



UNIVERSIDADE
FERNANDO
PESSOA

UTILIZAÇÃO DO ADN OBTIDO DE TECIDOS DENTÁRIOS NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA FORENSE: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

Utilization of DNA obtained from dental tissues in forensic human identification: an integrative review

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Salma Abbadi

Orientadores:

Doutora Márcia Carvalho

Doutora Inês Lopes Cardoso

Junho 2024

UTILIZAÇÃO DO ADN OBTIDO DE TECIDOS DENTÁRIOS NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA FORENSE: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

Utilization of DNA obtained from dental tissues in forensic human identification: an integrative review

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Salma Abbadi

Orientadores:

Doutora Márcia Carvalho

Doutora Inês Lopes Cardoso

Junho 2024

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Márcia Carvalho, orientadora principal, e à Professora Doutora Inês Lopes Cardoso, coorientadora, por me terem acompanhado durante a escrita deste projeto, pela sua gentileza, disponibilidade e acompanhamento durante este último ano. Obrigada por compartilharem o vosso conhecimento comigo, por sempre me terem dado a ajuda que eu precisava ao longo deste trabalho e por me terem permitido escrever sobre um assunto tão rico e apaixonante.

Tout d'abord, je remercie mon Seigneur de m'avoir permis de vivre cette belle aventure qu'ont été mes études. Merci pour Sa bénédiction, pour Sa bonté et pour le destin qu'Il m'a permis d'avoir. Merci de m'avoir entourée d'anges gardiens, d'avoir préservé les bonnes personnes autour de moi, famille et amis, qui ont toujours été présents, mais aussi d'avoir mis sur ma route des personnes merveilleuses qui m'ont permis de supporter la distance et la difficulté.

Merci à moi-même, de n'avoir jamais baissé les bras ni abandonné face à la difficulté et la contrainte, de m'être battue jusqu'au bout et d'avoir eu confiance en Dieu dans toutes les épreuves de la vie.

Merci à mon père, mon héros depuis toujours, mon premier exemple de détermination, débrouillardise et persévérance. À toi qui m'as toujours dit que rien n'arrive par hasard, que tout est écrit. Merci de m'avoir toujours poussée dans mes retranchements, toi qui as toujours cru en moi là où je n'avais aucun espoir. Partir de rien pour devenir la meilleure version de soi-même. Aussi gentil et doux que talentueux et intelligent. C'est pour te faire honneur qu'abandonner n'a jamais fait partie de mes options. Merci par la même occasion à Bassido, car après tout, c'est de lui que tu tiens tout cela.

Merci à ma mère, reine de mon cœur, qui depuis petite voit en sa fille le docteur qu'elle deviendra un jour. Je réalise pour toi ce rêve. Toi qui as eu une foi inconditionnelle en moi depuis toujours. Merci pour tout cet amour, cette douceur, ce soutien et cette lueur dans tes yeux qui, lorsque je la vois briller, me donnera toujours la force de gravir des montagnes.

Merci à mon mari, Selim, présent depuis le début. Tu as été mon épaule lorsque j'avais besoin de pleurer, ma béquille lorsque j'avais besoin de soutien, mon moteur lorsque l'énergie n'y était plus, mon bras droit et mon meilleur ami. Merci d'avoir été là du début à la fin, de m'avoir attendu toutes ces années, de m'avoir toujours encouragé mais aussi d'avoir adouci ces départs difficiles et toutes ces fois où je ratais des moments de vie. Merci d'avoir été ma force et mon

pilier.

À mon grand frère, Abou, qui est parti au front avant moi et qui m'a montré que lorsqu'on veut, ON PEUT ! À ma belle-sœur Sihame, pour sa gentillesse et sa bonté, et pour m'avoir donné des neveux exceptionnels et adorables ; mon petit Ibrahimou et ma Hibati.

À mes grandes sœurs Hajar et Omayma. Femmes capables prêtes à tout pour leur petite sœur. Merci car grâce à vous je n'ai jamais eu peur dans ce monde.

À Omar, mon petit frère, merci pour ton humour et ta présence depuis toujours, mon presque jumeau, toujours à mes côtés.

À Aya, ma BFF, merci pour tous ces fous rires et ces beaux moments passés ensemble sans prise de tête et sur la même longueur d'onde.

À Naila, ma princesse, mon petit trésor, arrivée au monde au début de ces études. Tu as été mon petit soleil toutes les fois où je suis revenue en France.

À Adami, ma petite boule d'amour.

À Ikram, merci de m'avoir accompagnée et épaulée.

Merci à ma belle-famille, et principalement à Saïda et Gamal, mes beaux-parents, pour avoir suivi cette belle aventure et pour m'avoir soutenue avec le cœur à chaque occasion.

Merci à ma seconde famille, mes amies de toujours, Eva et Tleïtmess, qui m'ont toujours laissé entendre que si quelqu'un pouvait bien le faire, c'était bien moi ! Merci d'avoir toujours été là et d'avoir fait en sorte que rien ne change lorsque je revenais.

À Elia, ma petite princesse.

À Elise, qui a partagé ce rêve avec moi.

Merci au plus beau cadeau que ces études m'ont fait, la team Only Good Vibes. Merci à vous, Mimi 1, Mimi 2, Mimi 3, Rebecca, Clem, Fifi, mais aussi à Ilianne, Momo et Elisa. La rencontre d'une vie. On dit qu'il y a la famille, les amis et les amis qui deviennent la famille. À vous, mes sœurs, sans qui toute cette aventure n'aurait pas eu le même goût. Vous avez été ici mon soutien, ma base. Merci pour tous ces moments de famille, pour toutes ces péripéties qui n'arrivent qu'à Porto, pour tous ces rires et pour toutes ces larmes, pour tous ces moments de réconfort et de soutien. Je ne retiens que le bon car je vous avais à mes côtés, chacune jouant son rôle dans ce groupe.

À toute la salle 0.1, nous avons souffert mais nous sommes venus, nous avons vu et nous avons

vaincu.

Enfin, merci à ma binôme Myriam, aka Mimi3. Merci Mimi d'avoir non seulement été ma binôme de clinique mais aussi ma binôme de vie. Merci pour ton soutien, ta présence mais surtout pour ta personne. Je n'aurais jamais mieux fait sans t'avoir à mes côtés. À nos moments de folie, de stress, de peine, de joie et de fierté. À toutes nos premières fois, nos réussites, nos secondes chances et notre détermination. À notre amitié et à nos belles années. Le binôme 20 est gravé à jamais dans mon cœur.

Merci à M. Filipe et M. Antonio, pour leur gentillesse et leur sympathie durant ces cinq dernières années.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités et qui ont toujours été derrière moi pour me soutenir.

À toutes ces personnes chères à mon cœur, je vous dédie mon diplôme car sans vous je n'aurais rien accompli. Ma réussite est la vôtre.

RESUMO

Os dentes humanos são estruturas biológicas que resistem a condições extremas, tornando-se assim uma fonte de ADN útil para fins de identificação humana forense. A identificação humana através do ADN obtido de tecidos dentários assume particular relevância nas situações forenses envolvendo corpos carbonizados, putrefactos, esqueletizados ou quando os métodos de identificação dentária convencionais não podem ser realizados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade da análise genética do dente no processo de identificação humana na Medicina Dentária Forense. Para isso, foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados da PubMed de artigos publicados nos últimos 5 anos (2019-2023), com as palavras-chave *DNA*, *tooth*, *human* e *identification*. Na primeira parte do trabalho são apresentadas as várias etapas para a obtenção de um perfil genético a partir de tecidos dentários, nomeadamente a extração de ADN, sua quantificação e amplificação, seguida da análise de regiões específicas do genoma. Na segunda parte são apresentados e discutidos os casos de estudo incluídos nesta revisão integrativa, que tiveram por objetivo a identificação de restos mortais recuperados do meio ambiente ou de valas clandestinas, ou a confirmação da identidade por comparação com o perfil genético de tecidos dentários. Os estudos mostraram que o tecido pulpar destaca-se como a fonte de ADN dentário mais utilizada em contexto forense. No entanto, embora a quantidade de ADN obtida do cálculo e do cemento dentário seja inferior à da polpa, a sua resistência à degradação ambiental torna-os fontes viáveis para análise forense, especialmente em ambientes onde o ADN da polpa possa estar degradado. Verificou-se ainda que a qualidade e quantidade de ADN obtido de dentes é severamente afetada pelas condições ambientais extremas, por exemplo, temperaturas acima dos 200°C. A maioria dos estudos analisou marcadores STR autossómicos, Y-STRs e ocasionalmente ADNmt, refletindo uma abordagem abrangente para identificação genética. Em conclusão, os estudos recentes analisados mostraram que é possível a obtenção de perfis genéticos completos ou parciais para os marcadores utilizados a partir da análise de ADN isolado do dente. Na maioria desses estudos foi possível estabelecer a identidade ou recolher dados sobre origem étnica das vítimas, confirmando assim que a análise genética de tecidos dentários é uma ferramenta poderosa na identificação humana em situações extremas.

Palavras-chave: ADN; dente; medicina dentária forense; DNA fingerprinting; identificação humana

ABSTRACT

Human teeth are biological structures that can withstand extreme conditions, making them a useful source of DNA for forensic human identification. Human identification using DNA obtained from dental tissue is particularly important in forensic situations involving charred, putrefied or skeletonized bodies or when conventional dental identification methods cannot be used. The aim of this study was to assess the applicability of genetic analysis of teeth in the process of human identification in Forensic Dentistry. To this end, a bibliographic search was carried out in the PubMed database of articles published in the last 5 years (2019-2023), using the keywords DNA, tooth, human and identification. The first part of this work presents the various steps involved in obtaining a genetic profile from dental tissues, namely DNA extraction, quantification and amplification, followed by the analysis of specific regions of the genome. The second part presents and discusses the case studies included in this integrative review, which aimed to identify remains recovered from the environment or from clandestine graves, or to confirm identity by comparing them with the genetic profile of dental tissues. The studies showed that pulp tissue stands out as the most widely used source of dental DNA in forensic contexts. However, although the amount of DNA obtained from calculus and dental cementum is lower than that of pulp, their resistance to environmental degradation makes them viable sources for forensic analysis, especially in environments where pulp DNA may be degraded. It has also been found that the quality and quantity of DNA obtained from teeth is severely affected by extreme environmental conditions, for example temperatures above 200°C. Most of the studies analyzed autosomal STR markers, Y-STRs and occasionally mtDNA, reflecting a comprehensive approach to genetic identification. In conclusion, the recent studies analyzed have shown that it is possible to obtain complete or partial genetic profiles for the markers used from the analysis of DNA isolated from the tooth. In most of these studies it was possible to determine the identity or collect data on the ethnic origin of the victims, thus confirming that genetic analysis of dental tissue is a powerful tool in human identification in extreme situations.

Keywords: DNA; tooth; forensic dentistry; DNA fingerprinting; human identification

ÍNDICE GERAL

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
I. INTRODUÇÃO	1
II. IDENTIFICAÇÃO HUMANA ATRAVÉS DO ADN OBTIDO DE TECIDOS DENTÁRIOS	5
2.1. Importância do exame dentário no processo de identificação humana	5
2.2. Fontes de ADN no dente	6
2.3. Recolha, amostragem e preparação das amostras.....	7
2.3.1. Processamento da amostra	7
2.3.2. Isolamento e quantificação do ADN.....	8
2.3.3. Fatores que influenciam a qualidade do ADN obtido dos dentes	9
2.3.3.1 Condições ambientais.....	9
2.3.3.2. Presença de microorganismos	10
2.4. Métodos e técnicas usadas na amplificação do ADN e análise de marcadores genéticos	11
2.4.1. Análise de Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) .	13
2.4.2. Análise de Sequências curtas Repetitivas em Tandem (STR).....	14
2.4.3. Análise do ADN mitocondrial (ADNmt).....	15
2.4.4. Análise do cromossoma Y.....	16
2.4.5. Análise de Polimorfismo de um único Nucleótido (SNP).....	17
2.4.6. Determinação de sexo	18
2.5. Análise dos resultados	19
2.6. Estudo de casos.....	20
III. DISCUSSÃO.....	35
IV. CONCLUSÃO	39
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma baseado no modelo PRISMA para a seleção dos artigos incluídos no estudo.	4
--	---

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de inclusão e de exclusão para a seleção de artigos.	3
Tabela 2. Mecanismos desencadeados por microorganismos que são prejudiciais para o ADN dentário (adaptado de Yu & Abbott, 2007).....	11
Tabela 3. Estudos incluídos (total de 20 publicações) na presente revisão em que a identificação humana foi realizada através da análise do ADN de amostras de dentes (Fonte: elaborado pelo autor).	24

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementar
ADNmt	ADN mitocondrial
Bp	Pares de bases (do inglês <i>base pairs</i>)
CBCT	Tomografia computadorizada de feixe cônico (do inglês <i>Cone Beam Computer Tomography</i>)
CODIS	Sistema de índice de DNA combinado (do inglês <i>Combined DNA Index System</i>)
Ct	Limiar de ciclo (do inglês <i>Cycle Threshold</i>)
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (do inglês <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>)
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por loop (do inglês <i>Loop-mediated isothermal Amplification</i>)
NASBA	Amplificação baseada em sequência de ácidos nucleicos (do inglês <i>Nucleic Acid Sequence-Based Amplification</i>)
NGS	Sequenciação de nova geração (do inglês <i>Next Generation Sequencing</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
qPCR	PCR quantitativo ou PCR em tempo real (do inglês <i>quantitative PCR</i>)
RCA	Amplificação por círculo rolante (do inglês <i>Rolling-Circle Amplification</i>)
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RT-PCR	PCR por Transcrição Reversa (do inglês <i>Reverse Transcriptase PCR</i>)
SNP	Polimorfismo de um único nucleótido (do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SRY	Região/gene determinante do sexo presente no cromossoma Y (<i>Sex-determining Region Y</i>)
STR	Sequências curtas repetidas em tandem (do inglês <i>Short Tandem Repeat</i>)
UV	Ultravioleta

- WGA** Amplificação de genoma completo (do inglês *Whole Genome Amplification*)
- YHRD** Base de dados de referência de haplótipos do cromossoma Y (do inglês *Y-Chromosome Haplotype Reference Database*)
- Y-STR** STR do cromossoma Y

I. INTRODUÇÃO

A Medicina Dentária Forense envolve o processamento, revisão, avaliação e apresentação de evidências odontológicas com o propósito de contribuir com dados científicos e objetivos nos processos legais (Mohammed et al., 2023). Os dentistas forenses necessitam de conhecimentos que abrangem diversas disciplinas, uma vez que os registos dentários podem identificar um indivíduo ou fornecer as informações necessárias às autoridades para estabelecer negligência, fraude ou abuso.

Esta ciência desempenha um papel crucial na identificação de restos humanos de vítimas, não apenas daqueles mutilados, queimados e decompostos, mas também de vítimas de bioterrorismo e desastres em massa. Diversos eventos catastróficos destacaram a importância dos peritos em Medicina Dentária Forense na identificação de vítimas de acidentes industriais, acidentes aéreos, desastres naturais e ataques terroristas, incluindo os de natureza explosiva, química, radiológica ou nuclear (Mohammed et al., 2023).

É de extrema importância destacar que a Medicina Dentária Forense desempenha um papel essencial em circunstâncias onde os métodos habituais de identificação, como as impressões digitais e o reconhecimento visual, não podem ser realizados, incluindo casos de corpos decompostos, carbonizados ou esqueletizados (Mohammed et al., 2023).

A identificação odontológica pode ter três aplicações diferentes: (a) identificação comparativa, na qual os registos dentários post-mortem são comparados com os registos ante-mortem de um indivíduo para estabelecer se ambos correspondem à mesma pessoa; (b) obtenção de informações dentárias para estreitar a busca de um indivíduo quando os registos ante-mortem não estão disponíveis e não há dados suficientes da identidade do sujeito; (c) identificação de vítimas após desastres em massa ou catástrofes (Ata-Ali & Ata-Ali, 2014).

Tradicionalmente, são realizadas comparações entre registos dentários obtidos post-mortem e os ante-mortem (presença de obturações dentárias, tratamentos endodônticos, coroas ou pontes, estudos radiológicos para verificar os dados clínicos, presença de má oclusão ou fraturas dentárias, entre outros) com o intuito de determinar se ambos correspondem ao mesmo indivíduo. No entanto, estes métodos são agora menos utilizados, uma vez que estão disponíveis técnicas de biologia molecular que apresentam maior eficácia e precisão. Neste contexto, o esmalte e a dentina protegem a cavidade

pulpar do meio exterior, preservando assim uma valiosa fonte de ADN (Ata-Ali & Ata-Ali, 2014).

A eficácia da extração de ADN de amostras humanas depende do método de extração utilizado, assim como de numerosos fatores ambientais. Estudos mostraram que o ADN de tecidos duros, como o osso e os dentes, é o mais estável mesmo após a putrefação do cadáver (Girish et al., 2010).

A capacidade do ADN de revelar informações cruciais sobre a identidade de um indivíduo proporciona perspectivas valiosas para a justiça e a resolução de casos complexos. Este campo de estudo tem guiado o percurso académico de muitos profissionais, conduzindo-os à exploração aprofundada das técnicas genéticas na identificação humana, especialmente na Medicina Dentária Forense. A investigação nesta área visa desenvolver e aperfeiçoar métodos forenses, destacando a sua importância fundamental dos médicos dentistas na identificação precisa e fiável dos indivíduos (Mohammed et al., 2023).

Este trabalho tem como objetivo explorar a aplicabilidade da análise genética do dente no processo de identificação humana. Assim, nesta revisão serão descritas as etapas para a obtenção de um perfil genético, nomeadamente a extração do ADN, sua quantificação e amplificação, seguida da análise de determinadas regiões do genoma. Por último, serão apresentados casos de estudo em que foi possível estabelecer a identidade do indivíduo a partir do traçado do perfil genético de tecidos dentários da vítima.

1.1. Metodologia

O trabalho proposto visa a realização de uma revisão integrativa da literatura científica sobre a aplicabilidade da análise genética de tecidos dentários no processo de identificação humana.

Para a concretização deste trabalho, foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed de artigos científicos publicados nos últimos 5 anos (de 1 janeiro de 2019 a 31 de dezembro de 2023), com as seguintes palavras-chave: *DNA, tooth, humans e identification*, no resumo e/ou título. A chave de pesquisa utilizada foi: *(tooth[MeSH Terms]) AND (DNA[MeSH Terms]) AND (humans[MeSH Terms]) AND (Identification[Title/Abstract]) AND ((2019/1/1:2023/12/31[pdat]) AND (english[Filter] OR french[Filter] OR portuguese[Filter]))*. Os critérios de inclusão e exclusão para a seleção dos artigos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1

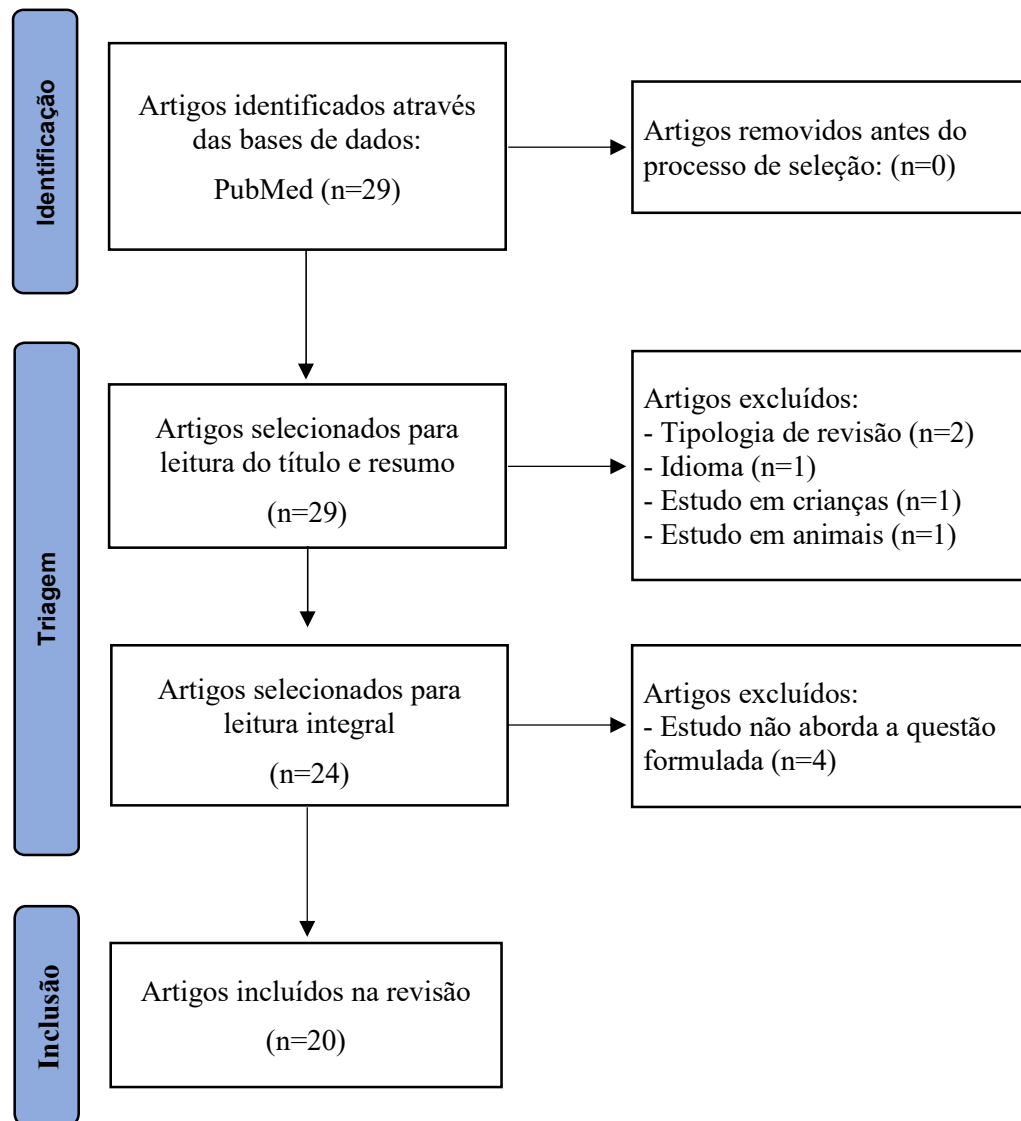
Critérios de inclusão e de exclusão para a seleção de artigos.

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
• Espaço temporal: 1 de janeiro de 2019 a 31 de dezembro de 2023 • Estudos em humanos • Estudos em adultos	• Estudos em animais • Estudos primários cujo idioma não seja português, inglês ou francês • Estudos em crianças • Tipologia de artigos de revisão, cartas editoriais, capítulos de livros e atas de conferências • Estudo não aborda a questão formulada.

Foram encontrados 29 artigos. Foi realizada a leitura dos títulos e resumos e, de acordo com os critérios de elegibilidade definidos para a pesquisa, foram excluídos 5 artigos, ficando para leitura integral 24 artigos. Foram excluídos mais 4 artigos, ficando 20 artigos que foram considerados pertinentes de acordo com os objetivos propostos para este trabalho. Este processo de seleção de artigos encontra-se representado no diagrama PRISMA apresentado na figura 1.

Figura 1.

Fluxograma baseado no modelo PRISMA para a seleção dos artigos incluídos no estudo.



II. IDENTIFICAÇÃO HUMANA ATRAVÉS DO ADN OBTIDO DE TECIDOS DENTÁRIOS

2.1. Importância do exame dentário no processo de identificação humana

A Medicina Dentária Forense desempenha um papel crucial na identificação individual de vítimas de desastres em massa (acidentes e terremotos) e em casos criminais (homicídios, violações e suicídios), mesmo diante da escassez de restos humanos ou amostras disponíveis (Jayakrishnan et al., 2021).

Diversos métodos de identificação utilizados na Medicina Dentária Forense incluem revisão de registos de casos dentários, avaliações antropológicas e análises de restaurações, próteses dentárias, radiografias, marcas de mordida e fotografias intraorais, assim como, a queiloscopia e a rugoscopia palatina (Lima & Medeiros, 2015).

O exame post-mortem dentário é semelhante a um exame dentário básico, mas deve ser muito completo, pois pode ser a única oportunidade de recolher informações. Este exame inclui fotografias dentárias, um exame bucal completo com um odontograma e uma série de radiografias. O acesso adequado aos dentes pode necessitar de incisões nos tecidos moles ou da ressecção das mandíbulas, o que deve ser realizado em conjunto com o patologista. A dignidade do falecido deve ser sempre respeitada. A ressecção completa das mandíbulas deve ser evitada, salvo necessidade absoluta, exigindo então autorizações legais. As fotografias devem ser tiradas antes de qualquer incisão, e os dentes devem ser minuciosamente limpos antes do exame. Impressões dentárias em silicone devem ser realizadas antes de qualquer extração de dente para análise de ADN, em conformidade com a legislação vigente. Uma série radiográfica completa é essencial para registar todos os detalhes dentários (Carabott, 2014).

A identificação dentária comparativa depende da disponibilidade e da qualidade dos registos dentários da possível vítima. Se a identidade da pessoa falecida for desconhecida, a identificação dentária comparativa é impossível. No entanto, o dentista forense pode ser convidado a realizar um exame post-mortem completo para fins de arquivamento. Este exame será mantido até que sejam descobertas identidades potenciais e que os documentos ante-mortem relevantes estejam disponíveis. Muitas vezes, uma identificação provisória pode ser obtida a partir dos objetos encontrados com o corpo ou nas proximidades, assim como a partir de provas indiretas (Carabott, 2014).

Assim, os exames dentários realizados frequentemente em vida são importantes para a criação e manutenção de uma base de dados de modo a facilitar o reconhecimento e a identificação humana sempre que necessário.

Surgem frequentemente situações em que o dente é o único elemento disponível para o processo de identificação humana. São exemplo disso as situações em que os corpos estão em avançado estado de decomposição ou carbonizados, ou quando a identificação não é possível por meio dos métodos odontológicos tradicionais. Nestas situações, os dentes destacam-se como sendo os únicos elementos viáveis para a identificação. Isto resulta da sua maior resistência comparativamente a outros tecidos humanos, quando sujeitos à degradação post-mortem, variações de pressão e de temperatura, permitindo melhor preservação do material genético. Assim, os dentes são considerados fontes seguras para a obtenção de material genético (Lima & Medeiros, 2015).

Devido ao ambiente protetor presente dentro da cavidade oral, a polpa dentária é considerada a fonte mais fiável para procedimentos de identificação baseados em ADN (Prajapati et al., 2018). De facto, o ADN contido num dente encontra-se protegido de várias maneiras. Em primeiro lugar, a estrutura dentária é robusta pois os dentes, para além da polpa dentária, possuem tecidos duros como o esmalte e a dentina. Essa estrutura resistente permite proteger o ADN de danos externos como a degradação química ou a abrasão. Uma vantagem adicional é a polpa dentária se encontrar isolada (Malaver et al., 2003).

2.2. Fontes de ADN no dente

Os dentes podem ser considerados uma fonte promissora de ADN para fins forenses, uma vez que o risco de ADN de baixo rendimento é menor devido à presença de uma grande quantidade de células na polpa (existem cerca de 11.000 odontoblastos e 1.000 fibroblastos por mm²). Para além disso, os tecidos duros dentários (esmalte e dentina) protegem os ácidos nucleicos de fatores prejudiciais, como calor, microorganismos, luz UV e humidade (Bianchi et al., 2022).

Ao contrário de outros tecidos recolhidos de cadáveres e esqueletos antigos, como o cabelo, ossos e tecidos mumificados, que estando expostos ao ambiente se degradam facilmente, a polpa dentária está localizada no interior de uma cavidade fechada, isolada e bem protegida do exterior pelo esmalte e dentina. Assim, a polpa e a dentina podem ser

utilizadas como fonte de ADN. O esmalte e a dentina são tecidos mineralizados muito duros, altamente resilientes, caracterizados por uma estrutura robusta que confere resistência significativa aos fatores de degradação ambiental. Estes componentes são reconhecidos como as partes anatómicas mais duráveis após a degradação do corpo humano, devido à sua composição mineral e à organização estrutural única, proporcionando assim uma preservação prolongada mesmo em condições adversas (Higgin & Austin, 2013).

2.3. Recolha, amostragem e preparação das amostras

2.3.1. Processamento da amostra

O revestimento duro de esmalte de um dente, ao proteger o ADN, também torna o isolamento desta molécula mais complexo, por ser necessária a remoção desse material. Os métodos atualmente utilizados para ter acesso aos tecidos dentários e permitir isolar ADN são: (1) pulverização do dente inteiro; (2) corte vertical do dente para acesso à polpa; (3) seccionamento horizontal através da junção cimento-esmalte para acesso à polpa e dentina; (4) acesso à câmara da polpa (da ponta da raiz à câmara da polpa); (5) acesso convencional à câmara da polpa, usando limas dentárias para recuperar a polpa e os odontoblastos; e (6) raspagem do cimento usando uma lâmina (Wei et al., 2023).

Os dentes são geralmente limpos e armazenados em soro fisiológico, podendo ou não ser refrigerados, dependendo das condições ambientais e das instalações disponíveis. As fontes de ADN nos dentes são a polpa, a dentina, o cimento, as fibras periodontais e fragmentos ósseos anexos. O tecido pulpar é o mais frequentemente utilizado porque é geralmente abundante e tem menor risco de contaminação por ADN não humano (Muruganandhan & Sivakumar, 2011).

No contexto da análise de ADN a partir de amostras dentárias, várias etapas são cruciais para garantir a fiabilidade dos resultados. Em primeiro lugar, a colheita das amostras é realizada a partir de dentes inteiros, fragmentos ou tecidos bucais, de acordo com a sua disponibilidade e estado. Essa colheita é meticulosamente conduzida por médicos dentistas ou médicos legistas, que utilizam instrumentos especializados para evitar qualquer contaminação. Cada amostra é então identificada e etiquetada logo após a recolha, assegurando assim a sua correta associação com a pessoa ou caso em questão, o que é essencial para evitar erros posteriores (Khan et al., 2020).

A pulverização completa da peça dentária tem permanecido como o método *gold-standard* para a extração de ADN de amostras de dentes (Khan et al., 2020).

As amostras são então tratadas para libertar o ADN das células presentes nos tecidos dentários ou bucais. Esta etapa pode envolver a trituração das amostras para romper as células e libertar o seu conteúdo, ou o uso de reagentes específicos capazes de degradar as membranas celulares e libertar o ADN. Logo que as células são lizadas, o ADN é extraído da solução resultante utilizando métodos de purificação, como extração com fenol-clorofórmio, colunas de purificação de ADN ou kits comerciais. O objetivo é remover proteínas, lípidos e outros contaminantes da solução de ADN não purificada (Hervella et al., 2015; Cafiero et al., 2019).

Após a purificação, a solução de ADN obtida é quantificada de modo a determinar se é suficiente para análises posteriores. Esta quantificação pode ser realizada por espectrofotometria na zona do UV ou por reação em cadeia pela polimerase quantitativo (qPCR). Em cada etapa do isolamento são realizados controlos de qualidade de modo a garantir a fiabilidade das amostras, incluindo controlos de contaminação cruzada, testes de eficácia da extração de ADN e controlos de pureza do ADN extraído. Seguindo essas etapas com precisão e utilizando protocolos padronizados, laboratórios de genética médico-legal podem obter amostras de ADN de alta qualidade a partir de materiais dentários, o que é essencial para análises precisas e fiáveis em investigações criminais e judiciais (Cafiero et al., 2019).

2.3.2. Isolamento e quantificação do ADN

O processamento do ADN envolve as etapas de isolamento e purificação, em que o material genético é separado de restos celulares e de outras macromoléculas. No contexto forense, o isolamento do ADN é fundamental para extrair o material genético das amostras biológicas recolhidas em locais de crime ou noutros contextos de investigação criminal. As amostras podem incluir sangue, saliva, cabelo, tecido humano, entre outros tipos de evidências biológicas. O isolamento cuidadoso do ADN dessas amostras é essencial para garantir a integridade do material genético e evitar contaminações que possam comprometer os resultados das análises subsequentes (Chen et al., 2020).

O isolamento de ADN envolve três etapas: i) lise celular por rutura da membrana das células para libertar o material genético; ii) desnaturação ou inativação de proteínas por

substâncias quelantes ou proteases; iii) purificação do ADN através da remoção de impurezas. As técnicas de isolamento de ADN podem incluir: extração orgânica, troca iónica, extração em fase sólida ou microdissecção a laser (Nandini & Joji, 2020). O objetivo final é obter uma amostra de ADN purificada e de alta qualidade, pronta para ser utilizada em análises genéticas posteriores.

A quantificação de ADN é essencial em técnicas de amplificação como o PCR, onde a quantidade de ADN inicial influencia a eficácia e a sensibilidade da amplificação. Portanto, uma quantificação precisa do ADN é crucial para garantir resultados fiáveis em análises genéticas em diversas áreas (Muruganandhan & Sivakumar, 2011; Chen et al., 2020).

2.3.3. Fatores que influenciam a qualidade do ADN obtido dos dentes

2.3.3.1 *Condições ambientais*

As condições ambientais, incluindo a temperatura, humidade e tipo de solo, podem ter um impacto significativo na qualidade do ADN extraído de dentes em cenários forenses (Mansour et al., 2019).

As temperaturas elevadas podem acelerar a degradação do ADN. Assim, em climas quentes, o calor pode promover a atividade de enzimas que degradam o material genético, reduzindo assim a sua integridade e utilidade para análises genéticas. Por outro lado, temperaturas extremamente baixas também podem afetar negativamente a qualidade do ADN, levando à formação de cristais de gelo que danificam as células e o material genético (Mansour et al., 2019).

A humidade excessiva pode favorecer o crescimento de microorganismos, como bactérias e fungos, que podem degradar o ADN presente nos dentes. Além disso, a humidade pode aumentar a taxa de degradação química do ADN, reduzindo a sua qualidade ao longo do tempo. Em contrapartida, ambientes extremamente secos também podem causar desidratação e danos às células, afetando a integridade do ADN (Mansour et al., 2019).

Também o tipo de solo em que os dentes estão enterrados pode influenciar a sua exposição a fatores ambientais, como humidade e microorganismos. Solos ácidos podem acelerar a degradação do ADN devido à presença de ácidos orgânicos que promovem a quebra destas moléculas. Da mesma forma, solos com alta concentração de minerais ou metais

pesados podem afetar a integridade do ADN devido à interação desses compostos com o material genético. É importante considerar estes fatores ao isolar e analisar amostras de dentes para garantir resultados precisos e fiáveis em investigações criminais e identificação de vítimas (Mansour et al., 2019).

Embora o tecido mole da polpa seja protegido pelos tecidos duros, está suscetível a putrefação até à sua completa decomposição. Quando os dentes são extraídos e armazenados à temperatura ambiente, ocorre uma rápida desidratação do tecido pulpar. Da mesma forma, quando os dentes estão soltos nos alvéolos dentários, a humidade e a ação bacteriana destroem a polpa. Por outro lado, em situações sem humidade, a presença de uma atmosfera seca proporciona condições ideais para a mumificação dos tecidos moles. A preservação do tecido pulpar nos dentes é influenciada por uma combinação de fatores ambientais, temporais e de tratamento. Uma compreensão aprofundada desses fatores é importante para a interpretação das evidências forenses e arqueológicas baseadas no tecido pulpar dentário (Malaver & Yunis, 2003; Lozanno-Peral et al., 2021).

2.3.3.2. Presença de microorganismos

De uma forma geral, os microorganismos associados à cárie dentária podem alterar o ADN dentário por diferentes mecanismos, contribuindo assim para a degradação e deterioração dos tecidos dentários. Foi demonstrado que a atividade microbiana desempenha um papel na degradação do material nuclear, reduzindo o rendimento de ADN proveniente da polpa (Wei et al., 2023). Na Tabela 2 são apresentados os mecanismos despoletados por microorganismos patogénicos que podem danificar o ADN dentário.

Embora o tecido pulpar seja fácil de obter e analisar, em muitos casos, o dente pode estar desprovido de polpa ou estar preenchido endodonticamente (Muruganandhan & Sivakumar, 2011). Também pode estar contaminado por microorganismos, que irão contaminar a amostra com ADN não humano. Nestes casos, a dentina ou o cimento são usados para extrair ADN. A possibilidade de encontrar ADN não humano é menor em tecidos calcificados, exceto em casos de lesões cariosas. Sendo o material orgânico calcificado, há maior probabilidade de recuperar ADN intacto. As amostras de dentina e cimento são obtidas triturando a raiz, obtendo-se um pó de dentina puro ou um pó de dentina-cimento. O procedimento usado para a extração de ADN é semelhante ao descrito

para a extração do tecido pulpar (Muruganandhan & Sivakumar, 2011).

Tabela 2.

Mecanismos desencadeados por microorganismos que são prejudiciais para o ADN dentário (adaptado de Yu & Abbott, 2007).

Efeito provocado	Mecanismo
Acidificação do ambiente oral	As bactérias, como <i>Streptococcus mutans</i> , produzem ácidos ao metabolizar os açúcares presentes na boca. Esses ácidos podem acidificar o ambiente em torno dos dentes, o que pode potencialmente danificar o ADN dentário.
Produção de resíduos metabólicos tóxicos	As bactérias também produzem resíduos metabólicos, como toxinas e enzimas, que podem interagir com o ADN e causar danos.
Formação de biofilmes	As bactérias podem formar biofilmes na superfície dos dentes, criando um ambiente propício para a deterioração do ADN dentário. Os biofilmes também podem proteger as bactérias do ambiente hostil, promovendo a sua sobrevivência e atividade metabólica.
Inflamação e resposta imune	A infecção por bactérias cariogénicas pode desencadear uma resposta imune inflamatória nos tecidos circundantes. Essa inflamação crónica também pode contribuir para danificar o ADN.
Decomposição dos tecidos dentários	As bactérias cariogénicas podem causar a decomposição dos tecidos dentários, incluindo a dentina e o tecido pulpar. Este processo de decomposição pode potencialmente libertar enzimas e substâncias que podem interagir com o ADN dentário.

O cimento fornece ADN de qualidade superior à da polpa. Isso deve-se à resistência do cimento à degradação ambiental. Em termos de quantidade, a polpa geralmente produz uma quantidade maior de ADN do que o cimento, embora isso possa ser influenciado por fatores como cáries e atividade microbiana, que podem degradar o ADN da polpa de maneira mais significativa (Wei et al., 2023). Ambos os métodos podem fornecer dados significativos ao preservarem a integridade da estrutura do dente.

2.4. Métodos e técnicas usadas na amplificação do ADN e análise de marcadores genéticos

Um marcador genético é um fragmento de ADN ou uma sequência de ADN cuja localização num cromossoma é conhecida e pode ser detetada experimentalmente. Estes marcadores são utilizados em genética para várias aplicações, tais como mapeamento

genético, identificação de genes associados a características particulares, pesquisa de doenças genéticas, determinação de parentesco e muito mais. Os marcadores genéticos podem ser sequências únicas (como sequências polimórficas de nucleótidos) ou repetições de uma sequência dada. Podem ser detetados por diferentes métodos, que são apresentados em seguida. (Nandini & Joji, 2020)

A amplificação do ADN é uma técnica essencial em biologia molecular que permite produzir um grande número de cópias de um fragmento específico de ADN. As principais técnicas de amplificação do ADN incluem PCR, qPCR (também designado PCR em tempo real), RT-PCR (PCR por transcrição reversa), LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop), NASBA (amplificação baseada em sequência de ácidos nucleicos), RCA (amplificação por círculo rolante) e WGA (amplificação de genoma completo) (Wang et al., 2023).

A PCR envolve a desnaturação do ADN de dupla hélice em cadeias simples, a hibridização dos primers às sequências alvo e a síntese de ADN (extensão) a partir dos primers por uma ADN polimerase termoestável como a Taq polimerase, permitindo uma amplificação exponencial da sequência alvo. A qPCR, uma variante da PCR, permite quantificar o ADN após a sua amplificação em tempo real através da utilização de corantes fluorescentes ou sondas fluorescentes. Esta técnica é usada na análise da expressão génica e quantificação de ácidos nucleicos (Wang et al., 2023).

Por outro lado, a RT-PCR é utilizada na amplificação de ADN a partir de ARN. Primeiro, o ARN é convertido em ADN complementar (ADNc) por ação da enzima transcriptase reversa, sendo depois convertido em cadeia dupla e amplificado por PCR. Esta técnica é muito útil no estudo da expressão dos genes (Tomsia et al., 2022).

A LAMP é uma técnica isotérmica com um intervalo de temperatura entre 60 e 65°C. Nesta técnica são utilizados 4 primers: dois primers externos (um *forward* e um *backward*) e dois primers internos (um *forward* e um *backward*). A amplificação é feita por uma ADN polimerase com atividade de destacamento da cadeia. A utilização de mais um par de primers (primers loop) permite acelerar a amplificação duas vezes (Becheler et al., 2020).

A NASBA é um método isotérmico, realizado à temperatura de 41°C, utilizado para a amplificação de ácidos nucleicos cadeia simples, como ARN e ADN cadeia simples. Esta técnica utiliza dois primers, ambos com prolongamentos do promotor T7 e a reação é

desencadeada por três enzimas: a transcriptase reversa do vírus da ameloblastose (AMV-RT), a T7 ARN polimerase e a RNase H. que amplifica especificamente o ARN utilizando uma série de enzimas, frequentemente usada para a detecção de vírus de ARN (Nieuwkerk et al., 2020).

A RCA é também um processo enzimático isotérmico em que um ADN curto ou um primer de ARN é amplificado dando origem a um ADN ou ARN cadeia simples longo. É utilizado um molde de ADN circular e ADN ou ARN polimerases. O produto do RCA é um concatâmero contendo dezenas a centenas de repetições em tandem que são complementares ao molde circular (Monsur Ali et al., 2014).

A WGA engloba métodos que amplificam todo o genoma de uma amostra, utilizando quantidades muito reduzidas de ADN (na ordem dos picogramas) e produzindo dezenas de microgramas dos produtos amplificados. É um método com aplicação crucial na amplificação do genoma de uma única célula. Esta técnica utiliza primers aleatórios que se ligam ao ADN molde e a amplificação é realizada por uma polimerase com atividade de destacamento da cadeia. No final, obtém-se cadeias de ADN ramificadas e longas. Este grupo de técnicas tem variadas aplicações em investigação biomédica, diagnósticos clínicos, criminalística e biotecnologia, e a escolha do método apropriado depende dos objetivos específicos da análise e das características da amostra de ADN (Wang et al., 2023).

2.4.1. Análise de Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP)

A análise de RFLP foi o primeiro método utilizado para análise de ADN, tendo sido amplamente utilizada no passado para mapear genes, estudar a variação genética e diagnosticar doenças genéticas (Nandini & Joji, 2020). No entanto, foi em grande parte substituída por técnicas mais avançadas.

A análise de RFLP é uma técnica utilizada em genética molecular para identificar variações nas sequências de ADN. Este método baseia-se na detecção de diferenças nos padrões de restrição produzidos pela ação de enzimas de restrição (endonucleases), que clivam o ADN em sequências palindrómicas específicas. As variações nas sequências de ADN resultam em comprimentos diferentes dos fragmentos de ADN após a clivagem, o que permite a distinção de diferentes alelos (Nandini & Joji, 2020).

Neste método, a amostra de ADN é cortada com enzimas de restrição, que clivam o ADN

numa sequência palindrômica específica chamada local de restrição. Em seguida, os fragmentos de ADN obtidos são separados de acordo com o seu tamanho através de uma eletroforese em gel. Os fragmentos de ADN separados no gel são em seguida transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose, num processo conhecido como *Southern Blotting*. Esta membrana é incubada com sondas de ADN específicas que se encontram marcadas com fósforo radioativo. O excesso de sonda é retirado por lavagem e a membrana é exposta a um filme de raios X, que é, posteriormente, revelado para tornar visível o padrão de bandas referido como autoradiografia. A marcação da sonda também pode ser feita usando métodos não radioativos como fluorocromos, peroxidase, entre outros. Este método é moroso e requer grandes quantidades (>100 ng) de ADN e, por isso, não pode ser aplicado em amostras degradadas. Deste modo, os resultados não são imediatos (Nandini & Joji, 2020).

2.4.2. Análise de Sequências curtas Repetitivas em Tandem (STR)

A análise de STR refere-se à análise de sequências de ADN curtas e repetitivas, também conhecidas como microssatélites. Trata-se de regiões de ADN onde uma sequência de nucleotídeos de alguns pares de bases (de 2 a 7 bp) é repetida múltiplas vezes lado a lado, criando padrões de repetição, podendo estar presentes em várias zonas no genoma de um indivíduo. Os STRs são altamente polimórficos, herdados de ambos os pais, não havendo dois indivíduos com o mesmo STR, exceto gémeos verdadeiros. Esta particularidade dos STR torna-os um biomarcador da identidade (Nandini & Joji, 2020).

Os sistemas de perfil de ADN baseados em STR diferem de país para país, sendo mais frequentemente utilizados na identificação de vítimas de desastres em massa e restos de cadáveres antigos. Os dentes e os ossos densos, como o fémur, são as fontes mais utilizadas para a recolha de amostra (Nandini & Joji, 2020).

A extração de ADN é o primeiro passo na análise genética, podendo o ADN ser extraído de amostras biológicas como sangue, saliva ou tecidos, utilizando técnicas de extração apropriadas. Segue-se a amplificação por PCR das regiões de interesse contendo sequências repetitivas, com primers específicos desenhados para emparelhar com essas regiões STR. Os fragmentos amplificados são depois separados por eletroforese em gel, havendo a sua separação com base no seu tamanho, permitindo visualizar os diferentes alelos presentes na amostra. Após separação das amostras por eletroforese em gel de

poliacrilamida, procede-se à coloração do gel, podendo esta ser feita com prata ou utilizando métodos de deteção por fluorescência associados à eletroforese capilar (Nandini & Joji, 2020).

As bandas obtidas são analisadas para determinar o número de repetições em cada *locus* STR, comparando os tamanhos dos fragmentos com marcadores de tamanho padrão. Os perfis STR obtidos são então comparados com perfis de referência ou bases de dados para identificação genética, especialmente em casos de identificação judiciária ou de parentesco. Por fim, os resultados são documentados e interpretados num relatório que pode ser utilizado para fins legais, médicos ou de pesquisa. A análise STR é amplamente utilizada em medicina legal para identificação de indivíduos, em genética humana para estudar relações familiares e variações genéticas, bem como noutros domínios da biologia molecular (Liu et al., 2019).

Diversos países apresentam bases de dados de ADN baseados em marcadores STR. O FBI usa um Sistema de Índice de ADN Combinado (CODIS) baseado em STRs para criar uma base de dados de ADN tanto familiar como criminal (*Interpol DNA Database*). No entanto, não existe uniformidade em termos de número de marcadores STR entre bases de dados de ADN diferentes. Na Europa é utilizado um conjunto de 12 marcadores padrão (*loci*) STR e nos EUA o padrão CODIS é constituído por 13 marcadores. Juntos, formam um padrão de 18 marcadores STR no total, uma vez que alguns são comuns aos dois sistemas (Nandini & Joji, 2020).

Este é um método muito específico de identificação humana pois existe apenas uma possibilidade num milhão de duas pessoas possuírem perfis de ADN semelhantes em 13 *loci* (Nandini & Joji, 2020).

Neste procedimento é necessária a presença de amostras de ADN em bom estado e em quantidade suficiente, pelo que o método STR não pode ser aplicado a amostras de ADN muito degradadas ou de escassa quantidade (Nandini & Joji, 2020).

2.4.3. Análise do ADN mitocondrial (ADNmt)

A análise do ADNmt é frequentemente utilizada quando as amostras estão degradadas ou em pequenas quantidades, pois as mitocôndrias são mais resistentes do que os núcleos celulares. Uma célula contém apenas uma cópia do ADN nuclear, mas milhares de cópias da sequência de ADNmt de 16.000 pares de bases, com alto grau de variabilidade de

Utilização do ADN obtido de tecidos dentários na identificação humana forense: uma revisão integrativa sequências (Nandini & Joji, 2020).

Deste modo, é possível obter ADNmt quando não é possível o isolamento de ADN nuclear, mesmo em situações de degradação extrema (Nandini & Joji, 2020; Cooley, 2023). No entanto, Silva e Passos (2002) afirmaram que a análise de ADNmt para fins forenses se restringe a tecidos antigos, como ossos, cabelos e dentes, nos quais o ADN nuclear não pode ser analisado (Silva & Passos, 2002). Sendo a herança do ADNmt estritamente materna, sem contribuição paterna, este método é usado na identificação de restos esqueléticos altamente degradados com parentes maternos (Nandini & Joji, 2020). Esta é a principal limitação deste método, isto é, fornecer informações apenas sobre a herança materna.

A maior base de dados forense de ADNmt é o EMPOP (www.empop.org) presente no Instituto de Medicina Legal em Innsbruck, Áustria, com aproximadamente 3.000 amostras de haplótipos de 63 países (Nandini & Joji, 2020).

2.4.4. Análise do cromossoma Y

As regiões únicas do cromossoma Y humano são amplamente utilizadas na análise de ADN forense, principalmente em casos em que o perfil de ADN autossómico não fornece informação suficiente para a identificação (Kayser, 2017).

Existem duas aplicações forenses diferentes da haplotipagem STR do cromossoma Y (Y-STR): identificação da linhagem paterna, para a qual os Y-STRs com taxas de mutação elevadas são os mais adequados; determinação da paternidade/parentesco e pesquisa familiar, para a qual os Y-STRs com taxas de mutação baixas a médias são os mais adequados (Kayser, 2017).

De facto, os Y-STRs tendem a acumular mutações mais rapidamente do que outros tipos de marcadores genéticos devido à natureza específica do ADN do cromossoma Y e ao seu modo de transmissão geracional. Esta variabilidade aumentada permite uma melhor discriminação entre os indivíduos e pode ser particularmente útil para rastrear as linhagens paternas ao longo das gerações. Em resumo, os Y-STRs com altas taxas de mutação são preferidos, pois sua variabilidade genética aumentada possibilita uma melhor resolução na identificação de indivíduos e relações paternas (Mitchell et al., 2023).

A maior base de dados forense de haplótipos do cromossoma Y é o YHRD

(www.yhrd.org), do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses de Berlim, na Alemanha, com cerca de 115.000 haplótipos pesquisados em 850 populações (Nandini & Joji, 2020).

2.4.5. Análise de Polimorfismo de um único Nucleótido (SNP)

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são a variação de uma única base na sequência de DNA entre indivíduos de uma espécie ou entre cromossomos homólogos de um indivíduo. SNPs são a classe mais abundante de polimorfismos no genoma humano, estimados entre 10 a 11 milhões, com uma média de 1 SNP a cada 275 pares de bases. A maioria dos SNPs são bialélicos, e a taxa média de mutação em uma posição específica é extremamente baixa. Por essas razões, SNPs têm sido amplamente utilizados para traçar a história demográfica das populações humanas e para estudos de associação entre marcadores SNP e alguns traços e doenças (Pontes et al., 2017).

Os polimorfismos consistem em substituições, inserções ou deleções que ocorrem em posições específicas no genoma humano. Sendo o ser humano um organismo diploide, a maioria dos SNPs são bi-alélicos, o que significa que têm duas variações possíveis, por isso não são tão informativos para testes de identidade como os *loci* de STR. No entanto, uma vez que o tamanho da região amplificada por PCR pode ser reduzido a 60-80 bp, o ADN que se encontra degradado para além dos limites requeridos para a tipagem por STRs pode ser suficiente para tipagem por SNP. Isso significa que é possível amplificar fragmentos relativamente curtos de ADN, ultrapassando o problema de amostras de ADN degradadas ou fragmentadas, devido à exposição a condições ambientais ou a erros nos procedimentos durante o processamento dessas amostras. Assim, mesmo que o ADN tenha sido alterado para além dos limites geralmente aceites para a tipagem dos *loci* de STR, ainda é possível obter informações úteis a partir destas amostras, utilizando PCR direcionado a amplificação de regiões curtas. Isso é particularmente útil em contextos forenses ou de identificação onde as amostras podem ser de baixa qualidade ou em quantidade limitada, como amostras antigas ou amostras provenientes de cenas de crime. Esta capacidade de analisar fragmentos curtos de ADN e potencialmente danificados ou degradados amplia significativamente as possibilidades de obtenção de informações genéticas utilizáveis, reforçando assim a eficácia das análises forenses e da identificação de indivíduos (Wang et al., 2020).

Os SNPs não são suscetíveis de substituir os STRs como método principal para testes de identificação forense no futuro próximo. No entanto, a análise de SNPs pode tornar-se uma tecnologia forense complementar, a ser usada quando a tipagem de STRs não produz resultados que permitam a identificação ou quando apenas se obtém um perfil parcial (Lim & Majid, 2023).

Prevê-se que as análises forenses de SNP sejam aplicadas à tipagem do ADNmt, à análise do cromossoma Y, à avaliação da ascendência biogeográfica e à tipagem para determinação de características físicas (Budowle, 2004).

2.4.6. Determinação de sexo

O gene *AMEL*, que codifica uma proteína do esmalte dentário altamente conservada, a amelogenina, está localizado nas regiões sexo-específicas dos cromossomas X (Xp22.1-Xp22.3) e Y (Yp11.2). Os genes *AMELX* e *AMELY* apresentam tamanhos diferentes, o que permite a determinação do sexo de indivíduos pela identificação de cada um destes genes. Em humanos, as mulheres (XX) têm dois genes *AMEL* idênticos, enquanto os homens (XY) têm dois genes não idênticos (Nandini & Joji, 2020).

Pode haver indivíduos que apresentam variações ou deleções de determinadas regiões do cromossoma Y, o que pode afetar a identificação do *locus* Yp11.2. Isto pode resultar na identificação errada de indivíduos do sexo masculino como sendo do sexo feminino, devido à semelhança no perfil do gene *AMEL* (Nandini & Joji, 2020).

O padrão ideal para a determinação do sexo é o método Y-STR e gene *SRY* (regiões determinantes do sexo do cromossoma Y), em conjunto com a identificação do gene *AMEL* (Kayser, 2017).

O método Y-STR é baseado na análise de STRs específicos presentes no cromossoma Y. Haplótipos compostos por polimorfismos de STR do ADN do cromossoma Y (Y-STRs) são usados para caracterizar as linhagens paternas de dadores masculinos desconhecidos, como em casos de agressão sexual. A análise dos haplótipos Y-STR usada em investigações criminais pode: (i) excluir suspeitos masculinos de envolvimento num crime; (ii) identificar a linhagem paterna dos autores masculinos; (iii) evidenciar múltiplos contribuintes masculinos para uma amostra; e (iv) fornecer pistas de investigação para encontrar autores masculinos desconhecidos (Kayser, 2017).

A análise dos haplótipos Y-STR é usada em disputas de paternidade de filhos do sexo masculino e noutros tipos de testes de parentesco paterno, bem como em casos especiais de identificação de homens desaparecidos ou vítimas de catástrofes (Kayser, 2017).

O método SRY refere-se à deteção do gene determinante do sexo *SRY*. Este gene é responsável pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos em mamíferos e está presente no cromossoma Y. A parte específica do cromossoma Y humano, relacionada com as características sexuais masculinas, é amplamente utilizada na análise de ADN em medicina legal, especialmente em casos em que a análise padrão do ADN autossómico não é informativa (Kayser, 2017).

2.5. Análise dos resultados

A eletroforese capilar é um método sofisticado de separação de fragmentos de ADN amplificados de acordo com o seu tamanho. Inicialmente, os fragmentos de ADN marcados com fluorocromos são introduzidos num capilar. Dentro dele, um laser excita esses fluorocromos produzindo sinais fluorescentes, que são em seguida captados por um detetor, convertendo-os em picos eletroforéticos. Estes picos são posteriormente interpretados usando software especializado, facilitando a determinação precisa do tamanho dos fragmentos de ADN. Por fim, os tamanhos obtidos são comparados com alelos de referência, permitindo assim a construção de um perfil genético único para a amostra em estudo. Este método é amplamente utilizado em áreas como genética forense devido à sua sensibilidade, precisão e rapidez (Gattu et al., 2018).

A sequenciação de nova geração (NGS) representa uma metodologia avançada que viabiliza a sequenciação simultânea de milhões de fragmentos de ADN de forma paralela. O processo de análise tem início com o alinhamento das leituras de sequenciação em relação a um genoma de referência. A partir deste ponto, as discrepâncias em relação a esse genoma de referência são identificadas, abarcando as variações pontuais (SNPs) assim como as inserções e deleções. Estas variantes então são submetidas a um processo de filtragem com o intuito de suprimir os falsos positivos, sendo devidamente anotados para se determinar a sua relevância biológica. Por fim, os resultados obtidos são interpretados de acordo com os objetivos específicos da análise, sejam estes a identificação de indivíduos ou a caracterização de variações genéticas particulares (McCombie et al., 2019).

A qPCR é uma técnica empregada na quantificação em tempo real de fragmentos de ADN. O procedimento tem início com a aquisição de dados a partir de curvas de amplificação, onde a fluorescência é medida ao longo dos ciclos de PCR. Estes dados são então analisados para determinar o limiar de ciclo (Ct), que indica o ponto onde o sinal ultrapassa o ruído de fundo. Os Ct são subsequentemente utilizados para quantificar a quantidade inicial de ADN na amostra, empregando curvas padrão. Os resultados são interpretados de acordo com as necessidades específicas da análise, tais como a detecção de mutações específicas ou a quantificação da carga viral (De Ronde et al., 2018).

Os microarrays consistem em chips contendo milhares de sondas específicas de ADN, utilizadas para detetar a presença e a abundância de sequências-alvo. O processo inicia-se com a hibridação, onde os fragmentos de ADN marcados se ligam às sondas complementares no chip. Em seguida, o chip é rastreado para capturar os sinais fluorescentes das sondas híbridas, e as intensidades de fluorescência são analisadas para determinar a presença e a abundância das sequências-alvo. Os resultados são interpretados com o intuito de identificar SNPs, variações no número de cópias e outros polimorfismos genéticos (Agapito & Arbitrio, 2022).

A hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica utilizada para detetar e localizar sequências específicas de ADN nos cromossomas. O processo tem início com a hibridação entre sondas fluorescentes e as sequências-alvo nos cromossomas previamente fixados. Posteriormente, as amostras são visualizadas através de microscopia de fluorescência e as imagens fluorescentes são capturadas. Estas imagens são então analisadas para identificar os sinais de hibridação, permitindo a detecção de anomalias cromossómicas, rearranjos ou deleções (Zhou et al., 2024).

Pela combinação destas técnicas avançadas e compreendendo o seu funcionamento em profundidade, os peritos em Medicina Dentária Forense podem ser capazes de analisar os dados com precisão e fornecer informações cruciais para investigações e identificações médico-legais.

2.6. Estudo de casos

A tabela 3 apresenta os dados extraídos dos 20 artigos selecionados para a revisão integrativa. Estas publicações fornecem uma visão abrangente e atual sobre o uso de amostras dentárias para a identificação humana através da análise de ADN.

Os estudos de Lisman et al. (2023) e Wei et al. (2023) destacaram a viabilidade do cálculo dentário e do cimento dentário como fontes de ADN, especialmente em ambientes onde o ADN da polpa pode estar degradado. Estes estudos demonstraram que, embora a quantidade de ADN obtida do cálculo e do cimento seja menor, a sua resistência à degradação ambiental torna-os fontes viáveis para análise forense.

Os estudos de Chávez-Briones et al. (2023) e Kumar e Sharma (2021) reforçaram a eficácia dos dentes como amostras de referência para a identificação de restos humanos. Chávez-Briones et al. (2023) mostraram que os perfis genéticos dos molares coincidiram com os de fragmentos ósseos, enquanto Kumar e Sharma (2021) destacaram a importância dos dentes saudáveis na confirmação da identidade e parentesco. Ambos os estudos sublinham a confiabilidade dos dentes na obtenção de perfis de ADN completos e precisos.

O impacto de fatores ambientais na qualidade e quantidade do ADN obtido foi também avaliado. Os estudos de Lozano-Peral et al. (2021) e Yudianto e Setiawan (2020) investigaram o impacto da temperatura na qualidade do ADN extraído de dentes. Lozano-Peral et al. (2021) observaram uma diminuição significativa na detecção de ADN com o aumento da temperatura de incineração, tornando a identificação genética quase impossível em dentes expostos a temperaturas acima de 200°C. Yudianto e Setiawan (2020) sugeriram o uso de primers miniSTR como alternativa para a análise de ADN degradado em dentes expostos a altas temperaturas.

Shbair et al. (2021) e Heathfield et al. (2021) exploraram técnicas de recuperação de ADN de dentes cariados. Shbair et al. (2021) mostraram que a técnica de perfuração e escavação manual dos tecidos cariados é eficiente para recuperar ADN, enquanto Heathfield et al. (2021) demonstraram que dentes pré-molares e caninos apresentam melhor desempenho na extração de ADN comparativamente com os molares. A presença de obturações reduziu a quantidade e a qualidade do ADN obtido, destacando a importância da seleção de dentes adequados para a análise.

Emery et al. (2022) e Zupanič Pajnič (2021) destacaram a utilização do ADNmt na identificação forense, especialmente quando o ADN nuclear se encontra degradado. Emery et al. (2022) demonstraram que é possível reconstruir genomas inteiros de ADNmt a partir de dentes com resultados comparáveis aos outros tipos de tecidos ósseos analisados, enquanto Zupanič Pajnič (2021) utilizou STRs autossómicos e do cromossoma Y para identificar vítimas da Segunda Guerra Mundial, mostrando a eficácia

dos dentes na obtenção de perfis genéticos completos.

Outros estudos como os de Turingan et al. (2019) e Koehn et al. (2020) reforçaram a importância dos dentes na obtenção de perfis de ADN completos em contextos forenses. Turingan et al. (2019) obtiveram perfis genéticos completos a partir dos dentes, enquanto amostras de referência, como envelopes e selos, forneceram perfis parciais. Koehn et al. (2020) mostraram que o tratamento com hipoclorito de sódio (NaOCl) não teve efeito significativo na recuperação do ADN de dentes, demonstrando que a descontaminação com NaOCl não degrada o ADN e que os perfis genéticos completos podem ser obtidos independentemente do tratamento com NaOCl.

Dudás et al. (2020), Ghaleb et al. (2019) e Edson (2019) mostraram a eficácia dos dentes em contextos históricos e arqueológicos. Dudás et al. (2020) conseguiram obter haplótipos completos de Y-STR e perfis de STR autossômicos de dentes. Ghaleb et al. (2019) identificaram esqueletos em valas comuns usando STRs, e Edson (2019) destacou que, embora os dentes forneçam perfis de ADN de alta qualidade, os resultados variam dependendo do método de extração utilizado.

Buš et al. (2019) analisaram fragmentos ósseos e dentes de uma vala comum viking, destacando a predominância de haplogrupos da Eurásia Ocidental e identificando possíveis relações maternas. Diepenbroek et al. (2019) estudaram dentes de restos mortais masculinos e obtiveram resultados sobre a origem étnica potencial desses indivíduos através de Y-STRs. Heathfield et al. (2021) compararam diferentes métodos de extração de ADN de dentes, concluindo que a extração com fenol/clorofórmio fornecia os melhores resultados.

De Donno et al. (2020) exploraram a tipagem de STRs de ossos do esterno e dentes, demonstrando a eficácia na identificação de restos humanos. Smajlović-Skenderagić et al. (2021) abordaram a complexidade da análise de ADN de valas comuns, encontrando co-amplificação de ADN não humano. Zupanič-Pajnič et al. (2020) destacaram a eficiência de combinar STRs autossômicos e Y-STR para identificar indivíduos em casos complexos envolvendo amostras de ADN degradadas de valas comuns na Eslovênia, mostrando a importância dos dentes na obtenção de perfis genéticos completos.

Em conjunto, estes estudos contribuem para um entendimento mais profundo das técnicas de extração e análise de ADN em vários contextos forenses, destacando a importância de métodos robustos e adaptáveis para garantir a precisão e a confiabilidade das

Utilização do ADN obtido de tecidos dentários na identificação humana forense: uma revisão integrativa identificações. A pesquisa contínua e as melhorias metodológicas são essenciais para superar os desafios existentes e aprimorar a confiabilidade da tipagem de ADN forense.

Tabela 3.

Estudos incluídos (total de 20 publicações) na presente revisão em que a identificação humana foi realizada através da análise do ADN de amostras de dentes (Fonte: elaborado pelo autor).

Referência (Autor, ano)	Amostra	Região ADN analisada	Processamento da amostra	Método de isolamento / análise do ADN	Amostra de referência	Resultados
Buś et al. (2019)	- Um fragmento ósseo ou um dente de cada um dos 20 cadáveres encontrados numa vala comum da Era Viking	ADN mitocondrial (ADNmt)	- Amostras de ossos foram polidas com lixa para remover contaminantes; descontaminadas em 6% de hipoclorito de sódio; - Ossos e dentes foram pulverizadas após imersão em azoto líquido por 10 min.	- <u>Isolamento de ADN</u> : Kit comercial. - <u>Quantificação de ADNmt</u> : PCR em tempo real. - <u>Tipagem de ADN</u> : PCR das regiões hipervariáveis HVS-I e HVS-II do ADNmt; sequenciação dos fragmentos de ADNmt realizado no Analisador Genético 3730xl ABI com o BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, seguindo o protocolo do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).		- Maioria dos indivíduos não relacionados por via materna. - Identificados dois possíveis pares de irmãos ou relação mãe-filho. - Todos os indivíduos pertenciam a haplogrupos da Eurásia Ocidental, com predominância do haplogrupo H. - Foi possível a obtenção de ADNmt de todas as amostras, apesar do alto grau de degradação do ADN.
Diepenbroek et al. (2019)	- Dentes de 177 restos mortais masculinos encontrados nos antigos jardins do centro de detenção em Białystok	23 STR do cromossoma Y (Y-STR)	- Limpeza mecânica e química (hipoclorito de sódio 15%, 15 min) dos dentes; lavados com água; descontaminados por UV (30 min); triturados num	- <u>Isolamento de ADN</u> : Kit comercial. - <u>Quantificação de ADN</u> : Kit DNA Quantifiler Trio. - <u>Tipagem de ADN</u> : PCR com Kit Yfiler Plus. - <u>Deteção dos produtos</u> : Analisador Genético 3500.	Base de dados YHRD	- Tipagem Y-STR completa de 67 indivíduos. - 70 amostras com tipagem de mais de 20 Y-STRs. - Os resultados preliminares lançam alguma luz sobre a possível origem étnica dos restos exumados.

Referência (Autor, ano)	Amostra	Região ADN analisada	Processamento da amostra	Método de isolamento / análise do ADN	Amostra de referência	Resultados
			moinho criogénico.			
Edson (2019)	- 2177 Fragmentos cranianos e 1565 dentes (359 caninos, 190 incisivos, 321 pré- molares e 676 molares) de perdas em tempos de guerra, incluindo da Segunda Guerra Mundial, Guerra da Coreia e Sudeste Asiático.	- DNA mitocondrial (DNAMt) e marcadores STR.	- Ossos foram pulverizados. -Dentes foram limpos e perfurados. A dentina foi removida.	- <u>Isolamento de ADN</u> por um dos seguintes: 1- Método fenol/clorofórmio. 2- Método fenol/clorofórmio e concentração da amostra usando filtros millipore. 3- Kit comercial. 4- Projetado para sequenciação de Nova Geração (NGS), envolvendo desmineralização, digestão com Proteinase K e purificação com o Kit Qiagen MinElute. - <u>Tipagem de ADN</u> : PCR das regiões hipervariáveis HVS-I e HVS-II do ADNmt; sequenciação dos produtos amplificados (método de Sanger) e NGS. PCR dos marcadores STR por AmpFISTR MiniFilerTM e PowerPlex.	- Sequência de Referência de Cambridge Revista (rCRS) para ADNmt. - Base de dados de perfis conhecidos de marcadores STR.	- Resultados relativamente decepcionantes foram obtidos com dentes para análise de STR. - Quase 100% de sucesso na tipagem de ADNmt usando a sequenciação de Sanger. - Os elementos da "abóbada" do crânio, occipital, parietal e frontal não são considerados ideais para testes de ADN, com exceção surpreendente do zigomático, que permitiu a tipagem.
Ghaleb et al. (2019)	- 2 Dentes de cada cadáver de uma vala comum (total de 7 cadáveres)	Marcadores STR	- Dentes foram limpos mecanicamente; descontaminados por UV (5 min); e pulverizados.	- <u>Isolamento de ADN</u> : kits comerciais. - <u>Quantificação de DNA</u> : PCR tempo real com kit Quantifier Human DNA.	Cabelo de um familiar de cada cadáver	- Foi possível a identificação dos esqueletos. - A análise de STRs, loci de pequeno tamanho, é adequada para a identificação de amostras degradadas.

Referência (Autor, ano)	Amostra	Região ADN analisada	Processamento da amostra	Método de isolamento / análise do ADN	Amostra de referência	Resultados
				- <u>Tipagem do ADN</u> : PCR convencional.		
Turingan et al. (2019)	- 1705 amostras incluindo sangue, tecido epitelial oral, papel, sêmen, dentes, osso e tecidos moles	Marcadores STR	- Amostra limpa com água corrente; removidos os tecidos aderentes; raiz de um pré-molar ou molar foi separada; lavada com agitação 15-20x; transferida para água estéril; imersão em etanol; secagem.	- Processamento rápido de ADN: Sistema de Identificação de ADN Rápido (ANDE).	Amostras bucais e cartões sanguíneos	- Tipagem completa obtida dos dentes. - Tipagem parcial das amostras de referência (envelopes e selos). - Evidências sólidas para a identificação.
De Donno et al. (2020)	- Osso do externo, um dente e sangue de um cadáver	15 Marcadores STR autossômicos e um locus X/Y (gene da amelogenina)	- Limpeza mecânica e química dos ossos. - Limpeza química e descontaminação dos dentes com peróxido de hidrogênio; remoção da polpa dentária.	- <u>Isolamento de ADN</u> : kit comercial. - <u>Tipagem do ADN</u> : PCR por kit AmpFISTR® Identifiler™. - <u>Deteção dos produtos</u> : qPCR multiplex com o Kit PowerQuant System (Promega).	- Saliva de um possível filho	- Tipagem parcial obtida a partir das amostras de dentes e de sangue. - Tipagem total obtida a partir das amostras do externo. - Identificadas 5 incompatibilidades nos padrões de ADN entre o cadáver e o possível filho, o que permitiu excluir a paternidade.
Dudás et al. (2020)	- Dente e fêmur de um cadáver (monge)	Marcadores STR autossômicos e do cromossoma Y (Y-STR)	- Dente limpo e descontaminado com agente químico (2 min),	- <u>Isolamento de ADN</u> : Kit comercial - <u>Tipagem do ADN</u> : PCR com kits PowerPlex Y23 e	- Envelopes e selos postais selados pelo falecido	- Tipagem completa de Y-STR e STR autossômicos a partir do dente.

Referência (Autor, ano)	Amostra	Região ADN analisada	Processamento da amostra	Método de isolamento / análise do ADN	Amostra de referência	Resultados
			moído e pulverizado.	PowerPlex Fusion 6C (Promega, EUA). - <u>Deteção dos produtos</u> : Analisador Genético 3500.		- Tipagem parcial de Y-STR e STR autossômicos a partir dos envelopes e dos selos.
Koehn et al. (2020)	- 71 Dentes (47 molares e 24 incisivos, caninos e pré-molares)	Marcadores STR	- Dentes limpos mecanicamente. - Tratamento com hipoclorito de sódio a 2,5% (30 seg e 60 seg) ou a 5% (30 seg, 60 seg ou 10 min). - Limpeza com água destilada e etanol 80%; esterilizados com UV (30 min); congelados com azoto líquido e triturados.	- <u>Isolamento de ADN</u> : Kit comercial. - <u>Tipagem do ADN</u> : PCR com Kit Yfiler Plus (ThermoFisher Scientific). - <u>Deteção dos produtos</u> : analisador genético 3500, 600 LIZTM.	Grupo controlo (11 dentes) não tratados com hipoclorito de sódio.	- Maior quantidade de ADN foi obtida a partir de dentes incisivos, caninos e pré-molares (entre 108,5 ng/μL e 219,4 ng/μL) do que dos molares (2,1 ng/μL). - Os tratamentos com hipoclorito de sódio parecem não ter impacto na quantidade de ADN isolado. - Tipagem completa foi obtida para todos os dentes analisados.
Yudianto & Setiawan (2020)	- 16 Dentes (segundos molares) de cadáver	3 Marcadores STR (miniSTR CODIS)	- Dentes incinerados a 500°C e 750°C (20-30 min); triturados; descalcificados com EDTA 0,5M.	- <u>Isolamento de ADN</u> : reagente DNAzol - <u>Tipagem de ADN</u> : PCR com FGA, CSF1PO, and D21S11 miniSTR CODIS - <u>Deteção dos produtos</u> : eletroforese em gel de agarose a 2%.		- A quantidade de ADN isolada é afetada pela temperatura de incineração. Temperaturas mais altas reduzem a quantidade de ADN disponível. - Tipagem do ADN completa para os loci FGA e CSF1PO a 500°C e 750°C. - Não foi possível a tipagem do locus CSF1PO com exposição a 500°C ou 750°C (30 min).

Referência (Autor, ano)	Amostra	Região ADN analisada	Processamento da amostra	Método de isolamento / análise do ADN	Amostra de referência	Resultados
Zupanič- Pajnič et al. (2020)	- 12 Ossos e dentes de restos de esqueletos de uma vala comum na Eslovénia.	Marcadores STR autossômicos e do cromossoma Y (Y- STR).	- Limpeza mecânica e química dos ossos; limpeza química e descontaminação por UV dos dentes.	- <u>Isolamento de ADN</u> : Kit comercial. - <u>Quantificação do ADN</u> : Kit ADN Quantifiler® Trio (Thermo Fisher Scientific). - <u>Tipagem do ADN</u> : PCR com sistemas PowerPlex® ESI 17 e Y23 (Promega). - <u>Deteção dos produtos</u> : ABI 3130 Genetic Analyzer	Perfis de ADN de parentes vivos das vítimas.	- Tipagem bem-sucedida de várias vítimas. - O estudo destacou a eficiência de combinar STRs autossômicos e Y- STR para identificar indivíduos em casos complexos envolvendo amostras de ADN degradadas
Heathfield et al. (2021)	- 52 Dentes (incisivos, caninos, pré-molares e molares) de três indivíduos falecidos	15 Marcadores STR	- Dentes foram limpos; removida a camada externa do esmalte; e moídos. - Dentes moídos foram guardados a -20°C até a extração de DNA.	- <u>Isolamento de ADN</u> : Kit QIAamp® DNA Investigator ou método de fenol/clorofórmio. - <u>Quantificação do ADN</u> : PCR em tempo real - <u>Tipagem do ADN</u> : PCR convencional - <u>Deteção dos produtos</u> : eletroforese capilar no Analisador Genético 3130xl da Applied Biosystems		- Melhor qualidade e quantidade de ADN obtida pelo método de fenol- clorofórmio. - Tipagem de ADN a partir de molares foi a menos bem-sucedida. Melhores resultados com dentes pré- molares, seguidos por caninos. - A presença de obturações reduziu a quantidade e qualidade do ADN. - O número de raízes ou a presença de raízes parcialmente quebradas não influenciou a quantidade média de ADN, o índice de degradação ou o sucesso da tipagem de ADN. - Maior quantidade de ADN obtida a partir de dentes com periodontite em comparação com dentes sem periodontite.

Referência (Autor, ano)	Amostra	Região ADN analisada	Processamento da amostra	Método de isolamento / análise do ADN	Amostra de referência	Resultados
Kumar & Sharma (2021)	- 7 Dentes inteiros e saudáveis (molares e caninos) de cadáver de indivíduo do sexo masculino não identificado	Marcadores STR autossômicos	- Molares limpos; Lavado com álcool absoluto; fraturado com martelo; pedaços colocados em microtubo e autoclavado; lisado a 56°C (72 horas) em banho-maria NB 20.	- <u>Isolamento de ADN</u> : kit comercial - <u>Tipagem do ADN</u> : PCR com Kit PowerPlex® 21 System. - <u>Deteção dos produtos</u> : eletroforese capilar.	Amostras de sangue do suposto filho e da esposa do cadáver	- Perfis de ADN das amostras de sangue e dos dentes mostraram uma concordância completa, permitindo a identificação do esqueleto. - Determinada uma probabilidade de paternidade superior a 99.99%, permitindo a identificação do cadáver. - Amelogenina é um marcador determinante de género e auxilia na identificação do sexo do indivíduo. - Os dentes desempenham um papel importante na ciência forense para confirmar a identidade e a maternidade/paternidade do corpo não identificado.
Lozano-Peral et al. (2021)	- Dentes extraídos, livres de cáries, endodontias ou reconstruções (molares e pré-molares, n=30)	Marcadores STR	- Dentes lavados com água destilada; armazenados em condições controladas (21 °C, 65% de humidade); imersos em hipoclorito de sódio a 3% (1,5 min) e lavados com água estéril; irradiados com luz UV de 256 nm (10 min) - Tratamentos:	- <u>Isolamento de ADN</u> : extração com fenol/clorofórmio - <u>Tipagem de ADN</u> : PCR em tempo real; marcadores STR (Kit PCR AmpFLSTR Identifiler Plus) - <u>Deteção dos produtos</u> : Eletroforese digital	Dentes controlo (n=10)	- Quantidade de ADN diminuiu significativamente com o aumento da temperatura de incineração - Redução significativa na quantidade de ADN por incineração a 100 °C. - Após 60 min de incineração, todos os loci STR foram detetados em todos os dentes expostos a 100 °C. - Identificação genética difícil após exposição dos dentes a 200 °C ou acima.

Referência (Autor, ano)	Amostra	Região ADN analisada	Processamento da amostra	Método de isolamento / análise do ADN	Amostra de referência	Resultados
			Incineração a 100, 200 ou 400 °C (60 min)			
Shbair et al. (2021)	- 120 Dentes cariados	Marcadores STR autossômicos e um locus X/Y (gene da amelogenina)	- Dentes cariados; descontaminados por branqueamento suave e curetagem completa do tecido mole. - Preservação a 220°C para processamento posterior.	- <u>Isolamento de ADN</u> : Kit comercial - <u>Tipagem do ADN</u> : PCR de um locus sexual e 19 STRs autossômicos (13 STRs do CODIS) - <u>Deteção dos produtos</u> : PCR multiplex com fluorescência		- Foi obtida tipagem completa da maioria das amostras. - Necessário repetir o PCR (2-3X) para 10-15 amostras. - Técnica de perfuração dos dentes revelou-se eficiente na recuperação de DNA humano de dentes cariados.
Smajlović- Skenderagic et al. (2021)	- Amostras de ossos e dentes de valas comuns na Bósnia e Herzegovina e no Kosovo e do Tsunami do Oceano Índico na Tailândia e nas Maldivas. - Amostras de pessoas desaparecidas do Iraque, Chipre, Brasil, Kuwait e Chile.	Marcadores STR	- Amostras foram limpas, descontaminadas com 0,5% hipoclorito e pulverizadas.	- <u>Isolamento de ADN</u> : método de fenol/clorofórmio ou Kit comercial. - <u>Tipagem do ADN</u> : PCR com PowerPlex 16 System, PowerPlex 21 System (Promega), AmpF _{STR} MiniFiler, Identifiler e Globalfiler (Applied Biosystems). - <u>Deteção dos produtos</u> : 3100 Genetic Analyzer ou 3130xl Genetic Analyzer.		- Houve coamplificação de ADN não humano para alguns marcadores STR. - Presença de picos de origem presumida microbiana em perfis STR de dezenas de milhares de amostras de ossos e dentes humanos, complicando a interpretação dos resultados do estudo.

Referência (Autor, ano)	Amostra	Região ADN analisada	Processamento da amostra	Método de isolamento / análise do ADN	Amostra de referência	Resultados
Zupanič Pajnič (2021)	- O segundo molar maxilar esquerdo, a tíbia direita e o fémur direito do esqueleto A - Terceiro, segundo e primeiro molares maxilares direitos do esqueleto B (vítimas da Segunda Guerra Mundial na Eslovénia)	Marcadores STR autossômicos e do cromossoma Y (Y-STR) SNPs HIRISplex fenotípicos para a previsão da cor do cabelo e dos olhos	- Molares foram retirados dos maxilares superiores, feita limpeza química, irradiação com UV para descontaminação superficial, mantidos a -20 °C, e moídos.	- <u>Isolamento de ADN</u> : kits comerciais. - <u>Quantificação de ADN</u> : qPCR. - <u>Tipagem de ADN</u> : PCR com kits NGM (AB) e PowerPlex Y23 (Promega). - <u>Tipagem adicional de STR</u> com os kits Investigator ESSplex Plus (Qiagen) e AmpFISTR NGM PCR Amplification (AB).	- Swabs bucais de dois parentes distantes da vítima masculina. - Para a mulher: foi utilizado um retrato, permitindo a comparação de sua cor de olhos e cabelos.	- Diferentes marcadores STR autossômicos e Y-STR permitiram identificar a vítima do sexo masculino. - Não foi possível a identificação da vítima feminina através de STRs autossômicos e de ADN mitocondrial. - Y-STR e amelogenina permitiram confirmar o sexo das duas vítimas - A tecnologia de NGS foi usada para prever a cor dos olhos e cabelos da mulher.
Emery et al. (2022)	- 27 Amostras obtidas de vítimas de incêndios (falanges, rádios, fragmentos parietais e temporais, metatarsos, metacarpos, tíbias, fêmures e pré-molares)	ADN mitocondrial (ADNmt)	- Amostras foram seccionadas e pulverizadas.	- <u>Isolamento de ADN</u> : kit comercial - Preparação de bibliotecas de DNAs: NEBNext II DNA Library Kit para Illumina®. - <u>Análise de ADN</u> : Sequenciação das bibliotecas enriquecidas na plataforma Illumina MiSeq.	A extração de ADN e a preparação de biblioteca de ADN de fita dupla foram realizadas com controles negativos em paralelo.	- É possível reconstruir genomas inteiros de ADNmt a partir de restos esqueléticos incinerados submetidos a temperaturas < 600°C. - As amostras de dentes forneceram amostras viáveis para a extração de DNA mitocondrial, com resultados comparáveis aos outros tipos de tecidos ósseos analisados no estudo, embora a qualidade do DNA tenha sido afetada pela intensidade das queimaduras.

Referência (Autor, ano)	Amostra	Região ADN analisada	Processamento da amostra	Método de isolamento / análise do ADN	Amostra de referência	Resultados
Chávez-Briones et al. (2023)	- Fragmentos ósseos de um corpo esqueletizado e carbonizado	Marcadores STR	- Ossos: congelados com azoto líquido e pulverizados; - Molares decíduos: extração da polpa dentária.	- <u>Isolamento de ADN</u> : Kit comercial - <u>Tipagem de ADN</u> : PCR com Kits AmpFISTR® Identifiler Plus e AmpFISTR® MiniFiler (Applied Biosystems) - <u>Deteção dos produtos</u> : Eletroforese capilar	Molares decíduos (guardados 30 anos)	- Perfis genéticos obtidos a partir dos fragmentos ósseos e dos molares coincidiram em todos os alelos - Demonstrada a viabilidade e eficácia do uso de dentes decíduos como amostras de referência para a identificação de ADN de restos humanos.
Lisman et al. (2023)	- Cálculos dentários de 17 corpos exumados de prisioneiros da II Guerra Mundial	STR autossômicos e Y-STR	- Cálculos: limpeza mecânica e química; pulverização criogénica	- <u>Isolamento de ADN</u> : kit comercial - <u>Tipagem de ADN</u> : Marcadores de STR autossômicos - amplificados com kit GlobalFiler™ PCR (Thermo Fisher Scientific) Marcadores Y-STR - amplificados com kit Y-filer™ Plus PCR (Thermo Fisher Scientific) - <u>Deteção dos produtos</u> : analisador genético 3500 (padrão de tamanho GeneScan™ 600 LIZ®)	Molares maxilares	- Concentração média ADN: Cálculos dentários: 0,03286 ng/μL Dentes controlo: 0,07130 ng/μL permitiu a determinação dos marcadores STR - O ADN de cálculos dentários tem índice de degradação menor (menos suscetível a degradação ambiental) do que o ADN do dente.
Wei et al. (2023)	- 58 Dentes removidos devido a cárie ou periodontite, 4 dentes recolhidos num exame forense	24 loci - 22 Marcadores STR	- Os dentes foram escovados e limpos com água corrente; cálculo foi removido. - 49 dentes foram enterrados durante 92 dias.	- <u>Isolamento de ADN</u> : Kit comercial. - <u>Quantificação do ADN</u> : Kit Quantifiler® Human DNA. - <u>Tipagem do ADN</u> : PCR multiplex com Kit GlobalFiler™.	Grupo controlo: 9 dentes não enterrados	- ADN recolhido do cimento tem melhor qualidade do que o recolhido da polpa dentária - Maior quantidade e qualidade de ADN obtida de dentes com várias raízes do que de dentes com uma raiz - A quantidade de ADN recolhida da polpa e do cimento dos dentes

Referência (Autor, ano)	Amostra	Região ADN analisada	Processamento da amostra	Método de isolamento / análise do ADN	Amostra de referência	Resultados
			- Recolha de cimento e polpa dos dentes	- <u>Deteção dos produtos:</u> analisador Genético Applied Biosystems 3500XL.		enterrados foi menor do que dos não enterrados. - A integridade do ADN dos dentes é afetada por fatores ambientais: ambiente seco protege de degradação, e ambiente húmido pode acelerar a degradação. - Tipagem completa para os dentes não enterrados. - Tipagem parcial para os dentes enterrados.

Abreviaturas: ADN: Ácido desoxiribonucleico; ADNmt: ADN mitocondrial; min.: minutos; Y-STR: STR do cromossoma Y; YHRD: Y-Chromosome Haplotype Reference Database

III. DISCUSSÃO

Nesta secção, são analisados e discutidos os resultados apresentados na Tabela 3 do estudo de caso, que resume diversos estudos realizados entre 2019 e 2023. Estes estudos focam-se na identificação humana através da análise de ADN de amostras dentárias. A discussão irá dar ênfase às principais descobertas, metodologias e implicações destes estudos, centrando-se na análise do ADN presente nas amostras dentárias.

Os estudos analisados utilizaram diferentes amostras dentárias, incluindo cálculos dentários, dentes extraídos clinicamente, assim como dentes intactos e saudáveis recolhidos de cadáveres. A maioria dos estudos analisou marcadores STR autossómicos, Y-STRs e ocasionalmente ADNmt, refletindo uma abordagem abrangente para identificação genética. A análise dos marcadores STR autossómicos, como demonstrado por estudos como os de Dudás et al. (2020) e Ghaleb et al. (2019), é amplamente vantajosa devido à sua capacidade de fornecer perfis genéticos completos e comparáveis. Por outro lado, os Y-STRs, utilizados em estudos como os de Diepenbroek et al. (2019), são particularmente úteis na determinação de linhagens paternas e na resolução de casos envolvendo múltiplos indivíduos do sexo masculino. O ADNmt, analisado por Emery et al. (2022) e Zupanič Pajnič (2021) é vantajoso em situações onde o ADN nuclear está degradado, fornecendo informação genética materna.

Os métodos de processamento das amostras dentárias variaram significativamente, refletindo adaptações a diferentes tipos de amostras e condições. Os procedimentos incluíram limpeza mecânica e química para remover contaminantes, pulverização criogénica e tratamento com EDTA para limpeza completa e desmineralização. Alguns estudos usaram métodos de descontaminação dos dentes, de modo a evitar a presença de ADN estranho. Para tal, procedimentos químicos, como imersão em hipoclorito de sódio, ou físicos, como irradiação por UV, foram utilizados. Especificamente, o estudo de Koehn et al. (2020) utilizou hipoclorito de sódio para a descontaminação, enquanto Heathfield et al. (2021) aplicaram irradiação UV como método de limpeza.

Vários kits comerciais, como Maxwell® FSC, ADN IQ™ Casework e PrepFiler Express BTA™, foram utilizados, indicando uma dependência de protocolos estabelecidos para extração de ADN confiável. Esses métodos foram essenciais para garantir a integridade e o rendimento do ADN extraído de amostras diversas e frequentemente comprometidas.

As técnicas de quantificação e amplificação foram críticas para avaliar a qualidade e quantidade do ADN. Técnicas como PCR em tempo real e fluorimetria foram usadas para a quantificação, garantindo ADN suficiente para tipagem do ADN. Os kits de amplificação de STR, como GlobalFiler™ PCR e Y-filer™ Plus PCR, foram os mais frequentemente usados, fornecendo resultados robustos e reprodutíveis. A eletroforese capilar foi um método comum a vários estudos, como os de Turingan et al. (2019), Dudás et al. (2020) e Ghaleb et al. (2019), para analisar os produtos amplificados, garantindo a identificação precisa dos alelos. A consistência no uso de técnicas avançadas e sensíveis destaca o progresso na análise de ADN em contexto forense, permitindo identificação confiável mesmo a partir de amostras degradadas.

Os estudos forneceram várias percepções importantes sobre fatores ambientais que afetam a qualidade e quantidade de ADN obtido de diferentes estruturas dentárias. Foi demonstrado que o cálculo dentário e os dentes saudáveis são fontes viáveis de ADN, com o cálculo dentário mostrando menor suscetibilidade à degradação ambiental. O estudo de Lozano-Peral et al. (2021) destacou que as temperaturas mais altas reduzem significativamente a quantidade e a qualidade do ADN, crucial para compreender as limitações do uso de amostras expostas ao calor. Por outro lado, os dentes saudáveis mostraram alta eficácia em fornecer ADN viável, essencial para identificações forenses, conforme demonstrado por Kumar e Sharma (2021) e outros. Wei et al. (2023) também ressaltaram a importância do cemento dentário como fonte de ADN, especialmente em ambientes onde o ADN da polpa pode encontrar-se degradado.

Os métodos de isolamento do ADNmt foram destacados em alguns estudos, revelando sua importância na identificação forense, especialmente quando o ADN nuclear está degradado ou em baixa quantidade. Emery et al. (2022) utilizaram procedimentos avançados de extração e sequenciação de ADNmt, demonstrando que é possível reconstruir genomas inteiros de ADNmt a partir de restos esqueléticos incinerados submetidos a temperaturas abaixo de 600°C. Esta abordagem é especialmente útil para identificar indivíduos em situações onde o ADN autossômico não é suficiente ou está degradado.

Além disso, as amostras de referência desempenham um papel fundamental na identificação forense. A maioria dos estudos usou amostras de dentes ou tecido bucal como referência para comparação de perfis genéticos. Por exemplo, Kumar e Sharma

(2021) utilizaram amostras de sangue de familiares para comparar e confirmar a identidade do falecido. Em casos onde as amostras de referência são escassas ou indisponíveis, como em estudos arqueológicos ou históricos, o uso de ADNmt pode fornecer informações valiosas sobre parentesco e origem étnica, complementando as análises baseadas em STR autossômicos e Y-STRs.

Apesar dos avanços, alguns desafios permanecem. Os fatores ambientais impactam significativamente a integridade do ADN, necessitando de protocolos rigorosos de limpeza e extração. Diferentes tipos de amostras dentárias e suas condições (e.g., incineradas, enterradas) afetam o rendimento e a qualidade do ADN. Pesquisas futuras devem focar-se na otimização dos métodos de extração para melhorar os rendimentos de amostras comprometidas, no desenvolvimento de kits de amplificação robustos capazes de trabalhar com ADN altamente degradado e explorar novos marcadores, como SNPs e ADNmt, para maior resolução e precisão nas identificações.

Para concluir a análise dos estudos de caso, destaca-se a importância das técnicas avançadas de extração e análise de ADN na identificação humana usando amostras dentárias. No entanto, a pesquisa contínua e as melhorias metodológicas são essenciais para superar os desafios existentes, como a degradação do ADN devido a fatores ambientais. Adicionalmente, são necessárias melhorias nos métodos de extração e o desenvolvimento de kits de amplificação mais robustos para garantir a confiabilidade da determinação de perfis de ADN forense. Com os avanços contínuos nesta área, espera-se que a identificação forense utilizando amostras dentárias se torne ainda mais precisa e eficiente, contribuindo significativamente para a ciência forense e a resolução de casos complexos.

IV. CONCLUSÃO

Este estudo confirmou que a análise genética de dentes é uma ferramenta poderosa na identificação humana, fornecendo evidências conclusivas em contextos forenses. A escolha do método de análise depende da condição da amostra e dos recursos disponíveis, sendo a combinação de várias técnicas frequentemente necessária para obter resultados confiáveis. A análise de STRs permanece o método *gold-standard* devido à sua especificidade e capacidade de diferenciar indivíduos com alta precisão. O ADNmt é essencial em casos onde o DNA nuclear está degradado, permitindo a identificação através de linhagens maternas. A análise de SNPs, embora ainda em desenvolvimento, oferece um nível adicional de detalhe que pode ser crucial em certas investigações.

Para maximizar a eficácia das identificações, é fundamental continuar o desenvolvimento e a otimização dessas técnicas, bem como a formação contínua dos profissionais envolvidos na recolha e análise das amostras. O avanço tecnológico e a padronização dos procedimentos contribuirão para a consolidação da medicina dentária forense como uma ciência indispensável na resolução de casos complexos e na prestação de justiça. A utilização combinada dessas técnicas, aliada a um rigor metodológico, garantirá que a identificação através do ADN dentário continue a evoluir, oferecendo respostas precisas e confiáveis num campo que é vital tanto para a ciência forense quanto para a sociedade.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agapito, G. & Arbitrio, M. (2022). Microarray Data Analysis Protocol. *Methods in Molecular Biology*, 2401, 263-271. doi:10.1007/978-1-0716-1839-4_17
- Ata-Ali, J. & Ata-Ali, F. (2014). Forensic dentistry in human identification: A review of the literature, *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 6(2), e162-7. doi:10.4317/jced.51387
- Becheler, L., Borst, N., Bakheit, M., Frischmann, S., Zengerle, R. & Von Stetten, F. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Analytical Methods*, 12, 717-746.
- Bianchi, I., Grassi, S., Castiglione, F., Bartoli, C., De Saint Pierre, B., Focardi, M., Oliva, A. & Pinchi, V. (2022). Dental DNA as an indicator of post-mortem interval (PMI): A pilot research. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12896. doi:10.3390/ijms232112896
- Budowle, B. (2004). SNP typing strategies. *Forensic Science International*, 146, S139-142. doi:10.1016/j.forsciint.2004.09.042
- Buś, M. M., Lembring, M., Kjellström, A., Strobl, C., Zimmermann, B., Parson, W. & Allen, M. (2019). Mitochondrial DNA analysis of a Viking age mass grave in Sweden. *Forensic Science International: Genetics*, 42, 268-274. doi:10.1016/j.fsigen.2019.06.002
- Cafiero, C., Re, A., Stigliano, E., Bassotti, E., Moroni, R. & Grippaudo, C. (2019). Optimization of DNA extraction from dental remains. *Electrophoresis*, 40, 1820-1823. doi:10.1002/elps.201900142
- Carabott, R. (2014). Dental human identification. In C. Adams, R. Carabott, & S. Evans (Eds.), *Forensic Odontology: An Essential Guide* (pp. 66-110). John Wiley & Sons, Ltd.
- Chávez-Briones, M. D., Jaramillo-Rangel, G., Ancer-Arellano, A., Ancer-Rodríguez, J. & Ortega-Martínez, M. (2023). Identification of the remains of an adult using DNA from their deciduous teeth as a reference sample. *Medicina (Kaunas)*, 59(10), 1702. doi:10.3390/medicina59101702
- Chen, T., Zhang, T., Yang, Y., Zhao, B. & Wu, C. (2020). Quantification of microbial DNA in laboratory environment during DNA extraction. *Chinese Journal of Biotechnology*, 36(12), 2541-2547. doi:10.13345/j.cjb.200526
- Cooley, A. M. (2023). Mitochondrial DNA analysis. *Methods in Molecular Biology*, 2685, 331-349. doi:10.1007/978-1-0716-3295-6_20
- De Donno, A., Mele, F., Baldassarra, S. L., Martini, A., Lauretti, C., Favia, M., Introna, F. & Santoro, V. (2020). DNA extraction from sternum bone for identification of a saponified body: use of a modified protocol. *Anthropol Anz*, 77(3), 235-242. doi:10.1127/anthranz/2020/1162
- De Ronde, M. W. J., Ruijter, J. M., Moerland, P. D., Creemers, E. E. & Pinto-Sietsma, S. J. (2018). Study design and qPCR data analysis guidelines for reliable circulating miRNA biomarker experiments: A review. *Clinical Chemistry*, 64(9), 1308-1318. doi:10.1373/clinchem.2017.285288
- Diepenbroek, M., Cytacka, S., Szargut, M., Arciszewska, J., Zielińska, G. & Ossowski, A. (2019). Analysis of male specific region of the human Y chromosome sheds

light on historical events in Nazi occupied eastern Poland. *International Journal of Legal Medicine*, 133(2), 395-409. doi:10.1007/s00414-018-1943-0

Dudás, E., Csany, M., Galambos, A., Vágó-Zalán, A. & Pamjav, H. (2020). DNA identification of relics of Blessed Stephen Sándor beatified by Pope Francis 2013. *Biologia Futura*, 71(1-2), 131-136. doi:10.1007/s42977-020-00002-y

Edson, S. M. (2019). Getting ahead: Extraction of DNA from skeletonized cranial material and teeth. *Journal of Forensic Sciences*, 64(6), 1646-1657. doi:10.1111/1556-4029.14123

Emery, M. V., Bolhofner, K., Ghafoor, S., Winingear, S., Buikstra, J. E., Fulginiti, L. C. & Stone, A. C. (2022). Whole mitochondrial genomes assembled from thermally altered forensic bones and teeth. *Forensic Science International: Genetics*, 56, 102610. doi:10.1016/j.fsigen.2021.102610

Gattu, S., Carihfield, C. L., Lu, G., Bwanali, L., Veltri, L. M. & Holland, L. A. (2018). Advances in enzyme substrate analysis with capillary electrophoresis. *Methods*, 146, 93-106. doi:10.1016/j.ymeth.2018.02.005

Ghaleb, S. S., Elwahab Hassan, D. A., Elroby, F. A., Mogassabi, K. R. & Attia Alemam, A. (2019). Identification of victims from mass grave discovery near Benghazi, Libya. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 67, 24-27. doi:10.1016/j.jflm.2019.07.012

Girish, K., Rahman, F. S. & Tippu, S. R. (2010). Dental DNA fingerprinting in identification of human remains. *Journal of Forensic Dental Sciences*, 2(2), 63-68. doi:10.4103/0975-1475.81284

Heathfield, L. J., Haikney, T. E., Mole, C. G., Finaughty, C., Zachou, A. M. & Gibbon, V. E. (2021). Forensic human identification: Investigation into tooth morphotype and DNA extraction methods from teeth. *Science & Justice*, 61(4), 339-344. doi:10.1016/j.scijus.2021.05.005

Hervella, M., Iñiguez, M. G., Izagirre, N., Anta, A. & De-la-Rúa, C. (2015). Nondestructive methods for recovery of biological material from human teeth for DNA extraction. *Journal of Forensic Sciences*, 60(1), 136-141. doi:10.1111/1556-4029.12568

Higgins, D. & Austin, J. J. (2013). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. *Science & Justice*, 53(4), 433-441. doi:10.1016/j.scijus.2013.06.001

Jayakrishnan, J. M., Reddy, J. & Vinod Kumar, R. B. (2021). Role of forensic odontology and anthropology in the identification of human remains. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 25(3), 543-547. doi:10.4103/jomfp.jomfp_81_21

Kayser, M. (2017). Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Human Genetics*, 136(5), 621-635. doi:10.1007/s00439-017-1776-9

Khan, A. A., Urs, A. B., Augustine, J. & Singh, H. (2020). Comparative forensic analysis of reverse root canal filing and conventional method for DNA isolation from extracted teeth under different environmental conditions: A prospective study. *Journal of Forensic Odontostomatology*, 38(3), 35-41.

Koehn, K., Buettner, A. & Lindner, I. (2020). Effect of sodium hypochlorite decontamination on the DNA recovery from human teeth. *International Journal of Legal Medicine*, 134(1), 93-99. doi:10.1007/s00414-019-02174-2

- Kumar, N. & Sharma, A. (2021). Human identification through DNA analysis of teeth using powder-free method - A case study. *Journal of Forensic Odontostomatology*, 39(1), 45-52.
- Lima, H. L. O. & Medeiros, U. V. (2015). Aplicabilidade do DNA em odontologia forense. *Odontologia Clínico-Científica*, 14(4), 801-808.
- Lim, L. & Ab Majid, A. H. (2023). Human profiling from STR and SNP analysis of tropical bed bug, *Cimex hemipterus*, for forensic science. *Scientific Reports*, 13(1), 1506. doi:10.1038/s41598-023-28774-y
- Lisman, D., Drath, J., Zielińska, G., Zacharczuk, J., Piątek, J., van de Wetering, T. & Ossowski, A. (2023). The evidential value of dental calculus in the identification process. *Scientific Reports*, 13(1), 21666. doi:10.1038/s41598-023-48761-7
- Liu, F., Jia, F., Sun, F., Zhao, B. & Shen, H. (2019). Validation of a multiplex amplification system of 19 autosomal STRs and 27 Y-STRs. *Forensic Science Research*, 5(4), 292-299. doi:10.1080/20961790.2019.1665158
- Lozano-Peral, D., Rubio, L., Santos, I., Gaitán, M. J., Viguera, E. & Martín-de-Las-Heras, S. (2021). DNA degradation in human teeth exposed to thermal stress. *Scientific Reports*, 11(1), 12118. doi:10.1038/s41598-021-91505-8
- Malaver, P. C. & Yunis, J. J. (2003). Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croatian Medical Journal*, 44(3), 306-309.
- Mansour, H., Krebs, O., Pinnschmidt, H. O., Griem, N., Hammann-Ehrt, I. & Püschel, K. (2019). Factors affecting dental DNA in various real post-mortem conditions. *International Journal of Legal Medicine*, 133(6), 1751-1759. doi:10.1007/s00414-019-02151-9
- McCombie, W. R., McPherson, J. D. & Mardis, E. R. (2019). Next-generation sequencing technologies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(11), a036798. doi:10.1101/cshperspect.a036798
- Mitchell, M. R., Chaseling, J., Jones, L., White, T., Bernie, A., Haupt, L. M., Griffiths, L. R. & Wright, K. M. (2023). Improving the strategy to identify historical military remains: A literature review and Y-STR meta-analysis. *Forensic Science Research*, 9(1), owad050. doi:10.1093/fsr/owad050
- Monsur Ali, M., Li, F., Zhang, Z., Zhang, K., Kang, D.-K., Ankrum, J. A., Le, X. C. & Zhao, W. (2014). Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chemical Society Reviews*, 43(10), 3324-3341. doi:10.1039/c3cs60439j
- Mohammed, F., Fairozekhan, A. T., Bhat, S. & Menezes, R. G., (2023, agosto 14). *Forensic Odontology*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540984/>
- Muruganandhan, J. & Sivakumar, G. (2011). Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry. *Journal of Forensic Dental Sciences*, 3(1), 38-45. doi:10.4103/0975-1475.85295
- Nandini, D. B. & Joji, J. G. (2020). Tooth as a source of DNA in forensic or investigative genetics: An overview. *Journal of Forensic Dental Sciences*, 12(3), 186-196. doi:10.18311/jfds/12/3/2020.617
- Nieuwkerk, D. M., Korajkic, A., Valdespino, E. L., Herrmann, M. P. & Harwood,

V. J. (2020). Critical review of methods for isothermal amplification of nucleic acids for environmental analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 179, 106099. doi:10.1016/j.mimet.2020.106099

Pontes, L., de Sousa, J. C. & Medeiros, R. (2017). SNPs and STRs in forensic medicine. A strategy for kinship evaluation. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 67(3), 226-240. doi:10.5114/amsik.2017.73194

Prajapati, G., Sarode, S. C., Sarode, G. S., Shelke, P., Awan, K. H. & Patil, S. (2018). Role of forensic odontology in the identification of victims of major mass disasters across the world: A systematic review. *PLoS One*, 13(6), e0199791. doi:10.1371/journal.pone.0199791.

Shbair, M., Adnan, A., Hao, P. & Liu, Y. (2021). Assessing the viability of carious lesions in human identification using STR typing. *Science Progress*, 104(2), 1-12. doi:10.1177/00368504211008054

Silva, N. S. & Passos, L. A. F. (2002). DNA forense: Coleta de amostras biológicas em locais de crime para estudo do DNA. Ed UFAL.

Silva, R.H.D., Peres, A.S., Oliveira, R.N.D., Oliveira, F.T.D. & Peres, S.H.S. (2007). Use of DNA technology in forensic dentistry. *Journal of Applied Oral Science*, 15(3), 156-161. doi:10.1590/s1678-77572007000300002

Smajlović-Skenderagić, L., Idrizbegović, S., Brkanić, L., Bilić, A., Huel, R. & Parsons, T. J. (2021). Challenges with co-amplification of microbial DNA in interpretation of STR profiles obtained from human skeletal remains. *Forensic Science International: Genetics*, 51, 102452. doi:10.1016/j.fsigen.2020.102452

Tomsia, M., Drożdżiok, K., Banaszek, P., Szczepański, M., Pałasz, A. & Chelmecka, E. (2022). The intervertebral discs' fibrocartilage as a DNA source for genetic identification in severely charred cadavers. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 18(4), 442-449. doi:10.1007/s12024-022-00536-8

Turingan, R. S., Brown, J., Kaplun, L., Smith, J., Watson, J., Boyd, D. A., Steadman, D. W. & Selden, R. F. (2019). Identification of human remains using Rapid DNA analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 134(3), 863-872. doi:10.1007/s00414-019-02186-y

Wang, D., Tao, R., Li, Z., Pan, D., Wang, Z. & Li, C., Shi, Y. (2020). STRsearch: a new pipeline for targeted profiling of short tandem repeats in massively parallel sequencing data. *Hereditas*, 157(1). doi:10.1186/s41065-020-00120-6

Wang, M., Liu, H., Ren, J., Huang, Y., Deng, Y., Liu, Y., Chen, Z., Chow, F. W.-N., Leung, P. H.-M. & Li, S. (2023). Enzyme-Assisted Nucleic Acid Amplification in Molecular Diagnosis: A Review. *Biosensors*, 13(2), 160. doi:10.3390/bios13020160

Wei, Y. F., Lin, C. Y., Yu, Y. J., Linacre, A. & Lee, J. C. (2023). DNA identification from dental pulp and cementum. *Forensic Science International Genetics*, 67, 102945. doi: 10.1016/j.fsigen.2023.102945.

Yu, C. & Abbott, P. V. (2007). An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian Dental Journal Endodontic Supplement*, 52(1), S4-S16. doi:10.1111/j.1834-7819.2007.tb00525.x

Yudianto, A. & Setiawan, F. (2020). The effectiveness of mini primer STR CODIS in DNA degradation as the effect of high-temperature exposure. *Analytical Cellular Pathology*, 2020, 2417693. doi:10.1155/2020/2417693

Zhou, W., Huang, J., Yang, X. & Zhang, X. (2024). Detection of dsRNA with Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Methods in Molecular Biology*, 2771, 35-38. doi:10.1007/978-1-0716-3702-9_6

Zupanič Pajnič, I. (2021). Identification of a Slovenian prewar elite couple killed in the Second World War. *Forensic Science International*, 327, 110994. doi:10.1016/j.forsciint.2021.110994

Zupanič Pajnič, I., Obal, M. & Zupanc, T. (2020). Identifying victims of the largest Second World War family massacre in Slovenia. *Forensic Science International*, 306, 110056. doi:10.1016/j.forsciint.2019.110056