

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PÍRACICABA

JULIANA MENDONÇA FERREIRA DOS SANTOS

ANÁLISE DA AMELOGENINA PULPAR PARA DETERMINAÇÃO DO GÊNERO BIOLÓGICO

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Biologia Buco-dental Área de Concentração: Odontologia Legal e Deontologia.

Orientador: Prof^o. Dr. Eduardo Daruge Júnior

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno e orientada pelo Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior.

Assinatura do Orientador

PIRACICABA-SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
HELENA FLIPSEN - CRB8/5283 - BIBLIOTECA CENTRAL "CESAR LATTES" DA
UNICAMP

Sa59a Santos, Juliana Mendonça Ferreira dos, 1984-
Análise da amelogenina pulpar para determinação do gênero
biológico / Juliana Mendonça Ferreira dos Santos. -- Piracicaba,
SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Eduardo Daruge Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Odontologia legal. 2. DNA. I. Daruge Júnior, Eduardo, 1960-
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em inglês: Analysis of pulpar amelogenin for biological gender
determination

Palavras-chave em Inglês:

Dentistry, Forensic

DNA

Área de concentração: Odontologia Legal

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Eduardo Daruge Júnior [Orientador]

Paulo Zárate Pereira

Luiz Francesquini Júnior

Data da defesa: 16-01-2012

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 16 de Janeiro de 2012, considerou a candidata JULIANA MENDONÇA FERREIRA DOS SANTOS aprovada.

A large, stylized blue ink signature of Prof. Dr. Eduardo Daruge Junior.

Prof. Dr. EDUARDO DARUGE JUNIOR

A blue ink signature of Prof. Dr. Paulo Zárate Pereira.

Prof. Dr. PAULO ZÁRATE PEREIRA

A blue ink signature of Prof. Dr. Luiz Franceschini Junior.

Prof. Dr. LUIZ FRANCESQUINI JÚNIOR

DEDICATÓRIA

A concretização dos sonhos em minha vida foi fruto da dedicação imensurável de meu pai, **Armando Ferreira dos Santos Filho**. Médico oftalmologista, pós-graduado pelo Instituto Barraquer (Barcelona), foi para mim, além de pai devoto e incansável, melhor amigo, companheiro e exemplo de pessoa extraordinária e única. Neste trabalho, trilhado ao longo dos últimos anos, ficou registrado intrinsecamente aos parágrafos e a cada pontuação que se seguiu, o orgulho de ser sua filha. Esta conquista não foi minha. Foi nossa! Dedico este trabalho a você que, segundo os versos do poeta, apenas passou para o outro lado da vida, longe dos meus olhos, porém dentro do meu coração. Te amo!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** por ter dado, a mim e a minha família, as condições essenciais para seguir em frente, até mesmo naqueles dias em que tudo parecia ter perdido sentido.

Minha amada avó **Laila Saad dos Santos**, por me fornecer, além de seu amor, todo o suporte e ânimo na conquista de meus objetivos. Você é, sem dúvida alguma, exemplo de vida!

Minha querida mãe **Liete Gamarra Mendonça**, que se fez presente quando mais precisávamos, trazendo afeto e conforto, sempre com um sorriso no rosto, sem medir esforços para estar conosco.

Ao meu noivo e futuro cônjuge, **Danilo Hamano Silveira Campos**, sem o qual não vislumbro futuro, uma vez que compõe minha vida no presente e passado. Crescemos juntos e agora podemos compartilhar nossas conquistas, tendo a certeza de que este é apenas o começo!

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **FOP/UNICAMP**, por me proporcionar conhecimento de excelência, contribuindo com meu desenvolvimento intelectual.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Daruge**, por sua inestimável dedicação e doação ao exercício da Odontologia Legal. Sempre solícito e digno de um verdadeiro mestre, não poupou sugestões a este trabalho. Foi uma honra poder adquirir parte de seu conhecimento.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior**, que me acolheu desde o início da especialização, em 2007, e que torna até hoje, através dos cursos *latu sensu* e *strictu sensu* em Odontologia Legal na FOP/UNICAMP, o alcance da especialidade como algo palpável, não só para esta pessoa que vos escreve, mas para muitas outras (alunos e ex-alunos) de todas as regiões do Brasil.

Ao **Prof. Dr. Luiz Francesquine Júnior**, com senso crítico e essência de pesquisador nato. Foi o idealizador deste trabalho, fornecendo-me

tal desafio ainda quando cursava a especialização. Que este seja apenas um dentre os muitos projetos que ainda serão desenvolvidos por nós.

Ao **Prof. Paulo Zárate Pereira**, fundamental no despertar de meu anseio em me tornar especialista em Odontologia Legal. Suas envolventes aulas foram essenciais em firmar minha convicção em seguir com tal carente especialidade em nosso estado.

À querida e sempre eficiente **Célia Regina Manesco**, a Celinha. Essencial na Odontologia Legal é também proprietária de todas as artimanhas burocráticas, além de estar sempre disposta a um bom papinho durante os cafezinhos.

Ao **Instituto de Perícias Científicas – IPC**, em especial ao **Bruno Figueiredo**, sem os quais este projeto não teria se concretizado. Em meio a grandes adversidades, fui recebida e atendida prontamente, sem esforços poupados, algo digno do laboratório de DNA referência em nosso estado e no país.

Ao **Departamento de Medicina Legal (DML) da Polícia Civil do Espírito de Vitória (ES)** e ao **Laboratório de DNA forense** da mesma instituição, por permitirem meu acesso as dependências e fornecerem os subsídios básicos para a realização deste trabalho. Em especial, um sincero agradecimento ao técnico em necropsia **Sr. Orlando**, e aos médicos, **Dr. Luis Renato Costa** e **Dr. Kátia Souza Carvalho**.

Aos componentes da minha banca de qualificação, **Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado** e **Prof. Dr. Rafael Nobrega Stipp**, pelas sugestões e críticas fornecidas para o aprimoramento deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Rogério Nogueira** (FO/USP), que prontamente esclareceu-me algumas dúvidas, fornecendo-me subsídio para fundamentar importantes achados laboratoriais.

E aos meus colegas e eternos amigos, **Daniel Bragança**, **Eduardo Rosa** e **Deibson Assis**. Essa amizade tornou nosso curso um saudoso retrato!

*“As palavras que eu escrevo são as
mesmas que você lê; mas lhe dirão
mais e outras coisas.”*

Jorge Larossa

Resumo

O processo de identificação humana envolve diferentes etapas, contexto no qual se faz necessário o aprimoramento das técnicas tradicionais e o desenvolvimento de novas metodologias aplicáveis na rotina da prática pericial. É através da investigação do gênero biológico, precedida da determinação da espécie, que se dá o passo inicial no delineamento do perfil de vítimas não-identificadas. Ao encontro dos exames antropológicos, as técnicas de DNA consolidaram-se como adjuvantes e certificadoras; porém, trazem consigo limitações atinentes ao custo, agilidade e aplicabilidade. O presente estudo buscou investigar o gênero biológico, através do isolamento do gene amelogenina. Para tanto, foram utilizadas 52 polpas dentais obtidas de dentes extraídos de corpos em decomposição, as quais foram submetidas à extração do material genético por meio da resina quelante *Chelex 100®* (BioRad) e à amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Após eletroforese com seqüenciador automático (*Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer®*), os picos foram obtidos, e os resultados interpretados como AMEL X para indivíduo feminino (106 pb), e AMEL Y para indivíduo masculino (112 pb). Não foi possível determinar o gênero biológico em 15,4% (n=8) dos dentes e não houve influência do sexo na viabilidade do material coletado para a determinação do gênero ($p = 0,072$). Quanto aos grupos dentais, divididos em molares, pré-molares, caninos e incisivos, os mesmos não exerceram influência na obtenção dos resultados ($p = 0,892$). Houve concordância de 95,5% (n=42) entre a determinação do gênero biológico e o gênero real dos indivíduos que compuseram a amostra (Kappa = 0,909). Dentre aqueles do gênero masculino houve discordância de 5,6% (n=2) entre o sexo real e o sexo obtido pela amplificação, revelando resultado de falso-feminino, ou seja, indivíduos masculinos com genótipo XX (AMEL X). Concluiu-se que, apesar da amostra ser composta por material degradado, a amplificação da amelogenina apresentou resultados satisfatórios na investigação do gênero biológico, mostrando-se como uma metodologia de ótimo custo-benefício capaz de complementar estudos antropológicos de identificação humana.

Palavras-chave: Identificação humana; DNA; Odontologia Legal

Abstract

The process of human identification involves different stages, in which context it is necessary to the improvement of traditional techniques and the development of new methods applicable in forensic practice routine. It is through the investigation of biological gender, preceded by the determination of species, which takes the initial step in designing the profile of unidentified victims. To meet the anthropological examination, DNA techniques established themselves as adjuvants and certifiers, but bring with them limitations pertaining to cost, flexibility and applicability. This study aimed to investigate the biological gender by isolating the amelogenin gene. For this purpose, we used dental pulp obtained from 52 teeth extracted from decomposing bodies, which were genetic material extracted through the chelating resin Chelex 100® (Bio Rad) and amplification by polymerase chain reaction (PCR). After electrophoresis on automatic sequencer (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser®), the peaks were obtained and the results interpreted as AMEL X for females individuals (106 pb) and AMEL Y for male individuals (112 pb). Could not be determined the biological gender of 15,4% ($n = 08$) of the teeth and there was no influence of gender on the viability of the material collected for the determination of sex ($p = 0,072$). As dental groups, divided into molars, premolars, canines and incisors, they were not influential in obtaining the results ($p = 0,892$). There was concordance of 95,5% ($n = 42$) between the determination of the actual biological gender and the gender of sampled individuals (Kappa = 0,909). Among those of males, there was disagreement of 5,6% ($n = 02$) between real sex and sex obtained by amplification, revealing results of false-female, or males subjects with XX genotype (AMEL X). We concluded that, although the samples were composed of degraded material, the amplification of amelogenin presented satisfactory results in the investigation of biological gender, showing himself as a cost-effective methodology, capable of complement anthropological studies in human identification.

Keywords: Human identification, DNA, Forensic Dentistry

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMELX	Amelogenina localizada no cromossomo X
AMELY	Amelogenina localizada no cromossomo Y
DNA	Ácido desoxidorribonucleico
Loci	Plural de locus
Locus	Local no cromossomo onde está localizado um gene
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
STR	Repetições curtas consecutivas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 Odontologia Legal	4
2.2 Identificação humana e os exames de DNA	5
2.3 Investigação do gênero biológico	9
2.4 Amelogenina	10
2.5 O órgão dental e os exames de DNA	14
2.6 Resina Chelex	17
3 PROPOSIÇÃO	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO	46
APÊNDICE	47

1 INTRODUÇÃO

No momento em que o embrião se desenvolve e chega ao seu nascimento, um fenômeno é celebrado: aquele indivíduo tornou-se único dentre os demais existentes no planeta! Tal acontecimento, perpétuo na humanidade, gerou ao homem, enquanto parte da sociedade, a necessidade de classificar e definir o que de fato é a identidade e o processo que leva a esse fim, chamado de identificação.

Classifica-se a identidade como o conjunto de características somatoscópicas e somatométricas que individualizam uma pessoa. Já o processo de identificação baseia-se no achado de semelhanças ou de diferenças entre indivíduos diferentes, e deve respeitar cinco princípios básicos: unicidade, imutabilidade, perenidade, classificabilidade e praticabilidade (Vanrell & Borborema, 2007).

Aliada à Medicina, a Odontologia Legal vem contribuindo na busca pela identificação humana nas mais diversas situações, como em crimes e catástrofes. Não raras são as situações que exigem a integração de equipes multidisciplinares, uma vez que o campo da investigação forense, além de amplo, exige o domínio de técnicas em ascendente desenvolvimento.

Conforme descrito na Resolução 63 (CFO, 2005), a qual aprova a consolidação das normas para procedimentos nos Conselhos Regionais de Odontologia, compete ao especialista em Odontologia Legal a perícia no vivo, no morto, íntegro ou em suas partes em fragmentos, sendo a investigação antropológica um dos acontecimentos mais frequentes na rotina do *expert*.

A antropologia forense é a ciência que investiga as variações qualitativas e quantitativas das características do homem (Silva, 1997). Durante a pesquisa antropológica, o perito Médico e/ou Cirurgião-Dentista deverá estabelecer inicialmente a espécie animal; na seqüência, determinar o gênero, depois estimar a idade, a estatura e o biótipo (Jobim et al., 2006).

A investigação ou determinação do gênero biológico (sexo) faz-se necessária, quando falamos de indivíduos mortos, por permitir a redução no número total de sujeitos durante o processo de identificação do desconhecido (em situações de catástrofes, desastres em massa ou encontro de sítios arqueológicos), e quando falamos de situações *in vivo*, nos casos de intersexualidade, pseudo-hermafroditismo, estupro, investigação de maternidade/paternidade entre outros (Arbenz, 1988).

Ainda, as técnicas antropológicas para a investigação do sexo, ditas clássicas e de rotina (por exemplo a análise morfométrica da pelve), sofrem limitação em sua aplicabilidade em variadas ocasiões. É o que se observa, dentre outros casos, quando da determinação do sexo em jovens na fase pré-puberal, crianças e bebês; em corpos mutilados sem possibilidade de reconhecimento; e em restos mortais encontrados em suas partes.

Por seu turno, um dos métodos adjuvantes no estabelecimento do gênero biológico é a análise da molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA) a qual pode ser comparada a um código de barras capaz não só de identificar, mas também de comparar pessoas, determinando inclusive a existência ou não de vínculo genético entre estes (Slavkin, 1997).

O aprimoramento da técnica da “reação em cadeia da polimerase”, também chamada PCR, desenvolvida em 1983 por Kery Mullis (Mesquita et al. 2001), possibilitou o manejo e extração de quantidades diminutas de DNA, tornando-as fontes viáveis para investigação forense. Assim, tornou-se possível a criação exponencial de múltiplas cópias de uma simples parte da molécula de DNA.

Mesmo com os avanços na genética forense, a obtenção dos perfis de DNA para fins investigativos apresenta limitações, sendo as mais comuns a presença de inibidores da PCR e contaminantes do DNA, além da própria fonte de obtenção da mostra biológica, a qual sofre interferência tanto pelo estágio de decomposição, como de fatores ambientais (Faerman et al., 1995).

A habilidade dos tecidos duros (ossos e dentes) resistirem à degradação *post-mortem* tem fornecido dados importantes para a ciência forense. Os dentes são os tecidos mais duros e resistentes do corpo humano, e podem permanecer intactos até mesmo nas situações mais extremas, como em carbonizações e em sítios arqueológicos datados em milhares de anos (Ricaud et al., 2005).

Nesse sentido, não somente o formato, o contorno e o tamanho dos dentes humanos são indicativos do gênero biológico. Nota-se que, além dos referidos caracteres, ainda a principal proteína encontrada no esmalte dental possui uma assinatura tanto no esmalte masculino como no feminino: a amelogenina (Velarde-Félix et al., 2008).

Secretada pelos ameloblastos, a amelogenina está presente no humano como dois genes, AMELX e AMELY, localizada no cromossomo feminino e masculino, respectivamente. A diferença no tamanho dos genes é suficiente para ser usada como marcador confiável na determinação do sexo a partir de pequenas amostras de DNA obtidas de restos humanos ou de dentes (Roffey et al., 2000).

Dentre as técnicas de extração de DNA, as mais frequentemente utilizadas são divididas entre método orgânico e inorgânico. Para que a metodologia de escolha atenda ao requisito da praticabilidade, tendo em vista a conjuntura brasileira, a mesma deverá se apresentar conveniente sob os aspectos de relação custo-benefício, confiabilidade e rapidez (Fridez & Coquoz, 1996).

Em vista do exposto, foi relevante testar a habilidade de recuperação do material genético do tecido pulpar de corpos em decomposição, fazendo uso da técnica de extração inorgânica com resina quelante Chelex 100® (Bio Rad), de maneira tal a validar a amplificação do gene da amelogenina para determinação do gênero biológico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Odontologia Legal

Foi em 1966, com a publicação da Lei nº 5. 081, a qual passou a regulamentar o exercício da Odontologia em todo o território brasileiro, que se elencou a competência do cirurgião-dentista a colocar em prática todo conhecimento adquirido em cursos de graduação e pós-graduação, incluindo-se a realização de perícia odontolegal em foro civil, criminal, trabalhista e em sede administrativa (Brasil, 1966).

Os profissionais habilitados a exercerem a Odontologia, assim como a Medicina, dividem-se entre as áreas curativa, preventiva e legal. Conforme definiu Silva (1997), a Odontologia Legal é a especialidade voltada à aplicação dos conhecimentos odontológicos a favor da Justiça.

O Conselho Federal de Odontologia, através da Resolução 63/2005 estabeleceu a Odontologia Legal como especialidade voltada ao esclarecimento dos fenômenos que tenham atingido o homem, seja ele vivo, morto ou em suas partes, cabendo ao especialista na área a realização das mais diversas tarefas periciais (CFO, 2005).

Para Vanrell & Borborema (2007), os quais posicionaram a Odontologia Legal como ramo da Medicina Legal, os odontologistas contam atualmente com tecnologia de ponta, servindo de subsídio para melhor resolução de casos. Assim, passaram a fazer parte da rotina pericial, por exemplo, os estudos com aminoácidos, ácido aspártico e sorológico, além dos exames histológicos e de análise dos perfis de DNA, entre outros.

Silva & Oliveira (2008) ao se questionarem sobre as modernas técnicas da biologia molecular, concluíram que, quando comparadas à antropologia forense - metodologia tradicional e consagrada - seriam ferramentas independentes umas das outras e os conhecimentos adquiridos de

ambas as técnicas fazem com que tais áreas contribuam entre si, levando à busca de novos ramos de atuação na Odontologia Legal.

Vieira et al. (2010) abordaram a análise de DNA na odontologia forense e demonstraram a grande contribuição dos exames biomoleculares aos processos de identificação humana, em especial nas situações em que as impressões digitais não puderam ser colhidas ou que as metodologias antropológicas e de identificação pelos arcos dentais também foram prejudicadas.

2.2 Identificação humana e os exames de DNA

O DNA ancestral utilizado para identificação humana, rotineiramente resulta em fragmentos independente de sua idade. Diante deste fato, Kelman & Moran (1996) buscaram a possível explicação para ocorrência de tal fenômeno. Segundo os autores, com a morte celular, o DNA passa a ser degradado, possivelmente pela ação de nucleases, que previamente degradaram as histonas responsáveis pela proteção do DNA no nucleossomo.

Conforme Calabrez (1997), por serem as amostras forenses limitadas quanto as suas quantidades, o emprego das técnicas da biologia molecular sofreu grande avanço no momento do desenvolvimento da técnica da “reação em cadeia da polimerase”, ou PCR. A maior contribuição da PCR foi tornar possível a amplificação exponencial de sequências de DNA *in vitro*, através do conjunto de reações em série, ou ciclos, de desnaturação, anelamento e extensão.

Slavkin, em 1997, reportou o caso de identificação de nove esqueletos supostamente pertencentes à família do Czar Nicholas II. Lançou-se mão da utilização do DNA mitocondrial para estabelecimento da relação genética das ossadas com familiares de linhagem materna ainda vivos.

Para que o exame de DNA com finalidade de identificação humana seja viável, Hoff-Olsen et al. (1999) sugeriram a busca pela correta metodologia

para extração do DNA. Tal escolha deverá levar em consideração o tempo despendido para obtenção dos resultados, sendo o método rotineiramente utilizado pelos laboratórios de DNA forense, o método dito orgânico, ou do fenol-clorofórmio, um método que envolve várias etapas e certo tempo.

. Zangenberg et al. (1999) sugeriram o uso de kits Multiplex para a PCR, pois os mesmos necessitam de apenas uma única alíquota de material biológico para amplificação de diferentes loci em uma mesma reação. A análise de múltiplos *loci* para identificação humana oferece significativa redução do tempo e custo dos trabalhos laboratoriais, especialmente quando é necessária a identificação de grande número de indivíduos

Para Cassiman (2000), amostras mais antigas, como dentes e ossos, sempre apresentarão algum tipo de contaminação. O autor recomendou aos laboratórios extremo cuidado para a limpeza da superfície das amostras, previamente à extração do DNA uma vez que o estabelecimento do perfil de DNA de um indivíduo permite a comparação do mesmo com outro perfil obtido a partir de uma amostra biológica.

Mesquita et al. (2001) avaliaram três métodos de extração de DNA obtido de tecido parafinado, advindo de exames patológicos da mucosa oral, além de tecido gengival não-fixado, coletado durante procedimento operatório. Somente as amostras que tiveram o material extraído sem digestão enzimática prévia não apresentaram amplificação satisfatória do material genético, porém as amostras parafinadas mostraram-se viáveis como amostras para coleta do DNA.

Schmerer, em 2001, propôs um protocolo de extração de DNA em ossos humanos antigos, sugerindo a análise múltipla da mesma amostra. Conforme os autores, a análise genética de restos humanos antigos tornou-se uma importante ferramenta de informação arqueológica, porém na amplificação de pequenas quantidades de DNA, há a possibilidade de obtenção de resultados de falsa homozigose em amostras heterozigóticas.

Ganswindt et al. (2003) relataram o processo de identificação de corpos descobertos, após a escavação de grande área em Berlim, para a construção de edifícios. Foram encontrados cerca de 1.819 ossos, além de 6.672 fragmentos ósseos, de origem tanto humana como animal. Para que o trabalho de segregação e identificação dos restos humanos fosse possível, foi necessária a participação e cooperação de diferentes áreas forenses, dentre elas de médicos, médicos veterinários, odontologistas, antropólogos e historiadores.

Em 2004, Del Valle et al. procederam a avaliação de três métodos de extração fenólica de DNA, a partir de restos ósseos e, conseqüentemente, avaliaram a relevância de fatores que pudessem interferir no resultado final dos procedimentos. Concluíram que os métodos de extração orgânica do DNA produziram amplificação para a PCR, porém a qualidade da mesma foi influenciada pela presença de inibidores, degradação e contaminantes.

Para Iwamura et al. (2004), a análise de DNA em cadáveres apresenta obstáculos que limitam sua utilização, dentre eles a presença de inibidores da PCR, resultantes da ação de microrganismos e do ambiente em que os corpos foram encontrados. Nessas situações, os autores propuseram a utilização de peças ósseas como fonte para obtenção de DNA, pois os mesmo costumam estar preservados e menos sujeitos às agressões.

Kanto et al.(2005), ao verificarem a viabilidade de recuperação do DNA de amostras salivares coletadas sob a pele humana, puderam concluir as amostras salivares utilizadas como prova forense podem apresentar limitações, dependendo da quantidade do DNA recuperado.

Arruda et al. (2007) relataram a problemática em extrair DNA de ossos datados em cerca de 100 a.C, encontrados em ambiente úmido. A obtenção de boas preparações com DNA de ossos antigos enfrentaram obstáculos tais como os fatores ambientais em que os corpos foram encontrados, além da habilidade técnica da equipe laboratorial e da qualidade dos reagentes utilizados.

Caramelli et al, em 2007, relataram os esforços para determinar se os restos mortais sepultados em nome do poeta italiano, Francesco Petrarca, eram de fato do referido sujeito. Assim, os autores elegeram a investigação do DNA mitocondrial como técnica, por essa permitir a busca através da linhagem materna, até mesmo de gerações mais distantes. Concluíram que os restos sepultados pertenciam a dois indivíduos diferentes, confirmando a violação do túmulo.

Dolinsky & Pereira, em 2007, traçaram a evolução da aplicabilidade do DNA nas ciências forenses e destacaram como vantagens de seu emprego, a sua estabilidade, confirmada por sua capacidade de preservação ao longo dos anos, e por sua abundância no corpo humano, uma vez que pode ser obtido das mais diversas fontes, seja de um simples fio de cabelo ou de um envelope selado com saliva.

A busca pela coleção de DNA é o primeiro passo da análise forense. Hansson et al.(2009) verificaram três tipos de produtos disponíveis no mercado utilizados para a coleta do material biológicos. Voluntários fizeram uso de uma camiseta por três horas, a qual teve parte de sua gola cortada para recuperação do DNA daquela região. Não foram observadas diferenças significantes entre as formas de coleta do material.

Hedman et al.,em 2009, colocaram em cheque a confiabilidade dos resultados de exames de DNA, ao concluírem que a enzima comumente utilizada pela comunidade forense, a *AmpliTaQ Gold®*, causou a inibição da PCR após ser utilizada em amostras colhidas em cenas de crimes. Os autores recomendaram uma exaustiva purificação das amostras para contornar tal problema.

Rocha, em 2009, realizou testes com tecido ósseo sujeito à ação de diferentes temperaturas, para verificar a possibilidade de obtenção dos 13 loci preconizados pelo CODIS/FBI*. A autora observou que o número de marcadores obtidos era inversamente proporcional à elevação da temperatura, sendo 500°C a temperatura em que nenhum marcador mostrou amplificação.

Carvalho et al (2010), ao avaliaram a qualidade do DNA obtido da saliva humana arquivada pelo período de 07 e 180 dias, comprovaram que o tempo não influenciou na obtenção de resultados de qualidade, obtendo êxito nos testes realizados, decorridos seis meses da data da coleta salivar.

Baker, em 2010, abordou os fatores que podem interferir e afetar a reação em cadeia da polimerase, ou PCR. Dentre os fatores mais comuns estão o pequeno número de cópias geradas, a ação de polimerases termoeestáveis e possíveis contaminações com DNA exógeno.

Girish et al., em 2010, sumarizaram a literatura referente as técnicas de DNA empregadas na odontologia forense. Conforme os autores existem quatro formas de identificação humana através do complexo buco-maxilar: a identificação dental pelo método comparativo, a reconstrução *postmortem*, os registros dentais e os perfis de DNA, sendo o tecido pulpar a maior fonte de material genético.

2. 3 Investigação do gênero biológico

Para Arbenz (1988), é a partir da puberdade que os ossos passam a exibir características fundamentais para a determinação do sexo. Assim, a investigação do gênero biológico é aplicada em diversas situações, dentre elas no vivo, no cadáver, no esqueleto, em ossos isolados, em fragmentos de pele, em manchas e outros.

Faerman et al. (1995), buscaram a identificação do gênero biológico em restos ósseos humanos encontrados em um sítio arqueológico de Israel, com idade entre 200 e 8100 anos, através da extração e amplificação do DNA. Foi possível a obtenção de resultados satisfatórios independente da idade das amostras e do local em que tais foram encontradas.

Duz (2000) buscou a determinação do sexo humano através da observação da cromatina sexual analisada a partir do exame microscópico de fibroblastos presentes no tecido pulpar. Para tanto, foram examinados 100

dentes, na mesma proporção entre o gênero feminino e masculino, os quais mostraram-se viáveis para a determinação do sexo, com indivíduos femininos apresentando no núcleo celular, o corpúsculo de Barr.

Das et al. (2004) buscaram estabelecer o período após a morte em que se fez viável a determinação dos sexo através da cromatina sexual da polpa dental. Tal determinação foi possível em cadáveres com tempo de morte superior a quatro meses, porém com acentuada queda de encontro do corpúsculo, decorridas as primeiras 6 horas.

O estudo do sexo em sítios arqueológicos faz-se necessária por permitir o agrupamento de indivíduos de um mesmo sexo, além de estabelecer o parentesco e delinear a genealogia histórica dos indivíduos em questão. Vanek et al (2009), ao analisarem restos humanos pertencentes ao século VII, denotaram a forte tendência da associação das técnicas exatas antropológicas com a genética, a fim de aprimorar a qualidade das informações colhidas de amostras mais antigas.

Suazo et al. (2010) verificaram o poder de diagnóstico dos sexo pela análise do corpúsculo de Barr, a partir da observação de células do tecido pulpar. Foram utilizados 40 dentes sadios, extraídos com finalidade ortodôntica, os quais obtiveram como resultado a efetividade na determinação do gênero em 100% da amostra. No entanto, foram recomendados pelos autores novos testes que simulassem as diversas condições encontradas no meio forense, dentre elas o tempo da morte e as condições ambientais.

2. 4 Amelogenina

Arce (1992), após rever o mecanismo de ação das proteínas da matriz de esmalte, concluiu ser a amelogenina a proteína mais abundante na matriz responsável pela formação do esmalte dental, sendo ela composta por 180 aminoácidos e com elevado poder de reparação do tecido periodontal adjacente.

A amelogenina é uma proteína específica secretada pelos ameloblastos durante o desenvolvimento do órgão dental. Conforme Lench et al. (1994), o gene da amelogenina está localizado nos cromossomos sexuais X e Y. Os autores investigaram uma família com indivíduos portadores de amelogênese imperfeita e concluíram que o gene da amelogenina ligado ao cromossomo feminino X estava diretamente implicado na patologia apresentada na estrutura do esmalte.

O gene amelogenina foi encontrado em diferentes espécies animais, porém, sua localização nos cromossomos sexuais X e Y é característica exclusiva dos humanos e bovinos. Na tentativa de se conseguir a separação de materiais genéticos de origens distintas, Buel et al. (1995), realizaram experimento no qual misturaram sangue humano com sangue animal, simulando um possível cenário, em que fossem encontrados restos humanos e não-humanos. Entre todas as tentativas realizadas, nenhuma delas mostrou-se satisfatória, pois a amplificação das amostras de DNA animal produziu fragmentos muito similares aos encontrados pelo DNA humano.

Clayton et al. (1995) relataram os esforços para identificação de 61 corpos de vítimas de incêndio ocorrido no Texas (EUA). Do total dos casos, 23 corpos tiveram o sexo determinado pela amplificação da amelogenina, metodologia julgada pelos autores como confiável, uma vez que utilizou o marcador X para controle, concomitantemente ao cromossomo Y.

Conforme Haas-Rochholz & Weiler (1997), o gene humano da amelogenina, localizado no cromossomo sexual X, é também chamado AMELX, enquanto a amelogenina localizada no cromossomo Y é chamada de AMELY. Dentre as metodologias de rotina que utilizam a amelogenina para PCR, encontra-se como produto 106 e 112 pb para os cromossomos X e Y, respectivamente. Os autores, no intuito de reverterem a possível sobreposição de fragmentos, investigaram a possibilidade de desenvolvimento de novos *primers* para os testes de investigação do sexo e obtiveram resultados satisfatórios com fragmentos menores que 100 pb.

Smith et al. (1997) reportaram a análise de DNA de 43 restos ósseos encontrados em Roma, referentes ao século IV, supostamente de crianças vítimas de infanticídio. O sexo foi determinado pela amplificação do gene amelogenina, pois a análise morfométrica em crianças, especialmente naquelas cujo esqueleto ainda não se apresentava completo, não forneceria confiabilidade aos resultados.

O gene amelogenina é um gene de cópia simples, encontrado nos cromossomos homólogos X e Y, que se diferenciam em tamanho e em sequência. Roffey et al.(2000) reportaram situação na qual um indivíduo com fenótipo masculino normal, apresentou identificação de seu genótipo sexual trocada, com resultado correspondente a falso-feminino. Para confirmação do falso resultado a partir do gene amelogenina, os autores optaram por amplificar o gene DYZ1, presente exclusivamente no cromossomo Y. Dessa forma, identificaram corretamente o sexo do indivíduo como sendo masculino e puderam sugerir a utilização de dois marcadores para determinação do sexo, de forma a evitar resultados errôneos.

Algumas situações forenses tornam a determinação do gênero biológico crucial, pois a primeira preocupação relacionada à análise de amostras está na possibilidade de contaminação com DNA exógeno advindo de outro indivíduo. Thangaraj et al. (2002) analisaram 270 amostras masculinas, no intuito de encontrar possível deleção da amelogenina no cromossomo Y. Tal busca se deu, motivada por ser a amelogenina o marcador padrão presente nos kits comerciais para identificação individual e do sexo. Dos indivíduos analisados, cinco deles apresentaram deleção da amelogenina, sugerindo a possibilidade de um ponto de mutação no cromossomo Y.

Stephanopoulos et al. (2005) averiguaram os genes envolvidos nos casos de amelogênese imperfeita e, após revisão da literatura, concluíram que a composição final do esmalte dental era o somatório das ações moleculares e celulares, controladas pela expressão de múltiplos genes, em especial pelo gene amelogenina, composto por sete éxons e seis íntrons.

Tschentscher et al. (2008) realizaram um estudo cego com 50 indivíduos do sexo masculino e 50 indivíduos do sexo feminino para determinação do sexo a partir do gene amelogenina, porém amplificando uma menor sequência do gene, com 48 e 45 pb. Como resultado, foi possível a obtenção da amplificação do material genético em todas as amostras averiguadas.

Velarde-Félix et al. (2008) realizaram estudo cego, observacional, comparativo e transversal em 457 amostras sanguíneas, com a finalidade de determinar o sexo a partir da amplificação do gene amelogenina. Como resultado, houve concordância de 100% entre a amplificação obtida e o sexo real dos indivíduos participantes.

Para a interpretação dos resultados obtidos a partir dos exames de DNA com o gene amelogenina, observa-se a presença de dois picos de leitura para indivíduos masculinos (heterozigóticos), enquanto que indivíduos do gênero feminino apresentam um único pico (homozigóticos). Codina et al. (2009) aplicaram a associação de quatro técnicas, entre elas a da amelogenina, para determinação do sexo, garantindo maior confiabilidade aos exames tradicionalmente realizados.

Pugach et al. (2010) descreveram o papel da amelogenina durante o desenvolvimento dental. Previamente à erupção do elemento dental na cavidade bucal, os ameloblastos são responsáveis pela secreção da matriz orgânica, a qual, por sua vez é constituída em cerca de 90 % pela proteína nominada amelogenina. Proteases também são secretadas pelos ameloblastos, com a função de processar a amelogenina e outras proteínas menos abundantes, dando espaço para o desenvolvimento dos cristais minerais que formarão o esmalte dental.

Luptáková et al.(2011) buscaram a identificação do sexo em 25 esqueletos da Idade Média, encontrados na Eslováquia. Tornou-se necessária a associação de técnicas da biologia molecular, pois a amostra, outrora analisada e tratada com métodos antropológicos e arqueológicos, apresentava-

se altamente degradada. Como a amplificação da amelogenina para determinação do sexo pode apresentar falsos resultados, as regiões eleitas para amplificação e determinação do sexo foram as dos genes SRY e DXZ4, pois além de constituírem fragmento com menor número de pares de bases em relação ao gene amelogenina, permitiram o trabalho com material escasso, determinando o sexo em 92% da amostra.

2. 5 O órgão dental e os exames de DNA

Para a realização de estudos arqueológicos e antropológicos, Richards & Sykes (1995) recomendaram a utilização de ossos e dentes, pois representam o tipo de amostra que mais resiste ao tempo, porém certos cuidados devem ser tomados, na tentativa de evitar a contaminação do material mais antigo com DNA moderno exógeno. Dessa forma, os autores realizaram testes de DNA em ossos oriundos de animais, obtidos de uma escavação, e puderam perceber a ocorrência da contaminação, possivelmente na fase pré-laboral, ou seja, durante a própria escavação.

Sweet & Sweet (1995) relataram a identificação humana de uma vítima incinerada. Devido a elevada temperatura em que o corpo foi exposto, a identificação foi possível graças à análise de DNA obtido do tecido pulpar oriundo de terceiro molar incluso, portanto preservado.

Yamamoto (1996) ao tratar sobre os estudos biomoleculares em dentes abordou as diferentes metodologias empregadas com o órgão dental, dentre elas a racemização de aminoácidos para estimativa a idade e a análise de DNA da polpa dental. O autor sugeriu que, nas ocasiões em que se fizer necessária a utilização de dentes para exames de DNA, o procedimento de extração do elemento dental não tenha ocorrido há mais de 21 meses, com a finalidade de preservação das células nativas.

Sweet et al. (1999) relataram um caso em que foi possível realizar a identificação humana a partir da análise de DNA de material obtido de exame

citológico prévio e comparado com o DNA recuperado de um dos elementos dentais da vítima. A identificação foi positiva, confirmando a possibilidade de exames médicos servirem de fonte para a identificação humana.

Murakami et al. (2000) avaliaram, do ponto de vista da medicina forense, a capacidade dos materiais obtidos dos dentes servirem para a determinar o sexo a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi possível a determinação do sexo, com amplificação dos marcadores DXZ1 e DYZ3, em dentes permanentes, com a utilização da polpa dental, e em dentes decíduos, com a utilização da superfície da cavidade pulpar. A determinação do sexo a partir da polpa dental mostrou-se possível em amostras preservadas pelo período de 22 anos.

Segundo Presecki et al. (2000), dentre os métodos de preparação dos dentes para isolamento do DNA, o corte horizontal na região amelocementária permitiu fácil acesso à câmara pulpar, além de fornecer a possibilidade de preservação da coroa dental, para utilização em futuras pesquisas, conservando suas características anatômicas. Para a análise de DNA lançou-se mão da pulverização do complexo dentina-cimento, pois esta foi capaz de fornecer grandes quantidades de DNA nuclear e mitocondrial.

Em 2001, Pretty & Sweet realizaram estudo demonstrando as principais áreas de atuação da odontologia forense, dentre elas as técnicas com DNA. Os dentes representam uma excelente fonte de material genético, sendo viáveis até mesmo aqueles tratados endodônticamente.

Malaver & Yunis (2003) verificaram a possibilidade da polpa, dentina e cimento, servirem como fonte de DNA para identificação humana. Fizeram parte da amostra 20 dentes obtidos de cadáveres, nos quais foi possível obter resultados satisfatórios para a dentina e cimento, sendo possível apenas a obtenção de DNA mitocondrial.

Em grande parte dos casos, os restos humanos encontrados em sítios arqueológicos correspondem aos tecidos duros, como os osso e dentes. Ricaut et al. (2005) verificaram a preservação do DNA de 10 corpos

encontrados em um sítio arqueológico na França, com idades de cerca de 400 a 1000 anos. Para o exame, a amostra foi composta tanto por ossos como por dentes, este último fornecendo a polpa dentária. Como resultado, não foi obtido amplificação do DNA para a amostra óssea, porém o tecido pulpar que sofreu purificação prévia revelou resultados positivos para material genético conservado e passível de sequenciamento.

Jobim et al. (2006) reportaram a identificação positiva de crânio queimado encontrado à margem do rio Gravataí (RS), pela análise da polpa dentária. Para a realização dos exames, foi colhido o DNA dos supostos pais da vítima, para a realização do estudo comparativo, com amplificação de oito loci STR, somados à amelogenina para determinação do sexo.

Para Silva RHA et al. (2007), o processo de identificação de vítimas necessita do emprego de técnicas eficientes e rápidas. O emprego do elemento dental para a obtenção do material genético vem sendo gradativamente demonstrado pela literatura, possibilitando o exame de DNA em menores quantidades de material disponível e sob condições adversas.

Silva RF et al. (2007) sugeriram a tomada de algumas precauções no momento em que os elementos dentais forem elegidos como fonte doadora de material biológico. Assim, os autores sugeriram que previamente à utilização dos dentes, os mesmos sejam identificados e descritos conforme suas características morfológicas e, se possível, a realização de tomada radiográfica dos mesmos.

Hemanth et al. (2008) classificaram os métodos para determinação do sexo através do tecido dental em três diferentes técnicas: método visual ou clínico, método microscópico ou métodos avançados da biologia molecular.

Musse et al (2009) realizaram um estudo laboratorial, com a finalidade de verificar a recuperação do material genético obtido de dentes submersos em água doce e salgada. Foi possível recuperar o material genético em 37,5% dos dentes utilizados no estudo, com amplificação em 45% da amostra mantida em água doce e 30% da amostra mantida em água salgada.

Santos (2009) comparou a extração de DNA obtido de 18 dentes extraídos e de amostras sanguíneas oriundas dos mesmos doadores. Os dentes mostraram-se como fonte viável para a obtenção do perfil genético, porém quando comparados com a simplicidade da identificação humana com amostras sanguíneas, deixaram de ser a metodologia de primeira escolha.

Veeraraghavan et al. (2010) realizaram estudo para verificar a confiabilidade da determinação do sexo a partir da fluorescência do cromossomo Y, presente no núcleo de células do tecido pulpar. Tal técnica mostrou-se efetiva para os exames realizados em dentes recém-extraídos, muito embora a identificação incorreta do sexo para indivíduos femininos tenha ocorrido nas amostras examinadas no período de um e cinco meses após a exodontia.

2.6 Resina Chelex

Os métodos para extração de DNA, historicamente têm incluído a separação e a purificação como passos, utilizando a extração com fenol-clorofórmio e/ ou precipitação etanólica. Walsh et al. (1991) demonstraram a eficácia da resina quelante Chelex como método de extração de DNA em 84 tipos diferentes de amostras forenses e obtiveram resultados idênticos aos apresentados pelo método com fenol-clorofórmio.

Fridez & Coquoz (1995) realizaram estudo comparativo para extração de DNA, entre as técnicas com fenol-clorofórmio e com Chelex. OS autores analisaram o poder de recuperação do DNA obtido de selos colados em envelopes de correspondência. A técnica com fenol-clorofórmio mostrou-se superior à Chelex e a quantidade de DNA recuperado foi diretamente proporcional à quantidade de saliva depositada sob os selos.

Sweet et al. (1996) compararam duas diferentes técnicas para extração de DNA: a técnica orgânica, com fenol-clorofórmio, e a técnica inorgânica, a qual faz uso da resina quelante Chelex. A técnica com Chelex

mostrou-se rápida e simples, dispensando o uso de solventes orgânicos tóxicos, sem necessidade de múltiplas transferências entre tubo.

Coombs et al. (1999) verificaram a possibilidade de recuperação do DNA a partir de tecido tumoral parafinado, coletado outrora para exames patológicos. Dentre as técnicas avaliadas, a que mostrou-se mais eficiente fez uso da resina Chelex, apresentando como grande vantagem o tempo despendido em sua metodologia: não mais que quatro horas.

A resina quelante Chelex, além de possuir elevada preferência por metais pesados como cobre e ferro, qual íons metálicos e atua sob cátions monovalentes, como o sódio e o potássio (Bio-Rad, 2000).

Barea et al. (2004) realizaram a comparação de cinco métodos para a extração de DNA de fontes ditas escassas, como esfregaços de sangue periférico, tecidos incluídos em parafina, sangue impregnado em papel, urina, saliva e bulbos capilares. Os autores concluíram que os melhores resultados encontrados pertenceram ao grupo previamente tratado e purificado com a resina quelante Chelex®.

Suenaga & Nakanura (2005) avaliaram três métodos para extração de DNA obtido de cabelo humano: A Chelex®, o QIAamp® DNA mini Kit e o ISOHAIR®. Os dois primeiros métodos obtiveram amplificação de 100% da amostra, porém os autores sugeriram a utilização do método com resina Chelex, por apresentar características como confiabilidade, rapidez, simplicidade e baixo custo.

Inexiste um método dito “universal” para a extração do DNA. Castella et al.(2006) avaliaram a eficiência do método baseado na membrana em sílica para extração de DNA e comparou-o aos métodos com fenol-clorofórmio e com Chelex. Os picos obtidos pelo método da sílica foram maiores que os obtidos com as duas técnicas usadas para comparação, permitindo aumento de cerca de 20% para obtenção de perfis genéticos.

Hansen et al. (2006) compararam amostras salivares e sanguíneas para a obtenção de perfis de DNA, pelos métodos de extração manual com resina Chelex e com o sistema automático BSD600 (BSD robotic). Foi possível a obtenção de amplificações consistentes, através do sistema automatizado, além do mesmo ter apresentado como vantagens sobre a resina Chelex, a redução no número de análises que necessitaram de nova análise, no número de fases laboratoriais e no número de ciclos da PCR.

Caenazzo et al. (2009) relataram a estratégia adotada para a resolução de um crime ocorrido em 1992, através do emprego da genética forense. Os autores puderam demonstrar a robustez da extração do DNA com resina Chelex, principalmente quando associada à correta armazenagem dos materiais coletados na cena do crime.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos:

- a) Verificar a viabilidade da polpa dentária, obtida de dentes de cadáveres em decomposição, em servir como fonte para obtenção de amostras de DNA;
- b) Buscar a determinação do gênero biológico por meio da amplificação do gene amelogenina das amostras de tecido pulpar;
- c) Analisar a eficácia do método inorgânico com resina Chelex 100® (Bio Rad) para extração de DNA;
- d) Confirmar a importância do conhecimento da biologia molecular para os profissionais cirurgiões-dentistas dedicados à Odontologia Legal.

4 Materiais e métodos

O presente trabalho tratou-se de estudo cego, comparativo, observacional, no qual buscou-se a identificação do gênero humano através da amplificação do gene amelogenina, após extração de material genético da polpa dental.

4.1 Obtenção da amostra

Após submissão e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Protocolo 187/2009 (Anexo 1), foram analisados 52 dentes, obtidos de 13 cadáveres, de ambos os sexos, que deram entrada no Departamento Médico Legal de Vitória (ES) no período de janeiro a março de 2010. Participaram da pesquisa somente corpos em avançado estado de decomposição, carbonizados ou ossadas que, após os exames dactiloscópicos e antropológicos, ainda estavam na condição de não-identificados.

O critério para inclusão dos dentes na amostra foi a preferência por dentes posteriores e isentos de cárie. Foram excluídos da pesquisa, aqueles dentes com grande destruição coronária ou restaurações extensas.

Os elementos extraídos foram acondicionados em recipientes estéreis, identificados quanto à sua procedência, classificados quanto ao tipo dental e mantidos em câmara fria a -4°C, até o momento da retirada da polpa dental.

4.2 Obtenção do material genético

Primeiramente, para remoção de remanescente ósseo e/ou de corpos estranhos aderidos à porção radicular, os dentes tiveram suas

superfícies externas curetadas e em seguida foram limpos com o auxílio de gaze estéril embebida em água deionizada.

A escolha da técnica para obtenção do material genético foi baseada naquela proposta por Silva (1998), porém com modificações quanto à forma de secção dental, pois após estudo piloto, constatou-se que a secção realizada circundando a estrutura dental, preservava maior quantidade de tecido pulpar. Assim, a secção dos elementos dentais ocorreu na junção amelo-cementária com o auxílio de motor de baixa rotação e mandril montado com discos de carborundum.

A remoção do tecido pulpar deu-se com o uso de curetas e instrumentais endodônticos. O tecido removido foi acondicionado em recipientes estéreis e identificado apenas com números, para em seguida serem enviados ao laboratório para análise molecular.

4.3 Análise do DNA e estimativa do gênero

As etapas de extração, amplificação e seqüenciamento do DNA provindo da polpa dental, foram realizadas pelo Instituto de Perícias Científicas – IPC, localizado no município de Campo Grande/MS.

4.3.1 Extração do material genético

Para a extração do material genético, o protocolo utilizado foi o padronizado por Walsh, Metzger & Higuchi (1991), com uso da resina quelante *Chelex 100®* (BioRad), diluída em água na proporção de 100ml de H₂O para 5g de resina.

Ao material extraído, adicionou-se a resina *Chelex 100®* a 5%, com volume final de 200 µL. Realizou-se a incubação por 56°C, por 30 minutos, seguida da vortexação por 10 segundos, nova incubação por 10 minutos a 95°C em bloco térmico e última vortexagem por 10 segundos. Previamente à

amplificação, centrifugou-se a amostra por 3 minutos a 15.000 rotações por minuto (rpm).

4.3.2 Amplificação do material genético

A amplificação se deu pela técnica da reação em cadeia pela polimerase, ou PCR, para o locus do gene amelogenina, utilizando-se Termociclador 9700® por um período de 3 horas, com ciclagem padrão e Kit Identifiler Plus® (ciclagem padrão).

A amplificação gerou produtos de 106 e 112 pares de bases (pb) para os cromossomos homólogos X e Y, respectivamente (Sullivan et al. *apud* Codina et al., 2009).

A enzima para polimerização usada foi a *AmpliTaq Gold®*.

4.3.3 Eletroforese

O sequenciamento foi realizado através de sequenciador automático (*Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer®*) o qual forneceu resultados que foram submetidos à leitura e interpretação e, posteriormente, foram classificados como feminino ou masculino - AMELX e AMELY respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo estatístico

No presente estudo, a avaliação da associação entre o sexo real dos indivíduos dos quais os dentes procederam e as variáveis “possibilidade de determinação do gênero biológico” e “concordância na determinação do gênero biológico” foi realizada por meio do teste exato de Fisher.

A avaliação da associação entre a possibilidade de determinação do gênero biológico e a classificação dental foi realizada por meio do teste do qui-quadrado.

A concordância entre a determinação do gênero biológico pela análise da amelogenina pulpar e o gênero real dos indivíduos dos quais os dentes procederam foi determinada por meio do coeficiente de *Kappa*.

Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos.

Os testes de associação foram realizados utilizando-se o *software* SigmaStat, versão 2.0, considerando um nível de significância de 5%. Já o coeficiente de Kappa foi determinado por meio de uma calculadora on-line

5.2 Amostragem

Fizeram parte deste estudo 52 dentes obtidos de corpos decompostos, os quais foram divididos quanto à classificação dental (tipo dental) e proporção (%) na amostra total.

A amostra foi composta por 51,9% (n=27) de molares, 26,9% (n=14) de pré-molares, 17,3% (n=9) de caninos e 3,8% (n=2) de incisivos.

Quanto ao gênero dos cadáveres que compuseram a amostra, 76,9% (n=40) eram indivíduos do sexo masculino, enquanto que os demais (23,1% - n=12) eram indivíduos do sexo feminino.

5.3 Análise da amelogenina X classificação dental

Dos 52 dentes avaliados, devido a não amplificação do gene, não foi possível determinar o gênero biológico em 15,4% (n=08) da amostra, enquanto em 84,6% (n=44) dos dentes, a determinação do gênero foi possível, conforme a leitura dos picos do gene amelogenina (Anexo 2).

A distribuição dos dentes analisados neste estudo, de acordo com a classificação dental, o sexo e a determinação do gênero biológico estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos dentes analisados de acordo com a classificação dental, o sexo e a determinação do gênero biológico.

Variável	% (n)
Classificação dental	
Molares	51,9 (27)
Pré-molares	26,9 (14)
Caninos	17,3 (9)
Incisivos	3,8 (2)
Sexo	
Masculino	76,9 (40)
Feminino	23,1 (12)
Determinação do gênero biológico	
Possível	84,6 (44)
Não possível	15,4 (8)

Entre os dentes do sexo masculino (n=40), foi possível a determinação do gênero em 90,0% (n=36) deles, enquanto para os demais (10,0%, n=4) esta determinação não foi possível. Já entre os dentes do sexo feminino (n=12), foi

possível a determinação do gênero em 66,7% (n=8) deles, enquanto para os demais (33,3% - n=4) esta determinação não foi possível.

O sexo não influenciou na viabilidade do material coletado para a determinação do gênero (teste exato de Fisher, $p=0,072$), ou seja, em ambos os sexos obteve-se êxito na amplificação da amelogenina. Estes resultados estão ilustrados na Figura 1.

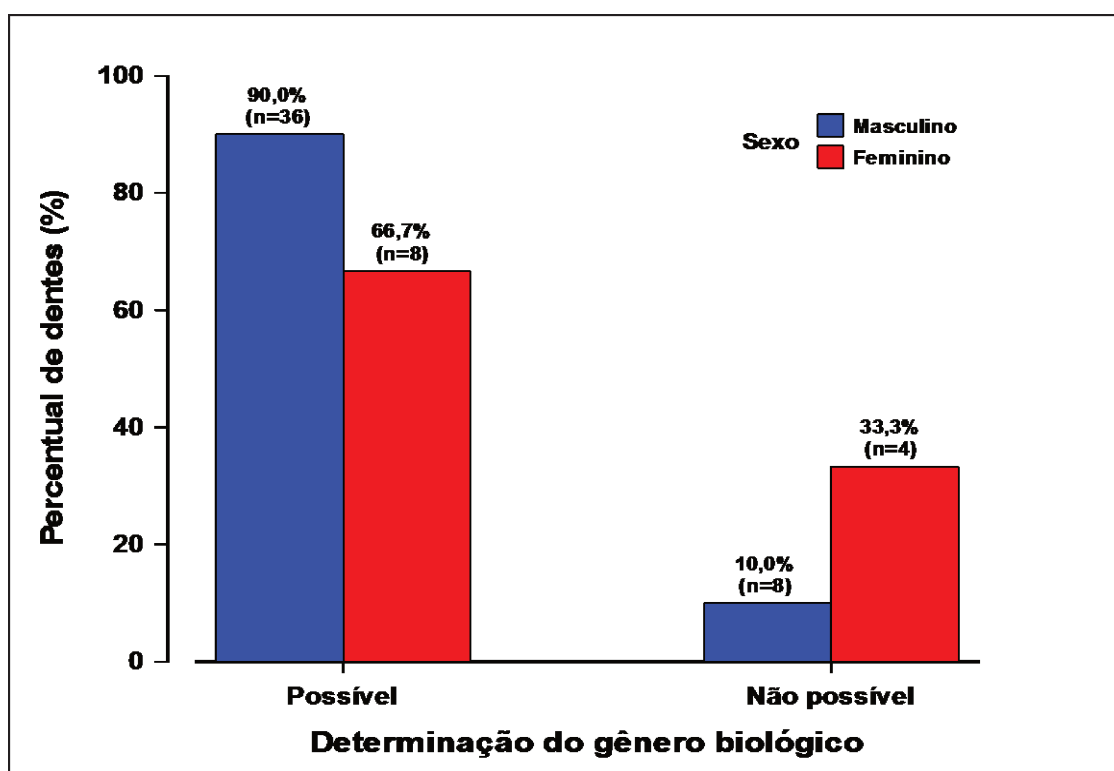


Figura 1 – Frequencia de dentes, de acordo com o sexo e a possibilidade de determinação do gênero biológico. Cada coluna representa o valor percentual.

Dos 44 dentes em que foi possível a determinação do gênero biológico, 81,8% (n=36) eram de indivíduos do sexo masculino e 18,2% (n=8) eram de indivíduos do sexo feminino.

Entre os dentes molares analisados (n=27), foi possível a determinação do gênero em 81,5% (n=22) deles, enquanto para os demais (18,5% - n=5) esta determinação não foi possível. Entre os dentes pré-molares analisados (n=14), foi

possível a determinação do gênero em 85,7% (n=12) deles, enquanto para os demais (18,5% - n=2) esta determinação não foi possível. Já entre os dentes caninos analisados (n=9), foi possível a determinação do gênero em 88,9% (n=7) deles, enquanto para os demais (11,1% - n=1) esta determinação não foi possível. Finalmente, entre os dentes incisivos analisados (n=2), foi possível a determinação do gênero em 100,0% (n=2) deles.

Não houve associação entre o grupo dental e a viabilidade do material coletado para a determinação do gênero (teste do qui-quadrado, $p=0,892$), logo, dentes multirradiculares, que forneceram maior quantidade de tecido pulpar, não revelaram melhores resultados que outros dentes fornecedores de pequena quantidade pulpar, *e.g.*, incisivos centrais inferiores.

Os resultados referentes à avaliação da associação entre a determinação do gênero biológico e as variáveis sexo e tipo dental estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Resultados referentes à avaliação da associação entre a determinação do gênero biológico e as variáveis sexo e tipo dental.

Alteração oral	Determinação do gênero biológico		Valor de p (teste exato de Fisher ou qui-quadrado)
	Possível	Não possível	
	% (n)	% (n)	
Sexo			
Masculino	90,0 (36)	10,0 (4)	0,072
Feminino	66,7 (8)	33,3 (4)	
Tipo dental			
Molares	81,5 (22)	18,5 (5)	0,892
Pré-molares	85,7 (12)	18,5 (2)	
Caninos	88,9 (7)	11,1 (1)	
Incisivos	100,0 (2)	0,0 (0)	

5.4 Estudo cego

Dentre os 44 dentes em que foi possível a determinação do gênero biológico, houve uma concordância de 95,5% (n=42) entre a determinação do gênero biológico pela análise da amelogenina pulpar e o gênero real dos indivíduos de onde os dentes eram procedentes. Neste caso, o coeficiente de Kappa foi de 0,909, considerado um grau de concordância com um nível de confiança muito alto.

Dos dentes viáveis procedentes de indivíduos do sexo masculino (n=36), a concordância foi de 94,4% (n=34), com uma discordância de 5,6% (n=2). Já entre os dentes viáveis procedentes de indivíduos do sexo feminino (n=8), a concordância foi de 100,0% (n=8).

Não houve influência entre o sexo dos indivíduos e a concordância entre a determinação do gênero biológico pela análise da amelogenina pulpar e o gênero real dos indivíduos dos quais os dentes eram procedentes (teste exato de Fisher, p=1,000). Estes resultados foram apresentados na Tabela 3 e ilustrados na Figura 2.

Tabela 3 - Resultados referentes à avaliação da associação entre a concordância na determinação do gênero biológico e o sexo real dos indivíduos de onde os dentes eram procedentes.

Alteração oral	Concordância		Valor de p (teste exato de Fisher)
	Sim	Não	
	% (n)	% (n)	
Sexo			
Masculino	94,4 (34)	5,6 (2)	1,000
Feminino	100,0 (8)	0,0 (0)	

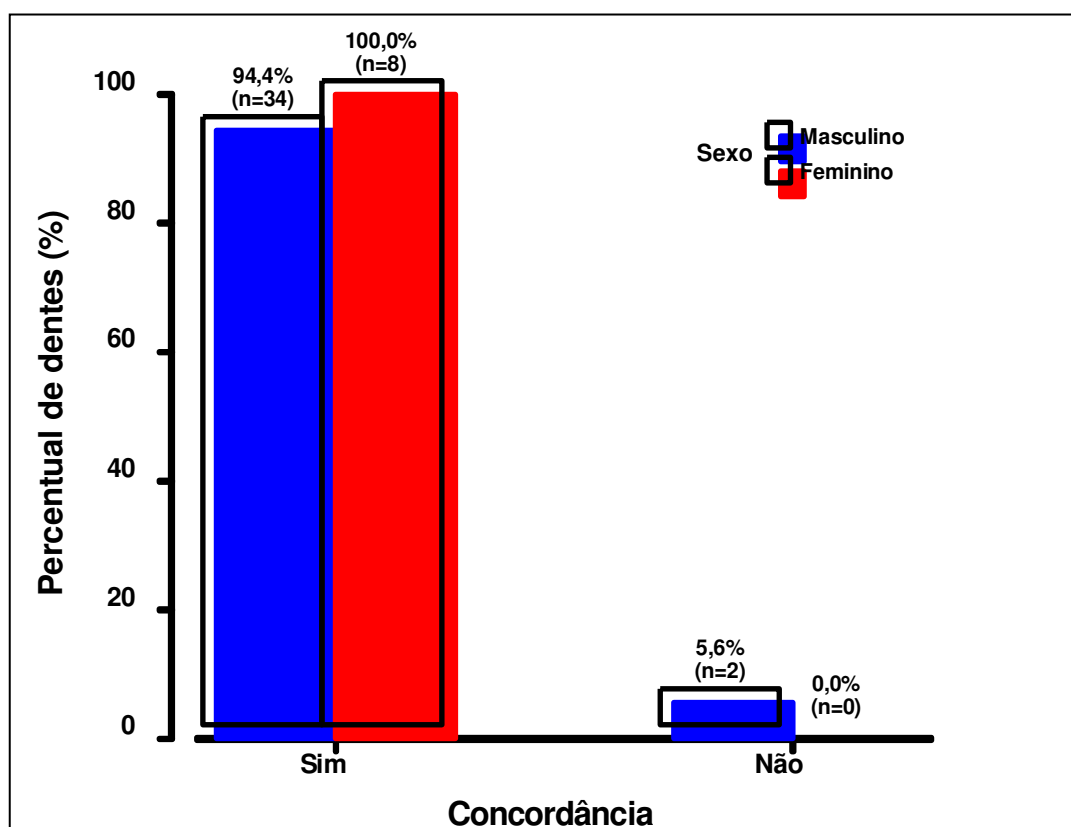


Figura 2 - Frequência de dentes, de acordo com o sexo e a concordância na determinação do gênero biológico. Cada coluna representa o valor percentual.

6 DISCUSSÃO

Marco histórico se deu com a descoberta, por Watson e Crick, em 1953, da estrutura de dupla hélice do ácido desoxirribonucléico, ou DNA, composta por nucleotídeos e com o pareamento das bases nitrogenadas denominadas citosina (C), guanina (G), adenina (A) e timina (T). A sequência de bases forma os genes, os quais estão localizados em um local específico do cromossomo, local este dito *locus* ou locos (Jobim et al., 2005; Vanrell & Borborema, 2007).

Com o passar dos anos e com o desenvolvimento das técnicas da biologia molecular, a identificação humana ganhou valiosa ferramenta, que por sua vez findou por revolucionar as ciências forenses com o emprego de novas tecnologias, mais rápidas, sensíveis e específicas (Presecki et al., 2000). Assim, a análise da molécula de DNA, passou a constituir atestado de veracidade às pesquisas clínicas e investigativas periciais (Roffey et al., 2000).

A Odontologia Legal, especialidade odontológica voltada à investigação de eventos que tenham atingido o homem, seja ele vivo, falecido, íntegro ou em suas partes (CFO, 2005), muito embora tenha como grande área de atuação a identificação humana pela análise dos elementos dentários (Yamamoto, 1996; Slavkin, 1997; Hemanth et al., 2008), concomitantemente, exibe o poder de atuar na busca e manipulação de evidências físicas, como o DNA (Silva RF et al., 2007; Silva RHA et al., 2007; Hedman et al., 2009; Vieira et al., 2010).

Não muito raro, esqueletos são encontrados nos mais diversos locais, sendo então trazidos junto aos Institutos Médico-Legais (IMLs) de todo o país para posterior identificação. Os métodos antropológicos clássicos e consagrados tornaram-se um recurso de baixíssimo custo, sendo o Cirurgião-dentista odontologista um dos profissionais mais bem preparados para realização de tal método.

No entanto, como descreveram Schmerer (2001), Ganswindt et al. (2003), Arruda et al. (2007), Caramelli et al. (2007), Vanek et al. (2009), Vieira et al. (2010) e Luptáková et al. (2011), a identificação antropológica tornou-se uma tarefa um tanto quanto árdua em casos cujos indivíduos a serem identificados encontravam-se nas seguintes situações: em sítios arqueológicos, com peças ósseas humanas mescladas às de animais; impressões digitais ou identificação pelos arcos dentais comprometidas; corpos ou ossadas fragmentados; e faixa etária aquém da puberdade, com características somatométricas e somatoscópicas indiferenciadas.

Consecutivamente, as técnicas da biologia molecular passaram a atuar como adjuvantes ou complementares das metodologias empregadas rotineiramente nos Institutos Médicos-legais do Brasil (Silva & Oliveira, 2008), com ressalva ao elevado custo da emergente tecnologia, limitada pela elevada demanda de procedimentos e burocracia presentes nos órgãos públicos do país.

Outro fator primordial que permitiu a evolução da genética forense foi o desenvolvimento da “reação em cadeia da polimerase”, conhecida como PCR. Esse rico método, através de sua sensibilidade e eficiência, permitiu a amplificação seletiva de partes específicas do DNA. Dividida em três fases, a PCR tem início com a separação da dupla fita do DNA (desnaturação), seguida do anelamento de *primers* ou iniciadores da amplificação, e finalização com a extensão da molécula de DNA. Todas as etapas sofrem influência da temperatura e conforme se aumentam os números de ciclos, maior é a quantidade de cópias idênticas de DNA geradas (Jobim et al., 2005; Zangenberg et al., 1999; Mesquita et al., 2001; Rocha 2009; Santos, 2009).

O presente trabalho buscou, primordialmente, a investigação do gênero biológico em cadáveres, por meio da obtenção do material genético do órgão dental, segundo reportaram Faerman et al. (1995), Yamamoto (1996), Slavkin (1997), Presecki et al. (2000), Ricaut et al. (2005), Hemanth et al. (2008), Musse et al. (2009) e Santos (2009).

Os elementos dentários, assim como os ossos, são os resquícios humanos frequentemente encontrados preservados. Em especial o órgão dental (Ricaud et al., 2005), que além de ser a estrutura mais resistente do corpo humano, tem a prerrogativa de manter-se a salvo de diferentes intempéries, como as causadas pelo fogo, conforme exemplo de caso relatado por Pretty & Sweet, em 2001, os quais identificaram vítima incinerada graças à presença de terceiro molar incluso, utilizado para a obtenção do material genético.

Por sua vez, optou-se pela utilização da polpa dentária para obtenção do DNA (Girish et al., 2010), com abertura coronária para acesso endodôntico através de corte horizontal, na região cervical, de maneira a preservar a anatomia oclusal e incisal dos elementos. Em tempo, Silva RF et al., 2007 recomendaram a tomada radiográfica prévia do elemento dental para futuros confrontos, caso fosse oportuno.

Em contraposto ao executado pelo presente trabalho estão as técnicas propostas por Sweet & Hildebrand (1998), que fizeram uso da criogenia seguida da pulverização da estrutura dental, e a metodologia proposta por Calabrez & Saldanha (1997), Musse et al.(2009) e Santos (2009), com criogenia e pulverização somente da porção radicular dos elementos dentais. Pareceu-nos adequada a utilização somente do tecido pulpar, pois foi possível manter em arquivo, tanto porção coronal, como porção radicular, ambas fontes viáveis para obtenção de DNA (conforme conclusão dos autores supracitados) em futuras pesquisas, ou caso o método proposto pelo atual projeto, não se apresentasse fatível.

Para a determinação do gênero biológico elegeu-se a amplificação do gene amelogenina, muito embora a literatura tenha outrora reportado metodologias mais simples, como o método citológico para visualização da cromatina sexual, ou corpúsculo de Barr, proposta por Arbenz, (1988) e Duz, (2000); Tal técnica exhibe limitações quanto ao seu emprego em corpos em estado de decomposição, pois como descreveu Daz, em 2004, a frequência de

encontro do corpúsculo sofre queda acentuada decorridas as primeiras seis horas da morte do indivíduo.

A amelogenina está presente no corpo humano em duas formas distintas, porém correlacionadas. A primeira apresenta-se como proteína da família amelogenina, também conhecida como proteína da matriz de esmalte (PME), exatamente por constituir 90% dessa matriz. É responsável pela formação do arcabouço do esmalte dental, sendo composta por cerca de 180 aminoácidos. Sua ausência ou deleção causa a patologia denominada amelogênese imperfeita (Arce, 1992; Lench et al., 1994; Stephanopoulos et al., 2005; Pugacch et al., 2010;).

A secreção da proteína amelogenina é controlada pelo gene amelogenina. Tal gene possui dois alelos homólogos presentes nos cromossomos sexuais X e Y, sendo denominados AMELX e AMELY, respectivamente. O gene AMELX mede 2.872 pb e localiza-se, mais precisamente, na porção Xp22.1-22.3 de seu cromossomo, enquanto o gene AMELY mede 3,272 pb e encontra-se na porção Yp11.2 (Haas-Rochholz & Weiler (1997); Velarde-Félix et al., 2008; Codina et al., 2009).

A determinação do gênero biológico através do gene amelogenina tornou-se possível a partir da descoberta da deleção de seis pares de bases no íntron I do gene AMELX, gerando produtos de 106 pb para indivíduos femininos e de 112 pb para indivíduos masculinos. Em suma, tal técnica permite visualizar indivíduos femininos em caráter homozitótico (XX), enquanto os indivíduos masculinos apresentam-se heterozigóticos (XY), com seus relativos pares de bases (Haas-Rochholz & Weiler (1997), Velarde-Félix et al., 2008).

Escolheu-se a aplicação da análise da amelogenina pulpar obtida de dentes oriundos de cadáveres em estado de decomposição, assim como concretizado por Malaver & Yunis, em 2003, e diferentemente daquilo realizado por Sweet & Hildebrand (1998), Presecki et al. (2000); Musse et al. (2009) e Santos (2009), dentre os quais avaliaram a obtenção de material genético de dentes recém-extraídos.

Neste sentido, foi-nos válido avaliar a capacidade de cadáveres fornecerem dentes capazes de provir material genético suficiente para os exames de DNA, de forma tal a posicionar e verificar a aplicabilidade da presente pesquisa, no contexto real das perícias forenses.

Compuseram a amostragem do atual estudo, 52 elementos dentais obtidos de cadáveres liberados para sepultamento, sem identificação positiva e, portanto, classificados como “não-identificados”. Após os exames necroscópicos padrão, tomou-se nota do registro geral dos indivíduos, bem como o gênero biológico aos quais pertenciam, compondo um estudo cego para a determinação do sexo.

A proporção do gênero biológico real da amostra dental foi de 76,9% (n=40) de indivíduos do sexo masculino e de 23,1% (n=12) de indivíduos do sexo feminino. Tal diferença na proporção entre gêneros deu-se pela amostragem ser composta por indivíduos sem identificação, com menor número de casos de mulheres inseridas nessa situação.

Para a obtenção dos dentes, tomou-se a preferência por dentes posteriores (Girish et al., 2010), todavia na ausência desses, seguia-se a preferência pelos elementos dentais no sentido pósterio-anterior, com obtenção final de 4 dentes por sujeito, sugestão oferecida por Faerman et al. (1995) e Ricaut et al. (2005), que mostraram a existência de discrepância de resultados obtidos de fontes diferentes de um mesmo indivíduo.

A amplificação da amelogenina pulpar mostrou-se viável em 84,6% (n=44) da amostra, resultados que estão de acordo ao encontrado por Velarde-Félix et al. (2008) e Santos (2009) os quais obtiveram amplificação de 100% de suas amostras. Proporções decrescentes foram encontradas por Tschentscher et al., 2008, com 50% e por Ganswindt et al., em 2003 e Ricaut et al., em 2005, com 43%.

O sexo dos indivíduos analisados não influenciou na possibilidade de extração do DNA da polpa dental ($p=0,072$), mesmo que a não obtenção de amplificação da amelogenina tenha ocorrido em 15,4% (n=08) da amostra.

Provavelmente, tal falha tenha ocorrido motivada pelos seguintes fatores: presença de inibidores da PCR, material genético altamente degradado, quantidade e qualidade insuficientes de material genético ou método de extração de DNA insuficiente (Kanto et al., 2005).

Conforme Richards & Sykes (1995), logo após a morte, o DNA sofre ação autolítica, sendo degradado principalmente por hidrólise e oxidação. A não amplificação do DNA - resultado da alta fragmentação do mesmo - foi reportada por Ricaut et al. (2005), ao relatarem os esforços para extraí-lo de ossos e dentes do período medieval, enquanto Yamamoto (1996) recomendou a utilização de dentes como fonte de material genético, desde que não tenham sido extraídos em período superior a 21 meses, levantando a hipótese de tais permanecerem preservados das agressões externas, por meio das estruturas circundantes e adjacentes.

Uma vez que o DNA nuclear é encontrado na cromatina das células eucarióticas, as histonas ao qual está associado e lhe servem de proteção, passam a sofrer os efeitos iniciais da degradação. Dentre os fatores que estão diretamente relacionados à degradação da molécula de DNA, foi possível citar como causas a desidratação tecidual, mudanças no pH, concentrações salínicas, variações na temperatura, composição do solo, presença de microrganismos, (Kelman & Moran, 1996; Arruda et al., 2007; Vanek et al., 2009).

A solução para a obtenção de material genético amplificável, foi sugerida por Haas-Rochholz & Weiler, em 1997, e por Tschentscher et al., em 2008, quando propuseram a amplificação de fragmentos menores de DNA.

Outra forma de obter-se material genético degradado, porém com qualidade, foi proposta por Buel et al.(1995) e Coombs et al.(1999), os quais fizeram uso da resina quelante Chelex para purificação prévia das amostras, ou o método proposto por Ricaut et al. (2005), que fez uso de Microcon® (Millipore, França). Ambas as técnicas tiveram o propósito de remover as impurezas e possíveis inibidores da PCR.

No atual estudo adotou-se como método de extração do DNA, a tecnologia proposta por Walsh et al., 1991, que fez uso da resina quelante Chelex 100® (Bio Rad), classificada como técnica inorgânica. Essa difere-se da técnica orgânica rotineiramente empregada (por exemplo, com fenol-clorofórmio), por dispensar o uso de solventes orgânicos tóxicos. Conforme Castella et al. (2006), a técnica orgânica é eficiente em remover inibidores da PCR, porém apresentam a desvantagem de diminuir a quantidade de material recuperado.

A resina Chelex, além de quelar íons, apresenta afinidade elevada por metais e cátions monovalentes (Bio Rad, 2000). Sua presença durante a fervura previne a degradação do DNA, além de apresentar a vantagem de poder ser removida, caso haja a necessidade do emprego de outros métodos subsequentes. Ponto-chave e determinante para sua escolha foi seu baixo custo, rapidez e robustez. (Walsh et al., 1991; Fridez & Coquoz, 1996; Barea et al., 2005; Suenaga & Nakamura, 2005; Caenazzo et al., 2009; Hansson et al., 2009)

O presente trabalho, ao analisar o material genético extraído da polpa dental de dentes oriundos de corpos não identificados através do método de extração com a resina *Chelex 100®*, obteve resultados que vão de encontro àqueles obtidos por Musse et al., 2009, quando relacionados o tipo dental (seja ele molar, pré-molar, canino ou incisivo) com a recuperação de DNA, pois todos os grupos dentais foram capazes de fornecer resultados viáveis ($p=0,892$), e em contraposto por Girish et al. (2010), o qual fez menção do uso somente dos molares.

Em relação à concordância entre o sexo encontrado e o sexo real do indivíduo, 5,6% ($n=02$) da amostra masculina mostrou discordância nos resultados, revelando-se na leitura como indivíduo homozigótico ou XX (feminino). Estes achados corroboram com os resultados de Roffey et al. (2000), Thangaraj et al. (2002), Ricaut et al. (2005) e Musse et al., 2009.

Tal falha, denominada por Thangaraj et al. (2002) como “deleção amelogenica masculina” ou DAM, teve como possível justificativa, atribuída por Velarde-Félix et al., em 2008, ser causada pela mutação da citosina (C) por guanina (G) no gene AMELY.

Para que o resultado do “falso-masculino” seja evitado, gerando interpretações errôneas, e quem sabe, possíveis condenações equivocadas, sugeriu-se a avaliação de outros *loci* para determinação do gênero, além da própria utilização da amelogenina, como por exemplo, os genes SRY e DYZ1, presentes no cromossomo Y (Roffey et al., 200; Iwamura et al., 2004; Caramelli et al, 2007), e DXZ4, localizado no cromossomo X (Luptáková et al., 2011).

Na presente pesquisa, não houve influência do gênero biológico real na obtenção gênero pela amplificação do gene amelogenina ($p=1,000$), com correta determinação do sexo em 100% ($n=08$) da amostra feminina amplificável. Muito embora a respectiva amostra tenha se mostrado modesta pela quantidade total de dentes avaliados, foi de grande valia os resultados apresentados pelo gênero masculino, com 94,4% ($n= 34$) dos indivíduos sendo estabelecidos como masculinos. Tal resultado apresentou expressiva relevância, uma vez que o grande empecilho para a utilização da presente metodologia apresenta-se somente no referido gênero.

Diante do exposto e em vista do conhecimento obtido na literatura pertinente, percebeu-se que a identificação do gênero biológico pela amelogenina do tecido pulpar é uma ferramenta capaz de gerar resultados confiáveis, confirmados pelo elevado grau de concordância ($Kappa = 0,909$) entre os sexos.

Tal metodologia mostrou-se relevante em diferentes situações, principalmente quando associada à Chelex como forma de extração de DNA. No entanto, necessita-se da reciclagem constante dos profissionais envolvidos nas ciências forenses, em especial o cirurgião-dentista, responsável pelo avanço das técnicas referentes ao uso do órgão dental.

7 CONCLUSÃO

Diante dos achados laboratoriais e embasados na literatura pertinente, foi possível concluir que:

- a) A polpa dentária obtida de dentes oriundos de indivíduos em decomposição mostrou-se viável como fonte de extração de DNA;
- b) Foi possível determinar o gênero biológico por meio do gene amelogenina em 95,5% da amostra;
- c) A extração do DNA com resina Chelex apresentou-se como alternativa rápida, barata e eficaz;
- d) Com os avanços nas disciplinas forenses, é mister a necessidade de atualização e aprimoramento dos especialistas em Odontologia Legal, para que possam acompanhar as técnicas da biologia molecular, em especial aquelas em que se torna necessária a identificação humana através do órgão dental.

REFERÊNCIAS*

1. Arbenz GO. Medicina legal e antropologia forense. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu; 1988.
2. Arce CLA. Proteínas de matriz de esmalte (amelogenina). Revisión bibliográfica. Revista Científica Odontológica. 1992; 1(1): 33-42.
3. Arruda DG, Hirata MH, Barreto OC, Pitfalls in DNA extraction from ancient bones found in brazilian shell-mounds. Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia. 2007; (17):461-467.
4. Baker LE. Review of: forensic biology: identification and DNA analysis of biological evidence. J Forensic Sci. 2010; 55(1) [acesso 2010 Ago 26]. Disponível em: <http://www.interscience.wiley.com>
5. Barea JÁ, Pardini MIMC, Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2004; 26 (4): 274-281.
6. Bio-Rad Instruction Manual: Chelex® 100 e Chelex® 20 chelatin ion exchange resin. Bio-Rad Laboratories; 2000.
7. Brasil. Lei 5.081 de 24 de agosto de 1966. Regula o exercício da Odontologia [acesso 31 Mai 2010]. Disponível em: <http://www.cfo.org.br>
8. Buel E, Wang G, Schwartz M. PCR amplification of animal DNA with human X-Y amelogenin primers used in gender determination. Journal of Forensic Sciences. 1995; 40 (4): 641-644.
9. Caenazzo L, Ponzano E, Cerri N. Case report of a homicide resolved 15 years later: the robustness of Chelex extraction. Forensic Sci. Int. Gene. Suppl. 2009 [acesso 2010 Set 03]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsiss.2009.08.013>
10. Calabrez MCT, Saldanha PH. A pesquisa em DNA em odontologia forense. In: Silva M. Compêndio de odontologia legal. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 1997.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas nas normas do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

11. Caramelli D, Lalueza-Fox C, Capelli C, Lari M, Sampietro ML, Gigli E, Milani L, Pilli E, Guimaraes S, Chiarelli B, Marin VTW, Casoli A, Stanyon R, Bertanpetit J, Barbujani G. Genetic analysis of skeletal remains attributed to Francesco Petrarca. *Forensic Science International*. 2007; (173): 36-40.
12. Carvalho SPM, Sales-Peres A, Ribeiro-Bicudo LA, Silva RHA. Quality evolution of DNA obtained from stored human saliva and its applicability to identification in forensic dentistry. *Rev odonto ciênc*. 2010; 25(1):48-53.
13. Cassiman JJ. DNA profiling in forensics. In: Willems G. *Forensic Odontology. Proceedings of the European IOFOS Millennium Meeting*. Bélgica; 2000.
14. Castella V, DImo-Simonin N, Brandt-Casadevall C, Mangin P. Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. *Forensic Science International*. 2006; (156): 70-73.
15. Clayton TM, Whitaker JP, Maguire CN. Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Science International*. 1995; (76):07-15.
16. Codina AE, Niederstatter H, Parson W. "GenderPlex" a PCR multiplex for reliable gender determination of degraded human DNA samples and complex gender constellations. *Int J Legal Med*. 2009; (123): 459-464.
17. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*. 1999; 27(16): i-iii.
18. Conselho Federal de Odontologia. Resolução CFO-63/2005, de 25 de maio de 2005. Consolidação das Normas para Procedimentos nos Conselhos de Odontologia [acesso 2011 Abr 20]. Disponível em: <http://www.cfo.org.br/downloads/pdf/consolidacao.pdf>
19. Das N, Gorea RK, Gargi J, Singh JR. Sex determination from pulpal tissue. *JIAFM*. 2004; 25 (2): 54-54.
20. Del Valle C, Rodriguez A, Espinoza M. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. *Rev. Biol. Trop*. 2004; 52(03): 717-725.

21. Dolinsky LC, Pereira LMCV. DNA forense. Artigo de revisão. Saúde e Ambiente em Revista. 2007; 2 (2): 11-22.
22. Duz S. Determinação do sexo através da cromatina sexual na polpa dentária e sua importância pericial [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2000.
23. Faerman M, Filon D, Kahila G, Greenblatt CL, Smith P, Oppenheim O. Sex identification of archeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. Gene. 1995; (167): 327-332.
24. Fridez F, Coquoz R. PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction. Forensic Science International. 1996; (78): 103-110.
25. Ganswindt M, Ehrlich E, Klostermann P, Troike WG, Schneider V. Bone finds: a challenge to forensic science. Legal Medicine 5. 2003: 382-385.
26. Girish KL, Rahman FS, Tippu SR. Dental DNA fingerprinting in identification of human remains. Journal of Forensic Dental Sciences. 2010; 2(2):63-68.
27. Haas-Rochholz H, Weiler G. Additional primer sets for an amelogenin gene PCR-based DNA-sex test. Inter J Legal Med. 1997; (110):312-315.
28. Hansen AJ, Simonsen BT, Borsting C, Hallenberg C, Morling N. Semi-automatic preparation of biological database samples for STR typing. International Congress Series. 2006; (1288: 663-665.
29. Hansson O, Finnebraaten M, Heitmann IK, Ramse M, Bouzga m. Trace DNA collection – performance of minitape and three different swabs. Forensic Sci. Int. Gene. Suppl. 2009 [acesso 2011 Fev 12]. Disponível em: <http://fsigeneticssup.com/article/S1875-1768%2809%2900070-5/abstract>
30. Hedman J, Nordgaard A, Rasmusson B, Ansell R, Radstrom P. Improved forensic DNA analysis through the use of alternative DNA polymerases and statistical modeling of DNA profiles. BioTechniques 2009; 47 (5): 351-358.
31. Hemanth M, Vidya M, Nandasprasad, Bhavana V. Sex determination using dental tissue. Medical-Legal Update. 2008; 8 (2) [acesso 2009 Jun 12]. Disponível em: <http://www.indmedica.com/journals>
32. Hoff-Olsen P, Mevag B, Staalstrom E, Hovde B, Egeland T, Olaisen B. Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. Forensic Science International. 1999; (105): 171-183.

33. Iwamura ESM, Soares-Vieira JA, Munoz DR. Human identification and analysis of DNA in bones. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo.* 2004; 59(6): 383-388.
34. Jobim LF, Costa LR, Silva M. Identificação Humana: identificação pelo DNA, identificação médico-legal e perícias odontológicas. Campinas. Editora Millenium; 2005.
35. Kanto EA, Hirata MH, Hirata RDC, Nunes FD, Melani RFH, Oliveira RN. DNA extraction from human saliva deposits on skin and its use in forensic identification procedures. *Braz Oral Res.* 2005; 19(3): 216-222.
36. Kelman Z, Moran L. Degradation of ancient DNA. *Curr. Biol.* 1996; 6 (3):223.
37. Lench NJ, Brook AH, Winter GB. SSCP detection of a nonsense mutation in exon 5 of the amelogenin gene (AMGX) causing X-linked amelogenesis imperfect (AIH1). *Human Molecular Genetics.* 1994; 3(5): 827-828.
38. Luptáková L, Bábrlová A, Omelka R, Kolena B, Vondrákova M, Bauerová. Sex determination of early medieval individuals through nested PCR using a new primer set in the SRY gene. *Forensic Science International.* 2011; (207): 1-5.
39. Malaver PC, Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croat Med J.* 2003; (44): 306-309.
40. Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesqui. Odontol. Bras.* 2001; 15(4): 314-319.
41. Murakami H, Yamamoto Y, Yoshitome K, Ono T, Okamoto O, Shigeta Y et al. Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples. *Acta Med Okayama.* 2000; 54 (1): 21-32.
42. Musse JO, Nardis AC, Anzai EK, Hirata MH, Cicarelli RMB, Oliveira RN. Freshwater and salt-water influence in human identification by analysis of DNA: an epidemiologic and laboratory study. *Braz J Oral Sci.* 2009; 8(2): 71-75.
43. Pugach MK, Li Y, Suggs C, Wright JT, Aragon MA, Yuan ZA, Simmons D, Kulkarni AB, Gibson CW. The amelogenin C-terminus is required for enamel development. *Journal of Dental Research.* 2010; 89 (2):165-169.

44. Presecki Z, Brkic H, Primorac D, Drmic I. Methods of preparing the tooth for DNA isolation. *Acta Stomatol. Croat.* 2000; 34(1):21-24.
45. Pretty IA, Sweet D. A look at forensic dentistry – part 1: the role of teeth in the determination of human identity. *British Dental Journal.* 2001; 190(7):359-366.
46. Ricaut FX, Keyser-Tracqui C, Crbézy E, Ludes B. STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *Forensic Science International.* 2005; (151): 31-35.
47. Richards MB, Sykes BC. Authenticating DNA extracted from Ancient Skeletal Remains. *Journal of Archeological Science.* 1995; (22): 291-299.
48. Rocha PB. O estudo do comportamento do material genético humano (DNA nuclear) em tecido ósseo sob a ação de diversas temperaturas [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.
49. Roffey PE, Eckhoff CI, Kuhl JL. A rare mutation in the amelogenin gene and its potential investigative ramifications. *Journal of Forensic Science.* 2000; 45 (5): 1016-1019.
50. Santos LSM. Viabilidade da utilização de amostras biológicas obtidas de dentes humanos para obtenção de perfis genéticos de DNA [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.
51. Schmerer WM. Optimized DNA extraction from ancient human bones improves the reproducibility of STR genotyping of highly degraded ancient DNA. *Technical Tips Online.* 2001; 6(1):41-45.
52. Silva M. *Compêndio de Odontologia Legal.* Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 1997.
53. 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(3): 156-161.
54. Silva RHA, Oliveira RN. Forensic anthropology and molecular biology: independent or complementary sciences in forensic dentistry? An overview. *Bras J Oral Sci.* 2008; 7(25):1575-1579.
55. Silva RF, Pereira SDR, Daruge Júnior E, Barcelos RSS, Godinho NMO, Souto R. Genetics and molecular biology: a literature review of forensic dentistry application. *Braz J Oral Sci.* 2007; 6 (20): 1254-1259.

56. Slavkin HC. Sex, enamel and forensic dentistry: a search for identity. JADA. 1997; (128): 1021-1025.
57. Smith P, Greenblatt C, Stager L, Oppenheim DF. DNA analysis reveals the sex determination of infanticide victims. Nature. 1997; 385 (6613): 212.
58. Stephanopoulos G, Garefalaki ME, Lyroudia K. Genes and related proteins involved in amelogenesis imperfecta. Journal of Dental Research. 2005; 84(12): 1117- 1126.
59. Suazo GI, Roa HI, Cantín LM. Sex chromatin in dental pulp. Performance of diagnosis test and gold standard generation. Int. J. Morphol. 2010; 28 (4):1093-1096.
60. Suenaga E, Nakanura H. Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. Journal of Chromatography B. 2005; (820): 137-141.
61. Sweet DJ, Sweet CH. DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene [abstract]. J Forensic Sci. 1995; 40 (2): 310-314.
62. Sweet D, Lorente M, Valenzuela A, Lorente JÁ, Alvarez JC. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. Forensic Science International. 1996; (83): 167-177.
63. Sweet D, Hildebrand D. Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding. J Forensic Sci. 1998; 43(6):1199-1202.
64. Sweet D, Hildebrand D, Phillips D. Identification of a skeleton using DNA from teeth and a PAP smear. J Forensic Sci. 1999; 44(3): 630-633.
65. Thangaraj K, Reddy AG, Singh L. Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? Int. J. Legal Med. 2002; (116):121-123.
66. Tschentscher F, Frey UH, Bajanowski. Amelogenin sex determination by sequencing of short PCR products. Int J Legal Med. 2008; (122): 333-335.
67. Vanek D, Šasková L, Koch H. Kinship and Y-Chromosome Analysis of 7th Century Human Remains: Novel DNA Extraction and Typing Procedure for Ancient Material. Croat Med J. 2009; 50(3): 286–295.
68. Vanrell, JP, Borborema ML. Vademecum de Medicina Legal e Odontologia Legal. São Paulo. J.H. Mizuno; 2007.

69. Veeraraghavan G, Lingappa A, Shankara SP, Mamatha GP, Sebastian BT, Mujib A. Determination of sex from tooth pulp tissue. *Lybian J Med*. 2010; (5) [acesso 2010 Dez 03]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071175/pdf/LJM-5-5084.pdf>
70. Velarde-Félix JS, Molina-Benítez CE, Solórzano-Rosales SR, Cázares-Salazar SG, Rendón-Aguilar H, Murillo-Llanes J, Ríos-Tostado JJ. Identificación Del sexo mediante análisis molecular. *Rev Mex Patol Clin*. 2008; 55 (1): 17-20
71. Vieira GS, Tavares CAP, Bouchardet FCH. Análise de DNA em Odontologia Forense. *Arqu bras odontol*. 2010; 6(2): 64-70.
72. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex® 100 as a médium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. 1991; 10(4): 506-513.
73. Yamamoto K. Molecular biological studies on teeth, and inquests. *Forensic Science International*. 1996; (80): 79-87.
74. Zangenberg G, Saiki RK, Reynolds R. Multiplex PCR: optimization guidelines. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. *PCR applications: protocols for functional genomics*. Academic Press. USA; 1999.

ANEXO

Anexo 1

Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP/UNICAMP

	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO	
O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise da amelogenina pulpar para determinação do gênero biológico", protocolo nº 187/2009, dos pesquisadores Juliana Mendonça Ferreira dos Santos e Eduardo Daruge Júnior, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/02/2010. The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Analysis of pulp amelogenin for determining the biological gender", register number 187/2009, of Juliana Mendonça Ferreira dos Santos and Eduardo Daruge Júnior, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 02/10/2010.	
	
Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP	Prof. Dr. Jacks Jorge Junior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.	

APÊNDICE

Amplificação da amelogenina – leitura dos picos

