grau de degradação cadavérica, inviáveis para a identificação genética. O sucesso da genotipagem a partir do dente compreende a etapa diferenciada de preparação da amostra e a de escolha dos polimorfismos com maior poder de discriminação.

PALAVRAS-CHAVE:

identificação positiva, discriminação, genotipagem

ABSTRACT:

Taking into account environmental factors inherent to the forensic reality, the tooth is an appropriate material for DNA analysis. The aim of this chapter is to enhance that by its histo-morpho-functional characteristics, the DNA is located in the tooth as the “fly in amber”. Dentin, which is included in pulp-dentin complex and the cellular elements of dental cementum found in dentin matrix, maintain their integrity in relation to aggressions from the external environment. This is particularly important when we are dealing with biological remains with a high degree of cadaverous decay, unviable for genetic identification. The success of genotyping from the tooth comprises a distinct stage of sample preparation and selection of polymorphisms with greater discrimination power.

KEYWORD:

positive identification, discrimination, genotyping

VIII.1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste capítulo é o conhecimento do contributo das características histológicas das peças dentárias, na obtenção de uma identificação genética.

Parece-nos relevante tecer algumas considerações quanto aos marcadores genéticos utilizados na identificação e técnicas analíticas, bem como proporcionar uma base geral de caráter anatomo-funcional, com destaque para o complexo dentino-pulpar e cimento.

VIII.2. INTRODUÇÃO À GENÉTICA FORENSE

A Genética Forense, uma das áreas das ciências forenses, tem permitido a identificação genética de amostras biológicas provenientes de casos judiciais de âmbito civil e criminal, contribuindo deste modo para a decisão dos tribunais.

Nos últimos anos, a análise do ADN através da aplicação de metodologias de biologia molecular extremamente sensíveis tais como as baseadas na PCR (Polymerase Chain Reaction), revolucionou a investigação forense. Todos os seres vivos contêm ADN, o qual apresenta variabilidade entre cada espécie e dentro de uma mesma espécie, permitindo a determinação da origem de material biológico.

São várias as aplicações da Genética Forense. As investigações de parentesco englobam perícias para investigação da paternidade biológica, investigações de maternidade (nomeadamente em casos de abortos ilegais e crimes de infanticídio) e de filiação, impugnações de paternidade e outros

estudos familiares mais ou menos complexos dependendo do grau de parentesco dos intervenientes envolvidos nas perícias. Estes exames são também utilizados em casos de imigração, quando é necessário determinar o grau de parentesco de determinado indivíduo relativamente às amostras de referência.

A identificação de pessoas desaparecidas e de restos cadavéricos provenientes de acidentes aéreos, desastres de massa ou de crimes contra a humanidade, é outra das áreas de intervenção da genética forense que ocorre quando já não é possível efetuar a identificação física. Nestes casos é essencial que haja boas amostras de referência para se proceder aos respetivos estudos comparativos e, sendo certo que na maioria das situações não é possível ter acesso a amostras biológicas do próprio (quer sejam colhidas em objetos pessoais, quer sejam por exemplo provenientes de biobancos hospitalares), é fundamental efetuar uma escolha criteriosa dos familiares a estudar.

A identificação genética de vestígios biológicos de processos criminais permite relacionar as vítimas com os suspeitos e vice-versa, os suspeitos com a cena do crime, diferenciar cenas de crime, ou ainda relacionar os objetos utilizados nas cenas de crime quer com as vítimas quer com os suspeitos. Atualmente é possível fazer a identificação genética de amostras biológicas cada vez mais diminutas ou degradadas, tais como células de descamação do epitélio, hastes de pelos/cabelos, ossos e por último os dentes, amostras de eleição em situações forenses extremas. Sendo a prova do ADN, em muitas situações, a única evidência da prática de um crime, é essencial que todos os exames sejam

realizados de forma precisa e criteriosa para que se atinjam elevados níveis de qualidade, de forma a serem úteis em tribunal.

As bases de dados de perfis de ADN para identificação criminal e identificação civil (cadáveres não identificados, militares ou outros profissionais de risco), assim como investigações histórica, monitorização de transplantes ou casos de negligência hospitalar (troca de amostras de doentes) são outras das inúmeras aplicações desta área forense.

Embora a maioria das identificações genéticas de âmbito criminal sejam efetuadas em ADN humano, muitas vezes é também necessário fazer a identificação de ADN não-humano. A identificação de pelos ou outro material biológico de animais domésticos (nomeadamente de cães e gatos) e de determinadas espécies botânicas, podem associar o suspeito ao local do crime ou comprovar que o cadáver foi removido do local onde o crime ocorreu. Outras aplicações envolvem ainda o combate ao tráfico de animais em vias de extinção e ainda a identificação de materiais utilizados no bioterrorismo (tal como o anthrax) e na contaminação alimentar [1-3].

VIII.3. MARCADORES GENÉTICOS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO

Atualmente a identificação genética é feita de preferência utilizando kits comerciais que permitem a amplificação simultânea (multi-locus) de vários STRs (Short Tandem Repeats) autossómicos presentes no ADN não-codificante, incluindo a identificação do gene da Amelogenina presente nos cromossomas homólogos X e Y.

Os STRs (Short Tandem Repeats) são regiões do ADN com unidades de repetição entre 2-7 pares de bases (pb), muito abundantes no genoma humano (cerca de 3%) e facilmente amplificáveis por PCR em reações multiplex dado que produzem fragmentos entre aproximadamente 100-400 pb. Entre as múltiplas vantagens da utilização destes marcadores destacam-se o seu polimorfismo, a facilidade de amplificação mesmo com quantidades diminutas de ADN ou quando as amostras estão degradadas, o facto de permitirem a interpretação de misturas e a possibilidade de automatização. A inclusão da Amelogenina para determinação do género nos kits multiplex de STRs tem-se revelado de grande utilidade especialmente quando estamos na presença de amostras criminais (em particular nos casos de agressão de natureza sexual) ou provenientes de cadáveres não identificados [4].

Em alguns casos justifica-se a utilização de STRs específicos do cromossoma Y. Ao contrário dos STRs autossómicos que têm uma transmissão mendeliana e sofrem recombinação durante a meiose, os STRs do cromossoma Y transmitem-se em bloco fazendo com que todos os indivíduos da mesma linhagem paterna possuam a mesma informação, o que permite a definição de haplótipos.

A identificação destes marcadores tem particular interesse em casos de parentesco que envolvam familiares de linhagem paterna e também nas agressões sexuais, em que existem misturas de material biológico de origem feminina e masculina, sendo possível a identificação de material biológico minoritário exclusivamente do agressor, mesmo em amostras com elevadas quantidades de material biológico de origem feminina [5].

Embora menos utilizados, os STRs do cromossoma X têm também várias aplicações forenses, nomeadamente nas investigações de paternidade que envolvem duos pai-filha (dado que os indivíduos do sexo feminino herdaram o cromossoma X paterno) ou na identificação genética de restos cadavéricos e de pessoas desaparecidas. É no entanto nos casos complexos de parentesco em que é necessário estabelecer a relação entre familiares distantes ou nas investigações de paternidade em que apenas estão disponíveis familiares do pretense pai, que estes marcadores têm a sua maior aplicação [6].

Com o intuito de aumentar a eficácia da amplificação, especialmente em amostras degradadas ou com pouco ADN, têm sido introduzidos na rotina laboratorial marcadores genéticos que produzem fragmentos de reduzida dimensão (mini-STRs) [7]. Embora também permitam uma amplificação multiplex, kits formados exclusivamente por mini-STRs incluem um número reduzido de loci (comparativamente aos kits de STRs convencionais) uma vez que os fragmentos resultantes da PCR são inferiores a 150 pb. Novos mini-STRs têm sido estudados sendo alguns deles recomendados para integrarem as bases de dados europeias, pelo contributo considerável que proporcionam na identificação de amostras que apresentam perfis genéticos parciais [8].

Nos casos em que não é possível recorrer à análise de STRs no ADN nuclear pode ser efetuado o estudo do ADN mitocondrial (ADNmt), pois este está presente nas células em maior quantidade. Ao existirem centenas de cópias de ADNmt em cada célula, torna-se mais resistente e permite a identificação de amostras antigas, degradadas ou com pouco ADN como é o caso de ossos, dentes

e pelos/cabelos. A herança é exclusivamente materna sob a forma de haplótipo, fazendo com que não haja recombinação e reduzindo a sua diversidade, permitindo no entanto determinar relações familiares sempre que são efetuados estudos comparativos com familiares de linhagem feminina [9,10].

A molécula de ADN mitocondrial é circular e de cadeia dupla, sendo constituída por cerca de 16569 pb. A análise é efetuada por PCR seguida de sequenciação, sendo as regiões hipervariáveis I e II (HVI e HVII) da região controlo ou D-loop (displacement loop) as mais estudadas para fins forenses por serem particularmente polimórficas, embora haja atualmente a tendência de alargar o estudo à totalidade da região controlo de modo a ser obtida o máximo de informação possível [11]. As sequências obtidas são comparadas com a sequência de referência de Cambridge (CRS) ou com a sequência de referência de Cambridge revista (rCRS – revised Cambridge Reference Sequence) [12]. A presença de heteroplasmias (mais de um tipo de ADNmt num indivíduo) pode levar à presença de diferentes sequências entre cabelos ou tecidos de um mesmo indivíduo, ou mesmo ao longo de uma mesma haste de cabelo, dificultando por vezes a interpretação dos resultados obtidos [13].

Além dos marcadores já descritos, quando o material biológico é diminuto ou está degradado não permitindo deste modo o estudo de STRs, ou ainda quando é necessária informação adicional, podem ser utilizados outros polimorfismos como é o caso dos SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Os SNPs abundam no genoma humano (existem já milhões de SNPs descritos)

e caracterizam-se pela variação na sequência de uma única base (substituições, inserções ou deleções) que resulta em formas alternativas (alelos) permitindo deste modo a distinção entre indivíduos. A maioria dos SNPs tem apenas duas formas (bi-alelicos).

Relativamente aos STRs têm a vantagem de terem um tamanho muito inferior (fragmentos abaixo dos 100 pb) permitindo uma maior eficácia da PCR e a análise simultânea (reações multiplex) de um número muito superior de polimorfismos; permitem ainda um elevado grau de automatização no seu processamento e análise bem como uma maior facilidade na interpretação de resultados dada a inexistência de bandas artefacto da amplificação (stutters). Através de uma criteriosa escolha dos SNPs a analisar, pode ser possível inferir a ancestralidade, bem como algumas das características fenotípicas das amostras analisadas. Os SNPs informativos de linhagem (associados aos cromossomas X e Y) são também úteis na análise forense. No entanto, o facto de serem pouco polimórficos faz com que seja necessário ter uma bateria alargada destes marcadores (cerca de 50 SNPs) para que se obtenha o mesmo grau de informação de um perfil genético de STRs. Outra das desvantagens prende-se com a limitação que têm na interpretação de misturas [14, 15].

Estudos recentes têm sido efetuados com Indels (Insertion-Deletion Polymorphisms), polimorfismos bi-alelicos com interesse forense (nomeadamente na análise de amostras degradadas ou para complementar o estudo de investigações de parentesco), que consistem na inserção ou deleção de um segmento de ADN que pode medir centenas de nucleótidos [14].

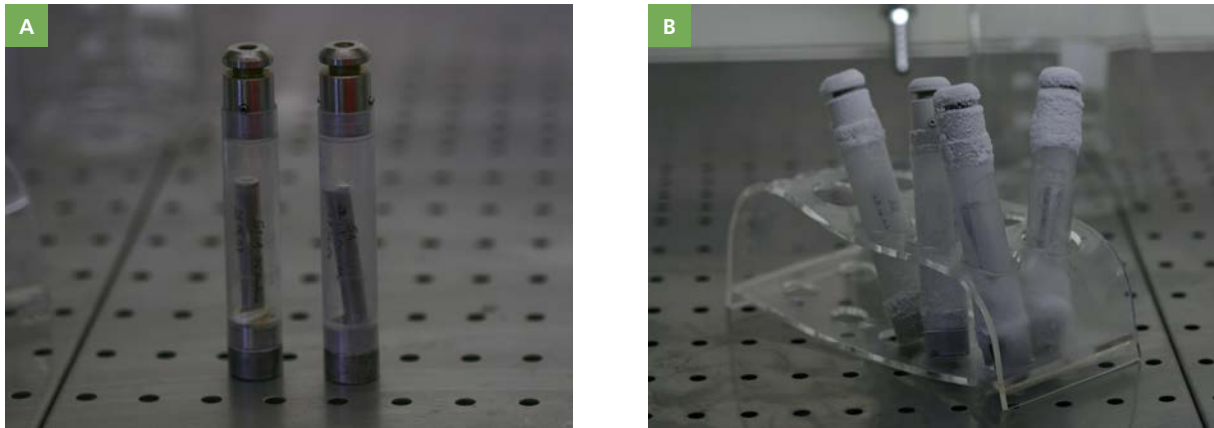
VIII.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS DE ROTINA NUM LABORATÓRIO FORENSE

A receção de amostras biológicas nos laboratórios de Genética Forense pressupõe uma correta preservação de modo a garantir a sua integridade, as quais devem também encontrar-se devidamente identificadas e estar acompanhadas de documentação que atestem a sua autenticidade, garantido deste modo a manutenção da cadeia de custódia [16].

Previamente à extração do ADN poderá ser necessário determinar a natureza do material biológico existente, nomeadamente nas amostras de sangue, sémen e saliva.

Nas amostras de pelos/cabelos é realizada a sua caracterização macroscópica e microscópica de forma a selecionar as amostras com interesse para a perícia solicitada. A presença de bolbos é preferida relativamente às amostras que apenas apresentam hastes, pois contêm um maior número de células e poderão com maior taxa de sucesso permitir a determinação de um perfil genético de STRs. Por outro lado, a triagem efetuada através desta metodologia, permite a eliminação de pelos não-humanos quando está por exemplo em causa a identificação de amostras da vítima e/ou do agressor.

Relativamente a amostras de ossos ou dentes, deverá primeiramente ser efetuada uma limpeza da superfície de modo a eliminar possíveis inibidores e contaminantes. A amostra é manipulada para ser selecionada a porção de material potencialmente mais rica em ADN (explanado posteriormente, neste capítulo). Estas amostras devem ser pulverizadas, reduzidas a pó, para que



Figuras VIII.1 (A e B) – Fotografias da redução a pó de material biológico mineralizado, osso e dente. **(A)** Vial preparado para colocação em moinho de nitrogénio líquido. **(B)** Viais retirados do moinho e colocados em suporte. Cortesia do INMLCF, I.P. 2013.

o material daí resultante se torne acessível aos métodos de extração que serão posteriormente utilizados (figs. VIII.1).

Com o processo de extração pretende-se separar o ADN contido no núcleo do restante conteúdo celular, eliminando simultaneamente possíveis inibidores que possa conter. A escolha do método de extração prende-se com vários fatores, nomeadamente com o tipo de amostra, bem como com a qualidade e a quantidade que se esperam disponíveis. Vários métodos têm sido descritos e utilizados na prática forense, sendo o método de Chelex [17] e a extração orgânica [18] dos mais referenciados a nível forense.

O método de Chelex é simples e económico não permitindo no entanto a obtenção de um extrato purificado, tornando-se uma limitação relativamente a grande parte das amostras forenses.

Pode contudo ser utilizado na extração de amostras de referência (sangue e saliva) e também em amostras forenses bem preservadas. Quanto à extração orgânica (também denominada de extração por fenol-clorofórmio), apesar de permitir obter um ADN mais puro e de remover a grande maioria dos inibidores inerentes à própria amostra, tem o inconveniente de utilizar solventes tóxicos e de ser mais suscetível à contaminação dado que necessita de múltiplas transferências de tubos durante o processamento das amostras.

Com a perspetiva de automatizar o procedimento de extração têm surgido múltiplos kits comerciais e várias plataformas robotizadas especialmente desenvolvidas para a área forense, que são mais sensíveis e que permitem uma maior reprodutibilidade nos resultados, assim como a diminuição da intervenção do operador contrariando

deste modo o risco de contaminação; o ADN obtido é ainda de grande qualidade [19]. Baseiam-se numa extração em fase-sólida que utiliza partículas de sílica ou partículas magnéticas que retêm o ADN, para depois ser purificado através de vários passos de lavagem [20]. Os robots são no entanto equipamentos onerosos e que limitam a flexibilidade que os kits manuais permitem.

De modo a otimizar a reação de PCR (amplificação), qualquer amostra forense deverá ser quantificada tendo por objetivo estimar a quantidade de ADN existente: a diminuta quantidade de ADN na reação de amplificação pode levar à perda parcial de alelos ou mesmo à ausência de resultados e, o excesso de ADN pode levar a resultados difíceis de interpretar.

A utilização de equipamentos de PCR em tempo-real na quantificação, permite determinar a quantidade de ADN existente na amostra e também a presença de inibidores que impossibilitam a obtenção de resultados. Existem kits comerciais que determinam a quantidade total de ADN humano da amostra e também a quantidade de ADN do cromossoma Y (muito útil nas agressões sexuais), podendo esta avaliação ser efetuada em simultâneo. Também têm sido desenvolvidas metodologias que permitem estimar a quantidade de ADN nuclear e ADN mitocondrial [21,22].

A amplificação do ADN existente nas amostras biológicas é efetuada através da PCR e está bastante standardizada a nível forense. Normalmente são utilizados kits comerciais que recorrem à amplificação simultânea de vários STRs. Atualmente têm aparecido novos kits, cada vez mais sensíveis (que amplificam melhor na presença de amostras degradadas e com inibidores) e que incluem novos marcadores (nomeadamente os que a comunidade

forense considera úteis em casos de investigação criminal), alguns dos quais em formato reduzido (mini-STRS), uma mais-valia na amplificação de amostras com pouco material genético.

Surgiram também recentemente kits de amplificação direta para aplicações forenses, que prescindem do passo de extração no caso de amostra biológica (sangue ou saliva) se encontrar depositada em papel FTA (suporte específico para o armazenamento de ADN), o que permite a automatização do procedimento de amplificação em plataformas robotizadas [23,24].

De forma a prevenir o risco de contaminação, já que a PCR produz milhões de cópias de ADN idênticas, os laboratórios forenses deverão recorrer à utilização de controlos negativos para monitorizar reagentes e consumíveis e estar dotados de uma base de dados dos profissionais que manipulam as amostras. A automatização deste procedimento, contribui também para a minimização dos riscos de contaminação intralaboratorial.

A análise dos fragmentos amplificados do ADN é efetuada em equipamentos de sequenciação automática que recorrem à eletroforese capilar multicanal (os mais recentes), e permitem detetar os produtos de PCR marcados com fluorescência recorrendo a softwares específicos de análise.

No que diz respeito à análise dos kits multiplex de STRs, a definição de critérios bem definidos e preestabelecidos para a análise de perfis genéticos deu origem aos denominados expert systems que permitem uma análise automatizada mesmo em situações complexas [25]. Estes sistemas facilitam amplamente o trabalho do perito que, no entanto, deve supervisionar os resultados obtidos.

Os sequenciadores automáticos, quando associados à automatização dos procedimentos de

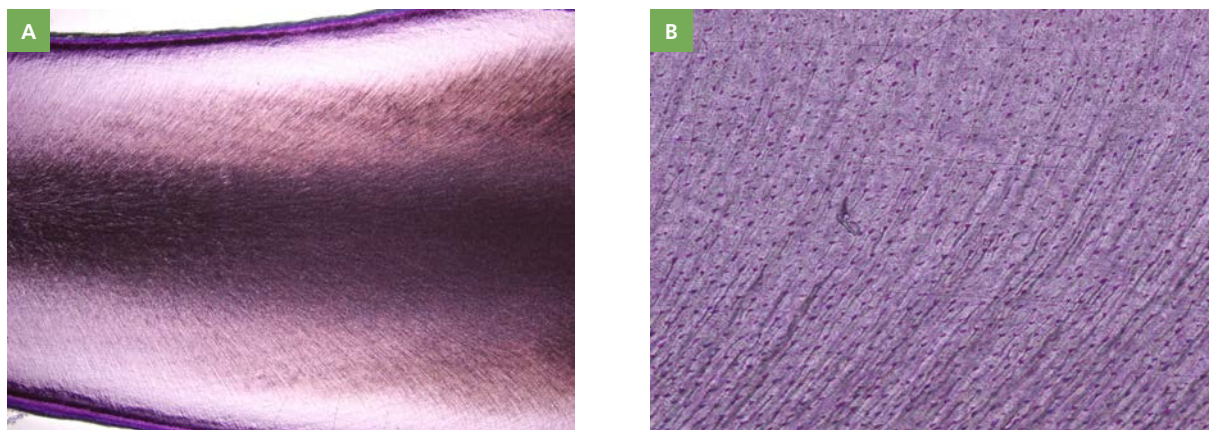


Figura VIII.2 (A e B) – Corte histológico, de material não descalcificado, de porção de dentina radicular. **(A)** Seção longitudinal evidenciando um maior número de túbulos por unidade de superfície junto à zona central. **(B)** Destaque para os túbulos dentários na sua matriz.

extração e amplificação e com integração em sistemas LIMS (Laboratory Information Management System) permitem aos laboratórios forenses incrementar grandemente o número de amostras processadas, diminuir os riscos de erro e contaminação associados aos procedimentos laboratoriais e ainda reduzir os custos [26].

VIII.5. OS TECIDOS DENTÁRIOS

Neste item o dente será caracterizado pela sua constituição histológica nomeadamente o conteúdo celular dos seus constituintes para uma análise genética de identificação.

A dentina e a polpa podem ser consideradas dois tecidos intimamente relacionados, embora não seja uma questão consensual na

literatura [27]. Estes dois tecidos relacionam-se sob um ponto de vista embriológico, partem de uma origem embrionária comum, uma vez que ambos derivam do ectomesênquima que forma a papila do gérmen dentário [28]. Formam uma unidade estrutural, com os prolongamentos dos odontoblastos incluídos na dentina e em algumas situações os próprios corpos celulares. Formam também uma unidade funcional, considerando que o tecido pulpar nutre, forma e reestrutura a dentina, pelo que iremos utilizar a denominação de órgão ou complexo dentino-pulpar.

A dentina apresenta uma dureza proporcional ao seu grau de mineralização, sendo menor do que a do esmalte, mas maior do que a do osso e do cemento. Pela sua dureza a dentina resiste aos agentes físicos melhor do que o osso.

Na estrutura da dentina podemos distinguir dois componentes básicos: a matriz extracelular e os canais ou túbulos dentinários que atravessam praticamente toda a sua espessura e que podem alojar os prolongamentos odontoblásticos, caracterizando a grande polarização na distribuição dos organelos no odontoblasto maduro [29] (figs. VIII.2). Em face do exposto, podemos considerar o corpo celular, com o núcleo, no limite interno da dentina e a sua longa extensão, o prolongamento, com um volumoso retículo endoplasmático, um complexo de Golgi proeminente rico em mitocôndrias, no interior da dentina; que definem os marcadores a amplificar, autossômico e mitocondrial, respetivamente [30].

Pelo facto de existir um maior número de túbulos, por unidade de superfície, nas zonas de dentina próximas à polpa, o prolongamento odontoblástico ocupar apenas o terço interno da dentina, e ainda pela deposição centrípeta da dentina peritubular, em relação ao túbulo dentinário [29], consideramos importante preservar esta porção da dentina, rica em elementos celulares, para a análise molecular [30].

Em oposição ao esmalte, acelular, sem inervação, e sem vascularização [29] a dentina, no complexo dentino-pulpar, está em produção contínua ao longo da vida do indivíduo. Podemos encontrar no dente humano diferentes tipos de dentina, consoante a sua origem, composição, estrutura, período de formação e localização. A intensa atividade celular reflete-se na produção de: dentina primária; dentina secundária (ou fisiológica), em toda a periferia da câmara pulpar; e dentina terciária, reacional ou reparadora, que representa um mecanismo de defesa e reparação do órgão pulpo-dentinário (fig. VIII.3). A produção

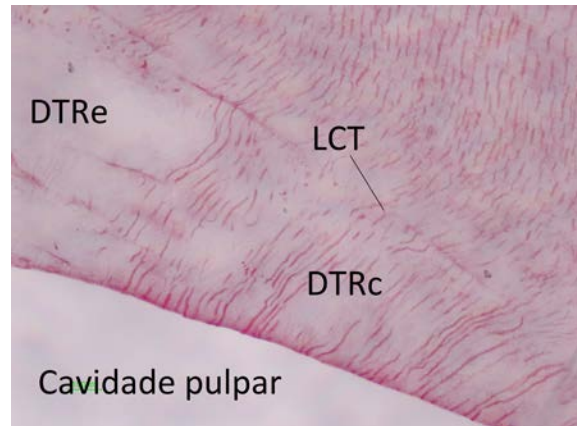


Figura VIII.3 – Corte histológico de material descalcificado da porção radicular. Tipos de dentina terciária. Coexistência de dentina terciária reacional (DTRc) e linha cálcio-traumática (LCT) com a dentina terciária reparadora tipo fibrodentina (DTRe) (HE).

de dentina ao longo da vida do indivíduo, coexistente com uma intensa atividade celular de odontoblastos e osteoclastos justifica que seja um tecido de eleição para a identificação genética.

Destacamos na utilização do dente na identificação genética, a existência da dentina secundária esclerótica. Neste tipo particular de dentina, o lúmen dos túbulos dentinários está reduzido formando uma dentina hipermineralizada, preferencialmente, na porção mais apical da raiz [30].

Por outro lado os característicos processos de difusão e capilaridade através da matriz da dentina ou dos túbulos dentinários, são em menor

escala comparativamente ao osso, o que favorece a preservação dos elementos celulares seus constituintes e permite uma resposta inflamatória, em vida, com uma atividade celular intensa [30].

Algumas reflexões se podem fazer em relação à dentição humana. Poderemos considerar a existência de túbulos dentinários de maior diâmetro na dentição decídua com um trajeto mais linear, ou seja, nem sempre sigmoide [31], associado à menor espessura tecidual, comparativamente ao esmalte, fator que pode condicionar a menor resistência do dente decíduo às agressões, porém devido à sua intensa atividade celular, este facto pode ser superado na análise genética [32].

O tecido pulpar, também designado por polpa, localiza-se na cavidade pulpar e tem a particularidade de ser o único tecido “mole” do dente, caracterizando-se por apresentar um “rico património” celular [29]. O tecido pulpar tem uma atividade formadora (sintetiza a dentina que o rodeia), nutritiva (nutre a dentina que é avascular), protetora (dando sensibilidade à dentina) e reparadora, pois é capaz de produzir nova dentina, sempre que necessário. A periferia da polpa apresenta uma paliçada contínua de odontoblastos que, embora especializados na secreção da dentina, são parte integrante da polpa. A polpa constitui o substrato biológico da dentina. Através do foramen, a polpa radicular comunica diretamente com o tecido do ligamento periodontal, sendo a porta de saída/entrada de nutrientes e tóxicos para o interior do dente, pelo que em situações forense extremas pode ser superado pela dentina na escolha para uma análise genética [33].

O cimento também designado por cimento dentário reveste e protege a dentina na sua porção radicular (fig. VIII.4), correspondendo, de certa

forma, ao esmalte da coroa. O cimento é menos duro que a dentina e o esmalte mas é mais duro que o osso. A interface entre a dentina e o cimento (fig. VIII.4) não se encontra bem definida [34] sendo difícil a sua separação mecânica. Por outro lado, devido à sua ínfima espessura, em cervical de 10 a 15µm e a nível apical é de 50 a 200µm [34], pode ser removido, acidentalmente na limpeza mecânica da superfície radicular, na preparação da peça dentária para uma análise genética.

À semelhança da dentina, o cimento está em contínua formação durante a vida do indivíduo, aumenta a espessura do dente e também reduz o diâmetro do foramen, principal responsável pelo suprimento sanguíneo à cavidade pulpar e conseqüentemente a porta de entrada/saída do interior do dente.

Alguns cementoblastos retrocedem para o ligamento periodontal, à medida que produzem e mineralizam a matriz, outros ficam “aprisionados” na própria matriz que mineralizam, a qual envolvendo-os em lacunas, transformam-nos em cementócitos e passam a fazer parte integrante do cimento na sua camada mais perto da dentina (fig. VIII.4A) [34], o que é de grande relevância para a obtenção de genoma nuclear nesta região topográfica do dente [30].

Podemos distinguir topograficamente no cimento duas camadas: acelular e celular. O cimento acelular recobre a raiz adjacente à dentina; o cimento celular, com cementoblastos, tem interesse na análise genética, localiza-se essencialmente na área apical e interradicular e recobre o cimento acelular (figs. VIII.1B, VIII.4A) [34-36]. Os cementoblastos se aprisionados no cimento mineralizado, designam-se por cementócitos. São células alojadas em lacunas, numa matriz mineralizada, por vezes

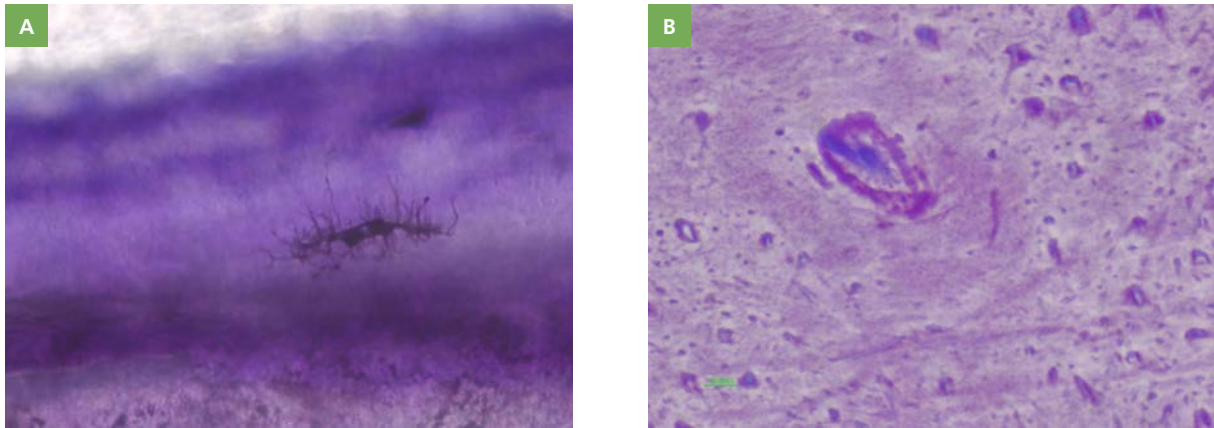


Figura VIII.4 (A e B) – Corte histológico, de material não descalcificado. **(A)** Cementócitos no cimento. **(B)** Formação análoga em cimento na dentina.

em grau superior à da dentina (de modo análogo ao que ocorre com os osteócitos). Simultaneamente com o facto de serem menos permeáveis que a dentina (parâmetro que diminui com a idade) [34], os cementócitos são elementos de elevado interesse na preparação do dente para a identificação genética (figs. VIII.4) [30,37].

VIII.6. O DENTE NA ANÁLISE GENÉTICA

Ao longo dos anos identificaram-se, através do tecido pulpar, diferentes grupos sanguíneos,

enzimas eritrocitárias e proteínas séricas caracterizadas através do seu polimorfismo genético [38-46].

A utilização de SLPs para a análise de RFLP a partir do dente foi estudada por Schwartz, Mieszerski e colaboradores [47]. Estes autores colocaram peças dentárias em meios diversos, fazendo variar com distintas temperaturas (4°C, 25°C e 37°C) diferentes valores de pH (3, 7 e 10), humidade (20%, 66% e 98%), tipo de solo (areia, argila e jardim). Para além disso imergiram peças dentárias em água do mar, por períodos de tempo variáveis entre uma semana a seis meses. Colocaram, ainda, dentes à temperatura ambiente por períodos de tempo de 16 e 19 anos. O método

utilizado na obtenção do tecido dentário pulpar, através de escavadores, pressupõe que tivesse o aproveitamento, apenas, da região central da polpa ou polpa propriamente dita.

A primeira referência da identificação humana a partir da análise de polimorfismos VNTRs em amostras de tecido dentário pulpar, data de 1992, tendo sido referenciada por Pötsch, Meyer, Rothschild e colaboradores [48]. Estes autores estudaram o efeito das condições ambientais na análise de ADN por PCR, a partir de tecido dentário pulpar. Os autores aplicaram a técnica de PCR, quantificação por espectrometria e Southern Blotting, em polpa de dentes colocados durante 1 e 15 anos à temperatura ambiente; conseguiram analisar os fragmentos de ADN mais pequenos e verificaram que não existia uma influência significativa dos períodos de tempo considerados.

Algumas metodologias de acesso ao interior do dente, para extração do ADN, foram investigadas por Smith, Fisher, Weedn e colaboradores, em 1993 [49], tema que ainda hoje atrai a comunidade científica [50]. Os estudos divergem na técnica da abordagem; no primeiro estudo os autores propõem uma secção transversal na junção coroa-raiz [49], no segundo estudo é sugerida uma abordagem endodôntica [50], chamando a atenção para os cuidados a ter na abordagem da peça dentária, pois devem ser conservados os tecidos duros para posterior avaliação forense.

Em 1994, Chen, Sun, e Wu, retomam o estudo da influência do meio ambiente na análise do ADN a partir da polpa dentária. Estes autores estudaram os fatores físico-químicos (pH, temperatura, humidade), com o auxílio de técnicas de PCR, comprovando a sua influência na análise dos polimorfismos do ADN [51].

Salienta-se o estudo de Alvarez, de 1996, em 549 peças dentárias submetidas a diferentes condições ambientais por períodos de tempo variáveis entre 15 dias e 36 meses [52]. Este autor estudou a polpa dentária nas peças referenciadas para a análise dos loci HLA DQA1, D1S80, HUMTHO1, HUMFES/FPS e amelogenina. A polpa dentária foi obtida mediante diferentes procedimentos: por fragmentação do dente, por secção horizontal (a nível da união coroa-raiz) e pela cavidade de acesso do procedimento endodôntico. As peças dentárias foram submetidas durante o período de tempo supracitado, a diversas temperaturas ("intempérie", 4°C, 20°C e 40°C), enterradas em areia e terra e submersas em água do mar e rio. Foram ainda submetidas diferentes séries de dentes a altas temperaturas (75°C, 100°C, 200°C, 300°C, 400°C e 500°C) durante 1 e 2 minutos. Este autor conseguiu os melhores resultados na análise do gene da amelogenina, devido ao seu pequeno tamanho (106 a 112pb), associado à sensibilidade da técnica utilizada. A não obtenção de um perfil de ADN foi especialmente registada em dentes submersos em água e a 500°C, atribuindo esta ocorrência ao tamanho do fragmento de ADN amplificado. Os melhores resultados foram obtidos com os STRs.

Em 1996, Katsuichi Yamamoto realizou uma estimativa da idade, a partir da dentina, estudando as formas D e L do ácido aspártico. Este autor realizou também a análise do ADN do tecido pulpar para a determinação do género [53].

Nos casos extremos de cadáveres antigos (com centenas de anos) ou restos calcinados, o estudo do ADN oferece possibilidades de sucesso quando esgotados os procedimentos tradicionais. López (em 1996) relata na sua tese de

doutoramento, que, em dentes submetidos à ação do calor, diminui consideravelmente a quantidade de ADN obtido da polpa dentária, em relação a amostras recentes. Este autor justifica os resultados negativos obtidos (8,25%), como consequência da suposta ação direta do calor sobre o tecido pulpar de peças com cárie, cuja polpa já se encontrava degradada por patologia existente [54].

Em 1998, Pfeiffer e colaboradores, extraíram o ADN mitocondrial de dentes da população coreana, a partir da polpa e da dentina. Estes autores concluíram que a extração de ADN da dentina poderia ser uma metodologia empregue no âmbito da identificação forense, como uma fonte fiável para a obtenção de ADN mitocondrial, em situações em que a polpa se encontra destruída após a morte [55]. Um ano mais tarde, em 1999, estudaram as sequências nucleotídicas do ADN mitocondrial (HVII), em polpa dentária e em dentina, num total de 21 dentes procedentes de diferentes idades da população coreana (entre 15 e 85 anos). Estes autores obtiveram 100% de êxito na sequenciação de HVII, tanto na polpa como na dentina. Saliente-se que na dentina de peças dentárias pertencentes a grupos etários mais avançados, os eletroferogramas resultantes da sequenciação apresentavam qualidade inferior, sem contudo haver ausência de resultados satisfatórios. Sugerem os autores, em relação a esta última observação, que em indivíduos de mais idade os prolongamentos odontoblásticos ficam aprisionados na matriz mineralizada (nos cristais de fosfato de cálcio) da dentina, que se tornam “armazéns” de mitocôndrias [56].

Em 1999, Pfeiffer, Brinkmann, Seitz e colaboradores, trabalhando com dentes íntegros, separaram a coroa da raiz, seccionaram longitudinalmente

a raiz e removeram com um escavador a polpa propriamente dita, aproveitando no seu estudo apenas o terço médio radicular [55]. Ainda Pfeiffer, com Mornstad e Teivens, comprovaram que existe uma degradação mais rápida do ADN pulpar em dentes seccionados em duas metades e enterrados em terra de jardim durante diferentes períodos de tempo, como consequência da ação direta dos agentes externos procedentes do meio em que foram enterrados, sobre o tecido pulpar e pela ausência de proteção física e química dos tecidos dentários mineralizados [56].

Analísaram-se ainda em polpa dentária diferentes polimorfismos do cromossoma Y (DYS19, SYS389, DYS390, e DYS393), submetendo o dente a diferentes temperaturas (100°C, 200°C, 300°C, 400°C e 500°C) por períodos de tempo de 2 minutos, obtendo-se resultados aceitáveis na análise dos diferentes polimorfismos, apenas, até atingir os 300°C [57].

Em 2003, Piedad Malaver e Juan Yunis, tentaram separar o cimento, a dentina e a polpa. Porém, pelas técnicas descritas, teriam apenas separado a polpa propriamente dita da dentina integrada no restante complexo da dentina pulpar. Trabalhando com esta última porção, estes autores conseguiram quantidade suficiente para permitir a amplificação do ADN mitocondrial [58].

Nesse mesmo ano Gaytmenn e Sweet, analisando a peça dentária no seu todo, salientaram que a maior quantidade de ADN situava-se na porção mais cervical da raiz, seguido da porção cervical da coroa e do terço apical da raiz; a porção mais oclusal da coroa apresentava a menor quantidade de ADN [59]. Recentemente, A. Corte-Real e colaboradores, recorrendo a técnicas mais precisas, considera a porção apical

radicular do dente, zona de relevante importância para a identificação genética [30, 37].

Ainda em 2003, a resolução de um caso de investigação de paternidade foi devida a partir da análise de porções do órgão dentário [60]. Foi efetuada a análise de 5 loci STRs (FGA, VWA, TH01, D12S391 e ACTBP2), da porção radicular de uma peça dentária e tecido interradicular mumificado pertencente ao imperador Alemão Wilhem II (do Museu Huis Door da Holanda). Em relação à amostra da zona radicular não se obtiveram bons resultados (resultados positivos só no sistema FGA) mas no tecido interradicular mumificado foi possível a análise de todos os marcadores [60].

Em 1999, Sweet, Hildebrand e Phillips, aplicaram a metodologia de redução a pó de uma peça dentária na resolução de um caso forense [61].

No âmbito do ADN antigo (com centenas de anos) é o dente o tecido de eleição, caracterizado pela proteção dos seus tecidos mineralizados, com a redução a pequenos fragmentos das porções “duras” do dente, sob baixa temperatura, sem ser relevante a polpa dentária [62].

A Comissão Internacional de Pessoas Desaparecidas (ICMP), responsável pela identificação de desaparecidos durante o conflito na antiga Jugoslávia, entre os anos 1992 a 1999, identificou 11000 pessoas desaparecidas mediante a comparação entre os perfis de ADN de familiares e os obtidos de ossos e dentes recolhidos de valas comuns. Em relação com este processo de identificação, em 2007, Parsons, Huel, Davoren e seus colaboradores, assinalaram que as maiores taxas de sucesso foram obtidas quando o ADN foi extraído da porção densa do fémur, bem como do dente inteiro, depois de serem submetidos a

um processo de limpeza e redução a pequenos fragmentos [63].

As amostras de ossos e dentes inteiros, foram utilizadas para a identificação de restos cadavéricos da Segunda Guerra Mundial, pertencentes a 27 indivíduos, encontrados na Eslovénia [64]; com tal finalidade foi empregue o kit Powerplex®16 (Promega Corp., Madison, WI, USA), tendo sido obtido um perfil genético completo em 15 dos casos estudados. Nos restantes casos foram apenas obtidos perfis parciais.

Não podemos deixar de salientar a importância do dente na identificação dos restos cadavéricos do desastre de World Trade Center em 2001, quando todas as outras amostras não permitiram identificação [65].

VIII.7. ESCOLHA E PREPARAÇÃO DO DENTE

A análise genética pode ser efetuada a partir de qualquer tipo de dente, mono ou pluri radicular, saudáveis, sem cárie ou cariados, restaurados ou com tratamento e obturação endodôntica.

O acesso ao tecido pulpar pode ser realizado pelo corte longitudinal da peça ou pelo acesso à câmara pulpar por um orifício idêntico ao acesso endodôntico [50].

Podemos considerar etapas até à extração do ADN dos tecidos mineralizados do dente. A primeira é a preparação da peça dentária, a remoção dos inibidores e contaminantes da superfície, etapa que pode ser conseguida pela conjugação das ações química e mecânica. Da ação química fazem parte a exposição a lâmpada de UV [62] e imersão em hipoclorito, atuação



Figuras VIII.5 (A, B,C e D) – (A) Identificação do dente. **(B)** Remoção do esmalte. **(C)** Corte Vertical interradicular. **(D)** Corte Vertical intraradicular.

que se baseia no elevado poder oxidante deste ião (Cl^- ou ClO^- [66], podendo ser seguida da imersão em etanol e/ou água desionizada [30]. A limpeza da superfície de uma peça dentária pode ser realizada mecanicamente, com um abrasivo [67], ou ação mecânica rotativa [30] bem como a limpeza manual por curetagem (figs. VIII.5) [68].

A segunda etapa é a redução a pequenos fragmentos, contudo recentemente é proposta

a manutenção da morfologia coronária sem a completa destruição da peça dentária [30]. As técnicas mais conservadoras possibilitam a manutenção da morfologia para posterior estudo arqueológico [62].

A redução a pó em meio de nitrogénio líquido corresponde à etapa final do procedimento de preparação [13,30,33,61,62].

VIII.8. AMOSTRAS DEGRADADAS VERSUS AMOSTRAS SEGURAS

As denominadas amostras seguras são as amostras preferidas de um laboratório forense. Colhidas em condições ideais, permitem a extração de quantidades suficientemente elevadas de ADN (usualmente com mais de 1 ng) para que os kits multi-locus de STRs possam ser amplificados e o respetivo perfil genético determinado [69]. No entanto, uma parte significativa das amostras forenses não se encontra nas condições adequadas, quer devido ao seu deficiente acondicionamento, quer porque estiveram sujeitas a condições ambientais adversas. O tempo decorrido até à análise laboratorial também poderá contribuir para a deterioração das amostras impedindo muitas vezes a obtenção de resultados satisfatórios [70].

De modo a potenciar a aquisição de bons resultados em amostras degradadas é necessária uma escolha criteriosa do método de extração que permita a recuperação de um ADN o mais puro possível e com quantidade suficiente para ser amplificável por PCR. Contudo, é frequente a quantidade de ADN resultante da extração ser reduzida (inferior a 100-200 pg), o que inviabiliza muitas vezes a obtenção qualquer perfil genético de STRs ou quando obtido, o perfil torna-se parcial com ausência de parte dos alelos (nomeadamente os de maiores dimensões) o que limita a sua informação.

Sendo os STRs os marcadores genéticos de eleição utilizados para a individualização genética, várias têm sido as estratégias para que a sua amplificação tenha sucesso. Um dos métodos utilizado tem sido o aumento do número de ciclos da PCR (metodologia designada por Low Copy Number ou LCN) que, apesar de ter sucesso nalgumas amostras,

tem o inconveniente de também gerar vários artefactos. Entre os artefactos mais frequentes, também designados por efeitos estocásticos, encontram-se o aparecimento de alelos adicionais provenientes de contaminação residual (drop-in), a falha de amplificação de um ou ambos os alelos de um mesmo locus (drop-out), o aumento exagerado das stutters, ou ainda o aparecimento de alelos não-balanceados nos loci heterozigóticos, o que dificulta a interpretação dos perfis genéticos [69-71].

Recentemente surgiram no mercado kits de nova geração, sensíveis e robustos, que permitem a amplificação de amostras degradadas e com uma reduzida quantidade de ADN. Estes kits incluem mini e midi STRs para além de STRs convencionais, estando particularmente desenhados para integrarem as bases de dados europeias [72-74].

Quando a utilização destas novas ferramentas não permite a resolução da perícia, a identificação das amostras poderá ser efetuada através do estudo do ADNmt ou recorrendo a SNPs e Indels. No entanto, apesar dos avanços técnicos que têm ocorrido na área da Genética Forense, existem ainda limites na obtenção de resultados em algumas das amostras recebidas nos laboratórios forenses.

São vários os fatores que influenciam a degradação do ADN tais como a exposição a radiações UV (nomeadamente à luz solar direta), temperaturas elevadas e humidade excessiva. O contacto com o ácido húmico dos solos, a presença de nucleases (enzimas que clivam a estrutura do ADN) e a presença de microrganismos tais como bactérias e fungos nas amostras que se pretendem identificar, dificultam também a genotipagem [70,75].

Existem situações que poderemos considerar associadas a amostras potencialmente

degradadas: processo de carbonização; elevada humidade do terreno associado a um igualmente elevado componente orgânico do solo (como por exemplo estrume) e microrganismos (bactérias e fungos) As transformações sofridas, devido a fermentações e putrefações, dão origem a compostos designados por ácidos húmicos e flúvicos [76].

As moléculas consideradas como responsáveis da inibição da PCR durante os procedimentos analíticos são genericamente subprodutos da degradação orgânica. Esta degradação refere-se aos produtos da autólise e hemólise dos tecidos biológicos da própria amostra e tecidos envolventes, bem como na que ocorre na matéria orgânica do meio envolvente, nomeadamente do solo [76].

Assim, consideramos como produtos responsáveis da inibição os ácidos orgânicos (ácidos húmicos e flúvicos) que decorrem do processo de humificação do solo [61]. Estes ácidos atuam sobre a atividade enzimática da célula, podendo “acompanhar” o ADN nos processos de extração e de amplificação.

Estes ácidos são importantes no processo de remodelação do solo, com a sua ação na transformação da matéria orgânica em inorgânica, aproveitada pelas plantas para um novo ciclo de vida [76].

Por outro lado, as porfirinas, presentes em algumas folhas vegetais, bem como no sangue e tecidos moles, são igualmente consideradas como produtos inibidores [75,77]. Relatam estes autores que a porfirina e seus produtos atuam como inibidores da PCR, quando analisadas amostras de ADN antigo. A ação inibidora dessas moléculas baseia-se na sua capacidade de captar catiões, necessários para a atividade enzimática da Taqpolimerase [77].

Podemos ainda destacar que a própria degradação dos ácidos desoxirribonucleicos pode

condicionar a amplificação. O equilíbrio ácido-base pode interferir na cinética da molécula do ADN, atendendo a que a clivagem da ligação fosfodiéster está relacionada com a presença de hidrogeniões que se podem ligar preferencialmente à extremidade O⁻ [78]. Por seu lado a possível redução dos açúcares da molécula, pode originar produtos com capacidade indutora da inibição direta da sua própria amplificação [79].

Em 1998, Schotz e colaboradores, demonstraram, *in vitro*, que o colagéneo do tipo I após um processo de degradação, apresentava características compatíveis com o comportamento das substâncias inibidoras da PCR. Estes autores demonstraram o poder inibidor do colagéneo S (forma nativa do colagéneo) no ADN não antigo; no entanto, este poderá ser reversível com o tratamento com colagenase [80].

VIII.9. AS IMPRESSÕES LABIAIS NA ANÁLISE GENÉTICA

As marcas dentárias obtidas nos alimentos podem constituir objeto de análise genética, na medida em que as amostras de saliva e de células epiteliais dos lábios do suspeito podem ser utilizadas para genotipagem [81].

De igual modo, as impressões labiais latentes ou as recolhidas em batons labiais, podem constituir potencialmente uma prova pericial para a determinação de um perfil genético. Considera-se que os componentes do batom e dos materiais de deteção das impressões labiais (ex.pó negro de Sudã) interferem nos procedimentos técnico-laboratoriais, o que poderá inviabilizar o sucesso deste procedimento [82].

VIII.10. REFERÊNCIAS

- [1] Butler, J.M. (2009). Applications of ADN Typing In Fundamentals of Forensic ADN Typing. Elsevier Academic Press, pp.397-421.
- [2] Butler, J.M. (2009). Additional Loci and Nonhuman ADN Testing In Fundamentals of Forensic ADN Typing. Elsevier Academic Press, pp. 341-362.
- [3] Jobling, M.A., Gill, P. (2004). Encoded Evidence: ADN in Forensic Analysis. Nature Reviews Genetics, 5, pp.739-751.
- [4] Butler, J.M. (2005). Commonly Used Short Tandem Repeat Markers and Commercial Kits In Forensic ADN Typing. (2ªed.). Elsevier Academic Press, pp.85-121.
- [5] Prinz, M., Ishii, A., Coleman, A. e col. (2001). Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex. Forensic Sci Int, 120, pp.177-188.
- [6] Szibor, R. (2007). X-chromosomal markers: Past, present and future. Forensic Sci Int: Genetics, 1, pp. 93-99.
- [7] Coble, M., Butler, J. (2005). Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded ADN. J Forensic Sci, 50(1), pp. 43-53.
- [8] Gill, P., Fereday, L., Morling, N. e col. (2006). The evolution of ADN databases - Recommendations for new European loci. Forensic Sci Int, 156, pp. 242-244.
- [9] Holland, M.M., Parsons, T.J. (1999). Mitochondrial ADN sequence analysis - validation and use for forensic casework. Forensic Sci Rev,11, pp. 21-49.
- [10] Budowle, B., Allard, M.W., Wilson, M.R. e col. (2003). Forensics and mitochondrial ADN: applications, debates and foundations. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet, 4(1), pp.19-141.
- [11] Parson, W., Bandelt, H.J. (2007). Extended guidelines for mtADN typing of population data in forensic science. Forensic Sci Int: Genetics, 1, pp.13-19.
- [12] Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial ADN. Nature Reviews Genetics, 23, pp.147.
- [13] Tully, G., Barritt, S.M., Bender, K. e col. (2004). Results of a collaborative study of EADNP group regarding mitochondrial ADN heteroplasmy and segregation in hair shafts. Forensic Sci Int,140, pp.1-11.
- [14] Gill, P. (2001). An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. Int J Legal Med, 114, pp.204-210.
- [15] Krjutskov, K., Viltrop, T., Palta, P. e col. (2009). Evaluation of the 124-plexSNP typing microarray for forensic testing. Forensic Sci Int: Genetics, 4, pp. 43-48.
- [16] Siegel, J. (2000). Crime scene investigation and examination. In Encyclopedia in Forensic Sciences. Elsevier, pp.409-412.
- [17] Walsh, P., Metzger, D., Higuchi, D. (1991). Chelex 100 as a médium for simple extraction of ADN for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 10, pp.506-513.
- [18] Maniatis, T., Fritsch, E., Sambbrock, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Publication.
- [19] Pinheiro, M.F. (2008). A perícia em Genética e Biologia Forense - Criminalística biológica. In CSI Criminal. Edições Fernando Pessoa, pp.11-40.
- [20] Butler, J.M. (2009). ADN Extraction In Fundamentals of Forensic ADN Typing. Elsevier Academic Press, pp.99-109.
- [21] Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C. e col. (2004). Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial ADN copy number in forensic and ancient ADN studies. Forensic Sci Int, 139, pp.141-149.
- [22] Niederstätter, H., Köchi, S., Grubwieser, P. e col. (2007). A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial ADN. Forensic Sci Int: Genetics, 1, pp. 29-34.
- [23] Belgrader, P., Del Rio, S.A., Turner, K.A. (1995). Automated ADN purification and amplification from blood-stained cards using a robotic workstation. Biotechniques, 19, pp. 426-432.
- [24] Wang, D.Y., Chang, C.W., Lagacé, R.E. (2011). Development and Validation of the AmpFℓSTR® Identifier® Direct PCR Amplification Kit: A Multiplex Assay for the Direct Amplification of Single-Source Sample. J Forensic Sci, 56, pp.835-845.
- [25] Roby, R.K., Christen, A.D. (2007). Validating expert systems: Examples with the FSS-i3™ expert system software. Profiles in ADN, 10, pp.13-15.
- [26] Jobling, M.A., Gill, P. (2004). Encoded Evidence: ADN in Forensic Analysis. Nature Reviews Genetics, 5, pp.739-751.

- [27] Golderg, M., Lasfargues, J.J. (1995). Pulp-dentinal complex revised. *J Dent*, Feb 23(1), pp. 15-20.
- [28] Mjör, I.A., Smith, M.R., Ferrari, M. e col. (2001). The structure of dentine in the apical region of human teeth. *Int Endod*, 5, pp.346-53.
- [29] Garant, P.R. (2003). Dentin. In Dickson, A. (2003). *Oral cells and tissues*. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc, pp.25-52.
- [30] Corte-Real, A., Anjos, M.J., Vieira, D.N. (2012). The tooth for molecular analysis and identification: a forensic approach. *J Forensic Odonto-Stomatol*, Jul 30(1), pp.22-28.
- [31] Sumikawa, D.A., Marshall, G.W., Gee, L. e ol. (1999). Microstructure of primary tooth dentin. *Pediatr Dent*, 21(7), pp.439-444.
- [32] Xavier, M., Bento A., Costa, A. e col. (2011). Primary teeth as ADN reference sample in disaster victim identification (DVI), *Forensic Sci Int: Genetics*, 3(1), pp. e381-e382.
- [33] Corte-Real, A., Andrade, L., Anjos, M.J. e col. (2006). The ADN extraction from the pulp dentine complex of both with and without carious. *ISFG Congress Proceedings International*, 1288, pp. 710-712.
- [34] Berkovitz, B.V.B., Holland, G.R., Moxham, B.J. (2004). *A colour atlas and textbook of oral anatomy, histology and embryology*. (2ªed.). London: Wolfe.
- [35] Miyaji, H., Sugaya, T., Kato, K. e col. (2006). Dentine resorption and cementum-like tissue formation by bone morphogenetic protein application. *J Periodontal Res*, Aug 41(4), pp.311-315.
- [36] Wu, J., Jin, F., Tang, L. e col. (2008). Dentin non-collagenous proteins (dNCs) can stimulate dental follicle cells to differentiated into cementoblast lineages. *Biol. Cell*, Mar 100(5), pp.291-302.
- [37] Corte-Real, A., Anjos, M.J., Serra, A. e col. (2011). Tooth portion profile in criminology. *Forensic Sci Int: Genetics*, pp. e433-e434.
- [38] Anderson, N., Anderson, N.G. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proceedings National Academy Sciences, USA* 74, pp.5421-5425.
- [39] Neiders, M.E., Standish, S.M. (1977). Blood group determinations in forensic dentistry. *Dental Clinic North Am*, Jan 21, pp.99-111.
- [40] Barsegiants, L.O., Ionesli, A.S. (1979). Possibilities of detecting ABH system antigens in teeth, dental calculi and the deposits on dental prostheses. *Sud Med Ekspert*, Jan-Feb 22, pp.19-21.
- [41] Cerón, J.A., García, E., Martín, J. (1991). Determinación de grupo sanguíneo ABO a partir de la pulpa de diente. *Acta Estomatológica Valenciana*, 4(7), pp.45-47.
- [42] Smeets, B., Van-De-Voorde, H., Hooft, P. (1991). ABO bloodgrouping on tooth material. *Forensic Sci Int*, 50(2), pp.277-284.
- [43] López-Abdia, U. (1993). Serum protein detection in old dental pulp. 15th International Congress International, *Proceedings. Soc Forensic Hemogenic. Venecia*.
- [44] Xinghzi, J.L. (1993). ABO blood grouping en dental tissue. *J Forensic Sci*, 38(4), pp.956-960.
- [45] López, U. (1994). Métodos actuales de necroidentificación dentaria. *Congreso Internacional de Ciencias Forenses, Proceedings. México*.
- [46] Kido, A., Oya, A.M. (1995). PI subtyping in dental pulps. 16th International Congress ISFH, *Proceedings. Santiago de Compostela. Sept, GP7*, p. 165.
- [47] Schwartz, T.R., Schwartz, E.A., Miezerski, L. e col. (1991). Characterization of deoxyribonucleic-acid (ADN) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci*, 4, pp.979-990.
- [48] Pötsch, L., Meyer, U., Rothschild, S. e col. (1992). Application of ADN techniques for identification using human dental pulp as a source of ADN. *Int J Leg Med*, 5, pp.139-143.
- [49] Smith, B.S., Weedn, V.W., Warnock, G.R. e col. (1993). A systematic-approach to the sampling of dental ADN. *J Forensic Sci*, 5, pp.1194-1209.
- [50] Pinchi, V., Torricelli, F., Nutini, A.L. (2011). Techniques of dental ADN extraction: some operative experiences. *Forensic Sci Int*, 204, pp. 111-114.
- [51] Chen, L., Sun, G., Wu, M. (1994). Influence exerted by environmental and hysicochemical factors on the results of sex identification of human dental pulp by polymerase chain reaction. *Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao*, 25(3), pp.253-258.
- [52] Alvarez-García, A., Munoz, I., Pestoni, C. e col. (1996). Effect of environmental factors on PCR-ADN analysis from dental pulp. *Int J Legal Med*, 109, pp.125-129.

- [53] Yamamoto, K. (1996). Molecular biological studies on teeth and inquest. *Forensic Sci Int*, 80, pp.79-87.
- [54] López, J. (1996). Identificación de cadáveres calcinados y en grandes catástrofes: aplicación de métodos odontológicos actuales. Importancia de marcadores genéticos en tejido dental. Dissertação de Tese de Doutoramento publicada, University Madrid.
- [55] Pfeiffer, H., Brinkmann, B., Huhne, J. e col. (1998). Mitochondrial ADN extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. *Int J Leg Med*, 111, pp.309-313.
- [56] Pfeiffer, H., Mornstad, H., Teivens, A. (1999). Influence of soil storage and exposure period on ADN recovery from teeth. *Int J Leg Med*, 112, pp.142-144.
- [57] Tsuchimochi, T., Iwasa, M., Maeno, Y. (2002). Chelating Resin-Based Extraction of ADN from Dental Pulp and Sex Determination from Incinerated Teeth with Y-Chromosomal Aliphoid Repeat and Short Tandem Repeats. *Am J Forensic Med & Pathol*, Sept 23(3), pp.268-271.
- [58] Malaver, P.C., Yunis, J.J. (2003). Different dental tissues as source of ADN for human identification in forensic cases. *Croat Med J*, 44 (3), pp. 306-309.
- [59] Gaytmenn, R.M., Sweet, S.D. (2003). Quantification of forensic ADN from various regions of human teeth. *J Forensic Sci*, 3, pp.622-625.
- [60] Pfeiffer, H. (2003). The Kaiser's tooth. *Int J Leg Med*, 117, pp.118-120.
- [61] Sweet, D., Hildebrand, D., Phillips, D. e col. (1999). Identification of a skeleton using ADN from teeth and a PAP smear. *J Forensic Sci*, 44(3), pp.630-633.
- [62] Burger, S., Hummel, B., Hermann, B. e col. (1999). ADN preservation: A microsatellite-ADN study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*, 20, pp.1722-1728.
- [63] Parsons, T.J., Huel, R., Davoren, J. e col. (2007). Application of novel "mini-amplicons" STR multiplexes to high volume casework one degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int: Genetics*, 1, pp.175-179.
- [64] Marjanovic, D., Durmic-Pasic, A., Kakal, N. e col. (2007). ADN identification of skeletal remains from world war II mass graves uncovered in Sloveniale. *Croat Med J*, 4, pp.513-519.
- [65] Holland, M.M., Cave, C.A., Holland, C.A. e col. (2003). Development of a quality, high throughput ADN analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. *Croat Med J*, 44, pp. 264-272.
- [66] Kemp, B.M., Smith, D.G. (2005). Use of bleach to eliminate contaminating ADN from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int*, 154, pp. 53-61.
- [67] Loreille, O.M., Diegoli, T.M., Irwin, J.A. e col. (2007). Coble MD, Parsons TJ. High efficiency ADN extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int: Genetics*, 1, pp. 191-195.
- [68] Sweet, D. (1998). Hillbrandd - Recovery of ADN from human teeth by cryogenic grinding. *J Forensic Sci*, 43(6), pp.1199-1202.
- [69] Gill, P., Whitaker, J., Flaxman, C. e col. (2000). An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100pg of ADN. *J Forensic Sci*, 91, pp.41-5.
- [70] Lee, S.B., Crouse, C.A., Kline, M.C. (2010). Optimizing Storage and Handling of DNA Extracts. *Forensic Sci Review*, 22, pp.131-144.
- [71] Budowle, B., Eisenberg, A.J., Van Daal, A. (2009). Validity of Low Copy Number Typing and Applications to Forensic Science. *Croat. Medical J*, 50, pp.207-217.
- [72] Tucker, V.C., Hopwood, A.J., Sprecher, C.J. e col. (2011). Developmental validation of the PowerPlex® ESX 16 and PowerPlex® ESX 17 Systems: STR multiplexes for the new European standard. *Forensic Sci Int: Genetics*, 5, pp.436-448.
- [73] Budowle, B., Ge, J., Chakraborty, R. e col. (2011). Population genetic analyses of the NGM STR loci. *Int J Legal Med*, 125, pp.101-109.
- [74] Welch, L.A., Gill, P., Phillips, C. e col. (2012). European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. *Forensic Sci Int: Genetics*, 6, pp.819-826.
- [75] Bogas V, Carvalho, M., Anjos, M.J. col. (2009). Genetic identification of degraded DNA samples buried in different types of soil. *Forensic Sci Int: Genetic Supplement Series*, 2, pp.169-171.
- [76] Cerqueira, J.M.C. (2001). *Solos e clima em Portugal*. (2ªed.). Lisboa: Clássica Editora.

- [77] Montiel, R., Malgosa, A., Subira, E. (1997). Overcoming PCR inhibitors in ancient ADN extracts from teeth. *J Ancient Biomol*, 1, pp.221-225.
- [78] Syvänen, A.C. (2001). Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, 2, pp.930-942.
- [79] Rogan, P.K., Salvo, J.J. (1994). High-fidelity amplification of ribosomal gene sequences from South American mummies. In Herrmann, B., Hummel, H. (1994). *Ancient ADN*. Springer, pp.182-194.
- [80] Scholtz, M., Giddings, L., Pusch, C.M. (1998). A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue ADN extracts is determined as human collagen type I. *Anal. Biochem*, 259, pp.283-286.
- [81] Corte-Real, A., Silva, D.N., Corte-Real, F. e col. (2013). Bitemarks in foodstuffs - An approach for genetic identification of the bitter. *Forensic Sci Int: Genetics*, 4, pp. e340–e341.
- [82] Webb, L.G., Egan, S.E., Turbett, G.R. (2001). Recovery of ADN for forensic analysis from lip cosmetics. *J Forensic Sci*, 46(6), pp.1474-1479.