UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

BRUNA SAUD BORGES

**Estimativa do intervalo *post mortem* pela degradação da molécula de RNA
proveniente da polpa de dentes submetidos ao meio aquático**

Ribeirão Preto

2019

BRUNA SAUD BORGES

**Estimativa do intervalo *post mortem* pela degradação da molécula de RNA
proveniente da polpa de dentes submetidos ao meio aquático**

Versão Corrigida

(A Versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP)

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência Médicas.

Área de Concentração: Patologia experimental

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Borges, Bruna Saud

Estimativa do intervalo *post mortem* pela degradação da molécula de RNA proveniente da polpa de dentes submetidos ao meio aquático. Ribeirão Preto, 2019.

74 p.: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientador: Silva, Ricardo Henrique Alves.

1. Estabilidade de RNA. 2.Odontologia Legal. 3.Ácidos nucleicos. 4. Biologia molecular

Folha de Aprovação

Bruna Saud Borges

Estimativa do intervalo *post mortem* pela degradação da molécula de RNA proveniente da polpa de dentes submetidos ao meio aquático

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia experimental

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1)Prof.(a). Dr.(a).:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

2)Prof.(a). Dr.(a).:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

3)Prof.(a). Dr.(a).:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus **pais Vanessa e Gustavo**, que sempre renunciaram seus sonhos em favor dos meus, pelo amor incondicional de sempre, apoio, carinho e compreensão para que pudesse concluir mais essa etapa da minha vida.

À minha **irmã Camila**, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me dando apoio, força e incentivo para que eu trilhasse meu caminho.

Agradecimientos

Agradeço,

Primeiramente a **Deus** que sempre foi meu guia e me deu força e coragem para lutar por meus sonhos, e pelas oportunidades que me foram concedidas.

À **Universidade de São Paulo**, à **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto** e ao **Departamento de Patologia e Medicina Legal**, especialmente aos seus funcionários, pela dedicação e paciência para tudo que eu precisasse.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru** e ao **Laboratório de Farmacologia, Fisiologia e Genética**, por me receberem para que eu pudesse desenvolver parte do trabalho, e em especial ao Prof. Dr. **Carlos Ferreira dos Santos** e ao **Thiago José Dionísio**, pelo carinho e disponibilidade para me ajudar na fase de laboratório.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**, em especial ao **Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal**, que foi minha casa por muito tempo, e me acolheu durante essa jornada.

À **Prefeitura** da Universidade de São Paulo do campus de Ribeirão Preto, pelo acesso ao Lago, me permitindo desenvolver a metodologia da minha pesquisa e ao pessoal do **Viveiro** do campus que disponibilizou vestimenta adequada para minha proteção.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Ricardo Henrique Alves da Silva**, que com tanto amor à profissão, me concedeu oportunidades, sempre foi dedicado e me apoiou para que chegasse até aqui, com palavras encorajadores e de incentivo.

Ao **CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil**, pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu companheiro **Getúlio** pelo apoio e paciência durante toda essa trajetória e por sempre acreditar em mim.

À toda minha **família** que direta ou indiretamente sempre me apoiou com palavras amigas.

Aos colegas de Departamento **Julia, Luciana, Paula, Victor e Tamara** que, inicialmente, quando cheguei na Universidade, me receberam com todo carinho. Agradecimento especial à **Paula**, que me auxiliou com várias etapas do trabalho.

Aos colegas guerreiros de Mestrado e Doutorado, **Ana Luísa, Giovanna, Larissa, Paulo, Silmara**, pela convivência, apoio, amizade, que sempre me deram forças e me fizeram crescer a cada dia. Vocês se tornaram uma família para mim. Obrigada pelo caminho que trilhamos juntos até aqui. Desejo todo sucesso do mundo para vocês. Agradeço especialmente à **Ana Luísa** e à **Silmara**, que tornaram grandes amigas e me ajudaram a superar cada obstáculo que aparecia no caminho, e que são muito especiais na minha vida.

Aos amigos que fiz durante meu Curso de Especialização em Odontologia Legal, especialmente os companheiros da mesa redonda, **Enock, Jody, Renata, Silmara e Tainá**, que acompanharam minha trajetória, sempre dando força e apoio. Obrigada pelos momentos que passamos juntos.

"O presente trabalho foi realizado com apoio do **CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil**".

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Resumo

RESUMO

BORGES, Bruna Saud. **Estimativa do intervalo *post mortem* pela degradação da molécula de RNA proveniente da polpa de dentes submetidos ao meio aquático.** 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2019.

O espaço de tempo entre a morte de um indivíduo e a descoberta do corpo ou remanescentes humanos é denominado intervalo *post mortem* (IPM) e, recentemente, o RNA ganhou potencial para ser investigado na área forense na estimativa de intervalo *post mortem*, sendo este um processo complexo que necessita de estudos aprofundados. Com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar a aplicabilidade da utilização do método de quantificação da degradação do RNA extraído de polpas dentais para utilização na estimativa do intervalo *post mortem*, por meio da simulação de condições de afogamento com dentes submersos em água doce expostos a diferentes intervalos de tempo. A amostra foi composta pelo total de 80 dentes humanos, especificamente terceiros molares que foram extraídos por indicação terapêutica, os quais foram divididos em 8 grupos de 10 dentes cada. Os dentes foram submetidos ao meio aquático pelos períodos de três dias, uma semana, duas semanas, três semanas, quatro semanas, oito semanas, doze semanas e dezesseis semanas. Posteriormente, foi realizada a extração da polpa dental, extração da molécula de RNA e análise da degradação da molécula. Após as análises, o maior número de integridade da molécula de RNA (RIN) encontrado foi 6,50, sendo que ele nos fornece valores que vão de 1 a 10, que significa dizer que a molécula está completamente degradada e completamente intacta, respectivamente, e os resultados mostraram moléculas muito degradadas, destacando o fato das amostras terem sido submetidas ao meio ambiente, simulando condições reais do dia a dia, o que pode ter sido fator primordial para justificar os resultados encontrados nesse trabalho. Assim, conclui-se que o método de quantificação da degradação do RNA não foi aplicável, uma vez que não foi possível estabelecer uma relação entre a degradação da molécula de RNA com a estimativa do intervalo *post mortem*.

Palavras-chave: Estabilidade de RNA, Odontologia Legal, Ácidos nucleicos, Biologia molecular

Abstract

ABSTRACT

BORGES, Bruna Saud. **Estimation of *post mortem* interval by degradation of RNA molecule from pulp of teeth submitted to aquatic environment.** 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2019.

The time between the death of an individual and the discovery of the body or human remains is denominated *post mortem* interval (PMI), and recently RNA has gained potential to be investigated in the forensic field related to the *post mortem* interval estimation, a complex process that requires in-depth studies. The objective of this study was to evaluate the applicability of the method of quantification of the degradation of RNA extracted from dental pulps for use in the estimation of the *post mortem* interval by simulating drowning conditions with freshwater submerged teeth exposed to different time intervals. The sample consisted of a total of 80 human teeth, specifically third molars that were extracted by therapeutic reasons, which were divided into 8 groups of 10 teeth each. The teeth were submitted to the aquatic environment for periods of three days, one week, two weeks, three weeks, four weeks, eight weeks, twelve weeks and sixteen weeks. Subsequently, dental pulp extraction, RNA molecule extraction and molecule degradation analysis were performed. After the analysis, the highest number of RNA molecule (RIN) integrity found was 6.50, which gives us values ranging from 1 to 10, which means that the molecule is completely degraded and completely intact, respectively. and the results showed very degraded molecules, highlighting the fact that the samples were submitted to the environment, simulating real conditions of everyday life, which may have been a prime factor to justify the results found in this work. Thus, it is concluded that the method of quantification of RNA degradation was not applicable, since it was not possible to establish a relationship between degradation of the RNA molecule with the estimation of the *post mortem* interval.

Key-words: RNA Stability, Forensic Dentistry, Nucleic Acids, Molecular Biology

Lísta de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Freezer Thermo Scientific Forma 8600 Series -86C Ultra-low, Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil	36
Figura 2- Vista externa da região da área do lago da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.....	37
Figura 3- Demonstração de armazenamento dos grupos de elementos dentais dentro do saco de poliéster confeccionado nas dimensões 16x13 cm.....	38
Figura 4- Gaiola onde foram depositados os sacos contendo os grupos com os elementos dentais.....	38
Figura 5- Posicionamento da broca paralela à junção cimento-esmalte, distando 2 mm da mesma.....	39
Figura 6- Posicionamento do fórceps cirúrgico utilizado para separação entre coroa e raiz dental e exposição da polpa dental.....	40
Figura 7- Elemento dental após a completa remoção da polpa dental e solução RNAlater (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) utilizada para acondicionar as polpas.....	40
Figura 8- MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) e plataforma automatizada de manipulação de líquidos Microlab NIMBUS (Hamilton CompanyR, Reno, Estados Unidos)	41
Figura 9- RNA 6000 Nano (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) e Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos)	42
Figura 10- Resultado da amostra padrão após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos)	47
Figura 11- Resultados das amostras do grupo 0 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos)	48
Figura 12- Resultados das amostras do grupo 1 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos)	48
Figura 13- Resultados das amostras do grupo 2 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos)	49
Figura 14- Resultados das amostras do grupo 3 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos)	50
Figura 15- Resultados das amostras do grupo 4 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos)	50

Figura 16- Resultados das amostras do grupo 5 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (AgilentTM, Califórnia, Estados Unidos)	51
Figura 17- Resultados das amostras do grupo 6 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (AgilentTM, Califórnia, Estados Unidos)	52
Figura 18- Resultados das amostras do grupo 7 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (AgilentTM, Califórnia, Estados Unidos)	52
Figura 19- Gráfico de dispersão linear, demonstrando a falta de linearidade entre as variáveis.....	53

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Períodos nos quais cada grupo de dentes ficaram submetidos ao meio aquático.....	36
Tabela 2- Amostras que continham polpa visível a olho nu em cada grupo.....	45
Tabela 3- Identificação de todos os elementos dentais de cada grupo, demonstrando em quais havia a presença de polpa.....	46
Tabela 4- Números de integridade do RNA (RIN), obtidos para cada grupo com seus respectivos períodos.....	53

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APCD	Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas
ARN	Ácido ribonucleico
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
DNA	Deoxyribonucleic acid
INTERPOL	<i>International Criminal Police Organization</i>
IPM	Intervalo <i>post mortem</i>
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossômico
RIN	RNA <i>integrity number</i>
RNA	Ribonucleic acid
tRNA	RNA transportador
USP	Universidade de São Paulo

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Intervalo <i>post mortem</i>	24
1.2. Óbito por asfixia na modalidade afogamento.....	25
1.3. Estruturas dentais no processo de identificação humana e na estimativa do intervalo <i>post mortem</i>	26
1.4. Biologia molecular na estimativa do intervalo <i>post mortem</i>	27
2. OBJETIVO.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Aspectos éticos.....	35
3.2. Obtenção das amostras.....	35
3.3. Separação e armazenamento das amostras.....	35
3.4. Submissão às condições de afogamento e de tempo.....	37
3.5. Extração da polpa dental.....	39
3.6. Isolamento da molécula de RNA.....	41
3.7. Análise da degradação da molécula de RNA.....	41
3.8. Análise dos dados.....	42
4. RESULTADOS	44
4.1. Elementos dentais com tecido pulpar aparente.....	45
4.2. Quantificação da Integridade da molécula de RNA.....	46
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	72
ANEXO B – Autorização para acesso ao lago da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto -SP, concedida pela Prefeitura do campus.....	73

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Intervalo *post mortem*

A morte é, muitas vezes, repentina, porém inevitável. Um dos fatores que implica na qualidade da investigação de um caso, se deve ao fato de não se saber em que momento o episódio ocorreu, quando o cadáver é encontrado (GARRIDO; NAIA, 2014).

O espaço de tempo que existe entre a morte de um indivíduo e a descoberta do corpo do mesmo é denominado intervalo *post mortem* (IPM), e o ramo da Medicina Legal tem se preocupado com estudos nessa área, para que se torne possível o esclarecimento de informações sobre o contexto da morte (DIAS, 2017). Quando se trata de esqueletos mais antigos, mais difícil se torna a estimativa desse intervalo (CATTANEO, 2007).

O IPM vem sendo descrito como um dos principais temas estudados em ciências forenses, criminais e cíveis (SILVA et al., 2013). Uma de suas funções é auxiliar na reconstrução das informações de casos de homicídio e morte suspeita, podendo excluir e limitar o número de suspeitos de um caso (YOUNG, et al., 2013).

Existem diversas técnicas utilizadas para estimar o IPM e na Tanatologia Forense, encontra-se disponível a cronotanatognose, utilizada para conhecer o tempo da morte, que analisa os sinais cadavéricos do corpo, e que por vezes é de difícil aplicação, uma vez que depende de vários fatores internos e externos. Quanto maior esse intervalo, mais difícil se torna a sua aplicação, sendo possível notar semanas de diferença (MENON et al., 2011; GARRIDO; NAIA, 2014).

Já a Entomologia Forense é a área da ciência que objetiva auxiliar na estimativa do IPM através do estudo de insetos encontrados no cadáver e ao redor, além de colaborar com informações relacionadas à estação do ano e local da morte (GONÇALVES, 2014). Essa área de estudo nos permite também, além de informações sobre a data do óbito, conhecimentos sobre a manipulação e deslocamento de corpos (MEIRA; BARROS, 2015).

A presença de remanescentes ósseos, remete a importância da Antropologia Forense, que trabalha com corpos esqueletizados, muito decompostos ou carbonizados. A área visa traçar um perfil biológico da vítima a fim de auxiliar no

processo de identificação. O IPM é uma questão difícil de ser respondida pela Antropologia Forense, devido à ausência de métodos que possam auxiliar no estabelecimento desse intervalo nessa área (CATTANEO, 2007).

Cada método utilizado para se estimar o IPM é dependente das condições de umidade e temperatura do local, sendo assim é necessário analisar cada situação individualmente para se estabelecer qual a melhor técnica a ser empregada para o caso em questão (NAIA, 2014). Muitos ainda permanecem imprecisos e pouco relevantes para se estimar o IPM, mesmo quando aplicados no período inicial dele. Novos métodos têm sido testados e uma proposta de utilização de vários deles em conjunto tem sido utilizada para tentar reduzir a margem de erro (SILVA et al., 2013).

Existe uma necessidade em testar novos métodos de estimativa de IPM simulando condições ambientais reais, para que os mesmos possam ser avaliados quanto sua aplicabilidade e possam ser utilizados em casos forenses, uma vez que essa estimativa também está sujeita a alterações do meio em que o corpo ou seus remanescentes são encontrados (COSTA, 2018).

1.1 Óbito por asfixia na modalidade afogamento

O afogamento é considerado um tipo de trauma que causa a morte por asfixia, por meio de submersão. Ocorre principalmente em água doce, e sua verdadeira incidência ainda não é precisa, porém é considerada causa expressiva de óbitos, e no Brasil, existem poucos estudos no que diz respeito ao afogamento (NETO et al., 2006; ARAUJO et al., 2008).

As causas do afogamento podem ser acidental, homicida ou suicida. A forma acidental, a mais comum, acontece por um episódio imprevisível. O homicídio ocorre quando o óbito é provocado por outra pessoa, seja de forma culposa ou dolosa. Já no suicídio, o óbito é causado pela própria pessoa, que deseja de forma intencional, matar a si mesma (MUSSE, 2007).

Szpilman (2000) traz que no ano de 1995, o Brasil contou com 7.020 óbitos provocados por afogamento, sendo que o Estado de São Paulo apareceu em primeiro lugar com 1.712 casos. O autor relata ainda que homens morrem cinco vezes mais que as mulheres quando se trata de afogamento, sendo a terceira causa, quando se trata de morte acidental no país, em qualquer idade (SZPILMAN, 2000). De acordo

com o Ministério da Saúde, no ano de 2016 ocorreram 5.071 óbitos por afogamento e submersões acidentais no Brasil (BRASIL, 2016).

1.2 Estruturas dentais no processo de identificação humana e na estimativa do intervalo *post mortem*

A *International Criminal Police Organization* (INTERPOL) classifica os métodos de identificação humana em primários e secundários. Dentre os métodos primários estão análise de impressões digitais (datiloscopia), análise odontológica comparativa e análise de DNA. Já os métodos secundários de identificação são descritos como meios auxiliares, os quais por si só não são suficientes para estabelecer a identidade. Dentre eles encontram-se os achados médicos, descrição pessoal, roupas, entre outros itens pessoais.

Os dentes possuem estruturas histológicas similares, porém diferem em sua forma e tamanho. Dentre seus tecidos estão a dentina, esmalte, cemento e polpa, e os dentes e os ossos são estruturas consideráveis para realizar análise de material genético de restos humanos (MALAVER; YUNIS, 2003).

As estruturas dentais são consideradas as mais resistentes do corpo humano e capazes de suportar as condições mais variadas do meio como alta temperatura e umidade, resistem à degradação *post mortem*, podendo ser presumível que sejam encontrados nesses tipos de acidentes e estejam disponíveis para avaliar e realizar a identificação, uma vez que os outros meios para isso estejam destruídos (MALAVER; YUNIS, 2003; SILVEIRA, 2006; KRISHAN; KANCHAN; GARG, 2015).

A cavidade pulpar possui uma proteção das estruturas dentais, formada pelo esmalte, dentina e cemento, e dentro dessa proteção encontra-se a polpa dental que pode ser recuperada para extração de DNA e realização de análises genéticas dentro da prática forense (VIEIRA; TAVARES; BOUCHARDET, 2010). A polpa dental possui uma massa central rica em fibroblastos e odontoblastos, contendo baixos níveis de atividade de RNases (POÓR et al., 2016), e a câmara pulpar confere uma proteção a diversos fatores ambientais. Conde et al. (2012) mostraram em seu estudo que a polpa dental é um tecido que pode ser utilizado como fonte para análise de integridade de RNA.

A Odontologia Legal é uma especialidade da Odontologia que visa a busca da identificação, analisando características presentes nos elementos dentais, que são considerados o tecido mais resistente do corpo, diferentes em cada indivíduo (KRISHAN; KANCHAN; GARG, 2015), e para casos de identificação, possuem rica fonte de DNA (VIEIRA; TAVARES; BOUCHARDET, 2010).

A cavidade pulpar é um elemento presente no dente, que é protegida por um arcabouço (esmalte, dentina e cemento), e por isso são priorizadas para análises genéticas por oferecer um meio seguro para o DNA (POÓR et al., 2016). Podemos contar com extração de DNA de saliva e dentes, que são considerados os tecidos que mais resistem às alterações *post mortem*. A identificação por meio do DNA é feita através de comparações de perfis genéticos (GONÇALVES, 2016).

Uma vez que a polpa dental se encontra protegida por outras estruturas, pode apresentar melhor circunstância para que possa ser realizada a extração de DNA para análise. Algumas técnicas podem ser utilizadas para extração de DNA do elemento dental, dentre elas temos a trituração dental, secção horizontal e extirpação da polpa por irrigação. Cada processo envolve suas devidas precauções para que o material de análise não seja perdido ou destruído (SILVA et al., 2006).

Para casos de identificação humana, o dente é considerado uma boa fonte de material genético, e a utilização de DNA nesses casos é feita através da comparação de perfis genéticos do cadáver com amostras de referência da suposta vítima e ainda da família dela. Das estruturas que constituem o elemento dental, conseguimos extrair boa quantidade de DNA da polpa e da dentina, porém, o esmalte dental não é considerado uma fonte de DNA (GONÇALVES, 2016).

1.3 Biologia molecular na estimativa do intervalo *post mortem*

O *deoxyribonucleic acid* (DNA) ou, no português, ácido desoxirribonucleico (ADN) é uma macromolécula de informação, muito estável quimicamente, cuja estrutura possui duas fitas helicoidais (fitas essas compostas por monômeros chamados de nucleotídeos) longas, enroladas em um eixo comum e forma uma dupla hélice (LODISH et al., 2014).

A constituição do DNA é dada através de uma longa fita dupla de nucleotídeos, e cada um deles possui uma base nitrogenada podendo ser: adenina (A), guanina (G),

timina (T) e citosina (C), onde A obrigatoriamente faz pareamento com T (A=T), e G com C (G=C). É responsável por formar as características genéticas de todos seres vivos, inclusive do homem (KLUG et al., 2010; JOBIN et al., 2018)

Já o ribonucleic acid (RNA), ou no português, ácido ribonucleico (ARN) é quimicamente similar ao DNA, porém sua estrutura é formada por uma fita única, possui o açúcar ribose no lugar de desoxirribose e no lugar da base nitrogenada timina (T) tem-se a substituta uracila (U) em seus nucleotídeos (KLUG et al., 2010). A função de reparo da timina (T), que é substituta da uracila (U) no DNA, faz com que ele seja mais estável (LODISH et al., 2014).

O DNA pode ser encontrado e coletado através de amostras biológicas como sangue, saliva, sêmen, entre outras, e o elemento dental também está entre os “materiais” que possui DNA em abundância. Esse DNA pode ser genômico (encontrado nos cromossomos do núcleo), ou mitocondrial que é aquele encontrado nas mitocôndrias. É válido ressaltar que em algumas condições, o estudo do DNA não é viável devido à contaminação, degradação ou pouca quantidade de material disponível para análise (VIEIRA; TAVARES; BOUCHARDET, 2010).

Para casos forenses, o DNA genômico é muito utilizado, pois ali estão localizados os genes que carregam as informações genéticas, sendo possível comparar amostras obtidas, com amostras *ante mortem* ou com material genético paterno e/ou materno (MUSSE, 2007). Porém, o DNA mitocondrial também é bastante utilizado em âmbito forense, em casos onde a quantidade de material é pequena ou degradada, por possuir em cada célula humana um grande número de cópias, e por ser mais resistente à degradação do que o DNA genômico. Porém vale elucidar, que em alguns casos a utilização do DNA mitocondrial não é possível uma vez que ele é exclusivamente de origem materna (MUSSE, 2007; VIEIRA; TAVARES; BOUCHARDET, 2010).

Durante a expressão das informações genéticas funcionam três classes principais de RNA: RNA ribossômico (rRNA), RNA mensageiro (mRNA) e RNA transportador (tRNA). O rRNA compõe cerca de 80% de todo RNA de uma célula, sendo elemento estrutural dos ribossomos onde as proteínas são sintetizadas. A responsabilidade de carregar as informações genéticas do DNA do gene para o ribossomo é do mRNA, seu tamanho pode variar de uma célula para outra. Já o tRNA carrega aminoácidos para o ribossomo (KLUG et al., 2010).

O ribossomo possui um importante papel na expressão da informação genética (KLUG et al., 2010), e consiste no complexo de RNA-proteína mais abundante da célula. Apesar de haver diferenças entre os ribossomos de procariotos e eucariotos, em todas as células, cada um é composto por uma subunidade grande e uma pequena. Em bactérias por exemplo, um ribossomo é composto por três moléculas de rRNA, e em eucariotos quatro moléculas. Cada uma possui duas moléculas principais (em bactérias 23S e 16S, e em vertebrados 28S e 18S) (LODISH et al., 2014).

A Biologia Molecular é uma área da Ciência que estuda o DNA, RNA e as proteínas. As técnicas desenvolvidas nessa temática trazem avanços importantes e novas possibilidades de pesquisas em diversas áreas (HEPP; NONOHAY, 2016). O DNA degrada-se de forma simples e continuada, o que permite uma maior exatidão da estimativa do intervalo *post mortem* e tem sido considerado um método confiável e preciso para esses casos (DIAS, 2017).

Existe uma necessidade, devido os avanços na Biologia Molecular, de se estudar a degradação dependente do tempo, dos ácidos nucleicos. A estabilidade do DNA em períodos *post mortem* já é mais conhecida (BAUER et al., 2003), entretanto, alguns estudos vêm sendo feitos com o intuito de analisar a degradação da molécula do RNA, e sua relação na estimativa no IPM (CATTS et al., 2005; HEINRICH et al., 2007; POÓR et al., 2016).

O RNA é mais instável e mais complexo (DIAS, 2017). Apresenta degradação mais rápida após a morte devido as enzimas RNases (HAAS et al., 2009), porém mesmo sendo mais susceptível à hidrólise, se torna mais estável em casos de depurinação e depirimidização (FORDYCE et al., 2013). A degradação do RNA pode ser influenciada por fatores externos, e a influência de um prolongado intervalo *post mortem* pode variar de acordo com o tecido utilizado (VENNEMANN; KOPPELKAMM, 2010).

A degradação do RNA no período *post mortem* nos tecidos depende da condição em que o corpo é armazenado, e das condições ambientais, sendo que os processos que causam degradação tanto químicos quanto térmicos podem ocorrer após a morte, auxiliando o processo de degradação dessa molécula (HEINRICH et al., 2007).

Devido ao fato do RNA se degradar mais rapidamente do que o DNA, a sua capacidade em possuir informação genética ainda é pouco explorada em pesquisas

post mortem, portanto, por ser portador de informações valiosas, o RNA carece de mais estudos nessa área (FORDYCE et al., 2013).

A influência nos níveis de degradação do RNA é única para cada cenário *post mortem*. A atividade enzimática da RNase é responsável por grande parte da degradação do RNA de um cadáver ou fragmentos. Já em superfícies desidratadas como manchas de sangue e saliva, a atividade dessa enzima se torna reduzida e os fatores físicos e químicos se tornam os maiores responsáveis pela degradação (FORDYCE et al., 2013).

Recentemente o RNA ganhou potencial para ser investigado na área forense na questão de determinação de intervalo *post mortem*, porém sua degradação no período *post mortem* é um processo complexo que necessita de estudos aprofundados (PARTEMI et al., 2010).

A análise da integridade do RNA vinha sendo feita por meio da técnica de gel de agarose corada pelo brometo de etídio, que mostra as duas bandas correspondentes ao RNA ribossomal 18S e 28S, sendo que quando a relação entre elas é igual ou maior a 2 é considerada boa. A empresa Agilent introduziu o sistema 2100 *bioanalyzer*, onde de acordo com o peso molecular, pequenas quantidades de RNA são separadas e o resultado se dá através de uma curva de eletroferograma, produzindo um algoritmo que nos fornece um RNA *integrity number* (RIN), que vai de 1 a 10 (de pior à melhor qualidade de integridade respectivamente) (SILVA; GARCIA, 2008).

Na literatura, pode-se notar que existem alguns estudos que exploraram as alterações na degradação na molécula de RNA para sua aplicação na estimativa do IPM. Catts et al. (2005) utilizaram cérebros de ratos para coleta e análise de RNA e chegaram à conclusão de que o aumento do IPM estava relacionado com a degradação do RNA, classificada pela relação RNA ribossomal 28S/18S.

Heinrich et al. (2007) investigaram em diversos tecidos do corpo humano, quais eram apropriados para análise de RNA após a morte e se a degradação do RNA é um fator relevante para o IPM e concluíram que pelo menos alguns tecidos como músculo, cérebro e tecido cardíaco, são relevantes para análise de RNA *post mortem*.

Poór et al. (2016) analisaram RNA extraídos de polpas de pré-molares e terceiros molares, para mostrar se a degradação do RNA proveniente dessas

amostras, poderiam ser usadas para a estimativa do IPM e concluíram que o método apesar de suas limitações, é promissor no que diz respeito à estimativa do IPM.

Objetivo

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a aplicabilidade do método de quantificação da degradação do RNA extraído de polpas dentais para utilização na estimativa do intervalo *post mortem*, por meio da simulação de condições de afogamento com dentes submersos em água doce expostos a diferentes intervalos de tempo.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), sob o número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 67257617.4.0000.5440, a fim de cumprir todas as exigências da Resolução 466/12 (BRASIL, 2012).

3.2 Obtenção das amostras

Os participantes foram esclarecidos sobre a pesquisa e retiraram todas as dúvidas dela previamente à coleta das amostras, preenchendo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente. Os integrantes do estudo foram pacientes que passaram por intervenção cirúrgica na clínica de Cirurgia da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas (APCD) do município de Ribeirão Preto.

A amostra foi composta pelo total de 80 dentes humanos. Os critérios de inclusão eram: terceiros molares extraídos por indicação terapêutica, onde os elementos dentais deveriam estar íntegros e hígidos, não existindo a fragmentação do mesmo durante o procedimento cirúrgico.

Após a extração, os dentes não poderiam conter: patologias periapicais; ápices abertos; lesões cariosas; fraturas em regiões de coroa e raiz; tratamentos endodônticos; tratamentos restauradores e/ou reabilitações protéticas no geral. Os dentes que apresentaram algumas dessas alterações não entraram para a amostra.

3.3 Separação e armazenamento das amostras

Após a coleta total de 80 dentes, eles foram separados em 8 grupos de 10 cada, correspondentes aos períodos aos quais foram submetidos a meio aquático. Os grupos foram divididos conforme tabela 1:

Tabela 1. Períodos nos quais cada grupo de dentes ficaram submetidos ao meio aquático.

Grupo	Período
Grupo 0	3 dias
Grupo 1	1 semana
Grupo 2	2 semanas
Grupo 3	3 semanas
Grupo 4	4 semanas
Grupo 5	8 semanas
Grupo 6	12 semanas
Grupo 7	16 semanas

Fonte: Tabela de autoria própria

Após a coleta, os dentes eram armazenados primeiramente em freezer -80°C (Thermo Scientific Forma 8600 Series -86C Ultra-low, Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) para evitar o início da degradação da molécula de RNA (COSTA, 2018) até completar o número suficiente para formação do seu respectivo grupo e posteriormente submeter ao meio aquático (Figura 1).

Figura 1- Freezer Thermo Scientific Forma 8600 Series -86C Ultra-low, Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil.

Fonte: COSTA, 2018.

3.4 Submissão às condições de afogamento e de tempo

Com a intenção de simular as condições de um processo de afogamento, os grupos amostrais foram submersos em lago de água doce, na área da Universidade de São Paulo (USP), no município de Ribeirão Preto, estado de São Paulo (Figura 2). A área da região do lago da USP foi utilizada com autorização da Prefeitura do campus e seguida todas as recomendações dadas aos pesquisadores (Anexo A).

Figura 2- Vista externa da região da área do lago da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

Fonte: Campus USP Ribeirão Preto¹

Inicialmente foram confeccionados sacos em poliéster (tipo filó) com as dimensões de 16x13 cm, para armazenar cada grupo de dez elementos dentais. Os sacos eram identificados de acordo com o grupo e o período a qual seria submetido e fechado com um elástico (Figura 3).

¹ Disponível em: < <http://www.imagens.usp.br/?p=31756>>. Acesso em: 6 mai. 2019.

Figura 3- Demonstração de armazenamento dos grupos de elementos dentais dentro do saco de poliéster confeccionado nas dimensões 16x13 cm.

Fonte: Imagem de autoria própria

Após esse procedimento, os sacos foram depositados em uma gaiola para pássaros, para que ficassem em segurança no lago e o grupo amostral não fosse perdido (Figura 4). A gaiola foi amarrada em uma árvore através de uma corrente fechada por cadeados e foi lançada no lago em uma profundidade de cerca de um metro, devido ao acesso disponível ao lago.

Figura 4. Gaiola onde foram depositados os sacos contendo os grupos com os elementos dentais.

Fonte: Imagem de autoria própria

Após os grupos permanecerem submersos pelos períodos pré-estabelecidos, os sacos foram retirados da gaiola, os elementos dentais foram removidos e iniciou-se imediatamente a etapa de extração da polpa dental.

3.5 Extração da polpa dental

Essa etapa foi realizada da seguinte maneira: foram utilizadas brocas Carbide odontológica nº 701 e um motor de alta rotação para seccionar os dentes e, na sequência, foi confeccionada uma canaleta a 2 mm da junção cimento-esmalte sem romper a coroa e a raiz completamente (Figura 5), sendo a separação total realizada com auxílio de um fórceps cirúrgico nº 151 para que a polpa dental fosse exposta (Figura 6). Com auxílio de limas endodônticas números 10 e 15 e escavador de dentina nº 16, a polpa dental coronal e radicular dos dentes foram removidas e armazenadas em *ependorfs* individuais contendo 0,5 mL de RNAlater (Thermo Fisher ScientificTM, São Paulo, Brasil) e os mesmos foram devidamente identificados (Figura 7). Os *ependorfs* contendo a solução de RNAlater e as respectivas polpas dentais foram armazenados em freezer com temperatura de -20°C até a etapa de extração da molécula de RNA.

Figura 5. Posicionamento da broca paralela à junção cimento-esmalte, distando 2 mm da mesma.

Fonte: Imagem de autoria própria

Figura 6. Posicionamento do fórceps cirúrgico utilizado para separação entre coroa e raiz dental e exposição da polpa dental.

Fonte: Imagem de autoria própria

Figura 7- Elemento dental após a completa remoção da polpa dental e solução RNAlater (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) utilizada para acondicionar as polpas.

Fonte: Imagem de autoria própria

3.6 Isolamento da molécula de RNA

A etapa de isolamento da molécula de RNA e a análise da sua degradação foi realizada no laboratório de Farmacologia, Fisiologia e Genética da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo.

O início do processo de isolamento se deu com todos os instrumentos, materiais de trabalho e bancada sendo tratado com RNase Zap (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) para evitar a degradação da molécula de RNA.

Para viabilizar a utilização de qualquer pedaço de tecido pulpar que estivesse presente nos *ependorfs*, após essa etapa os tubos passaram por um processo de centrifugação. A molécula de RNA foi extraída e isolada utilizando o MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) na plataforma automatizada de manipulação de líquidos Microlab NIMBUS (Hamilton CompanyR, Reno, Estados Unidos) (Figura 8).

Figura 8. MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) e plataforma automatizada de manipulação de líquidos Microlab NIMBUS (Hamilton CompanyR, Reno, Estados Unidos).

Fonte: Thermofisher e Hamiltoncompany ²

3.7 Análise da degradação da molécula de RNA

A avaliação da integridade do RNA foi feita através do uso dos kits de RNA 6000 Nano (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) que utilizam eletroforese baseada em chip microfluídrico para sua análise. As amostras foram analisadas com o sistema

² Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A27828>> e <<https://www.hamiltoncompany.com/automated-liquid-handling/platforms/microlab-nimbus>>. Acesso em: 6 mai. 2019.

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), e o número de integridade do RNA (RIN) foi calculado usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) (Figura 9).

O software fornece uma avaliação da integridade do RNA, detalhando a distribuição do tamanho de seus fragmentos. Seu método de aplicação é usuário independente, possui uma boa sensibilidade, e avalia a proporção das subunidades ribossomais 18S a 28S (MUELLER; LIGHTFOOT; SCHROEDER, 2016).

O sistema avalia até 12 amostras em cada chip, de forma fácil e simples, e gasta desde a preparação da amostra até a execução, menos de uma hora para cada chip. Os kits de RNA permitem a análise da qualidade do mesmo e atribui um RNA *Integrity Number* (RIN), ou seja, um número de integridade de RNA (BIOCOMPARE, 2009). O RIN nos fornece valores que vão de 1 a 10, que significa dizer que a molécula está completamente degradada e completamente intacta, respectivamente (MUELLER; LIGHTFOOT; SCHROEDER, 2016).

Figura 9- RNA 6000 Nano (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) e Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: Biocompare e Integrated Sciences.³

3.8 Análise dos dados

Foi realizada uma análise descritiva onde os resultados foram apresentados em forma de tabelas ilustrativas e gráficos, apresentando um RIN para cada grupo

³ Disponível em: <<https://www.biocompare.com/Product-Reviews/40310-Bioanalyzer-2100-RNA-6000-Nano-Kit-From-Agilent-Technologies/>> e <<http://www.integratedsci.com.au/product/rna-6000-nano-kit-and-reagents.html>>. Acesso em: 6 mai. 2019.

que foi possível realizar a leitura da integridade do RNA descrevendo os valores de cada um.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Elementos dentais com tecido pulpar aparente

Após os dentes serem retirados da condição de simulação de afogamento pelos períodos determinados, eles passaram imediatamente para a etapa de extração da polpa dental, onde após a secção e separação em coroa e raiz, foi possível a detecção da mesma, visível a olho nu, em apenas algumas amostras, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Amostras que continham polpa visível a olho nu em cada grupo.

Grupo	Tempo de submersão	Número de elementos dentais com polpa visível a olho nu
0	3 dias	10
1	1 semana	7
2	2 semanas	3
3	3 semanas	5
4	4 semanas	0
5	8 semanas	0
6	12 semanas	2
7	16 semanas	5

Fonte: Tabela de autoria própria

Do total das amostras (n=80), foi possível verificar polpa dental visível a olho nu em 40% delas (n=32), sendo os grupos 0 e 1 os que mais contavam com esse tecido, e os grupos 4 e 5 não apresentaram nenhum dente com polpa dental visível a olho nu.

Nas amostras que não aparentavam tecido pulpar aparente, foi realizado uma raspagem nas paredes internas, com o auxílio de escavador de dentina nº16, na tentativa de que se houvesse algum material presente, ele fosse coletado.

Em cada grupo, os dez dentes foram identificados primeiramente pelas letras de A até J, demonstrando os que continham polpa, para posteriormente relacionar a presença de polpa com a quantidade de RNA presente na amostra e análise do material (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação de todos os elementos dentais de cada grupo, demonstrando em quais havia a presença de polpa.

Grupo	Letras dos dentes que continham polpa
0	A
	B
	C
	D
	E
	F
	G
	H
	I
	J
1	A
	B
	E
	F
	G
	H
	I
	A
	D
	F
2	A
	B
	C
	E
	I
	-
	-
	A
	B
	A
3	B
	C
	D
	E
	F
	G
	H
	I
	A
	B
4	A
	B
	C
	D
	E
	F
	G
	H
	I
	J
5	A
	B
	C
	D
	E
	F
	G
	H
	I
	J
6	A
	B
	C
	D
	E
	F
	G
	H
	I
	J
7	A
	B
	C
	D
	E
	F
	G
	H
	I
	J

Fonte: Tabela de autoria própria

4.2 Quantificação da Integridade da molécula de RNA

Inicialmente, foi preparada uma amostra padrão, para utilizar como controle e garantir que todas as etapas foram realizadas de forma eficiente. Ela foi preparada e analisada da mesma forma, utilizando os mesmos materiais e equipamentos que o restante das amostras. A mesma se tratava de gengiva de rato, que não foi exposta ao meio ambiente, e estava mantida na solução de RNAlater. Ela nos forneceu um

RIN de 6,60, demonstrando mais de 60% de integridade da molécula de RNA presente (Figura 10).

Figura 10. Resultado da amostra padrão após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: Imagem obtida do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Após as amostras ficarem submetidas ao meio aquático pelos períodos determinados e passarem pela etapa de extração da polpa dental, elas foram preparadas utilizando o kit RNA 6000 Nano (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) e analisadas com o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), seguindo todas as recomendações do fabricante.

Do total de 80 amostras, o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) forneceu um RIN para 37,5 % (n=30) delas, sendo que no restante das amostras não havia quantidade suficiente de RNA para quantificar a degradação da sua molécula, mesmo algumas dessas sendo de elementos dentais que haviam polpas visíveis a olho nu.

No grupo 0, encontramos polpa dental visível a olho nu em todas as amostras, e foi possível obter um valor de RIN para apenas 40% (n=4) delas, sendo que o maior RIN encontrado para esse grupo foi de 2,40, mostrando uma molécula muito degradada, conforme demonstra a Figura 11.

Figura 11. Resultados das amostras do grupo 0 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: Imagem obtida do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Passando para a análise do grupo 1, foi possível obter um RIN também para apenas 40% das amostras (n=4), sendo que esse grupo foi o que apresentou o maior valor encontrado de RIN, que foi de 6,50, já apresentando uma melhor integridade da molécula de RNA (Figura 12).

Figura 12. Resultados das amostras do grupo 1 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: Imagem obtida do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

No grupo 2 foi possível estabelecer RIN para apenas 20% (n=2) das amostras, sendo elas 2A e 2B, sendo que se compararmos com a existência de polpa visível a olho nu nas mesmas, o elemento dental denominado 2B não apresentava esse tecido, e apesar de apresentar um RIN baixo de 1,20, foi possível a realização dessa análise, o que não aconteceu por exemplo com a amostra 2D e 2F, que apresentavam polpa visível a olho nu e o sistema não conseguiu realizar a análise, justificado pela quantidade insuficiente de RNA para quantificar a degradação da sua molécula. Já a amostra 2A apresentou um valor de RIN de 5,50. (Figura 13)

Figura 13. Resultados das amostras do grupo 2 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: Imagem obtida do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

O grupo 3 forneceu um RIN para 30% (n=3) das amostras, sendo a amostra 3A que apresentou um valor maior entre as amostras do grupo, com o RIN em 3, conforme Figura 14.

Figura 14. Resultados das amostras do grupo 3 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: Imagem obtida do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™ , Califórnia , Estados Unidos).

Em relação ao grupo 4 foi possível estabelecer um RIN para 40% (n=4) das amostras, onde o maior valor foi de 2,10, que foi encontrado em duas amostras (Figura 15).

Figura 15. Resultados das amostras do grupo 4 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: Imagem obtida do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™ , Califórnia , Estados Unidos).

O grupo 5, que permaneceu submerso pelo período de dois meses, foi o que mais apresentou valores de RIN, em 60% (n=6) das amostras, apesar de demonstrar valores baixos, caracterizando moléculas muito degradadas, onde o maior valor foi de 2,10 (Figura 16).

Figura 16. Resultados das amostras do grupo 5 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: Imagem obtida do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Passando para a análise do grupo 6, obtivemos um RIN para apenas 20% das amostras, onde o maior valor foi de 1,40, conforme Figura 17.

Figura 17. Resultados das amostras do grupo 6 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: Imagem obtida do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Já em relação ao último grupo, que permaneceu submetido ao meio aquático por quatro meses, o maior período entre todos os grupos, foi possível estabelecer um RIN para 50% das amostras, sendo o maior valor de 2,30 (Figura 18).

Figura 18. Resultados das amostras do grupo 7 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: Imagem obtida do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

O restante dos números de integridade do RNA que obtivemos para cada grupo, estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Números de integridade do RNA (RIN), obtidos para cada grupo com seus respectivos períodos.

Período	Número de integridade do RNA (RIN)					
3 dias	1,7	1,9	2,1	2,4	-	-
1 semana	1,5	1,7	3,1	6,5	-	-
2 semanas	1,2	5,5	-	-	-	-
3 semanas	2,3	2,4	3	-	-	-
1 mês	1,4	1,5	2,1	2,1	-	-
2 meses	1	1,2	1,2	1,4	1,5	2,1
3 meses	1,3	1,4	-	-	-	-
4 meses	1,5	1,9	1,9	2	2,3	-

Fonte: Tabela de autoria própria

Com os resultados obtidos não seria possível desenvolver uma regressão linear simples, que era o intuito inicial, para caracterizar as variáveis RIN como dependente e o tempo como independente. Porém, com o desfecho das análises, os dados presentes não seriam eficientes para tal. Foi desenvolvido um gráfico de dispersão para demonstrar que não foi possível estabelecer uma relação entre as variáveis, conforme Figura 19.

Figura 19. Gráfico de dispersão linear, demonstrando a falta de linearidade entre as variáveis

Fonte: Autoria própria.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O IPM é um elemento comum usado em investigações onde tenha ocorrido um óbito. Esse intervalo significa o período que temos desde a morte, e sua estimativa se torna muito importante uma vez que pode auxiliar na inclusão ou exclusão de suspeitos que possam ter participado de um crime (YOUNG et al., 2013).

As metodologias existentes para se estimar o IPM, muitas vezes possuem sua aplicação limitadas por um grau de imprecisão (POOR et al., 2016; SAMPAIO-SILVA et al., 2013). Uma vez que existem diversas variáveis que podem influenciar nas alterações *post mortem*, eles transmitem apenas uma aproximação desse IPM (SAMPAIO-SILVA et al., 2013).

Existem diversos fatores que contribuem para a decomposição do cadáver no decorrer do tempo, devendo ser analisado qual o melhor método para ser utilizado em cada caso. O ambiente em que o cadáver se encontra é crucial para essa escolha, pois características como umidade, temperatura, capacidade que os insetos possuem em acessar o corpo, são fatores que influenciam no estado de conservação (SIEGER; SAUKKO; KNUPFER, 2000; COSTA, 2018).

No estudo em questão, optou-se por aplicar a metodologia de quantificação da degradação do RNA extraído de polpas dentais, para tentar relacionar com sua utilização na estimativa do intervalo *post mortem*, por meio da simulação de condições de afogamento com dentes submersos em água doce expostos a diferentes intervalos de tempo, uma vez que é de extrema importância realizar métodos que testem sua aplicabilidade em situações reais do dia a dia para que possa vir a ser utilizadas em âmbito forense.

As alterações ocorridas no IPM sofrem variações decorrentes do meio ambiente e quanto maior esse intervalo, mais difícil estimar esse período, que ficará menos exato, podendo ocorrer um erro de até semanas de diferença (NAIA, 2014).

Os dentes são considerados as estruturas mais resistentes do corpo, capazes de resistirem à degradação *post mortem* (MALAVER; YUNIS, 2003; SILVEIRA, 2006; KRISHAN; KANCHAN; GARG, 2015). Esses elementos já são bastante utilizados no meio forense, mas geralmente não utilizados para estudos *post mortem* (POÓR et al., 2016).

No trabalho realizado, optou-se por utilizar polpas dentais, que de acordo com Poór e colaboradores (2016) são consideradas massas com baixos níveis de atividade da Rnase e são estruturas protegidas dos fatores ambientais por um arcabouço (esmalte, dentina e cemento), presumindo que elas possuem uma degradação mais lenta da molécula de RNA. Além disso, os dentes são considerados estruturas que possuem boa fonte de informação genética, e conseguimos extrair boa quantidade de DNA da polpa e da dentina, porém, o esmalte dental não é considerado uma fonte de DNA (GONÇALVES, 2016).

As amostras de dentes do estudo em questão ficaram primeiramente armazenadas em freezer -80°C até completar o número suficiente para formação do seu respectivo grupo e posteriormente submeter a meio aquático e assim evitar a degradação do RNA.

Conde e colaboradores (2012) testaram quatro formas de armazenamento de elementos dentais anteriormente à remoção da polpa e análise da integridade do RNA, sendo elas: nitrogênio líquido; freezer -80°C, freezer -20°C e em refrigerador 4°C. Os autores mostraram que houve preservação da integridade do RNA em todas as condições de armazenamento.

No trabalho de Costa (2018), foi realizado um teste piloto para avaliar se o congelamento dos dentes em freezer -80°C iria interferir no comportamento da molécula de RNA. Os dentes ficaram congelados pelo período de 3 meses e foi feita uma análise comparativa entre os mesmos e um conjunto de dentes que foram analisados imediatamente após a extração cirúrgica, sem que permanecessem congelados. Os resultados obtidos foram similares entre os dois grupos, sendo que as amostras congeladas chegaram a obter um RIN de 7,30, e a amostra “fresca” um RIN de 8,0. Foi concluído nesse estudo que o congelamento não interferiu no processo.

O estudo de Costa (2018) mostra ainda que as amostras que não ficaram expostas ao meio apresentaram números maiores de integridade da molécula e RNA, chegando a 7,30, no teste piloto citado, quando comparados com as amostras que a autora submeteu ao meio ambiente simulando condições de inumação, onde obteve como resultado, moléculas muito degradadas. Esse fato corrobora com o resultado do presente estudo, uma vez que as amostras foram submetidas ao meio aquático, a fim de simular condições ambientais reais, e os resultados também mostraram essa característica de moléculas de RNA muito degradadas.

A escolha de terceiros molares para a pesquisa facilita a composição da amostra, por serem dentes que são extraídos rotineiramente por cirurgiões-dentistas (TRENTO et al., 2009). Porém, quando analisamos a quantidade de polpa visível a olho nu, podemos observar que do total de 80 amostras, apenas 40% (n=32) delas apresentavam essa característica. Esse fato pode ter sido pelas morfologias distintas que os terceiros molares apresentam (OLIVEIRA, 2014), o que pode influenciar na quantidade de polpa presente em cada dente.

Ainda em relação à presença de polpa nos dentes, além dos terceiros molares superiores e inferiores serem dentes que não possuem uma anatomia interna com padrão definido (OLIVEIRA, 2014), as características dos canais radiculares no geral, são afetadas por fatores como idade, trauma oclusal, necessidade de preparos cavitários, o que pode levar à formação de dentina secundária, causando retração dos cornos pulpare (PEREIRA; CARNEVALLI; CARVALHO, 2011; MADEIRA, 2006). Com isso, optou-se por dentes hígidos a fim de tentar minimizar a chance de eles terem sofrido algum trauma onde possa ter ocorrido tal situação.

Além disso, indivíduos mais jovens possuem câmara pulpar mais ampla que indivíduos mais velhos, e o tamanho da cavidade pulpar também é influenciado pelo tipo de dente, como por exemplo, incisivos inferiores possuem a câmara pulpar relativamente menor quando comparado com molares (MADEIRA, 2006).

Após a remoção da polpa, o armazenamento foi realizado em solução contendo RNAlater e mantidas em freezer -20°C até o momento da extração da molécula de RNA e análise da sua integridade. A solução RNAlater é utilizada para estabilizar e proteger o RNA, fazendo com que minimize a necessidade de análise imediata da amostra, podendo armazená-la nessa solução sem correr o risco de comprometer a qualidade do RNA. Assim, a recomendação para amostras que irão ficar por um tempo indeterminado na solução até serem analisadas, é que permaneçam na solução armazenadas em uma temperatura a -20°C (THERMOFISHER), conforme foi realizado nesse estudo.

Quando se fala da população brasileira, 11% dos brasileiros não possui nenhum dente, correspondente a 16 milhões de pessoas desdentadas (KNOPLOCH, 2015). Esse fator pode influenciar em pesquisas que utilizam análises de polpas dentais, uma vez que não se sabe se os dentes estarão disponíveis em toda situação forense.

Outra questão é referente à prevalência de agenesias de terceiros molares, que são mais frequentes do que em outros grupos de dentes (BORBA et al., 2010), e também por serem dentes onde a intervenção cirúrgica é um procedimento comum (COSTA et al., 2010), assim, também se torna necessário a existência de outros estudos analisando diferentes tipos de dentes para avaliar se existe uma diferença nos resultados com relação à amostra.

O RNA desempenha diversos papéis e está presente em todas as células vivas, porém a degradação dessa molécula no IPM é complexa e carece de mais estudos (PARTEMI et al., 2010), uma vez que trabalhar com seres humanos, diferentemente de amostras de animais onde se consegue controlar as mesmas e suas variações biológicas, existem parâmetros que podem influenciar nesse processo, como estilo de vida, idade, e aspectos gerais relacionados à saúde do indivíduo (VENNEMANN; KIOPPELKAMM, 2010). Com isso, outro fator que pode ter influenciado na degradação da molécula de RNA na pesquisa é o fato de que não foi levado em consideração a saúde geral dos participantes e nem a idade deles na composição amostral.

A degradação do RNA, ocorre principalmente pela ação enzimática das Ribonucleases (RNases), tanto em cadáveres como em partes de um corpo, que são onipresentes e vêm sendo consideradas responsáveis pela rápida degradação do RNA (FORDYCE et al., 2013; HEINRICH et al., 2007). Porém, em condições de umidade, como por exemplo tecidos desidratados e manchas de sangue seca, é possível que essa atividade seja alterada, e exista uma prolongação da integridade dessa molécula de RNA (COSTA, 2018).

A própria estrutura do RNA, que contém um grupo hidroxila na posição 2', é um dos fatores que faz com que essa molécula seja mais instável do que o DNA (FORDYCE et al., 2013). A molécula de RNA é mais susceptível à hidrólise quando na presença de cátions como Ca^{2+} , metais transicionais e condições alcalinas, aumentando as chances de degradação do mesmo (FORDYCE et al., 2013).

Diversos fatores internos como, por exemplo, a natureza das bases, os açúcares e o fosfato, assim como fatores externos, onde podemos citar pH, a presença de oxigênio e água, limitam a meia vida dos ácidos nucleicos, e em cada cenário *post mortem* esses fatores são únicos (FORDYCE et al., 2013).

Com isso, sugere-se que a presença de umidade, ou seja, o fato das amostras terem sido submetidas a meio aquático, tenha acelerado o processo de degradação da molécula de RNA, o que pode ter sido um dos fatores que possa justificar a intensa degradação que foi encontrada nas amostras da presente pesquisa.

Essas condições levam ao entendimento de que também são necessários estudos mais aprofundados que envolvam submersão de amostras, como medir o pH da água para demonstrar em qual situação a amostra está sendo exposta, e se essa pode ser outra característica que influencia o processo de degradação da molécula de RNA.

Durante o manuseio e processamento das amostras contendo RNA, são necessários alguns cuidados a fim de evitar qualquer degradação adicional dessa molécula (VENNEMANN; KOPPELKAMM, 2010). Na presente pesquisa, para que pudéssemos trabalhar em um ambiente livre de RNases, inicialmente utilizamos RNase Zap (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil), em todos os instrumentos, materiais de trabalho e bancada que seriam utilizados para o processamento das amostras, com o intuito de evitar a degradação do RNA.

A verificação da integridade do RNA, foi feita através do uso dos kits de RNA 6000 Nano (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) que utilizam eletroforese baseada em chip microfluídico para sua análise. As amostras foram analisadas com o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), e o número de integridade do RNA (RIN) foi calculado usando o Agilent 2100 Expert software (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

O sistema Agilent 2100 Bioanalyzer associado ao uso do kit RNA 6000 Nano tornou-se o padrão na avaliação e quantificação da qualidade do RNA, onde o software fornece um eletroferograma e transmite resultados como a concentração da amostra e as suas proporções ribossômicas (MUELLER; LIGHTFOOT; SCHROEDER, 2004). O RNA Integrity Number (RIN) foi criado com o intuito de descartar a interpretação individual e criar uma padronização para os resultados (MUELLER; LIGHTFOOT; SCHROEDER, 2004; SCHROEDER, et al., 2006).

Pode-se notar que existem alguns estudos (BAUER et al., 2003; PREECE; CAIRNS, 2003; CATTS et al., 2005; HEINRICH et al., 2007; GONZALEZ HERRERA et al., 2013; POÓR et al., 2016; COSTA, 2018), que exploraram as alterações na

degradação na molécula de RNA para sua aplicação na estimativa do IPM, utilizando metodologias e amostras distintas.

Bauer e colaboradores (2003) testaram amostras de sangue humano e de tecido cerebral. Eles encontraram uma boa relação com a degradação da molécula de RNA e o IPM, porém a metodologia utilizada, mantinha as amostras em ambiente controlado. Assim como Catts et al. (2005), que utilizaram cérebros de ratos para coleta e análise de RNA. Eles chegaram à conclusão de que o aumento do IPM estava relacionado com a degradação do RNA, classificada pela relação RNA ribossomal 28S/18S. Portanto, em ambos estudos, os autores contaram com tecidos diferentes em suas amostras, e elas não foram submetidas ao meio ambiente. Assim, o resultado deles difere da pesquisa em questão, que mostrou não haver relação entre a degradação do RNA e o IPM.

Heinrich e colaboradores (2007) investigaram em diversos tecidos do corpo humano, quais eram apropriados para análise de RNA após a morte. Nenhuma amostra foi exposta ao meio ambiente. Eles concluíram que pelo menos alguns tecidos como músculo, cérebro e tecido cardíaco, são relevantes para análise de RNA *post mortem*, diferentemente do estudo presente, onde a amostra utilizada para a verificação da degradação do RNA, não se mostrou favorável para essa análise *post mortem*.

Conde et al. (2012) mostraram em seu estudo que a polpa dental é um tecido que pode ser utilizado como fonte para análise de integridade de RNA, uma vez que utilizando polpas para extrair RNA e avaliar sua integridade, utilizando eletroforese em gel de agarose, os autores conseguiram boa qualidade das moléculas analisadas. Já nesse trabalho, podemos observar que, apesar do tecido utilizado também ter sido de polpas dentais, obtivemos com as análises, moléculas de RNA muito degradadas.

Também encontramos na literatura estudos em que os resultados não foram tão favoráveis assim como na pesquisa em questão. Preece e Cairns (2003), analisando níveis de RNA de tecido cerebral humano *post mortem*, conseguiram uma influência do mesmo em relação ao sexo e idade. Porém para intervalo *post mortem* mostraram efeitos inconsistentes em relação ao nível de RNA.

Ainda, Gonzalez Herrera e colaboradores (2013), embora tenham encontrado alguma relação sobre as amostras utilizadas (tecidos cardíacos e fluidos corporais de cadáveres) e a integridade do RNA, não conseguiram estabelecer uma relação

significativa entre número de integridade do RNA e o IPM, o que corrobora com o resultado da presente pesquisa, onde não foi possível estabelecer essa relação entre o IPM e os números de integridade do RNA (RIN) encontrados.

Um estudo piloto realizado por Poór e colaboradores (2016), que tinha como objetivo, assim como no estudo em questão, demonstrar se a degradação do RNA poderia ser utilizada como forma de se estimar o intervalo *post mortem*, utilizando polpas de dentes humanos. A amostra dos autores foi composta por pré-molares e terceiros molares, os quais foram armazenados em recipientes plásticos fechados, até um período máximo de 121 dias, mantidos em temperatura ambiente (22-25°C). A análise na integridade do RNA foi realizada através do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer e foi calculado o RIN usando o Agilent 2100 Expert software.

Na presente pesquisa, quando comparada com os dados do estudo citado de Poór e colaboradores (2016), pode-se observar que parte da amostra era semelhante, uma vez que foi utilizado polpas de terceiros molares; assim como o período máximo que elas ficaram armazenadas e o sistema que foi utilizado para a análise da integridade do RNA. Porém elas se diferem no que diz respeito ao armazenamento das amostras, uma vez que os autores as mantiveram em temperatura ambiente, e no trabalho em questão, elas foram expostas ao meio, a fim de simular condições ambientais reais, onde não é possível realizar o controle das mesmas.

Assim, os resultados do presente estudo mostraram não haver relação da degradação dessa molécula com o tempo, o que foi diferente no estudo de Poór e colaboradores (2016), que relataram ao final do estudo que o método apesar de suas limitações, é promissor no que diz respeito a estimativa do IMP. Esse resultado pode estar relacionado com o fato de que as amostras desses autores, foram mantidas em ambiente controlado e não expostas ao meio ambiente.

Em relação à amostra controle utilizada nesta pesquisa, obtivemos na mesma um RIN de 6,60, que nos mostrou que todas as etapas do processo e a leitura das amostras foram realizadas de forma correta, uma vez que ela se mostrou mais de 60% intacta. Seu conteúdo também não foi exposto ao meio, o que pode ser uma outra característica mostrando que a degradação intensa do RNA e sua falta de relação com o tempo nas demais amostras, pode estar ligada ao fato de elas terem sido expostas ao meio, além de que podemos citar que o tecido nas amostras também eram diferentes.

Podemos notar ainda nos resultados, que não foi possível a análise de todas as amostras, pois em 50 delas, não havia quantidade suficiente de RNA para quantificar a degradação da sua molécula. Porém dos que apresentaram leitura, obtivemos um RIN para todos os períodos em que os dentes ficaram submetidos a meio aquático, contudo a maioria desses números foram muito baixos, sendo que 26 das 30 analisadas, possuíam um $RIN \leq 2,40$, e as 4 restantes apresentando $RIN \geq 3,0$.

De todos os valores obtidos, não foi possível estabelecer uma relação com o tempo, sendo assim impossível relacionar se amostras que permaneceram por um período menor na condição estabelecida possuíam uma molécula de RNA mais intacta, e as que foram mantidas por um longo período, continham moléculas mais degradadas ou vice e versa, conforme demonstrado na figura 19. Já Poór e colaboradores (2016), conseguiram correlacionar os valores de RIN com o tempo, mas apenas com amostras que ficaram armazenadas por períodos de no máximo 21 dias.

A presença de polpa visível a olho nu também não interferiu nas amostras, sendo que em algumas das amostras que continham essa característica, não foi possível realizar a leitura delas, e em amostras que não continham esse material visível, apresentaram valores de RIN.

Poór e colaboradores (2016) estabelecem em seu estudo, que os números de integridade do RNA (RIN) estabelecidos entre 1,0 até 2,40, significa que estamos diante de moléculas muito degradada e as mesmas não devem ser levadas em consideração. Assim poderíamos contar com apenas 4 amostras viáveis, e o período máximo com capacidade para análise no presente estudo seria de 3 semanas, dado que pode ser comparado com o trabalho de Costa (2018).

Com os resultados encontrados, e diante de tudo que foi discutido, foi possível observar grandes obstáculos na metodologia escolhida para a pesquisa em questão. Entre eles podemos citar a utilização de terceiros molares para extração da polpa dental, a atividade enzimática das Ribonucleases, e de acordo com as análises encontrados em outros trabalhos (BAUER et al., 2003; CATTS et al., 2005; HENRICH et al., 2007; POÓR et al, 2016), podemos destacar o fato das amostras terem sido submetidas ao meio ambiente, simulando condições reais do dia a dia, o que pode ter sido fator primordial para justificar os resultados encontrados nesse trabalho.

Como já foi citado que a estimativa do IPM possui metodologias de aplicação limitadas por um grau de imprecisão (POÓR et al, 2016), novas metodologias vêm sendo testadas e uma proposta de utilização de várias delas em conjunto tem sido utilizada para tentar reduzir a margem de erro (SILVA et al., 2013). Portanto, em relação à utilização do método do presente estudo em âmbito forense, uma vez que nos deparamos com diversas fragilidades do mesmo, recomenda-se que exista uma maior investigação antes que ele possa auxiliar de fato questões que envolvam a estimativa do intervalo *post mortem*.

É importante salientar que os mecanismos relacionados com a molécula de RNA, assim como os diversos fatores que podem influenciar sua degradação e análise sejam conhecidos a fundo, para o desenvolvimento de métodos confiáveis, que possam ser aplicados com confiança e sejam capazes de auxiliar na estimativa do IPM.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O método de quantificação da degradação do RNA não foi aplicável, uma vez que não foi possível estabelecer uma relação entre a degradação da molécula de RNA extraída de polpas de terceiros molares que ficaram submetidos ao meio aquático a diferentes intervalos de tempo com a estimativa do intervalo *post mortem*.

Referências

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, R. T. et al. Dados médico-legais sobre afogamentos na região de Ribeirão Preto (SP, Brasil): um passo para a prevenção. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 41, n. 1, p. 50-57, 2008.
- BRASIL. Ministério da saúde. **Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html. Acesso em: 7 fev. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Tecnologia da Informação a Serviço do SUS - DATASUS. Tabela CID BR- 10: óbitos por causas externas- Brasil. Óbitos por afogamento e submersão accidental. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/ext10uf.def>>. Acesso em: 2 mai. 2019.
- BAUER, M. et al. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. **Legal Medicine**, v.5, n.4, p.220– 227, 2003.
- BORBA, G. V. C. et al. Levantamento da prevalência de agenesias dentais em pacientes com idade entre 7 e 16 anos. **RGO. Revista Gaúcha de Odontologia (Online)**, v. 58, n. 1, p. 35-39, 2010.
- CAMPUS USP RIBEIRÃO PRETO. Limpeza Externa. Disponível em: <<http://www.imagens.usp.br/?p=31756>>. Acesso em: 6 mai. 2019.
- CATTANEO, C. Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. **Forensic Science**, Int. v.165, p.185–193, 2007.
- CATTS, V. S. et al. A microarray study of post-mortem mRNA degradation in mouse brain tissue. **Molecular brain research**, v. 138, n. 2, p. 164-177, 2005.
- CONDE, M. C. M. et al. Odontoblast RNA stability in different temperature-based protocols for tooth storage. **International Endodontic Journal**, v.45, n.3, p.266–272, 2012.
- COSTA, M. A. et al. Incidência das posições anatômicas e agenesia dos terceiros molares em estudantes de São Luís, Maranhão. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 10, n. 3, p. 399-403, 2010.
- COSTA, P. B. **Correlação entre a degradação da molécula de RNA proveniente da polpa dental e a estimativa de intervalo post mortem em condições simuladas de inumação**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, 2018.
- CULPIN, R. BIOCOMPARE. Bioanalyzer 2100 RNA 6000 Nano Kit From Agilent Technologies. 2009. Disponível em : <<https://www.biocompare.com/Product-Reviews/40310-Bioanalyzer-2100-RNA-6000-Nano-Kit-From-Agilent-Technologies/>>. Acesso em: 4 mai. 2009.

DIAS, M. F. **Determinação do intervalo postmortem através do estudo de micro-RNA's extraídos de manchas de sangue colhidas a cadáveres.** Dissertação de mestrado, Universidade do Porto, 2017.

FORDYCE, S. L. et al. Long-term RNA persistence in post-mortem contexts. **Investigative Genetics**, v.4, n.7, 2013.

GARRIDO, R. G.; NAIA, M. J. T. Cronotanatognose: A influência do clima tropical na determinação do intervalo post-mortem. **Lex Humana**, Petrópolis, v. 6, n. 1, p.180-195, 2014.

GONÇALVES, I. M. M. **A importância do DNA na medicina dentária forense.** Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, 2016.

GONÇALVES, R. E. M. Entomologia Forense e Cronotanatognose: Insetos de Importância Médico-Legal. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 3, n. 3, p. 200-207, 2014.

GONZÁLEZ-HERRERA, L. et al. Studies on RNA integrity and gene expression in human myocardial tissue, pericardial fluid and blood, and its postmortem stability. **Forensic science international**, v. 232, n. 1-3, p. 218-228, 2013.

HAAS, C. et al. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. **Forensic Science International: Genetics**, v. 3, n. 2, p. 80-88, 2009.

HAMILTON. Microlab NIMBUS. Disponível em: <<https://www.hamiltoncompany.com/automated-liquid-handling/platforms/microlab-nimbus>>. Acesso em: 6 mai. 2019.

HEINRICH, M. et al. Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. **International journal of legal medicine**, v. 121, n. 2, p. 136-142, 2007.

HEPP, D.; NONOHAY, J. S. A importância das técnicas e análises de DNA. **ScientiaTec**, v. 3, n. 2, p. 114-124, 2017.

INTEGRATED SCIENCES. RNA 6000 nano kit & reagentes. Disponível em: <<http://www.integratedsci.com.au/product/rna-6000-nano-kit-and-reagents.html>>. Acesso em: 6 mai. 2019.

INTERNACIONAL CRIMINAL POLICE ORGANIZATION (INTERPOL). **Disaster Victim Identification Guide**, 2018. Disponível em: <file:///C:/Users/getul/Downloads/18Y1344%20E%20DVI_Guide.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2019.

JOBIN, L. F. et al. **Identificação Humana: identificação médico-legal, perícias odontológicas, identificação pelo DNA.** 3.ed. Campinas, SP: Millennium, 2018.

KLUG, W. S. et al. **Conceitos de Genética**. 9.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

KNOPLOCH, C. Brasil tem 11% da população sem nenhum dente, 2015. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/sociedade/saude/brasil-tem-11-da-populacao-sem-nenhum-dente-16325819>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

KRISHAN, K. ; KANCHAN, T. ; GARG, A. K. Dental Evidence in Forensic Identification - An Overview, Methodology and Present Status. **Open Dentistry Journal**, v.9, p.250–256, 2015.

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

MADEIRA, M. C. Anatomia do dente. 5ª ed. Sarvier, São Paulo, 2006.

MALAYER, P. C.; YUNIS, J. J. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. **Croatian Medical Journal**, v.44, n.3, p.306-309, 2003.

MEIRA, K. T. R.; BARROS, R. M. Padrões de sucessão da fauna cadavérica no Brasil, uma contribuição para a prática forense. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 4, n.1, 2015.

MENON, L. M. L. et al. Tanatologia forense e odontologia legal: interface e importância na rotina pericial. **Odonto**, v. 19, n. 37, p. 15-23, 2011.

MUELLER, O.; LIGHTFOOT, S.; SCHROEDER, A. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. Disponível em : <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf>> . Acesso em: 4 mai. 2019.

MUSSE, J. O. **A influência do meio aquático nos processos de identificação humana: estudo epidemiológico e laboratorial (recuperação do DNA)**. Defesa de Dissertação, Faculdade de Odontologia, da Universidade de São Paulo, 2007.

NAIA, M. J. T. **Determinação do Intervalo Postmortem através do decréscimo de citrato e DNA em ossos**: Influência das condições tropicais. Dissertação de mestrado, Universidade Católica de Petropolis, 2014.

NETO, J. E. et al. Situação dos afogamentos em duas regiões do interior do estado de São Paulo. **Revista de Ciências Médicas**, v. 15, n. 4, 2012.

OLIVEIRA, J. Molares-Descrição Anatômica, 2014. Disponível em: <<https://www.odontoup.com.br/molares-descricao-anatomica/>>. Acesso em : 17 jul. 2019.

PARTEMI, S. et al. Analysis of mRNA from human heart tissue and putative applications in forensic molecular pathology. **Forensic science international**, v. 203, n. 1-3, p. 99-105, 2010.

PEREIRA, E. R.; CARNEVALLI, B.; CARVALHO, E. M.O. F. Anatomia do assoalho da câmara pulpar de molares superiores: Parte I. **Rev. odontol. UNESP (Online)**, v. 40, n. 2, 2011.

POÓR, V. S. et al. The rate of RNA degradation in human dental pulp reveals post-mortem interval. **International Journal of Legal Medicine**, v.130, n.3, p.615-619, 2016.

PREECE, P.; CAIRNS, N. J. Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. **Molecular brain research**, v. 118, n. 1-2, p. 60-71, 2003.

SIEGEL, J. A.; SAUKKO, J. P.; KNUPFER, G. C. **Encyclopedia of Forensic Sciences**: San Diego: Academic Press, 2000.

SAMPAIO-SILVA, S. et al. Profiling of RNA Degradation for Estimation of Post-Mortem Interval. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56507, 2013.

SCHROEDER, A. et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC molecular biology**, v. 7, n. 1, p. 3, 2006.

SILVA, F. S. et al. Profiling of RNA Degradation for Estimation of Post Mortem Interval. **Plos One**, v. 8, n.2, 2013.

SILVA, A. R.; GARCIA, S. B. Estudo comparativo de três diferentes procedimentos para extração de RNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 2, p. 123-130, 2008.

SILVA, R. F. Genetics and molecular biology: a literature review of forensic dentistry application. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 6, n. 20, p. 1254-1259, 2007.

SILVEIRA, E. M. S. Z. S. F. Odontologia legal: a importância do DNA para as perícias e peritos. **Saúde, Ética & Justiça**, v. 11, n. 1-2, p. 12-18, 2006.

SZPILMAN, D. Afogamento. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.6, n.4, 2000.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. MagMAX™ *mirVana*™ Total RNA Isolation Kit. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A27828>>. Acesso em: 6 mai. 2019.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. RNA^{later} Solutions for RNA Stabilization and Storage. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/product-brand/rnalater.html>>. Acesso em: 4 mai. 2019.

TRENTO, C. L. et al. Localização e classificação de terceiros molares: análise radiográfica. **Interbio**, v. 3, n. 2, p. 18-26, 2009.

VENNEMANN, M.; KOPPELKAMM, A. mRNA profiling in forensic genetics. I: Possibilities and limitations. **Forensic Science International**, v.203, n.1-3, p.71–75, 2010.

VIEIRA, G. S; TAVARES, C. A. P.; BOUCHARDET, F. C. H. Análise de DNA em odontologia forense. **Arquivo Brasileiro de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 57-63, 2010.

YOUNG, S. T. et al. Estimating postmortem interval using RNA degradation and morphological changes in tooth pulp. **Forensic Science International**, v.229, n.1, p.163.e1–163.e6, 2013.

Anexo A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CORRELAÇÃO ENTRE A DEGRADAÇÃO DA MOLÉCULA DE RNA PROVENIENTE DA POLPA DENTAL E A DETERMINAÇÃO DO INTERVALO POST MORTEM

Pesquisador: PAULA BARRETO COSTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67257617.4.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.101.728

Apresentação do Projeto:

Intervalo post mortem (IPM) é o período de tempo que se passou desde a ocorrência do óbito até o momento em que se passa a estudar o corpo e/ou remanescente humano. A determinação deste intervalo é assunto de grande relevância no âmbito forense por seu papel importante na resolução de casos criminais. Existem, hoje, diversas técnicas forenses para determinação do IPM incluindo diferentes vertentes das Ciências Forenses, como a cronotanatognose, entomologia e antropologia forense. Apesar dos diferentes métodos já existentes para a determinação do IPM, diversas vezes são necessárias associações para melhores resultados. Na busca pela precisão, novos métodos são constantemente avaliados e testados, como a utilização da biologia molecular, na análise de moléculas de DNA e RNA. A maioria dos estudos se concentra na utilização do DNA, porém estudos recentes vêm demonstrando o uso da molécula de RNA na determinação do IPM. Os dentes são regiões do corpo indicadas para extração do RNA por possuírem uma adequada disponibilidade de material genético e grau de proteção às condições tanto endógenas como exógenas que podem acelerar a degradação da molécula."

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é avaliar a possibilidade de utilização do método de quantificação da degradação do RNA extraído de polpas dentais como uma alternativa na determinação do intervalo

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE
UF: SP
Município: RIBEIRÃO PRETO
CEP: 14.048-900
Telefone: (16)3502-2228
Fax: (16)3503-1144
E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 2.101.728

post mortem, em condições forenses simuladas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios acarretados pela obtenção dos resultados desta pesquisa superam seus riscos. Os riscos e medidas para evitá-los foram adequadamente explicitados no projeto e no TCLE. A garantia ao sigilo dos doadores do material foi adequadamente esclarecida e explicitada.

Não há benefícios diretos aos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está muito bem redigido. Serão utilizados dentes humanos que tenham sido extraídos por indicação terapêutica, estimando-se uma amostragem total de 160 dentes. Os participantes recrutados que aceitarem participar da pesquisa irão preencher um formulário de doação e o TCLE. A análise estatística foi adequadamente descrita conforme solicitado, assim como o item de avaliação dos riscos e benefícios.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as recomendações abaixo efetuadas no último parecer foram atendidas de modo satisfatório. "Há a necessidade de adequações no TCLE de modo a tornar a compreensão dos termos utilizados mais fácil para as pessoas convidadas a participar do estudo. Recomendo substituir ou explicar melhor os termos/frases abaixo: área pericial, RNA, "E esta estimativa de tempo pode ser realizada através da análise da degradação do RNA que será extraído da polpa do dente, por isso, sendo necessária a coleta, por meio de doação voluntária, de terceiros molares (dentes do siso) extraídos por indicação terapêutica". Recomendo ainda uma descrição detalhada e simples de todos os riscos do projeto e de todas as medidas para evitar a ocorrência dos mesmos."

Recomendações:

Todas as modificações abaixo recomendadas no último parecer foram atendidas de modo satisfatório, portanto recomendo a aprovação do projeto de pesquisa por este CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa modificado em 17/05/2017, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Nova versão TCLE – ajustado 17/05/2017, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais e o Parecer do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE
UF: SP
Município: RIBEIRÃO PRETO
CEP: 14.048-900
Telefone: (16)3502-2228
Fax: (16)3503-1144
E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO B- Autorização para acesso ao lago da Universidade de São Paulo, em
Ribeirão Preto -SP, concedida pela Prefeitura do campus

<p>Gabinete do Prefeito Av. Bandeirantes, 3900 Ribeirão Preto CEP 14040-900 Tel.: (16) 3315 3500/3511 – e-mail: prefeiturarp@usp.br</p>	<p>Rub. <u>10</u></p>
--	-----------------------

Interessado: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Assunto: Autorização para que o Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva e a Aluna de Mestrado Paula Barreto Costa, possam ter acesso nas dependências do Lago do Campus para fins de pesquisa.

Autorizamos, para fins de pesquisa, o acesso às dependências do lago. Encaminhe-se à ATD-IV para conhecimento à:

- DVADM / Serviço de Guarda Universitária; ✓
- DVMANOP/Serviço de áreas Verdes. ✓

Após, à FORP para providências que couber, com a recomendação de que os participantes da pesquisa ao adentrarem na área cercada do Lago utilizem os EPIs (macacão tratado com inseticida e botas), evitando assim a infestação por carrapato-estrela, vetor da febre maculosa brasileira.

Informamos que a PUSP-RP disponibiliza aos alunos, docentes e pesquisadores o referido macacão, mediante pagamento de taxa, para tanto, caso haja interesse, entrar em contato com Sra. Helen, da Serviço de Áreas Verdes, ramal (15) 3543.

Ribeirão Preto, 05 de dezembro de 2017.

Profa. Dra. Cláudia Souza Passador
Prefeita do Campus USP de Ribeirão Preto
em exercício