**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

PAULA BARRETO COSTA

**CORRELAÇÃO ENTRE A DEGRADAÇÃO DA MOLÉCULA DE RNA
PROVENIENTE DA POLPA DENTAL E A ESTIMATIVA DE INTERVALO *POST*
MORTEM EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE INUMAÇÃO.**

Ribeirão Preto

2018

PAULA BARRETO COSTA

Correlação entre a degradação da molécula de RNA proveniente da polpa dental e a estimativa de intervalo *post mortem* em condições simuladas de inumação.

Versão Original

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

2018

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 (BDTD).

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

Costa, Paula Barreto

Correlação entre a degradação da molécula de RNA proveniente da polpa dental e a estimativa de intervalo *post mortem* em condições simuladas de inumação. Ribeirão Preto, 2018.

77 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.Odontologia Legal. 2.Identificação de vítimas. 3.Ácidos nucleicos. 4. Tanatologia.

Folha de Aprovação

Paula Barreto Costa

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 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

Aprovado em: 04/09/2018

Banca Examinadora:

1) Prof. Dr.: Hermes de Freitas Barbosa

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Julgamento: Aprovada Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr (a).:Andrea Sayuri Silveira Dias Terada

Instituição: Universidade de Rio Verde

Julgamento: Aprovada Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: Rogério Nogueira de Oliveira

Instituição: Faculdade de Odontologia de São Paulo

Julgamento: Aprovada Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, exemplos de dedicação e perseverança, que me deram todo o suporte e apoio para a realização e conclusão dessa etapa tão importante da minha vida

Agradecimientos

Agradeço,

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva**, por ser meu professor e guia durante a minha jornada desde a graduação, sempre com palavras firmes e amigas de incentivo e coragem, demonstrando aos seus alunos uma conduta ética e profissional, além de muito amor pela profissão.

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, especialmente a todos os **funcionários da secretaria do Departamento de Patologia e Medicina Legal**, por todo cuidado e dedicação.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – USP** e ao **Departamento de Farmacologia**, por me acolherem e gentilmente me deixarem trabalhar junto com a equipe. Um agradecimento em especial para o **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, o **Thiago José Dionísio** e a aluna de doutorado **Giovana** que foram imprescindíveis para que o projeto saísse do papel.

Ao funcionário **Roni Eder Turati**, Jardineiro da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por todo o auxílio na realização desse trabalho de forma tão generosa e bem humorada.

À minha mãe **Jucimara F. B. Costa**, por ser exemplo de doação e carinho tanto nos momentos bons como nos ruins, e por não me deixar desanimar ou pensar que eu não seria capaz de conseguir sempre.

Ao meu pai **Nelson Costa Jr.**, por sempre me ensinar que o estudo e o conhecimento são coisas de valor imensurável e que nós sempre temos coisas novas para aprender, porém sempre com humildade, paciência e integridade.

À minha irmã **Lívia** e aos demais **familiares** que compreenderam minha ausência e sempre me ajudaram em tudo que podiam e não podiam.

Aos meus colegas de mestrado **Luciana, Tamara, Júlia, Victor, Beatriz e Marcos**, que me ensinaram tanto com tanta paciência e alegria. Companheiros do dia a dia e

de muitas histórias, pessoas que se tornaram parte da minha família e que me fizeram crescer não só como profissional, mas como pessoa. Muito obrigada por cada conversa, por cada silêncio, por cada bronca e por cada risada que demos juntos.

A todos os demais **colegas** que conheci durante o mestrado, sempre atenciosos e parceiros.

Ao meu companheiro **Guilherme Nasser**, que surgiu ao longo dessa trajetória, mas que foi e é uma das pessoas que mais acredita no meu potencial e futuro. Muito obrigada por todos os dias ao meu lado sempre com tanto amor e mostrando que eu consigo.

A **todos os demais** que de alguma forma contribuíram ao longo dessa jornada para me engrandecer ou me ajudar de qualquer maneira.

*“Livros não mudam o mundo,
quem muda o mundo são as pessoas.
Os livros só mudam as pessoas.”*

Mário Quintana

Resumo

COSTA, Paula Barreto. Correlação entre a degradação da molécula de RNA proveniente da polpa dental e a estimativa de intervalo *post mortem* em condições simuladas de inumação. 2018. 87f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Resumo

O 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 estimativa deste intervalo é assunto de grande relevância no âmbito forense por seu papel importante na resolução de casos criminais. Existem diversas técnicas forenses para estimativa do IPM, porém, em muitos casos 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. Estudos recentes vêm demonstrando o uso da molécula de RNA na estimativa do IPM e, nesse sentido, os dentes são regiões do corpo indicadas para extração do RNA devido à presença do complexo dentino-pulpar que possui uma adequada disponibilidade de material genético e um elevado grau de proteção às condições endógenas e exógenas que podem acelerar a degradação da molécula. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade da utilização do método de quantificação da degradação do RNA extraído de polpas dentais como uma alternativa na estimativa do IPM, simulando condições de inumação em terreno exposto as alterações de temperatura e umidade. Para isso, foram utilizados 70 dentes humanos divididos em 7 grupos, os quais foram submetidos à condição de inumação por períodos de tempo pré-estabelecidos. Posteriormente, os grupos foram exumados e procedeu-se a extração da polpa dental, extração da molécula de RNA e análise da degradação da molécula para obtenção dos resultados. Após as etapas descritas, foi possível constatar tecido pulpar para extração em 32,85% das amostras, sendo os grupos 1 e 4 aqueles com maior número de amostras com tecido pulpar aparente. Com relação à quantificação da integridade da molécula de RNA, dentre os 70 dentes que constituíam o grupo amostral total, o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (AgilentTM, Califórnia, Estados Unidos) só foi capaz de fornecer um RIN (número de integridade do RNA) para 11 amostras, o que corresponde a 15,71%. O grupo 1, foi o que apresentou o maior número de componentes com um RIN detectável, totalizando 40% e o Grupo 3, foi o que apresentou o maior RIN dentre um de seus representantes frente a todo grupo amostral, sendo este valor de 5.90. Nos grupos 6 e 7 não foi possível detectar nenhuma amostra com alguma taxa de integridade da molécula de RNA. Constatou-se que os resultados obtidos não foram suficientes para que fosse desenvolvida uma equação de regressão que fosse aplicável. Após a análise dos resultados, foi possível concluir que o método de quantificação da degradação da molécula de RNA extraída de polpas dentais não foi aplicável para estimativa do IPM em condições simuladas de inumação em terreno exposto as alterações de temperatura e umidade.

Palavras-chave: Odontologia Legal. Identificação de vítimas. Ácidos nucleicos. Tanatologia.

Abstract

COSTA, Paula Barreto. **Correlation between the RNA from the dental pulp degradation and the estimation of the post mortem interval under simulated inhumane conditions.** 2018. 87f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Abstract

The post-mortem interval (PMI) is the period of time that has elapsed since the occurrence of death until the moment the body and/or human remains are studied. The PMI estimation has great relevance in the Forensic Sciences for its important role in the resolution of criminal cases. There are several techniques for the PMI estimation but associations are often necessary for better results. In the search for precision, new methods are constantly evaluated and tested, such as the use of molecular biology, through DNA and RNA analysis. Recent studies have demonstrated the use of the RNA molecule in the PMI estimation. Teeth are important for RNA extraction because they have an adequate availability of genetic material and degree of protection against endogenous and exogenous conditions that can accelerate the molecule degradation. The aim of this study was to evaluate the applicability of the quantification method of the degradation of RNA extracted from dental pulps as an alternative in the estimation of the *post mortem* interval, simulating inhumation conditions on exposed soil, with temperature and humidity changes. For this, 70 human teeth were divided into 7 groups, which were submitted to the inhumation condition for pre-established periods of time. Subsequently, the groups were recovered, and it was performed the dental pulp removal, RNA extraction and analysis of the degradation of the molecule to obtain the results. After the steps described, it was possible to verify pulp tissue for extraction in 32.85% of samples, with Groups 1 and 4 being those with the highest number of samples with apparent pulp tissue. Regarding the quantification of RNA molecule integrity, among the 70 teeth that made up the total sample group, the Agilent 2100 Bioanalyzer system (AgilentTM, California, USA) was only able to provide a RIN (RNA integrity number) for 11 samples, which corresponds to 15.71%. Group 1 presented the highest number of components with a detectable RIN, totaling 40% and Group 3, which presented the highest RIN among one of its representatives in relation to any sample group, being this value of 5.90. In groups 6 and 7 it was not possible to detect any sample with any integrity rate of the RNA molecule. It was found that the results obtained were not enough to develop a regression equation that was applicable and had baseline. After the analysis of the results, it was possible to conclude that the method of quantification of degradation of the RNA molecule extracted from dental pulps was not applicable to the estimation of the post mortem interval in simulated conditions of inhumation on exposed soil changes in temperature and humidity.

Key-words: Forensic Dentistry, Victims Identification, Nucleic Acids. Thanatology.

Lista de Ilustrações

Lista de Ilustrações

Figura 1- Freezer Thermo Scientific Forma 8600 Series -86C Ultra-low, Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil.....	39
Figura 2- Comparação entre os resultados obtidos após análise das amostras 2C e 2F, evidenciando similaridade entre os resultados.....	40
Figura 3- Comparação entre resultados obtidos após análise das amostras 2C E 1F, evidenciando similaridade entre os resultados.....	41
Figura 4- Saco de tecido poliéster com dimensões de 16x13cm, identificação do grupo amostral acoplada a um elástico e demonstração do armazenamento dos dentes dentro do saco.....	42
Figura 5- Buracos de dimensões de 1,0x0,4m confeccionados no terreno da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.....	42
Figura 6- Buracos confeccionados no terreno da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.....	43
Figura 7- Saco de tecido poliéster contendo os dentes do grupo amostral misturados com uma porção de terra do terreno da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Demonstração da tira utilizando fita adesiva para demarcação de solo (50mmx30m, amarela, Tectape) amarrada ao saco.....	44
Figura 8- Buraco delimitado por estacas de madeira e fita com identificação do grupo amostral.....	44
Figura 9- Delimitação dos buracos onde se encontram enterrados os grupos amostrais.....	45
Figura 10- Posicionamento da broca paralela à junção cimento-esmalte, distando 2 mm da mesma. Demonstração de canaleta confeccionada ao redor da extensão do elemento dental.....	46
Figura 11- Posicionamento do fórceps cirúrgico utilizada para separação entre coroa e raiz dental demonstrada na sequência.....	46
Figura 12- Remoção da polpa utilizando escavador de dentina nº16 e solução RNA Later (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) na qual as polpas foram acondicionadas em <i>eppendorf</i>	47
Figura 13- 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).....	48

Figura 14- RNA 6000 Nano (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) e Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).....	49
Figura 15- Resultados das amostras 1F e 1G após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).....	52
Figura 16- Resultados das amostras 2E e 2G após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).....	53
Figura 17- Resultado da amostra 3C após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) demonstrando o maior RIN encontrado dentro de todo grupo amostral.....	53
Figura 18- Resultados das amostras 3H e 3I após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).....	54
Figura 19- Resultados das amostras 4D e 5E após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).....	54
Figura 20- Resultados das amostras dos grupos 6 e 7 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).....	55
Figura 21- Resultados das amostras “padrão 1” e “padrão 2” após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).....	56
Figura 22- Correlação entre tempo e número de integridade do RNA.....	57

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1- Distribuição dos grupos amostrais.....	41
Tabela 2- Quantidade de amostras, dentro de cada Grupo, que apresentaram polpa dental visível a olho nu após secção do elemento dental.....	51
Tabela 3- Valores referentes ao número de integridade do RNA (RIN) de cada amostra dentro dos grupos pré-estabelecidos.....	56

Lísta de Abreviaturas e Siglas

Lista de Abreviaturas e Siglas

APCD	Associação Paulista de Cirurgiões-dentistas
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
INTERPOL	Organização Internacional de Polícia Criminal
IPM	Intervalo <i>post mortem</i>
mL	Mililitro
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ácido ribonucleico
USP	Universidade de São Paulo

Lista de Símbolos

Lista de Símbolos

% Porcentagem

TM *Trade Mark* (Marca registrada)

Sumário

Sumário

1. Introdução.....	29
1.1. Estimativa do Intervalo <i>post mortem</i>	29
1.2. Biologia molecular e a estimativa do intervalo <i>post mortem</i>	32
1.3. Polpa dental.....	33
2. Objetivo.....	36
3. Material e métodos.....	38
3.1. Aspectos éticos.....	38
3.2. Obtenção das amostras.....	38
3.3 Teste Piloto.....	39
3.4. Armazenamento das amostras e submissão às condições ambientais e de tempo.....	41
3.5. Extração da polpa dental	45
3.6. Isolamento da molécula de RNA.....	47
3.7. Análise da degradação da molécula de RNA	48
3.8. Análise estatística	49
4. Resultados.....	51
4.1 Resultados amostra total.....	51
4.1.1 Quantificação de tecido pulpar aparente.....	51
4.1.2 Quantificação da integridade da molécula de RNA.....	51
4.1.3 Amostra padrão.....	55
4.1.4 Análise estatística.....	56
5. Discussão.....	59
6. Conclusão.....	70
Referências.....	72
 Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	 77

Introdução

1. Introdução

1.1 Estimativa de intervalo *post mortem*

O intervalo *post mortem* (IPM) é o período de tempo desde a ocorrência do óbito até o momento em que se passa a analisar o corpo e/ou seus remanescentes (SZELECZ, et al. 2018). A estimativa deste intervalo é assunto de grande relevância no âmbito forense por seu papel importante na resolução de casos criminais.

Durante a investigação de casos que envolvam morte violenta, por exemplo, o aspecto temporal influencia na reconstrução tanto do modo como da circunstância da morte, além de ligar ou excluir suspeitos ao caso e autenticar ou não informações cedidas por testemunhas. Já na área cível, pode ter influência em questões sucessórias, tanto em casos de morte natural quanto suspeita (GREENBERG, KUNICH, 2002; YOUNG et al., 2013).

Diversos métodos vêm sendo desenvolvidos para a tentativa de estimar o tempo decorrido do momento do óbito, porém a precisão e aplicabilidade são, em muitos casos, um desafio (POÓR et al., 2016), pois a dificuldade em estimar o intervalo *post mortem* está ligada a dependência deste em relação a diversos fatores, como por exemplo, a análise dos fenômenos cadavéricos naturais do corpo, porém estes podem trazer dúvidas por variarem de acordo com a influência de fatores internos e externos, promovendo um resultado desta análise como um valor aproximado ou até um intervalo de tempo, não existindo uma precisão mais significativa (WOELFERT, 2003).

A estimativa do intervalo *post mortem* tem sua precisão inversamente proporcional ao período de tempo decorrido desde a morte (AMENDT, et al., 2011). Estudos mostram que o IPM estimado em um período de até seis horas tem uma margem de erro de cerca de duas horas, aumentando esta margem para três horas quando o intervalo é de 14 horas, até atingir uma margem de erro de 4,5 horas nas 10 horas subsequentes que vão somar 24 horas decorridas do momento do óbito (KALISZAN; HAUSER; KERNBACH-WIGHTON, 2009).

Johnson e Ferris (2002) demonstraram, também, que os métodos já existentes podem chegar a uma margem de erro de oito horas entre o real

tempo decorrido desde a morte e o tempo estimado, o que pode influenciar significativamente em investigações.

Desta forma, existem atualmente diversas técnicas forenses para estimativa do IPM incluindo diferentes vertentes das Ciências Forenses para a busca de resultados com maior acurácia (SILVA et al., 2013). Para auxiliar nesse processo, os profissionais buscam a associação de informações provenientes de diversas fontes como as evidências do próprio cadáver, do meio ao qual o corpo se encontrava, além de fatos sobre a história clínica prévia e os acontecimentos e atividades que o indivíduo desenvolvia antes de vir a óbito (JAFFE, 1983).

A cronotanatognose, por exemplo, é um método de estimativa do tempo transcorrido desde a morte com base no estudo e análise dos processos deformativos e putrefativos ocorridos no corpo (GARRIDO; NAIA, 2014). Este método analisa os fenômenos cadavéricos abióticos como o arrefecimento corporal, aparecimento de livores de hipóstase, dessecação tegumentar e rigidez cadavérica (CAÑADAS et al., 2003), além dos fenômenos cadavéricos transformativos que podem ser destrutivos ou conservadores. Essa área da Patologia é utilizada nos períodos iniciais após o óbito, demonstrando maior precisão quando utilizada em até quatro dias *post mortem* (VASS et al., 2002).

A Entomologia Forense analisa a colonização do corpo por insetos, ácaros e outros artrópodes estudando o seu ciclo de vida, não só para estimar o IPM, como também localizá-lo geograficamente, quando possível (BERNHARDT et al., 2008). Diversas espécies de insetos alojam-se no cadáver em diferentes fases da decomposição. Todavia, dependendo do meio ambiente no qual o cadáver se encontra ou da forma como ocorreu a morte, o início da colonização pelos insetos pode ser atrasado ou acelerado (HALL, 2005). Outro ponto sobre a limitação deste método pode ser apresentado como a necessidade de o examinador possuir conhecimento da fauna específica do local da morte (YOUNG et al., 2013).

Já a Antropologia Forense atua em casos envolvendo maiores períodos de tempo transcorridos desde o óbito, onde já se encontra esqueletização do corpo. Apesar de essa ciência ser conhecida no estabelecimento do perfil antropológico onde é capaz de auxiliar na estimativa do sexo, idade, estatura e ancestralidade da vítima (BIANCALANA et al., 2015),

dentro do IPM, a Antropologia pode fornecer informações sobre os remanescentes ósseos definindo se esses esqueletizaram recentemente, após um maior período de tempo ou se já podem ser considerados arqueológicos (CATTANEO, 2007). Além destas informações, os remanescentes podem fornecer ou dar indicativos, também, a respeito do momento do óbito, presença de traumas e possível patologia que levou à morte (INTERPOL, 2014).

Apesar dos diferentes métodos já existentes para a estimativa do IPM, ainda são necessárias associações para melhores resultados. Além de levar em consideração as informações obtidas no cadáver, o examinador precisa se atentar também a todas as condições que envolvem o meio em que o corpo se encontra e sua história previamente ao óbito.

Alguns métodos de datação do IPM acabam baseando-se em avaliações subjetivas do cadáver, exigindo, dessa forma, conhecimento prévio por parte do examinador das alterações e fenômenos cadavéricos que ocorrem após o óbito, trazendo certa subjetividade para o processo, mesmo que de forma involuntária, além de possíveis variações entre as técnicas utilizadas e a impossibilidade de controlar fatores externos (NAIA, 2014).

A estimativa do IPM também fica submetida às características do ambiente em que o corpo ou remanescente se encontra (SIEGER; SAUKKO; KNUPFER, 2000), sendo necessário que os estudos que envolvam a análise e teste de novos métodos para estimativa de intervalo *post mortem* sejam desenvolvidos simulando condições ambientais próximas da realidade a qual corpos são encontrados para que de fato seja testado se tais métodos vão possuir aplicabilidade dentro do cenário forense.

A estimativa do IPM é de extrema importância na resolução de casos criminais e as Ciências Forenses já possuem métodos para a sua estimativa, porém muitos ainda não possuem um bom índice de precisão (JOHNSON; FERRIS, 2002; KALISZAN; HAUSER; KERNBACH-WIGHTON, 2009, POÓR et al., 2016), existindo a necessidade de se obter métodos que possuam a capacidade de diminuir a margem de erro e assim tragam outras possibilidades para os casos em que os métodos pré-existent não são aplicáveis.

Sendo assim, a proposta do estudo se justifica na necessidade de expandir o número de estudos sobre a estimativa do intervalo *post mortem* e nesse cenário se encontra a possibilidade da utilização da biologia molecular.

1.2 Biologia molecular e a estimativa do intervalo *post mortem*

A análise de moléculas de DNA e RNA no contexto forense já é sedimentada, explicitando como vantagens ser um método de conhecimento global e relativamente rápido, possuir alto caráter discriminatório e possibilidade de extração de inúmeras fontes de material biológico e informações (YOUNG et al., 2013, LEITE et al., 2013).

A utilização do DNA se centraliza basicamente em traçar o perfil genético da vítima como uma forma de método primário de identificação humana. Já o estudo do RNA ainda é um assunto pouco explorado dentro do campo forense, principalmente pela crença de que essa molécula não teria aplicação dentro do contexto da identificação humana.

O RNA é uma molécula monocatenária (de uma única cadeia), existindo a possibilidade de haver regiões de dupla hélice decorrente do pareamento intramolecular. O RNA difere do DNA quanto à composição das bases, sendo presente a uracila no lugar da timina, e quanto à pentose, estando presente a ribose (RIBEIRO, 2009).

O RNA tem se mostrado um importante aliado no processo de determinação da origem celular de uma amostra encontrada onde é utilizado na identificação e diferenciação de manchas de fluidos corporais, como sangue venoso, sangue menstrual, saliva e sêmen (BAUER et al., 2003, SETZER; JUUSOLA; BALLANTYNE, 2008), além de ser utilizado também para estimar o tempo de existência da amostra em questão (BAUER, 2007).

Ao abordar a estimativa do intervalo *post mortem*, a maioria dos estudos se concentra na utilização do DNA por acreditarem ser este mais estável. O RNA pode ser considerado mais susceptível à hidrólise por diversos fatores como a presença de cátions Ca^{2+} e metais de transição (LINDAHL, 1967), meios alcalinos (BROWN; TODD, 1952) e também devido a presença de enzimas RNases que aumentam significativamente as taxas de degradação da molécula (KLESSER; BAR; KRATZER, 2009). No entanto, existem estudos que demonstram que o RNA pode ser considerado uma molécula estável em determinadas situações (LINDAHL; NYBERG, 1972, KOTCHETKOV; BUDOWSY, 1972, FORDYCE et al., 2013). Dessa forma é possível a estabilidade da molécula permitindo que seja procedida sua detecção e

análise, tornando plausível o estudo do seu grau de degradação relacionado com casos de estimativa de IPM.

Na literatura, encontramos outros estudos que analisaram as mudanças da molécula de RNA com relação a sua aplicação para estimativa do intervalo post mortem. Inoue, Kimura e Tuji (2002) estudaram a degradação de moléculas de mRNA provenientes de tecido de ratos por um período de 7 dias.

Bauer et al. (2003) analisaram o perfil do RNA extraído de amostras de sangue e tecido cerebral em períodos de 7 a 145 horas após o óbito, enquanto Zhao et al. (2006) estimaram o perfil de degradação de três genes provenientes de tecido cerebral, do coração, rim e pulmão obtidos em necropsias em um período de 0 a 72 horas transcorridos da morte.

Young et al. (2013) estudaram a estimativa do IPM por meio da análise da degradação da molécula de RNA combinado a mudanças morfológicas sofridas na polpa dental de animais suínos, encontrando resultados positivos para essa associação.

Poór et al. (2016) desenvolveram um projeto piloto investigando moléculas de RNA provenientes da polpa dental de terceiros molares e pré-molares e sua aplicação na estimativa do IPM atingindo resultados favoráveis.

1.3 Polpa dental

Analizando as melhores condições para a preservação do RNA, podemos indicar o uso dos elementos dentais como uma adequada opção de escolha para extração do ácido nucleico. A utilização do método da Odontologia Legal já é bem estabelecida no campo da identificação humana, atuando, por exemplo, no estabelecimento de perfil antropológico, utilização de rugoscopia e queiloscopia, análise de marcas de mordida e identificação de vítimas em desastres em massa (KRISHAN; KACHAN; GARG, 2015), além dos próprios elementos dentais já serem amplamente utilizados no âmbito das investigações criminais. Porém ainda não possui sua possível contribuição com análise genética devidamente explorada no campo da Tanatologia Forense e estimativa de intervalo *post mortem*.

Os dentes são formados por tecidos altamente mineralizados, como é o caso do esmalte dental, resistentes às ações do ambiente, tais como

incineração, traumas, imersão, decomposição e mutilação, o que permite que, mesmo em casos agressivos de destruição dos remanescentes humanos, ainda se tenha acesso a esses elementos (MALAVER; YUNIS, 2003).

No interior dos dentes encontra-se um complexo estrutural denominado complexo dentina-polpa, responsável pela vitalidade do dente. A polpa dental é um tecido conjuntivo altamente vascularizado que se situa no interior do complexo e é protegida pelas camadas de dentina e esmalte. Dessa forma, a polpa se apresenta como um local de possíveis condições favoráveis para que seja feita a extração de RNA para análise.

A observação de um estudo prévio sobre a utilização do RNA proveniente da polpa dental permitiu constatar que essa molécula possui um comportamento relativamente estável e mais resistente à ação da temperatura nesse tecido quando comparado ao comportamento em outros tecidos do corpo (CONDE et al., 2012). E Poór et al. (2016) também demonstraram que a estimativa do IPM através de molécula de RNA extraída da polpa pode ser uma metodologia eficaz.

Nota-se, assim, que estudos sobre a utilização do RNA em detalhamento de IPM já foram realizados, mas a precisão do método ainda necessita de maior investigação.

Objetivo

2. Objetivo

Avaliar a aplicabilidade da utilização do método de quantificação da degradação da molécula de RNA extraída de polpas dentais como uma alternativa na estimativa do intervalo *post mortem*, simulando condições de inumação em terreno exposto as alterações de temperatura e umidade.

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 sob o número CAAE 67257617.4.0000.5440, a fim de cumprir todas as exigências da Resolução nº 466/12.

3.2 Obtenção das amostras

Para este estudo, a amostra foi composta por dentes humanos, especificamente terceiros molares que foram extraídos por indicação terapêutica, totalizando 70 dentes. Os sujeitos da pesquisa, doadores dos elementos dentais, foram pacientes que passaram por intervenção cirúrgica na clínica de cirurgia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), na clínica de cirurgia do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Clínica da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP) e na clínica de Cirurgia da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas (APCD) do município de Ribeirão Preto.

Previamente à coleta das amostras, todos os participantes foram informados sobre a pesquisa por meio do termo de consentimento livre e esclarecido, sendo este documento devidamente preenchido, seguindo as normativas vigentes.

O critério de inclusão para a seleção dos dentes foi a necessidade de os terceiros molares estarem íntegros e hígidos. Os critérios de exclusão foram elementos dentais que sofreram fragmentação durante procedimento cirúrgico, dentes com presença de patologias periapicais, lesões cariosas, fraturas em região de coroa e raiz, tratamentos endodônticos, tratamentos restauradores e reabilitações protéticas no geral.

Para evitar o início da degradação da molécula de RNA, os dentes eram armazenados, logo após o procedimento odontológico de exodontia, em freezer -80°C (Thermo Scientific Forma 8600 Series -86C Ultra-low, Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) até completar número suficiente para iniciar a segmentação da amostragem em grupos relacionados ao período de tempo em que ficariam expostos às condições climáticas.

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

Fonte: Imagem de autoria própria.

3.3 Teste piloto

Foi executado um teste piloto com a finalidade de avaliar a eficácia do processo de congelamento aos quais os dentes seriam submetidos, com a intenção de preservação da polpa e retardamento do processo de degradação da molécula de RNA, para determinar se esse seria realmente efetivo.

Para tal, foram utilizados seis dentes divididos em dois grupos, sendo o grupo 1 composto por três terceiros molares que permaneceram congelados por três meses após o procedimento cirúrgico de extração, cuja as amostras foram denominadas 1C, 2C e 3C, e o grupo 2 composto por três terceiros molares que foram imediatamente analisados após o procedimento cirúrgico, sem que fosse submetido ao processo de congelamento em freezer -80°C, cuja as amostras foram denominadas 1F, 2F e 3F.

Posteriormente aos processos de extração da polpa dental através da separação entre coroa e raiz e extração da molécula de RNA utilizando o MagMAX™ mirVana™ *Total RNA Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) na plataforma automatizada de manipulação de líquidos Microlab NIMBUS (Hamilton Company^R, Reno, Estados Unidos), foi realizada a análise

da degradação da molécula de RNA sendo possível evidenciar um número de integridade da molécula em todos os componentes dos grupos amostrais.

No grupo 1, os resultados obtidos para as amostras congeladas variaram entre um RIN de 4.20 a 7.30, sendo a amostra 2C a que apresentou melhores resultados com RIN de 7.30 e no grupo 2 os resultados obtidos para as amostras frescas variaram entre um RIN de 7.40 a 8, sendo a amostra 2F a de melhores resultados com RIN de 8.

Com relação ao processo de comparação entre dentes previamente congelados e dentes recém-extraídos (frescos), ao que diz respeito da integridade da molécula de RNA extraída da polpa dental, é possível notar que resultados muito similares foram obtidos após análise da amostragem, onde, por exemplo, uma amostra congelada demonstrou RIN 7.30 (amostra 2C), enquanto uma amostra fresca apresentou RIN próximo a 7.40 (amostra 1F), demonstrando que o processo de congelamento não interferiu no comportamento da molécula de RNA.

Figura 2- Comparação entre resultados obtidos após análise das amostras 2C E 2F, evidenciando similaridade entre os resultados.

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

Figura 3- Comparação entre resultados obtidos após análise das amostras 2C E 1F, evidenciando similaridade entre os resultados.

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

3.4 Submissão das amostras às condições ambientais e de tempo

Após atingir o total de 70 dentes, estes foram divididos em sete grupos de dez dentes cada, correspondentes aos períodos de tempo aos quais foram submetidos às condições climáticas, sendo estes períodos de uma semana, duas semanas, três semanas, quatro semanas, oito semanas, doze semanas e dezesseis semanas.

Com a intenção de simular as condições climáticas de um processo de inumação, os grupos amostrais foram enterrados em terreno pertencente à área da FORP-USP.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos amostrais.

Grupo	Nº de semanas
1	1 semana
2	2 semanas
3	3 semanas
4	4 semanas
5	8 semanas
6	12 semanas
7	16 semanas

Fonte: Imagem de autoria própria

Para isso, inicialmente foram confeccionados pequenos sacos de tecido em poliéster (tipo filó) com as dimensões de 16x13cm, nos quais os dentes de cada grupo foram colocados recebendo uma identificação acoplada a um elástico, o qual foi utilizado para fechar o saco. Este tecido foi escolhido por ser

tramado em rede, com furos hexagonais, o que permitiria a passagem de luz, umidade e terra, permitindo uma simulação mais fidedigna das condições climáticas.

Figura 4 - Saco de tecido poliéster com dimensões de 16x13cm, identificação do grupo amostral acoplada a um elástico e demonstração do armazenamento dos dentes dentro do saco.

Fonte: Imagem de autoria própria.

No local de escolha do terreno supracitado, foram confeccionados buracos individuais para cada grupo com as dimensões de um metro de profundidade e 0,4 metros de largura, por serem dimensões que simulam e se aproximam das condições do processo de inumação.

Figura 5- Buracos de dimensões de 1,0x0,4m confeccionados no terreno da FORP-USP.

Fonte: Imagem de autoria.

Figura 6- Buracos confeccionados no terreno da FORP-USP.

Fonte: Imagem de autoria própria.

Antes de colocar os sacos dos grupos amostrais contendo os dentes no interior dos buracos confeccionados, foi depositada uma quantidade de terra do próprio terreno dentro dos mesmos para garantir que os dentes tivessem total contato com o solo. Também foi elaborada uma espécie de tira utilizando fita adesiva para demarcação de solo (50mm x 30m, amarela, Tectape) sendo essa amarrada ao saco, com a intenção de deixar a extremidade da fita para fora do buraco a fim de facilitar o manejo durante o processo de desenterramento.

Após este processo, os sacos de tecido devidamente preenchidos, identificados e amarrados foram colocados nos buracos confeccionados sendo estes delimitados e identificados através de estacas de madeira, fita adesiva para demarcação de solo (50mm x 30m, amarela, Tectape) e uma placa com a numeração do grupo amostral.

Figura 7- Saco de tecido poliéster contendo os dentes do grupo amostral misturados com uma porção de terra do terreno da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Demonstração da tira utilizando fita adesiva para demarcação de solo (50mmx30m, amarela, Tectape) amarrada ao saco.

Fonte: Imagem de autoria própria.

Figura 8- Buraco delimitado por estacas de madeira e fita com identificação do grupo amostral.

Fonte: Imagem de autoria própria.

Figura 9- Delimitação dos buracos onde ficaram inumados os grupos amostrais.

Fonte: Imagem de autoria própria.

Após os dentes serem mantidos armazenados pelo período de tempo pré-determinado de acordo com o grupo amostral, o buraco foi reaberto sendo o saco de tecido retirado, os dentes recuperados e lavados em água corrente para remover os excessos de terra e assim passou-se para a etapa de extração da polpa dental.

3.5 Extração da polpa dental

Para a extração da polpa dental, os dentes foram seccionados utilizando uma broca carbide de uso odontológico nº 701 e ponta diamantada cilíndrica, acoplada ao micromotor de alta rotação para uso odontológico. A broca foi posicionada paralela à junção cimento-esmalte, distando 2 mm da mesma, sendo confeccionada uma canaleta ao redor de toda a extensão do elemento dental sem romper completamente a união entre a coroa e a raiz.

Figura 10- Posicionamento da broca paralela à junção cimento-esmalte, distando 2 mm da mesma. Demonstração de canaleta confeccionada ao redor da extensão do elemento dental.

Fonte: Imagem de autoria própria.

Anteriormente à separação completa entre raiz e coroa dental, a secção com broca foi interrompida e assim, finalizada com o auxílio de um fórceps cirúrgico de ponta reta número 151, separando por completo coroa e raiz do dente, expondo a polpa dental.

Figura 11- Posicionamento do fórceps cirúrgico utilizada para separação entre coroa e raiz dental demonstrada na sequência.

Fonte: Imagem de autoria própria.

As porções da polpa dental, coronal e radicular, foram removidas com o auxílio de instrumental escavador de dentina nº 16, sendo posteriormente acondicionados em *ependorfs* individuais, devidamente identificados, contendo 0,5 mL de RNA Later (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil).

Figura 12- Remoção da polpa utilizando escavador de dentina nº16 e solução RNA Later (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) na qual as polpas foram acondicionadas em *ependorf*.

Fonte: Imagem de autoria própria.

Os tubos plásticos contendo as polpas dentais e a solução RNA Later (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) foram armazenados em freezer com temperatura de -20°C até o momento de extração da molécula de RNA.

3.6 Isolamento da molécula de RNA

Antes de iniciar o processo de isolamento do RNA, todos os utensílios, materiais utilizados e bancada foram tratados com RNase Zap (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) para evitar a degradação da molécula.

Em um primeiro momento, os *ependorfs* passaram por um processo de centrifugação para viabilizar a utilização de qualquer fragmento de tecido pulpar, independente de seu tamanho.

Para a extração e isolamento da molécula de RNA das amostras foi utilizado o MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) na plataforma automatizada de manipulação de

líquidos Microlab NIMBUS (Hamilton Company^R, Reno, Estados Unidos) seguindo todas as recomendações e etapas propostas pelos fabricantes.

Figura 13- MagMAXTM mirVanaTM Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher ScientificTM, São Paulo, Brasil) e plataforma automatizada de manipulação de líquidos Microlab NIMBUS (Hamilton Company^R, Reno, Estados Unidos).

Fonte: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A27828> e <https://www.hamiltoncompany.com/products/automated-liquid-handling/liquid-handling-workstations/microlab-nimbus>.

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 (AgilentTM, Califórnia, Estados Unidos) que utilizam eletroforese baseada em chip microfluídrico para suas observações.

Após a preparação das amostras com o kit RNA 6000 Nano (AgilentTM, Califórnia, Estados Unidos), essas foram analisadas com o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (AgilentTM, Califórnia, Estados Unidos), onde o número de integridade do RNA (RIN) foi calculado usando o Agilent 2100 Expert software (AgilentTM, Califórnia, Estados Unidos), um método com uma boa sensibilidade e usuário independente, que avalia e quantifica as áreas de pico que representam fragmentos de RNA ribossômico (18S e 28S) e, assim, fornece valores de 1, que significa completa degradação da molécula, a 10, que demonstra molécula de RNA completamente intacta, além de levar em consideração a intensidade de possíveis produtos de degradação.

Figura 14- RNA 6000 Nano (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) e Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Fonte: <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>

3.8 Análise estatística

Será realizada regressão linear simples, através do software IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp, Armonk, Estados Unidos), denotando a variável RIN como a variável dependente e a variável tempo como covariável, além de uma análise descritiva dos resultados.

Resultados

4. Resultados

4.1 Resultados amostra total

4.1.1 Quantificação de tecido pulpar aparente

Durante a etapa de extração da polpa dental, após a secção e separação do dente em coroa e raiz, não foi possível detectar tecido pulpar visível a olho nu para extração em todas as amostras, sendo esse encontrado em apenas 32,85% das amostras, o que representa 23 amostras no total.

O Grupo 1 e o Grupo 4 foram os que apresentaram o maior número de amostras com tecido pulpar aparente, totalizando em 6 amostras, e o Grupo 7 foi o que apresentou o menor número de amostras com polpa dental disponível, não sendo possível constatar o tecido pulpar aparente em nenhuma das amostras que compõem este grupo.

Nas amostras em que não foi constatada polpa dental, procedeu-se uma tentativa de raspagem nas paredes internas da câmara pulpar, utilizando escavador de dentina nº 16, para que todo material disponível possível fosse coletado. Vale ressaltar que todas as etapas descritas na metodologia foram aplicadas em todo o grupo amostral, independente da quantidade de tecido pulpar encontrada em cada elemento dental.

Tabela 2- Quantidade de amostras, dentro de cada Grupo, que apresentaram polpa dental visível a olho nu após secção do elemento dental.

GRUPO	Nº de amostras com tecido pulpar aparente
1	6 amostras
2	4 amostras
3	2 amostras
4	6 amostras
5	3 amostras
6	2 amostras
7	0

Fonte: Tabela de autoria própria.

4.1.2 Quantificação da Integridade da molécula de RNA

Previamente ao início dos testes, todos os grupos tiveram suas amostras identificadas através de letras que variaram de “A” a “J”. Após o processo de extração do RNA e preparação das amostras utilizando o kit RNA 6000 Nano

(Agilent™, Califórnia, Estados Unidos), as mesmas foram analisadas com o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Dentre os 70 dentes que constituíam o grupo amostral total, o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) só foi capaz de fornecer um RIN para 11 amostras, o que corresponde a 15,71%, justificando que nas demais não foi possível detectar uma quantidade suficiente da molécula de RNA para que fosse possível a tentativa de quantificação do seu nível de degradação, apesar de existir ainda em alguma tecido pulpar aparente.

Vale ressaltar que, das 11 amostras em que foi possível encontrar um RIN, em 4 delas o valor era equivalente a 1, o que significa uma total degradação da molécula de RNA.

O Grupo 1, referente a amostras que permaneceram o período de tempo de uma semana enterradas antes de sua análise, foi o que apresentou o maior número de componentes com um RIN detectável, totalizando 40% das amostras. A amostra 1F foi a que exibiu o maior número de integridade, sendo 4.20 este valor, e a amostra 1G foi o menor número dentre os detectáveis, sendo este RIN de apenas 1.

Figura 15- Resultados das amostras 1F e 1G 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).

Com relação ao Grupo 2, referente a duas semanas de inumação das amostras, só foi possível detectar dois representantes com número de

integridade do RNA presente sendo estes a amostra 2E, com o RIN de 1, e a amostra 2G, com o RIN em 3.90.

Figura 16- Resultados das amostras 2E e 2G 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, que diz respeito à amostras que permaneceram inumadas por três semanas, expressou resultados detectáveis de degradação da molécula de RNA em apenas 30% das amostras, porém foi o grupo que apresentou o maior RIN dentre um de seus representantes frente a todo grupo amostral, sendo este valor de 5.90 na amostra 3C. As demais amostras que apresentaram um valor de RIN foram a 3H, com 3.70 e a 3I, com 1.

Figura 17- Resultado da amostra 3C após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) demonstrando o maior RIN encontrado dentro de todo grupo amostral.

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

Figura 18- Resultados das amostras 3H e 3I 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 que diz respeito aos Grupos 4 e 5, relacionados, respectivamente, a 4 semanas e 8 semanas de inumação, foi encontrada apenas uma amostra em cada um dos mesmos em que fosse possível obter um número de integridade do RNA, sendo estas as amostras 4D, com o valor de 1.90, e a amostra 5E com o valor de 1.

Figura 19- Resultados das amostras 4D e 5E 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).

Nos grupos 6 e 7, onde os dentes permaneceram inumados por 12 e 16 semanas respectivamente, segundo o software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos) não foi possível detectar nenhuma amostra com um número significativo de moléculas de RNA com alguma taxa de integridade para que estas fossem analisadas pelo sistema e fornecido um RIN.

Figura 20- Resultados das amostras dos grupos 6 e 7 após análise pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent™, Califórnia, Estados Unidos).

Sample Name	Status	Result Label	Sample Name	Status	Result Label
6A	✓	RIN N/A	7A	✓	RIN N/A
6B	✓	RIN N/A	7B	✓	RIN N/A
6C	✓	RIN N/A	7C	✓	RIN N/A
6D	✓	RIN N/A	7D	✓	RIN N/A
6E	✓	RIN N/A	7E	✓	RIN N/A
6F	✓	RIN N/A	7F	✓	RIN N/A
6G	✓	RIN N/A	7G	✓	RIN N/A
6H	✓	RIN N/A	7H	✓	RIN N/A
6I	✓	RIN N/A	7I	✓	RIN N/A
6J	✓	RIN N/A	7I	✓	RIN N/A
Ladder	✓	All Other Samples	Ladder	✓	All Other Samples

* RIN N/A: Não foi detectada quantidade suficiente de RNA para análise e determinação do RIN.

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

4.1.3 Amostra padrão

Para garantir que todas as etapas do processo de extração e quantificação do RNA foram eficientes, utilizou-se duas amostras de culturas de fibroblastos humanos, nomeadas como “padrão”, para avaliar a integridade de todo o método aplicado. Optou-se pela utilização das células em cultura como forma de referência por terem procedência e integridade conhecida, e após análise, as amostras “padrão 1” e “padrão 2” demonstraram valores de RIN 9.70 e 9.50 respectivamente, validando os passos desenvolvidos durante a aplicação da metodologia.

Figura 21- Resultados das amostras “padrão 1” e “padrão 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).

4.1.4 Análise estatística

Foi proposto na metodologia obter medidas resumo (média, mediana, desvio padrão) e desenvolver uma regressão linear simples denotando a variável “RIN” como a variável dependente e a variável “tempo” como covariável. Todavia, após a realização dos testes constatou-se que os resultados obtidos não seriam suficientes para que fosse desenvolvida uma equação de regressão que fosse aplicável e tivesse embasamento em suas conclusões.

Tabela 3- Valores referentes ao número de integridade do RNA (RIN) de cada amostra dentro dos grupos pré-estabelecidos.

GRUPO	Amostras									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	1.30*	ND	ND	ND	ND	4.20*	1*	ND	3.30*	ND
2	ND	ND	ND	ND	1*	ND	3.90*	ND	ND	ND
3	ND	ND	5.90*	ND	ND	ND	ND	3.70*	1*	ND
4	ND	ND	ND	1.90*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	1*	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*Amostras que apresentaram um RIN após análise

ND- amostra com quantidade de RNA abaixo do limite mínimo detectável para quantificação da degradação.

Apesar da existência de poucos valores de integridade da molécula de RNA para que fosse procedida a análise, foi desenvolvido um gráfico de dispersão para verificar nos valores existentes quanto a variável “RIN” era afetada pela variável “tempo”, porém após sua avaliação ficou demonstrado que não foi possível identificar uma correlação entre as variáveis, não existindo qualquer linearidade entre os resultados.

Figura 22- Correlação entre tempo e número de integridade do RNA.

Díscussão

5. Discussão

A definição de intervalo *post mortem* (IPM) diz respeito ao lapso temporal que transcorreu desde a ocorrência do óbito até o momento em que se tem início a análise do corpo ou suas partes disponíveis (SZELECZ, et al. 2018). A estimativa do IPM tem seu prelúdio com o exame macroscópico do cadáver ou remanescentes ósseos, observando os aspectos que levam em consideração a aparência macroscópica, preservação do tecido e odor (WOESS, et al. 2017).

Existem diversos métodos para a estimativa desse intervalo como, por exemplo, a cronotanatognose (VASS et al., 2002), a Entomologia Forense (BERNHARDT et al., 2008; WOESS et al., 2017), a Antropologia Forense (CATTANEO, 2007), métodos microscópicos (SCHULTZ, 1997), testes de quimiluminescência como as reações de luminol (CREAMER; BUCK, 2009), técnicas de radiocarbono (UBELAKER; BUCHHOLZ; STEWART, 2006), análise espectroscópica (HOWES et al., 2012), fluorescência UV macroscópica (HOKE et al., 2013) e a detecção de vários radionuclídeos (SCHARG et al., 2012). Nesse estudo optou-se por testar a possibilidade de estimativa do IPM através da análise da degradação da molécula de RNA e sua possível correlação com o tempo.

A escolha do método que será aplicado em cada situação está associada com o estado de conservação do corpo ou remanescentes, e essa preservação do cadáver está diretamente relacionada com o ambiente em que esse se encontra, pois a temperatura, umidade, facilidade de acesso por parte de insetos e animais, o terreno e se o corpo se encontrava enterrado (TAYLOR et. al, 1989; SIEGER; SAUKKO; KNUPFER, 2000) são fatores com potencial de influenciar o processo de decomposição que o corpo sofre ao longo do tempo.

Dessa forma, surge a necessidade de os estudos voltados para a área forense priorizarem a realização de suas metodologias com simulação de condições encontradas no dia-a-dia da prática pericial, a fim de trazer maior veracidade aos resultados. No estudo em questão, optou-se por replicar condições de inumação que, segundo Campos (2007), é o ato de enterrar o cadáver em cova aberta e aterrada com profundidade de 1,10 a 1,50 metros e

é uma das formas de sepultamento mais comuns devido à influência da visão cristã (CAPUTO, 2008).

As amostras foram submetidas ao processo de inumação no município de Ribeirão Preto, que apresenta um solo característico conhecido como terra roxa, originado da alteração de roxas vulcânicas e arenito. Com relação as condições climáticas, o clima típico do município é o tropical úmido, caracterizado por verões chuvosos e invernos secos.

Outros estudos como o de Bishop (2015) e Young et al. (2013), que da mesma forma analisaram o método de estimativa do IPM através de moléculas de RNA, também optaram por representar condições de inumação, porém demonstraram que apenas a utilização do RNA poderia não ser um método eficaz (YOUNG, et. al, 2013). Já Poor et. al (2015) que utilizaram metodologia similar de análise à esse estudo, optaram por armazenar sua amostra em ambiente controlado, fato que pode justificar os resultados diferentes dos obtidos neste estudo.

Um fato que pode fortalecer a influência do processo de inumação na aceleração da degradação da molécula de RNA é a comparação feita no teste piloto deste estudo, onde foi realizada a análise imediata da polpa dental de terceiros molares extraídos, demonstrando um RIN de 8.0, com dentes que permaneceram congelados logo após a extração, sendo possível encontrar um RIN de até 7.30. Assim, ficou evidente que dentes que não foram submetidos a condições ambientais no período “*post mortem*” apresentaram uma integridade da molécula de RNA significativamente maior, exibindo que essa, de fato, possui integridade quando extraída do tecido pulpar.

No que diz respeito ao método de estimativa do intervalo post mortem através da análise da degradação da molécula de RNA, pode se dizer que ainda é uma metodologia em fase de testes para analisar sua viabilidade na aplicação da rotina forense.

Os resultados encontrados nessa pesquisa em questão não foram favoráveis em demonstrar uma correlação entre a degradação do RNA e a estimativa do IPM. Foi possível detectar valores de integridade nas amostras em um período máximo de 8 semanas (56 dias), porém esse foi equivalente a 1, o que significa total degradação da molécula de RNA.

Os números de integridade (RIN) que se estabelecem entre os valores 1 e 2.4 demonstram uma expressiva degradação da molécula não devendo ser considerados para resultados (POÓR et. al, 2016), o que indicaria que o período máximo com potencial de análise nesse estudo foi de 3 semanas (21 dias) e só restariam 5 amostras com resultados viáveis, o equivalente a 7,14% de todo grupo amostral.

Se levados em consideração os resultados obtidos na amostra em sua totalidade, encontrou-se um número de integridade em apenas 15,71% das amostras utilizadas, todavia, esses valores não se distribuíram de uma forma inversamente proporcional ao tempo, não sendo possível demonstrar a analogia esperada.

González-Herrera e colaboradores (2013) analisaram a molécula de RNA extraída de tecidos cardíacos e fluidos corporais pertencentes a 30 cadáveres com o tempo de óbito conhecido e, embora tenham encontrado uma correlação entre o número de integridade do RNA e o tipo de amostra, também não conseguiram encontrar correlações significativas entre o RIN e IPM, sendo essa ausência de associação também evidenciada por Barton et. al (1993) e Partemi et. al (2010).

Preece e Cairns (2003) extraíram e analisaram RNA proveniente de tecido cerebral humano e encontraram uma influência entre sexo e idade no momento da morte com os níveis de RNA disponíveis, porém não conseguiram encontrar a mesma influência com relação ao tempo transcorrido do óbito.

Ademais, Henrich et. al (2007) chegaram a conclusão que a estimativa de um intervalo *post mortem* através da degradação de RNA também não foi promissora quando analisaram tecidos provenientes do cérebro, coração, músculo, rins, fígado e baço.

Em contrapartida, é possível encontrar resultados mais favoráveis ao método de estimativa de IPM através de moléculas de RNA, como ocorreu no estudo de Bauer et al. (2003), que tentou estabelecer o IPM através da análise quantitativa da degradação do RNA utilizando amostras de sangue humano e tecido cerebral. Seus resultados mostraram uma correlação significativa entre degradação de RNA e intervalo *post mortem* por um período de até 5 dias, porém as amostras foram conservadas em ambiente com temperatura controlada.

Marchuk et al. (1998) encontraram resultados relativos a períodos de tempo menores onde demonstraram que o RNA tem a capacidade de permanecer estável por um período de 96 horas transcorridas do óbito em tecido cerebral, cartilagem, ligamentos e tecido pulmonar.

O estudo de van Doorn e colaboradores (2011) tentou estabelecer uma relação entre o IPM e a degradação do RNA extraído de tecido ósseo e medula óssea de coelhos esqueleticamente maduros. Os resultados indicaram que nos leucócitos da medula foi possível detectar o RNA em um período de até 21 dias, porém no osso, não foi observada integridade da molécula após quatro dias *post mortem*. Já Kuliwaba et al. (2005) determinaram uma estabilidade confiável para análise do RNA em até 48 horas quando proveniente do osso trabecular, período além desse valor estimado trariam problemas para a utilização do método.

Young e colaboradores (2013) promoveram um estudo para testar a estimativa de intervalo post mortem utilizando dentes suínos e fazendo uma associação entre a degradação do RNA e mudanças na polpa e, embora os autores tenham obtido resultados favoráveis dessa associação com um método eficaz para estimativa em um período de até 84 dias, os mesmos demonstram que, apesar de possível, apenas o uso dos níveis de RNA extraídos da polpa dental para a estimativa do PMI seria dificultoso.

Poór et. al (2016) conseguiram estabelecer uma correlação linear entre tempo e degradação de RNA em amostras submetidas a um período de tempo máximo de 21 dias, aumentando esse lapso temporal para 42 dias com a associação da utilização da técnica de PCR, no entanto, os autores também optaram por armazenar suas amostras em ambiente controlado durante o estudo.

Sampaio-Silva e colaboradores (2013) desenvolveram um estudo através da utilização de moléculas de RNA provenientes de tecidos cardíacos, musculares e do fígado de camundongos e constatou-se a existência de uma correlação positiva entre a degradação da molécula em questão e o intervalo *post mortem*, onde os autores conseguiram desenvolver um modelo matemático para estimar o IPM com um erro médio de 51,4 minutos. Todavia, os mesmos demonstraram a necessidade de realização de novos estudos que

levem em consideração os vários parâmetros com potencial para influenciar no comportamento da molécula de RNA.

Inoue e colaboradores (2002) observaram o perfil de degradação do RNA e sua relação com o IPM em tecidos obtidos do cérebro, pulmão, coração e fígado de camundongos. Relataram encontrar diferenças entre os tecidos onde foi possível detectar a molécula em um período de 7 dias no tecido cerebral, porém houve uma degradação substancial da molécula a partir do primeiro dia “*post mortem*” quando extraída do tecido hepático, o que evidenciou a dificuldade de trabalhar com esse método.

Diante do exposto, surge a necessidade de também discutir dois aspectos importantes que possuem grande potencial de influenciar a metodologia proposta pelo estudo: a fragilidade da molécula de RNA e o tecido de escolha utilizado na análise.

A criação e desenvolvimento de novas tecnologias para estudo e análise da molécula de RNA, em conjunto com alguns relatos de uma estabilidade inesperadamente alta da mesma em determinadas condições, instigou, de certa maneira, os pesquisadores que atuam na área forense a explorar o potencial do uso do RNA nas rotinas de investigação (BAUER, 2007). É possível considerar que o RNA se torna mais estável em casos de depurinação e depirimidização (LINDAHL; NYBERG, 1972), que ocorrem quando há quebra de bases de ligação das moléculas, sendo estimado por Kotchetkov e Budowsky (1972) que esse processo ocorre de 100 a 1000 vezes mais lentamente em RNA do que em DNA. No entanto, a literatura trouxe à tona a existência de diversos fatores que possuem a capacidade de afetar o RNA e consequentemente comprometer a sua utilização em algumas metodologias propostas.

Basicamente, o ponto chave na rápida degradação e fragilidade da molécula de RNA é a atividade enzimática das Ribonucleases, que são consideradas onipresentes, produzidas por todos os organismos e, podem ser de origem tanto endógena como de origem exógena (CATTS, et al. 2005). Ao contrário das DNases, as RNases não precisam de co-fatores, como Mg^{2+} , para serem ativadas e também são extremamente estáveis, o que explica sua reatividade extraordinariamente alta (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Devido ao fato da grande estabilidade das RNases, essas não podem ser destruídas ou neutralizadas por limpeza e desinfecção de superfícies utilizando, por exemplo, detergentes e álcool, além de o processo de autoclavagem também não ser eficiente na inativação das enzimas (VENNEMANN; KOPPELKAMM, 2010). Assim, é necessário uma limpeza do ambiente de trabalho e dos materiais utilizados com soluções adequadas para tal, como foi o caso deste estudo onde utilizamos RNase Zap (Thermo Fisher Scientific™, São Paulo, Brasil) para neutralização das enzimas.

Ainda com relação à atividade enzimática, uma condição que pode influenciar a performance das ribonucleases é a umidade. Tecidos adiposos desidratados, por exemplo, tiveram uma prolongação significativa da integridade da molécula de RNA (BAHAR, et al., 2007), assim como manchas de sangue secas, onde foi possível detectar RNA após um período de 16 anos (BAUER; POLZIN; PATZELT, 2003; ZUBAKOV, et al., 2008).

Isso acontece porque a redução dos níveis de água provoca uma redução dos níveis de atividade enzimática e consequentemente há uma maior preservação do RNA, diminuindo suas taxas de degradação, tornando a molécula mais resistente em condições controladas de umidade, existindo degradação considerável nestes casos apenas se houver a influência de fatores químicos e físicos (FORDYCE et al., 2013).

Outros fatores como a temperatura, as condições ambientais, condições químicas, o local de armazenamento do corpo ou remanescentes a contaminação microbiológica e o pH dos tecidos são algumas variáveis com grande relevância que também podem influenciar o comportamento da molécula de RNA imediatamente após a morte (CATTS, et al. 2005; SAMPAIO-SILVA, et al., 2013).

Sampaio-Silva e colaboradores (2013), por exemplo, optaram por acondicionar as amostras de seu estudo em ambiente asséptico e com temperatura controlada, porém sabe-se que esta não é a realidade de um caso forense onde não existe nenhum tipo de controle sobre as condições em que os corpos ou remanescentes são encontrados.

Na metodologia proposta neste estudo, não havia qualquer controle sobre as condições ambientais de temperatura, umidade, contaminação ou qualquer outro fator, pois a intenção dos pesquisadores foi simular condições

forenses o mais próximo das condições reais possíveis. Dessa forma, é possível que a influência de todos os fatores supracitados tenha contribuído para uma degradação significativa da molécula de RNA das amostras inumadas.

Outro fator que deve ser levado em consideração é que, além da fragilidade da molécula de RNA, a sua disponibilidade também é variável, pois seus níveis podem oscilar de pessoa para pessoa devido a fatores como doenças, tratamentos médicos ou diferenças genéticas (YOUNG, et al., 2013).

Os tecidos humanos que são utilizados como amostras são, em muitos casos, derivados de populações heterogêneas e estão submetidos a fatores *ante* e *post mortem* com potencial de influência na molécula de RNA que não podem ser controlados e em muitas vezes não são conhecidos em sua totalidade (STAN, et. al, 2006; VENNEMANN; KOPPELKAMM, 2010).

Destarte, o método que optar por utilizar essa molécula também fica submisso às condições encontradas em cada situação específica. Vale ressaltar que neste estudo não foram utilizados critérios de inclusão e exclusão que envolvesse a saúde geral dos participantes doadores dos elementos dentais, sendo este mais um fator que pode ter influenciado nos resultados encontrados.

A escolha do tecido ou parte do corpo a ser periciada é crucial para o sucesso do uso do RNA na estimativa do tempo transcorrido desde o óbito. Já é de conhecimento que a integridade do RNA entre diferentes tecidos ou órgãos *post mortem* possui comportamento diferente (INOUE, et. al, 2002; BAHAR, et. al, 2007; HENRICH et. al, 2007).

Existem tecidos em que as taxas de atividade enzimática são mais elevadas, devendo, esses, serem evitados. Estudos demonstraram que a molécula de RNA pode ser considerada mais estável em tecido cerebral (CASTENSSON et. al, 2000; INOUE, et. al, 2002), enquanto Sampaio-Silva (2013) encontraram maior eficiência no tecido hepático e no músculo.

Além disso, o RNA extraído de uma mesma fonte através de diferentes métodos pode gerar números de integridade distintos, mostrando que a técnica de extração da molécula deve ser validada para cada tipo de tecido específico buscando a melhor metodologia que se adequa a cada um dos mesmos (VENNEMANN; KOPPELKAMM, 2010). Dessa forma, sugere-se que novos

estudos sejam desenvolvidos testando diversificadas formas de extração da molécula de RNA extraída da polpa dental com uma posterior análise de integridade para identificar a mais eficiente.

Sendo assim, deve se optar pelo uso de tecidos em que haja uma adequada disponibilidade de material genético, mas que ao mesmo tempo apresente um determinado grau de proteção às condições tanto endógenas (ação enzimática) como exógenas (luz, umidade, fauna e temperatura) (VENNEMANN; KOPPELKAMM, 2010; FORDYCE et al., 2013) como é o caso dos elementos dentais utilizados neste estudo. Segundo estudos prévios, como de Poór e colaboradores (2016) e Conde e colaboradores (2012), a polpa dental apresenta grande disponibilidade de material genético, baixo índice de atividade das RNases e possui a grande vantagem de estar protegida da ação de fatores degradantes tanto internos como externos pelo esmalte dental podendo se tornar um adequado tecido de escolha para o teste da metodologia proposta.

É necessário atentar-se para a escolha de dentes hígidos ou com alterações e tratamentos que não atinjam ou apresentem riscos para o tecido pulpar, pois o contato com fatores externos pode promover a aceleração da degradação da molécula de RNA.

A polpa dental comumente permanece sã durante a vida, porém fatores como excessiva força ortodôntica, trauma agudo, cárie dental, fraturas, erosão e abrasão podem gerar a interrupção do suprimento sanguíneo apical e a ruptura das barreiras de proteção do tecido (esmalte e dentina), causando alterações pulpares por atingir as células tais como odontoblastos, células endoteliais, nervosas e da musculatura lisa vascular (PÉCORA, 2004).

Neste estudo optou-se por utilizar apenas dentes hígidos, porém os resultados encontrados não foram favoráveis para a metodologia. Dessa forma, elementos dentais que passaram por tratamentos endodônticos, possuem processos cariosos extensos, reabilitações protéticas ou fraturas consideráveis, por exemplo, podem trazer alterações ainda mais significativas sendo necessária a realização de novos estudos para testar a viabilidade de elementos dentais não hígidos.

Ainda levando em consideração a importância do elemento dental na metodologia do estudo, cabe ressaltar que na população brasileira, por

exemplo, o índice de desdentados total atingiu 11% da população na Pesquisa Nacional de Saúde feito pelo IBGE (2013), totalizando 16 milhões de pessoas, e o percentual de pessoas que utiliza algum tipo de prótese dentária chega a 33,3%. Dessa forma, a variação e imprevisibilidade da disponibilidade de elementos dentais podem acabar, também, dificultando a utilização do tecido pulpar como amostra.

Com relação aos casos onde é possível identificar dentes hígidos para uso, a disponibilidade do tecido pulpar também não pode ser considerada uma certeza, pois a quantidade pode variar de acordo com o elemento dental que está disponível. Os dentes de pessoas mais jovens costumam ter a câmara pulpar mais ampla em comparação a indivíduos de idade mais avançada, e com relação ao tipo de elemento dental, os molares inferiores costumam ter uma maior cavidade pulpar enquanto incisivos inferiores possuem uma câmara significativamente menor (MADEIRA, 2006).

Neste estudo foram utilizados terceiros molares superiores e inferiores por serem dentes com alta indicação de extração, o que facilitou a composição da amostra, porém a anatomia dos terceiros molares é variável (OLIVEIRA, 2014), o que pode alternar a quantidade de tecido disponível para análise e consequentemente ter influenciado também o número de amostras que continham tecido pulpar aparente (32,85%).

De um modo geral, foi possível notar diversas fragilidades do método de estimativa do IPM por meio da análise da degradação da molécula de RNA proveniente da polpa dental como a sua submissão aos fatores ambientais, atividade enzimática, disponibilidade de elementos dentais e de tecido pulpar, todas discutidas anteriormente. Assim, existe a necessidade de maior investigação do método para testar de fato sua viabilidade dentro do campo forense, e caso a equipe opte por utilizar o mesmo, recomenda-se sua associação com outros métodos para garantir resultados com maior acurácia.

Atualmente, com a tecnologia disponível, recomenda-se que o RNA seja utilizado para estudos qualitativos e identificação de tecidos (VAN DOORN, et. al 2011). Para o desenvolvimento de um método de fato confiável na associação entre degradação de RNA e estimativa de intervalo *post mortem*, é necessário que a o mecanismo da degradação da molécula e como ela de fato

se comporta frente às adversidades seja bem conhecido e estabelecido para que possa posteriormente ser aplicado.

Conclusão

6. Conclusão

Após a análise dos resultados, foi possível concluir que o método de quantificação da degradação da molécula de RNA extraída de polpas dentais não foi aplicável para estimativa do intervalo *post mortem* em condições simuladas de inumação em terreno exposto as alterações de temperatura e umidade.

Referências

Referências

- AMENDT, J. et al. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci. Med. Pathol.* v.7, n.4, p.379–392, 2011.
- BAHAR, B. et al. Long-term stability of RNA in post-mortem bovine skeletal muscle, liver and subcutaneous adipose tissues. *BioMed Central Mol Biol.* v.8, p.108, 2007.
- BARTON, A.J. et al. Pre- and post-mortem influences on brain RNA. *J. Neurochem.* v.61, p. 1–11, 1993.
- BAUER, M. et al. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study, *Leg. Med.* v.5, n.4, p.220– 227, 2003.
- BAUER, M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet.* v.1, n.1, p.69–74, 2007.
- BAUER, M.; POLZIN, S.; PATZELT, D. Quantification of RNA degradation by semiquantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains?. *Forensic Sci Int.* v.138, n.(1-3), p.94–103, 2003.
- BERNHARDT, V. et al. Species diversity and tissue specific dispersal of necrophagous Diptera on human bodies. *Forensic Sci Med Pathol.* doi: 10.1007/s12024-018-9947-0, 2018.
- BIANCALANA, R.C. et al. Determinação do sexo pelo crânio: etapa fundamental para a identificação humana. *Rev. Bras. Crimin.* v.4, n.3, p.38-43, 2015.
- BISHOP, C.P. Estimating Postmortem Interval: A Molecular Approach. U.S. Department of Justice. Documento nº 248959, 2015.
- BROWN, D.M.; TODD, A.R. Nucleotides. Part X. Some observations on the structure and chemical behaviour of the nucleic acids. *J Chem Soc.* v.0, p.52–58, 1952.
- CAMPOS, A.P.S. Avaliação do potencial de poluição no solo e nas águas subterrâneas decorrente da atividade cemiterial. Dissertação de mestrado. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2007.
- CAÑADAS, V.; CARRO, L.; PEÑARANDA, J. Problemas tanatológicos médico-legal. In: Calabuig Gisbert JA. *Medicina Legal y Toxicología.*, 5ª ed., Masson, p. (194-218), Barcelona, 2003.

CAPUTO, R. F. O Homem e suas Representações Sobre a Morte e o Morrer: Um Percorso Histórico. *Saber Acadêmico: Revista Multidisciplinar Da Uniesp*. n.6, p. 73 – 80, 2008.

CASTENSSON, A. et al. High-resolution quantification of specific mRNA levels in human brain autopsies and biopsies. *Genome Res*. v.10, n.8, p. 1219-1229, 2000.

CATTANEO, C. Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium, *Forensic Sci. Int*. v.165, p.185–193, 2007.

CATTS V.S. et al. A microarray study of post-mortem mRNA degradation in mouse brain tissue. *Brain Res Mol Brain Res* v.138, n.2, p.164–177, 2005.

CONDE, M.C. et al. Odontoblast RNA stability in different temperature-based protocols for tooth storage. *Int Endod J*. v.45, n.3, p.266–272, 2012.

CREAMER, J.I.; BUCK, A.M. The assaying of haemoglobin using luminol chemiluminescence and its application to the dating of human skeletal remains. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*. v.24, n.5, p.311–316, 2009.

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. Chronothanatognosis: the influence of the tropical climate in determining the post-mortem interval. *Lex Humana. Petrópolis*, v. 6, n. 1, p.180-195, 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 Sci Int*. v.232, n.1-3, p.218-228, 2013.

GREENBERG, B.; KUNICH, JC. *Entomology and the law: flies as forensic indicators*. Cambridge: University Press. 2002.

HALL, R.D. *Entomology and the law: Flies as forensic indicators*. *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 5, p. 922, 2005.

HEINRICH, M. et al. Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. *Int J Legal Med*. v.121, n.2, p.136-142, 2007.

HOKE, N. et al. Reconsideration of bone postmortem interval estimation by UV-induced autofluorescence. *Forensic science international*. v.228, n.1–3, p.176 e1–6, 2013.

HOWES, J.M. et al. An investigation of model forensic bone in soil environments studied using infrared spectroscopy. *Journal of forensic sciences*. v.57, n.5, p.1161–1167, 2012.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa Nacional de Saúde – acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violência. 2013.

INOUE, H.; KIMURA, A.; TUJI, T. Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study. *Forensic Sci. Int.* v.130, n.2-3, p.127–132, 2002.

INTERPOL. Disaster Victim Identification Guide, 2014. Disponível em: www.interpol.int/INTERPOLexpertise/Forensics/DVI-pages/DVI-guide [Acesso em 20 de outubro de 2017].

JAFFE, A. Guide to Pathological Evidence: For Lawyers and Police Officers, 2^a ed., Carswell Criminal Law Series, Carswell Ltd. Toronto, 1983.

JOHNSON, L.A.; FERRIS, A.J.J. Analysis of post-mortem DNA degradation by single-cell gel electrophoresis. *Forensic Science International.* v. 126, n. 1, p.43-47, 2002.

KALISZAN, M.; HAUSER, R.; KERNBACH-WIGHTON, G. Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling. *Leg Med Tokyo*, v.11, n.3, p.111–117, 2009.

KLESSER, C.H.B.; BAR, C.M.W.; KRATZER, A. 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.

KOTCHETKOV, N.K.; BUDOWSKY, E.I. Organic Chem Nucleic Acids. Plenum Press, Nova York, 1972.

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

KULIWABA, J.S.; FAZZALARI, N.L.; FINDLAY, D.M. Stability of RNA isolated from human trabecular bone at post-mortem and surgery. *Biochim Biophys Acta.* v.1740, n.1, p.1-11, 2005.

LEITE, V.S. et al. Uso das técnicas de biologia molecular na genética forense. *Derecho y Cambio Social*, issn :2224-4131, depósito legal: 2005-5822, 2013.

LINDAHL, T. Heat inactivation of transfer ribonucleic acids. *J Biol Chem.* v.242, p.1970–1973, 1967.

LINDAHL, T.; NYBERG, B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* v.11, n. 19, p.3610-3618, 1972.

MADEIRA, M.C. Anatomia do Dente. 4^a ed. Sarvier, São Paulo, 2006.

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

MARCHUK, L. et al. Postmortem stability of total RNA isolated from rabbit ligament, tendon and cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta.* v.1379, n.2 p.171–177, 1998.

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 Petrópolis, 2014.

OLIVEIRA, J.P. Molares – Descrição Anatômica. 2014. Disponível em <http://odontoup.com.br/molares-descricao-anatomica/>. [Acesso em: 30/05/2018]

PARTEMI, S. et al. Analysis of mRNA from human heart tissue and putative applications in forensic molecular pathology. *Forensic Sci. Int.* v.203, p.99–105, 2010.

PÉCORA, J.D. Complexo- Dentina Polpa. 2004. Disponível em <http://143.107.206.201/restauradora/dentin.html>. [Acesso em: 29/05/2018].

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

PREECE, P.; CAIRNS, N.J. Quantifying mRNA in post-mortem human brain: influence of gender, age at death, post-mortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Brain Res Mol Brain Res.* v.118, p.60–71, 2003.

RIBEIRO, M.C.M. Genética Molecular. 1ª ed, BIOLOGIA/EAD/UFS, Florianópolis, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3ª ed. Cold Spring Harbor Press, Nova York, 2001.

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

SCHRAG, B. et al. Dating human skeletal remains using a radiometric method: biogenic versus diagenetic ⁹⁰Sr and ²¹⁰Pb in vertebrae. *Forensic science international.* v.220, n.1–3, p.271-278, 2012.

SCHULTZ, M. Microscopic investigation of excavated skeletal remains: a contribution to paleopathology and forensic medicine. In: HAGLUND, W.D.; SORG, M.H. *Forensic Taphonomy: the Postmortem Fate of Human Remains.* Boca Raton: CRC Press, 1997, p.201–222.

SETZER, M.; JUUSOLA, J.; BALLANTYNE, J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen and saliva stains. *J. Forensic Sci.* v.53, n.2 p.296–305, 2008.

SIEGER, J.; SAUKKO, P.; KNUPFER, G. Encyclopedia of Forensic Sciences: San Diego: Academic Press, 2000.

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

STAN, A.D. et al. Human postmortem tissue: what quality markers matter? Brain Res. v. 1123, n.1, p. 1–11, 2006.

SZELECZ, I. et al. Comparative analysis of bones, mites, soil chemistry, nematodes and soil micro-eukaryotes from a suspected homicide to estimate the post-mortem interval. Sci Rep. v. 8, n.25, 2018.

TAYLOR, R.E. The use of radiocarbon (^{14}C) to identify human skeletal materials of forensic science interest. J Forensic Sci. v.34,n.5, p.1196–1205, 1989.

UBELAKER, D.H.; BUCHOLZ, B.A.; STEWART, J.E. Analysis of artificial radiocarbon in different skeletal and dental tissue types to evaluate date of death. Journal of forensic sciences. v.51, n.3, p.484–488, 2006.

VAN DOORN, N.L. et al. Bone marrow and bone as a source for postmortem RNA. J Forensic Sci. v.56, n.3, p.720-725, 2011.

VASS A.A. et al. Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. J. Forensic Sci. v.47, p. 542-553, 2002.

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

VENNEMANN, M.; KOPPELKAMM, A. Postmortem mRNA profiling II: Practical considerations. Forensic Sci Int. v.203, n.(1-3), p.76–82, 2010.

WOELFERT, A.J.T. Introdução à Medicina Legal. 1ª ed, ULBRA, Canoas, 2003.

WOESS, C. et al. Assessing various Infrared (IR) microscopic imaging techniques for post-mortem interval evaluation of human skeletal remains. PLoS One. v.12, n.3, 2017.

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.

ZHAO, D. et al. Real-time RT-PCR quantitative assays and postmortem degradation profiles of erythropoietin, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 alpha mRNA transcripts in forensic autopsy materials. Leg Med. v.8, n.2, p.132–136, 2006.

ZUBAKOV, D. et al. New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J Legal Med.* v.123, n.1, p.71–74, 2008.

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 elou 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 CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3632-2228 Fax: (16)3633-1144 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 acametados pela obtenção dos resultados desta pesquisa superam seus riscos. Os riscos e medidas para evita-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 tomar 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 a critério do CEP:

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

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3632-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br