UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ANDREA SAYURI SILVEIRA DIAS TERADA

UTILIZAÇÃO DO PRODUTO ALLPROTECT TISSUE REAGENT® NA
ESTABILIZAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO DE TECIDOS DENTAIS HUMANOS
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Ribeirão Preto
2013

ANDREA SAYURI SILVEIRA DIAS TERADA

**UTILIZAÇÃO DO PRODUTO ALLPROTECT TISSUE REAGENT® NA
ESTABILIZAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO DE TECIDOS DENTAIS HUMANOS
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva

VERSÃO CORRIGIDA

A versão original se encontra disponível na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

Ribeirão Preto

2013

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTES
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

Terada, Andrea Sayuri Silveira Dias

Utilização do produto Allprotect Tissue Reagent® na estabilização do DNA extraído de tecidos dentais humanos em diferentes condições de armazenamento. Ribeirão Preto, 2013.

129p. : il. ; 30cm

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Biologia Oral.

Orientador: Silva, Ricardo Henrique Alves da

1. Identificação Humana; 2. Odontologia Legal; 3. Biologia Molecular; 4. DNA; 5. Dente; 6. Estabilização.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANDREA SAYURI SILVEIRA DIAS TERADA

**UTILIZAÇÃO DO PRODUTO ALLPROTECT TISSUE REAGENT® NA ESTABILIZAÇÃO
DO DNA EXTRAÍDO DE TECIDOS DENTAIS HUMANOS EM DIFERENTES
CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre.

Área de Concentração: Biologia Oral

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,

A todos que estiveram ao meu lado em todos esses anos de esforço e dedicação.

Sem cada uma dessas pessoas nada disso teria se tornado verdade, ou pelo menos não seria igual.

Agradecimentos

Ao Professor Ricardo Henrique Alves da Silva, obrigada pela orientação e por acreditar e confiar em meu trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, que se tornou minha segunda casa, local que eu escolhi e onde me orgulho por construir minha formação profissional.

À Professora Raquel Fernanda Gerlach, por ter cedido seu laboratório para a realização de vários experimentos deste trabalho.

À Professora Aline Azevedo, pela orientação na fase laboratorial desse projeto.

À Adrielly Garcia Ortiz, pelo período de apoio técnico laboratorial.

Ao Professor Luiz Antonio Ferreira da Silva, Coordenador do Programa de Identificação Humana e Diagnóstico Molecular da Universidade Federal de Alagoas, pelo estágio e parceria que permitiu a realização de experimentos relacionados a esse projeto de pesquisa.

A toda equipe do Laboratório de Genética Forense da Universidade Federal de Alagoas pelo total apoio durante minha estada em Maceió.

Ao Programa de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto –USP, na pessoa da coordenadora, Professora Fernanda Panzeri, que viabilizou a realização do estágio em Maceió.

Ao professor **Rodrigo Galo**, pela análise estatística e disponibilidade em ajudar sempre.

Às secretárias do Programa da Reabilitação Oral, funcionárias da administração e funcionários do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal pelo apoio.

Aos meus pais **Luiz Yoshikazu Terada** e **Claudia Silveira Dias**, que apoiam as minhas escolhas, me encorajaram a prosseguir em meus objetivos e que são os motivos de grande parte dos meus esforços.

À minha irmã **Luísa Thiemy Silveira Dias Terada**, por fazer parte minha vida e ser um exemplo de superação em nossa família.

Ao **Marcelo Bighetti Toniollo**, pelo companheirismo e tolerância e por estar ao meu lado nessa etapa tão importante.

À Laís Gomes de Araujo e Marta Regina Pinheiro Flores, pela amizade e toda colaboração durante meu mestrado.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro que permitiu a compra de materiais e equipamentos para a execução do projeto.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva e a realização deste trabalho.

Aos professores da banca, pela disponibilidade e atenção para a leitura desta dissertação.

"A felicidade não se resume na ausência de problemas, mas na sua capacidade de lidar com eles."

Albert Einstein

Resumo

TERADA, A.S.S.D. **Utilização do produto Allprotect Tissue Reagent® na estabilização do DNA extraído de tecidos dentais humanos em diferentes condições de armazenamento.** Ribeirão Preto, 2013. 129p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

A metodologia genético-molecular destaca-se como uma técnica apurada para os processos de identificação humana e, dentre as fontes de evidência biológica, o uso de elementos dentais é de grande interesse. A manutenção da integridade do material enviado ao laboratório é imprescindível para o sucesso dos resultados obtidos e uma das principais dificuldades encontradas é com relação ao armazenamento da amostra, que geralmente é realizado em baixas temperaturas. O presente trabalho avaliou a eficácia do produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) na estabilização do DNA extraído de tecidos dentais humanos armazenados em diferentes condições. Para tal, foram utilizados 165 elementos dentais, os quais foram distribuídos em dois grupos distintos: dente íntegro e tecido pulpar dental isolado. As amostras foram armazenadas com ou sem a utilização do referido produto, variando o período de tempo (1, 7, 30 e 180 dias) e temperatura (ambiente e refrigeração). Além desses grupos, foi formado um grupo controle positivo composto por cinco elementos dentais armazenados a -20°C durante 180 dias. Após o armazenamento foi realizada extração do DNA, eletroforese em gel de agarose, quantificação do DNA genômico por PCR Tempo Real e análise de fragmentos de 37 amostras. Os fragmentos de 32 amostras que representavam cada condição possível e as cinco amostras do grupo controle positivo foram analisados, a fim de verificar quatro marcadores pré-selecionados. O gel de agarose mostrou evidências da presença de DNA genômico. Os valores da quantificação foram analisados estatisticamente pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os resultados mostraram valores que variaram de 0,01 a 10246,88ng/μL de DNA. Houve diminuição da concentração de DNA nas amostras de dente armazenadas em temperatura ambiente por 30 e 180 dias em relação às que ficaram armazenadas por 1 e 7 dias. Além do fator tempo, a temperatura também influenciou na concentração de DNA, sendo maior nos dentes que ficaram por 30 dias e na

polpa dental mantida por 180 dias, quando refrigerados. Em relação à utilização do produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany), o mesmo mostrou diferença significativa na estabilização dos dentes que foram armazenados em temperatura ambiente durante 30 e 180 dias. A análise de fragmentos foi possível nas 37 amostras selecionadas, independente da quantidade de DNA, confirmando a importância das reações de amplificação e da análise de STR utilizando método automático. Conclui-se que a utilização do produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) mostrou diferença significativa na estabilização do DNA das amostras de dentes íntegros armazenadas em temperatura ambiente durante 30 e 180 dias, enquanto que nas demais condições testadas, os resultados não evidenciaram justificativas para o uso do produto.

Palavras - chaves: Identificação Humana, Odontologia Legal, Biologia Molecular, DNA, Dente, Estabilização.

Abstract

TERADA, A.S.S.D. Use of the Allprotect Tissue Reagent® in the stabilization of DNA extracted from human dental tissues at different storage conditions. Ribeirão Preto, 2013. 129p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

The genetic-molecular methodology stands out as an accurate technique for human identification process and among the sources of biological evidence, the use of teeth is of great interest in Forensic Dentistry. Maintaining integrity of the material sent to laboratory is essential for success of the analysis, and one of the main difficulties is related to sample storage, which is usually carried out at low temperatures. This study evaluated the effectiveness of the Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Germany) in stabilizing DNA extracted from human dental tissues stored under different conditions. In this study were used 165 teeth, distributed in two groups: intact teeth and isolated pulp tissue. The samples were stored with or without the product and varying the storage time (1, 7, 30 and 180 days) and temperature (room temperature and under refrigeration). In addition to these groups, was formed a positive control group, composed by five teeth, which was stored at -20°C for 180 days. After storage, DNA extraction, electrophoresis on agarose gel and genomic DNA quantification by Real-Time PCR and fragments of 37 samples were performed. The fragments of 32 samples representing every possible condition and five positive control group samples were analyzed to verify four pre-selected markers. The agarose gel showed evidences of genomic DNA presence. Quantification results were statistically analyzed with the tests Kruskal-Wallis and Mann-Whitney. Quantification results showed values ranging from 0.01 to 10,246.88 ng/μL of DNA. There was a decrease in DNA concentration in stored tooth samples at room temperature for 30 and 180 days compared to those stored for 1 and 7 days. Besides the time factor, temperature also influenced the DNA concentration, being higher in teeth that remained for 30 days and in tooth pulp maintained for 180 days, under refrigeration. Regarding the use of Allprotect Tissue Reagent® it showed a significant difference in stabilization of stored teeth at room temperature for 30 and 180 days. The analysis of fragments was possible in 37 selected samples, regardless of the

DNA quantity variation, confirming that amplification reactions and STR analysis using automated methods provides good results. It was concluded that the use of Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Germany) showed a significant difference in stabilizing DNA samples of intact human teeth stored at room temperature for 30 and 180 days, while in the other test conditions the results showed no justification for using this product.

Keywords: Human Identification, Forensic Dentistry, Molecular Biology, DNA, Teeth, Stabilization.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany)	69
Figura 2 - Amostras formadas pelo dente íntegro com e sem produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany), respectivamente	69
Figura 3 - Visão aproximada de amostras formadas pelo dente íntegro com e sem produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany), respectivamente	69
Figura 4 - Secção na junção amelocementária do elemento dental	70
Figura 5 - Amostra de polpa dental armazenada sem o produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany)	70
Figura 6 - Amostra de polpa dental armazenada com o produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany)	71
Figura 7 - Qiaamp® DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany)	73
Figura 8 - Equipamento 7500 Real Time PCR System com o SDS Software	74
Figura 9 - Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)	74
Figura 10 - Equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer	76
Figura 11 - Software Gene Mapper® ID (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).	76
Figura 12 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 1 a 20	81
Figura 13 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 21 a 40	81
Figura 14 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 41 a 60	81
Figura 15 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 61 a 80	81
Figura 16 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 81 a 100	82
Figura 17 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 101 a 120	82
Figura 18 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 121 a 140	82
Figura 19 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 141 a 160	82
Figura 20 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 161 a 165	83

Figura 21 - Curvas de dissociação dos padrões de DNA utilizados na quantificação das amostras 1 a 84	83
Figura 22 - Curvas de dissociação dos padrões de DNA utilizados na quantificação das amostras 85 a 165	84
Figura 23 - Curvas de dissociação da quantificação das amostras 1 a 84	84
Figura 24 - Curvas de dissociação da quantificação das amostras 85 a 165	85
Fgura 25 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 41, 46 e 05	89
Figura 26 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 161, 162 e 163	89
Figura 27 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 153, 16 e 160	90
Figura 28 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 28, 31 e 40	90
Figura 29 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 56, 62 e 07	91
Figura 30 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 129, 134 e 139	91
Figura 31 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 85, 88 e 92	92
Figura 32 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 164, 165 e 21	92
Figura 33 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 144, 15 e 150	93
Figura 34 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 111, 118 e 123	93
Figura 35 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 70, 71 e 79	94
Figura 36 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 54, 104 e 109	94
Figura 37 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer da amostra 96.....	95

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluições seriadas para preparo dos DNAs padrões	75
Tabela 2 - Tipos e quantidades de reagentes utilizados na PCR.	78
Tabela 3 - Média e desvio padrão da quantificação de DNA genômico por PCR Tempo Real do grupo dente inteiro, amostras 1 a 80.	87
Tabela 4 - Média e desvio padrão da quantificação de DNA genômico por PCR Tempo Real do grupo polpa dental, amostras 81 a 160.	87

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupo amostral dentes íntegros. Temperatura Ambiente (24 a 37°C)	68
Quadro 2 - Grupo amostral dentes íntegros. Temperatura (4 a 8°C).....	68
Quadro 3 - Grupo amostral polpa dental. Temperatura Ambiente (24 a 37°C)	71
Quadro 4 - Grupo amostral polpa dental. Temperatura (4 a 8°C)	72
Quadro 5 - Grupo amostral controle positivo	72
quadro 6 - Cálculo do volume necessário para cada amostra no preparo do PCR Mix.....	75
Quadro 7 - Amostras selecionadas para análise de fragmentos.	77
Quadro 8 - Localização e a sequência repetitiva dos marcadores selecionados.....	77
Quadro 9 - Quantificação do DNA genômico por pcr tempo real das 160 amostras.....	86
Quadro 10 - Quantificação do DNA genômico por pcr tempo real do grupo controle positivo	87
Quadro 11 - Análise dos marcadores selecionados nas 37 amostras.....	88

Lista de **A**breviaturas e **S**iglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de ética em Pesquisa
CODIS	Combined DNA Index System
dATP	Desoxiadenosina trifosfatada
dCTP	Desoxicitidina trifosfatada
dGTP	Desoxiguanosina trifosfatada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
dTTP	Desoxitimidina trifosfatada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FBI	Federal Bureau of Investigation
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Interpol	Organização Internacional de Polícia Criminal
mA	Miliampére
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
SNPs	Polimorfismo de base única
STRs	Repetições consecutivas curtas
TAE	Tampão tris-acetato-edta
TE	Tampão tris-edta

TRIS	Trisaminometano
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts
VNTR	Número variável de repetições consecutivas
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
®	Marca registrada

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	51
1.1. Identificação Humana	53
1.2. Métodos de Identificação Humana	53
1.3. Biologia Molecular: O DNA	54
1.4. Biologia Molecular e Identificação Humana	55
1.5. Protocolos da análise forense do DNA.....	56
1.6. Biologia Molecular e Odontologia Legal	59
2. OBJETIVO	61
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3.1. Aspectos éticos.....	67
3.2. Coleta das amostras.....	67
3.2.1. Critérios de exclusão	67
3.2.2. Limpeza e armazenamento dos elementos dentais	67
3.3. Cálculo estatístico para obtenção da amostra.....	67
3.4. Formação dos grupos amostrais.....	68
3.4.1. Grupo amostral – Dente íntegro	68
3.4.2. Grupo amostral – Polpa dental.....	70
3.4.3. Grupo amostral – Controle positivo	72
3.5. Extração de DNA	72
3.5.1. Grupo amostral - Dente íntegro	72
3.5.2. Grupo amostral – Polpa dental.....	73
3.6. Eletroforese de DNA em gel de agarose	73
3.7. Quantificação do DNA por PCR Tempo Real	74
3.7.1. Preparo do DNA padrão para a quantificação	75
3.7.2. Preparo da solução para a PCR.....	75
3.8. Análise de fragmentos do DNA	76
3.8.1. Seleção dos marcadores.....	77
3.8.2. Preparo das amostras para a análise dos fragmentos	77
3.8.3. Reação da polimerase em cadeia	78
3.9. Análise estatística.....	78

4. RESULTADOS.....	79
5. DISCUSSÃO	97
6. CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
GLOSSÁRIO.....	119
Apêndice A – Termo de Doação dos Dentes	125
Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	129

1. Introdução

1.1. Identificação Humana

A identificação humana ainda é um desafio para a ciência nos casos em que os corpos encontram-se sem possibilidade de reconhecimento direto e, por definição, trata-se do processo cuja finalidade é levantar uma identidade, ou seja, reunião de um conjunto de características que singularizam, individualizam e atribuem uma condição de unicidade a uma pessoa ou coisa, fazendo-a distinta e diferente das demais (Daruge Júnior *et al.*, 2001).

Na ausência de um suspeito, a investigação pela identificação da vítima toma como ponto de partida a definição do perfil antropológico, o qual é traçado por meio de métodos reconstrutivos. O uso de técnicas de Antropologia Forense gera parâmetros capazes de prover informações úteis quanto às características gerais do indivíduo em relação à estatura, sexo, idade, etnia e destreza manual, os quais produzem uma identificação geral que orientará a busca por um suspeito e por elementos comparativos subsequentes (Silva, 2007; Boyd e Boyd, 2011).

A partir do suspeito, a comparação dos caracteres levantará coincidências entre os dados previamente registrados e os obtidos no momento atual e tal procedimento pode ser realizado por diferentes técnicas, as quais lançam mão do material disponível em cada caso (Weedn, 1998).

1.2. Métodos de Identificação Humana

São três os métodos considerados primários na identificação humana: a impressão digital, a Odontologia e o DNA. A definição da metodologia que será aplicada dependerá da disponibilidade e qualidade do material para análise (Interpol, 2009).

Historicamente, no Brasil, as impressões digitais são frequentemente usadas nos processos de identificação humana. Por ser arquivada como forma de registro civil, a facilidade ao acesso dessa informação faz com que a datiloscopia seja a primeira opção entre os métodos de identificação. No entanto, por ser um método comparativo, o processo torna-se inviável quando essa evidência é perdida, seja na falta do registro anterior ou ainda em indivíduos que foram expostos aos efeitos do calor, traumatismos ou processos autolíticos, os quais causam perdas das polpas digitais (Stigler, 1995; Kahana *et al.*, 2001).

Nos casos de indivíduos carbonizados, em avançados estágios de decomposição ou que se apresentam esqueletizados, os vestígios humanos se tornam escassos, restando em algumas situações apenas remanescentes ósseos e elementos dentais, os quais tendem a resistir as mais extremas situações graças ao grau relativamente alto de resistência física e química de suas estruturas (Miyajima *et al.*, 2001).

A análise dental quando realizada por profissionais com habilidades específicas e conhecimentos científicos fornece informações precisas e particulares de um indivíduo (Hinchliffe, 2011). A cavidade bucal possui diversas características dentais, patológicas e de tratamentos, os quais podem ser utilizados para a comparação (Vanrell, 2008). No entanto, o sucesso da técnica de identificação por esses dados depende, primordialmente, das informações *ante-mortem* fornecidas e de registros *post-mortem* adequados, sendo o processo de identificação dificultado quando os registros odontológicos não estão disponíveis (Silva *et al.*, 2006).

Nas situações em que os métodos tradicionais de identificação (impressão digital e Odontologia) são inviáveis ou quando existe a necessidade de comprovação dos resultados obtidos, o uso de técnicas envolvendo a análise do DNA ganha destaque (Pardini *et al.*, 2001; Brkić *et al.*, 2002; Dolinsky e Pereira, 2007; Dias, 2009; Girish *et al.*, 2010; Datta e Datta, 2012).

1.3. Biologia Molecular: O DNA

As sequências de DNA são responsáveis pelas características genéticas do homem e de todos os seres vivos. A sua molécula é considerada a unidade de herança do corpo e carrega as informações genéticas de uma geração para outra (Jobim *et al.*, 2006).

O DNA é formado por uma longa fita dupla de nucleotídeos, que se condensa com proteínas formando os cromossomos. Cada nucleotídeo é constituído por três componentes: um fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada (pode ser adenina, timina, guanina ou citosina). A fita dupla é formada pela ligação específica que ocorre entre essas bases: a adenina se liga à timina e a citosina à guanina, sendo esse pareamento específico essencial quando a molécula é replicada, pois permite uma cópia perfeita da molécula nos processos de divisão (Johnson e Walter, 2011).

Embora a estrutura de DNA seja semelhante entre as pessoas existem variabilidades nas sequências dos genes, componentes que carregam a informação genética (Junqueira e Carneiro, 2008). O gene é um segmento da molécula de DNA composto por éxons (partes que codificam proteínas) e íntrons (partes que não codificam proteínas), sendo esses último os mais usados nas análises forenses (Bray *et al.*, 2011).

Existem dois tipos de DNA: o genômico ou nuclear, encontrado no núcleo das células, e o mitocondrial, localizado no interior das mitocôndrias presentes no citoplasma da célula, e apesar de ambos serem utilizados nos processos de identificação, algumas peculiaridades determinam a indicação de uso de um ou outro (Butler, 2009). O DNA nuclear é usado na maioria dos casos e sua principal característica é ser metade de origem paterna e metade materna (Koch e Andrade, 2008). Já o DNA mitocondrial é matrilinear, ou seja, de herança exclusivamente materna. A explicação para esse fato é que as mitocôndrias paternas são quebradas durante a fecundação e, dessa forma, todas as mitocôndrias herdadas são derivadas do gameta feminino, por esse motivo a análise desse DNA não permite que se estabeleça relação com informações paternas (Sutovsky *et al.*, 1999).

A análise do DNA mitocondrial é considerada mais complexa e demorada que a análise de DNA nuclear, pois exige o sequenciamento direto de suas bases nitrogenadas, e por esse motivo, não é utilizada de maneira habitual nos laboratórios genéticos. Apesar dessa limitação, esse DNA é considerado mais resistente, principalmente em função do seu formato (dupla hélice circular) que dificulta sua degradação (Holland, 2012).

Além da resistência, outra vantagem é que as células humanas possuem centenas de mitocôndrias e cada uma delas apresenta várias cópias do cromossomo mitocondrial. Dessa forma, uma única célula contém um alto número de cópias deste DNA, razão pela qual a chance de sua obtenção em amostras degradadas é maior que a do DNA nuclear. Portanto, a escolha do tipo de análise dependerá da condição da amostra disponível (Pakendorf e Stoneking, 2005).

1.4. Biologia Molecular e Identificação Humana

O avanço científico permite que processos de identificação envolvendo biologia molecular sejam realizados mesmo na ausência de registros *ante-mortem* de ordem física ou, até mesmo, com material biológico deteriorado e em pequenas quantidades. O material genético para análise já foi isolado de amostras de dentes,

sangue, sêmen, saliva, ossos, tecidos musculares, fios de cabelo, entre outras fontes biológicas e a principal vantagem é que, devido à herança genética, famílias inteiras podem oferecer material para referência (Corach, 1997).

A individualização por esse método é possível, pois cada indivíduo apresenta um perfil genético, sendo exceção à diferenciação de gêmeos univitelinos que, por serem originados da divisão de um único óvulo fecundado, são considerados clones genéticos (Primorac e Schanfield, 2000).

A base para a investigação da individualidade pela análise do DNA encontra-se nas regiões que apresentam diferenças entre os indivíduos, denominadas de polimorfismos. Os primeiros polimorfismos encontrados foram em regiões da molécula chamadas de minissatélites. Essas regiões são formadas por números variáveis de repetições consecutivas de nucleotídeos (VNTR) (de 10 a 100 repetições) que podem variar de 10 a 64 pares de bases (Oliveira, 2009). São essas variações no número de repetições que fazem com que algumas regiões, chamadas de *loci de VNTR*, possuam diversos alelos na população (Jobim *et al.*, 1999).

No entanto, as limitações dos testes com minissatélites são decorrentes da análise de grandes fragmentos, o que a torna difícil quando o material está parcialmente degradado (Carey e Mitnik, 2002). Diante das dificuldades nessa análise, o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiu que trechos selecionados do DNA fossem amplificados (Morling, 2009), tornando possível a análise de fragmentos menores chamados de microssatélites, formados a partir de sequências curtas de repetição (STRs) (menos de 50 repetições) que variam de 2 a 7 pares de bases (Butler, 2004, 2007).

Nas técnicas que analisam STRs geralmente são necessárias concentrações entre 0,5 a 2ng de DNA para a realização da genotipagem (Koch e Andrade, 2008). Por esse motivo, os STRs se tornaram os marcadores genéticos mais usados em vários campos da ciência, inclusive, no contexto forense, na identificação genética humana (Oliveira, 2009), tendo em vista suas características como: abundância no genoma humano; elevado poder discriminativo; baixa taxa de mutação; tamanho previsível dos fragmentos de amplificação (na ordem dos 90-500 pb) e estudo fácil mediante técnicas de PCR (Butler, 2005).

1.5. Protocolos da análise forense do DNA

As técnicas que abrangem biologia molecular envolvem diferentes etapas, que compreendem desde a coleta e armazenamento da amostra, extração, quantificação e amplificação do DNA até a análise das regiões de interesse da molécula. O sucesso na obtenção dos resultados está diretamente relacionado aos cuidados com as diferentes fases durante esses processos (da Silva *et al.*, 2007).

Os cuidados iniciais são relacionados ao tipo, quantidade disponível, manuseio, procedimento de coleta e armazenamento das amostras. Essas preocupações são essenciais para evitar a perda, degradação e contaminação do material, especialmente em casos forenses. É importante ressaltar que a integridade da amostra enviada ao laboratório é imprescindível para o sucesso da análise, e uma amostra mal coletada e armazenada pode tornar inócuo o resultado apresentado nos exames (Lee e Ladd, 2001).

Uma das maiores dificuldades encontradas pelos peritos é em relação ao armazenamento dessas amostras, uma vez que as condições adversas encontradas nos locais de crimes podem prejudicar a estabilidade do material (Benecke, 2005). A degradação do DNA é um fenômeno muito complexo que se inicia com a autólise seguida da destruição aeróbica e bacteriana das células (Ludes *et al.*, 1993; Nakanish *et al.*, 2003; Bender *et al.*, 2004; Alaeddini *et al.*, 2010), a qual depende do nível de água, oxigênio e, mais importante, da temperatura do ambiente local.

Estudos demonstram que as moléculas orgânicas e de DNA sobrevivem mais tempo em ambientes frios, em que as taxas de decaimento são diminuídas significativamente a cada 10°C de queda na temperatura. Por esse motivo, a técnica mais utilizada para conservação da integridade das amostras tem sido a do congelamento (Höss *et al.*, 1996; Willerslev *et al.*, 1999).

Além do congelamento, outros métodos para a estabilização das amostras são indicados (Nagy, 2010), e existem hoje no mercado produtos que prometem estabilizar o DNA imediatamente após a imersão da amostra biológica no conteúdo, permitindo dessa forma a coleta, estabilização e transporte desse material mesmo sem condições especializadas. Assim, torna-se possível que as evidências recolhidas em qualquer lugar à temperatura ambiente sejam enviadas para as instalações apropriadas de forma segura (Grotzer *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2003; Mutter *et al.*, 2004; Qiagen, 2006, 2008, 2011).

O Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) é um desses fluidos que, segundo o fabricante, é capaz de estabilizar o DNA, RNA e proteínas

simultaneamente. Segundo orientações do produto (Qiagen, 2011), as amostras podem ser preservadas em temperatura ambiente por curtos períodos de tempo (até 7 dias), refrigerados por até 6 meses e, para armazenamento em longo prazo, o congelamento é recomendado. Apesar de o produto ter sido submetido há alguns testes iniciais (Mee *et al.*, 2011; Gelbart *et al.*, 2012), ainda não há trabalhos na literatura que evidenciam a funcionalidade e eficácia do mesmo em relação aos tecidos dentais.

Em relação à extração do DNA, vários protocolos podem ser utilizados. Atualmente kits comerciais são vendidos visando tornar a execução desse processo mais simples e rápida, além disso, esses kits são indicados na tentativa de padronizar o procedimento (Cotton *et al.*, 2000; Interpol, 2009).

Após a extração do DNA, sua quantidade e qualidade devem ser examinadas, principalmente nas amostras utilizadas em investigação criminal ou naquelas passíveis de degradação e contaminação. Essa etapa, também denominada de quantificação de ácido nucleico, é importante para a adequação da concentração das amostras e para observação inicial dos resultados, o que possibilita informações quanto ao seu estado de degradação e permite a decisão sobre qual análise será realizada (Alonso *et al.*, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual representa grande avanço científico e serve de alicerce para o processo de identificação humana, permite a amplificação seletiva de sequências específicas do DNA por meio da utilização de reagentes em ciclos com variação de temperatura (Morling, 2009).

O processo compreende três fases: a primeira denominada desnaturação, na qual a dupla fita do DNA molde se separa; a segunda quando ocorre o pareamento dos iniciadores (primers), que são confeccionados a partir da sequência do DNA e ligam-se especificamente ao DNA sinalizado delimitando a região que será amplificada, e a terceira fase, ou fase de extensão, quando a enzima polimerase termoestável (*Taq* DNA polimerase) atua adicionando os nucleotídeos sintéticos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) nos locais apropriados e a síntese de múltiplas cópias de DNA é então iniciada (Cury *et al.*, 2005).

Outro importante avanço para o processo de quantificação foi o desenvolvimento da PCR Tempo Real, que permitiu, por meio de técnica bastante sensível, maior facilidade, rapidez e precisão na obtenção dos dados. Além disso, a

automação e redução nos procedimentos laboratoriais diminuem a quantidade de manipulações manuais, favorecendo assim, a manutenção na qualidade dos procedimentos (Novais *et al.*, 2004).

Além dessa facilidade, atualmente novas tecnologias permitem que a análise de regiões amplificadas seja realizada por sequenciadores automáticos. Nessa técnica a identificação de fragmentos é realizada após eletroforese capilar, por meio da detecção de sinais de marcadores fluorescentes que são incorporados na PCR. Dessa forma é possível identificar os fragmentos utilizando um feixe de laser que ao excitar os marcadores emitem luz em um comprimento de onda específico gerando as sequências de DNA (Koch e Andrade, 2008).

Atualmente a maioria das genotipagens automatizadas de DNA é realizada por meio da análise de vários STRs ao mesmo tempo. Para fins de identificação, os que possuem maior significância são aqueles que apresentam maior polimorfismo (possibilidade de vários alelos) e menor tamanho (fragmentos de DNA com 100 a 200 pares de base) (Jobim, 2003). Os principais STRs usados foram definidos por meio de estudos populacionais realizados em bancos de dados genéticos, por exemplo, o CODIS (*Combined DNA Index System*), criado pelo FBI nos Estados Unidos. (Butler, 2006).

1.6. Biologia Molecular e Odontologia Legal

No contexto forense a aplicação de técnicas envolvendo a biologia molecular em Odontologia Legal representa uma conquista científica, pois quando os métodos convencionais para identificação dental falham, materiais biológicos da cavidade bucal podem prover a relação necessária a fim de obter a identidade (Sweet e Sweet, 1995; Muruganandhan e Sivakumar; Manjunath *et al.*, 2011).

A resistência e a durabilidade associadas ao posicionamento e sua organização estrutural permitem uma eficiente proteção dos elementos dentais a diversos fatores exógenos, possibilitando a retirada de DNA de células de diferentes regiões do dente (Gaytmenn e Sweet, 2003; da Silva *et al.*, 2012).

Embora a polpa dental seja formada por tecido conjuntivo frouxo, sua localização no interior do elemento dental (Cerri *et al.*, 2004) a mantém isolada

quimicamente, termicamente e fisicamente por tecido mineralizado (Melani, 1999), garantindo que a mesma possa ser usada efetivamente como fonte de material genético em diversas situações (Pötsch *et al.*, 1992; Hanaoka *et al.*, 1995).

O método de extração do DNA da polpa dental traz ainda como vantagem a possibilidade de preservação da coroa dental para um eventual confronto. Além disso, ao seccionar coroa e raiz para a remoção do tecido pulpar as porções coronária e radicular permanecem intactas, possibilitando o uso do remanescente caso seja necessária nova extração de DNA (Smith *et al.*, 1997; De Leo *et al.*, 2000; Corte-Real *et al.*, 2012).

Além dessa vantagem o material obtido da polpa dental apresenta maior peso molecular comparado à quantidade de DNA extraído de tecidos dentais mineralizados (Malaver e Yunis, 2003). A extração por meio dessa fonte biológica, mesmo quando armazenada em temperatura ambiente, mostra-se eficiente após diferentes períodos de tempo ou ainda após exposição a fatores de degradação (Lessig e Edelmann, 1995).

Apesar dos fatores exógenos não serem determinantes para a obtenção de DNA de alto peso molecular a partir de polpas dentais, os mesmos podem interferir na quantidade de DNA extraído (Schwartz *et al.*, 1991; Pfeiffer *et al.*, 1999; Musse 2007). Ao considerar amostras forenses, que geralmente apresentam pequenos fragmentos de DNA, todos os cuidados na manutenção do material devem ser tomados, visto que qualquer perda pode prejudicar a análise dessas amostras.

2. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar do uso do produto Allprotect Tissue Reagent[®] (Qiagen, Hilden, Germany) na estabilização do DNA de tecidos dentais humanos armazenados em diferentes condições de tempo e temperatura.

3. Material e Métodos

3.1. Aspectos éticos

Inicialmente, o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP-FORP/USP), sendo aprovado sob o registro CAAE nº 0020.0.138.000-11, Processo nº 2011.1.364.58.7 (Anexo A).

3.2. Coleta das amostras

Foram coletados 165 elementos dentais provenientes de exodontias de terceiros molares superiores e/ou inferiores íntegros (removidos integralmente e sem cárie dental ou outras afecções), obtidos nas clínicas de graduação e/ou pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), mediante Termo de Doação dos Dentes (Apêndice A). Cada sujeito da pesquisa pôde doar de um a quatro dentes, dependendo da cirurgia indicada.

3.2.1. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram a não assinatura dos referidos documentos, impossibilitando a participação, ou a condição dental - no caso de dentes extraídos que não se apresentavam hígidos e íntegros.

3.2.2. Limpeza e armazenamento dos elementos dentais

Após o procedimento cirúrgico, os elementos dentais foram submetidos à limpeza com gaze estéril e soro fisiológico, e armazenados a -20°C, individualmente, em tubos de centrifugação esterilizados – Tipo Falcon (Axygen, Inc, EUA), para que o material biológico se mantivesse estável. Após a obtenção do número suficiente do grupo amostral, os dentes foram descongelados de maneira gradativa, transferidos para geladeira (8°C) e posteriormente levados às temperaturas estudadas no projeto, conforme descrito na formação dos grupos.

3.3. Cálculo estatístico para obtenção da amostra

O parâmetro estatístico para determinar a quantidade de elementos dentais necessários na pesquisa foi a análise da determinação do tamanho mínimo de

amostra para o cálculo da média de uma população. Sendo assim, foi definido como desejado para este estudo nível de confiança de 95%, com erro máximo desejado de 5% e desvio padrão da população de 5%, sendo definida amostra mínima de quatro dentes para cada grupo estudado para uma população não conhecida. Devido à disponibilidade de dentes e visando o aumento do limite optou-se pelo armazenamento de cinco elementos dentais para cada fator de exposição. O cálculo de determinação de amostra mínima populacional foi realizado com o auxílio do programa estatístico Minitab 16 fornecido pelo grupo Siqueira Campos.

3.4. Formação dos grupos amostrais

3.4.1. Grupo amostral – Dente íntegro

Após o descongelamento dos dentes, cada elemento dental recebeu uma numeração e ficou mantido em diferentes condições, conforme os Quadros 1 e 2.

Quadro 1 - Grupo amostral dentes íntegros. Temperatura Ambiente (24 a 37°C)

Temperatura Ambiente (24 a 37°C)							
Allprotect		Sem produto		Allprotect		Sem produto	
180 dias	1	180 dias	6	30 dias	11	30 dias	16
	2		7		12		17
	3		8		13		18
	4		9		14		19
	5		10		15		20
7 dias	21	7 dias	26	1 dia	31	1 dia	36
	22		27		32		37
	23		28		33		38
	24		29		34		39
	25		30		35		40

Quadro 2 - Grupo amostral dentes íntegros. Temperatura (4 a 8°C)

Temperatura (4 a 8°C)							
Allprotect		Sem produto		Allprotect		Sem produto	
180 dias	41	180 dias	46	30 dias	51	30 dias	56
	42		47		52		57
	43		48		53		58
	44		49		54		59
	45		50		55		60
7 dias	61	7 dias	66	1 dia	71	1 dia	76
	62		67		72		77
	63		68		73		78
	64		69		74		79
	65		70		75		80

Nos dentes em que foi utilizado o produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany), demonstrado na Figura 1, o mesmo foi despejado em recipiente plástico de centrifugação esterilizados - Tipo Falcon (Axygen, Inc, EUA), utilizando a válvula dispensatória presente no frasco, sendo depositada quantidade de reagente suficiente para cobrir o elemento dental, conforme as Figuras 2 e 3.

Figura 1 - Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany)

Figura 2 - Amostras formadas pelo dente íntegro com e sem produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany), respectivamente

Figura 3 - Visão aproximada de amostras formadas pelo dente íntegro com e sem produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany), respectivamente

3.4.2. Grupo amostral – Polpa dental

Também foi testada a conservação pelo produto utilizando apenas a polpa dental humana, onde os dentes, após o descongelamento gradativo, foram cortados lentamente, evitando o aquecimento, no sentido horizontal na região da junção amelocementária, utilizando motor de baixa rotação com auxílio de um disco de carburundo esterilizado e trocado para cada elemento dental (Figura 4).

Figura 4 - Secção na junção amelocementária do elemento dental

Após a secção do dente e separação das porções coronária e radicular, o tecido pulpar foi removido com uso de instrumental endodôntico esterilizado e individualizado, e armazenado em tubos de microcentrifugação (Axygen, Inc, EUA) de 0,5mL, Figura 5.

Figura 5 - Amostra de polpa dental armazenada sem o produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany)

Nas polpas que foram armazenadas utilizando o produto, o mesmo foi despejado no tubo de microcentrifugação (Axygen, Inc, EUA) utilizando a válvula dispensatória presente no frasco, sendo depositada quantidade de reagente suficiente para recobrir a polpa dental, conforme a Figura 6.

Figura 6 - Amostra de polpa dental armazenada com o produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany)

Cada polpa dental recebeu uma numeração e ficou mantida em diferentes condições, conforme os Quadros 3 e 4.

Quadro 3 - Grupo amostral polpa dental. Temperatura Ambiente (24 a 37°C)

Temperatura Ambiente (24 a 37°C)							
Allprotect		Sem produto		Allprotect		Sem produto	
180 dias	81	180 dias	86	30 dias	91	30 dias	96
	82		87		92		97
	83		88		93		98
	84		89		94		99
	85		90		95		100
7 dias	101	7 dias	106	1 dia	111	1 dia	116
	102		107		112		117
	103		108		113		118
	104		109		114		119
	105		110		115		120

Quadro 4 - Grupo amostral polpa dental. Temperatura (4 a 8°C)

Temperatura (4 a 8°C)							
Allprotect		Sem produto		Allprotect		Sem produto	
180 dias	121	180 dias	126	30 dias	131	30 dias	136
	122		127		132		137
	123		128		133		138
	124		129		134		139
	125		130		135		140
7 dias	141	7 dias	146	1 dia	151	1 dia	156
	142		147		152		157
	143		148		153		158
	144		149		154		159
	145		150		155		160

3.4.3. Grupo amostral – Controle positivo

Um grupo controle positivo foi formado por cinco elementos dentais, os quais receberam numeração e ficaram armazenados a -20°C durante 180 dias, conforme o Quadro 5. Esse controle foi determinado para garantir a viabilidade da extração proveniente da polpa dental usando kit comercial e seguindo o protocolo padrão de armazenamento (-20°C). Tal grupo não serviu para a comparação dos efeitos da utilização do produto, e por isso os resultados da quantificação do DNA extraído desse grupo não foram utilizados na análise estatística.

Quadro 5 - Grupo amostral controle positivo

Temperatura (-20°C)	
180 dias	161
	162
	163
	164
	165

3.5. Extração de DNA

3.5.1. Grupo amostral - Dente íntegro

Inicialmente, os dentes foram cortados no sentido horizontal na região da junção amelocementária, utilizando motor de baixa rotação com auxílio de um disco de carburundo esterilizado e trocado para cada elemento dental (Figura 4). O tecido pulpar foi removido com uso de instrumental endodôntico e curetas, e inserido em tubo de microcentrifugação (Axygen, Inc, EUA). Posteriormente, o DNA genômico foi extraído utilizando o Qiaamp® DNA Micro Kit (Quiagen, Hilden, Germany) (Figura 7),

de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o protocolo de extração de DNA genômico de tecidos (Qiagen, 2010).

Figura 7 - Qiaamp[®] DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany)

3.5.2. Grupo amostral – Polpa dental

As polpas dentais armazenadas no produto Allprotect Tissue Reagent[®] (Qiagen, Hilden, Germany) foram removidas do fluido com o auxílio de instrumental endodôntico e colocadas em um novo tubo de microcentrifugação (Axygen, Inc, EUA). Posteriormente, o DNA genômico foi extraído utilizando o Qiaamp[®] DNA Micro Kit (Quiagen, Hilden, Germany) (Figura 7), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o protocolo de extração de DNA genômico de tecidos (Qiagen, 2010).

3.6. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Para analisar o produto da extração do DNA foram utilizados géis de agarose (Seakem[®], FMC Inc.) a 1% em tampão TAE (Tris acetato [40,0mM]; EDTA [1,0mM] pH 8,0), no qual foi observada pelo método qualitativo a efetividade do protocolo utilizado na extração genômica. Nessa etapa as concentrações de DNA não foram padronizadas uma vez que essa análise em gel foi exclusivamente para verificar a extração.

Foram separados 2 μ L de cada amostra de DNA e colocados em tubos de microcentrifugação (Axygen, Inc, EUA) de 0,5mL com 7 μ L de água Milli-Q e 1 μ L de gel Red (Invitrogen[®], EUA) diluído. A eletroforese foi realizada a 60V durante 60 minutos e após iluminação com luz ultravioleta, os géis foram fotografados pelo

sistema de imagem (Chemi Doc MP, Biorad). O restante da amostra de DNA foi mantido a -20°C até a realização da próxima etapa.

3.7. Quantificação do DNA por PCR Tempo Real

A quantificação pela PCR Tempo Real foi realizada utilizando o equipamento 7500 Real Time PCR System com o SDS Software (Figura 8). Essa técnica foi utilizada para determinar a quantidade de ácido nucleico na amostra por meio do sinal fluorescente que aparece a cada ciclo da PCR em resultado da amplificação das extremidades da molécula.

Figura 8 - Equipamento 7500 Real Time PCR System com o SDS Software

Para quantificar o DNA genômico total presente na amostra foi utilizado o kit Quantifiler[®] Human DNA Quantification (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Figura 9), que contém os reagentes necessários para a amplificação, detecção e quantificação do DNA humano presente na amostra, o protocolo para a quantificação foi realizado seguindo orientações do fabricante (Applied, 2012).

Figura 9 - Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

3.7.1. Preparo do DNA padrão para a quantificação

Para realizar a quantificação é necessário que se tenha padrões pré-determinados. O preparo dos padrões foi realizado por meio de diluições seriadas, utilizando o DNA controle fornecido pelo kit Quantifiler® Human DNA Quantification (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e Tampão TE (Tris-HCl [10mM]; Na₂EDTA [0,1mM], pH 8,0). Nesse estudo foram definidos seis padrões, produzidos de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Diluições seriadas para preparo dos DNAs padrões

Padrão	Solução	Concentração (ng/μL)
Padrão 1	DNA controle	200
Padrão 2	20 μL Padrão 1 + 20 μL TE	100
Padrão 3	20 μL Padrão 2 + 20 μL TE	50
Padrão 4	10 μL Padrão 3 + 20 μL TE	16,700
Padrão 5	10 μL Padrão 4 + 20 μL TE	5,560
Padrão 6	10 μL Padrão 5 + 20 μL TE	1,850

3.7.2. Preparo da solução para a PCR

A solução para a Reação de Amplificação (PCR mix) foi produzida utilizando o Quantifiler Human Primer Mix e Quantifiler PCR Reaction Mix, fornecidos pelo kit Quantifiler® Human DNA Quantification (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e a proporção para cada amostra está demonstrada no Quadro 6.

Quadro 6 - Cálculo do volume necessário para cada amostra no preparo do PCR Mix

Reagente do Kit	Volume por reação (μL)
Quantifiler Human Primer Mix	10,5
Quantifiler PCR Reaction Mix	12,5

Foram utilizadas placas de reações com 96 poços para inserção das amostras. Em cada poço foi adicionado 23μL do PCR Mix e 2μL da amostra de DNA para ser quantificada ou 2μL do DNA padrão. A quantificação das 165 amostras foi realizada em duas placas de reações e, em cada placa foram colocados seis padrões em duplicata, totalizando 12 padrões por reação, que foram colocados para controlar a padronização durante essa etapa.

3.8. Análise de fragmentos do DNA

A análise de fragmentos foi realizada utilizando o equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Figura 10) com o software Gene Mapper® ID (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Figura 11.

Figura 10 - Equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Figura 11 - Software Gene Mapper® ID (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Esse procedimento foi realizado para observar se ocorria a amplificação a partir do uso de quatro marcadores selecionados em 37 amostras, as quais foram definidas da seguinte forma: uma amostra de cada condição possível de armazenamento do presente estudo, totalizando 32 amostras, e cinco amostras do grupo controle positivo. As amostras selecionadas estão descritas no Quadro 7.

Quadro 7 - Amostras selecionadas para análise de fragmentos.

Amostra 05	Amostra 07	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 21	Amostra 28	Amostra 31
Amostra 40	Amostra 41	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 56	Amostra 62	Amostra 70
Amostra 71	Amostra 79	Amostra 85	Amostra 88	Amostra 92	Amostra 96	Amostra 104
Amostra 109	Amostra 111	Amostra 118	Amostra 123	Amostra 129	Amostra 134	Amostra 139
Amostra 144	Amostra 150	Amostra 153	Amostra 160	Amostra 161	Amostra 162	Amostra 163
Amostra 164	Amostra 165					

3.8.1. Seleção dos marcadores

Os marcadores selecionados para a análise dos fragmentos foram: FGA, D3S1358, D7S820 e D16S539, cedidos pelo do Laboratório de Genética Forense da Universidade Federal de Alagoas, e selecionados por apresentarem significativo polimorfismo. A sua localização e a sequência repetitiva estão expressos no Quadro 8.

Quadro 8 - Localização e a sequência repetitiva dos marcadores selecionados.

Marcador	Localização	Sequência Repetitiva
FGA	4q28	TTTC
D3S1358	3p	TCTA
D7S820	7q11.21-22	GATA
D16S539	16q24	GATA

3.8.2. Preparo das amostras para a análise dos fragmentos

As amostras selecionadas que apresentavam alta concentração foram diluídas em Tampão TE (Tris-HCl [10mM]; Na₂EDTA [0,1mM], pH 8,0), de forma que ficassem com a concentração padronizadas em no máximo 20ng/μL de DNA, seguindo protocolo utilizado pelo Laboratório de Genética Forense da Universidade Federal de Alagoas.

3.8.3. Reação da polimerase em cadeia

Para a reação de amplificação, o DNA foi aquecido a 94°C por 4 minutos para que ocorresse a desnaturação da dupla fita. A etapa de pareamento dos iniciadores ocorreu com o resfriamento da reação para 56°C por 30 segundos, no qual os iniciadores hibridizam nas porções complementares da fita, permitindo que, com o aumento da temperatura a 72° C por 1 minuto, a enzima *Taq* DNA polimerase (em meio contendo os desoxirribonucleotídeos trifosfatados [dNTP] e Cloreto de Magnésio) iniciasse o processo de replicação, totalizando 30 ciclos. Os reagentes utilizados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Tipos e quantidades de reagentes utilizados na PCR.

Reagente	Volume/amostra (µL)
Taq DNA polimerase	0,8
Tampão Universal	2,5
Primer	2,5
Água	16,7
Amostra DNA	2,5

Após amplificação das 37 amostras, 1 µL do “amplicon” (amostra amplificada na PCR) foi adicionada a 10 µL de formamida e levados para o equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As etapas de quantificação por PCR Tempo Real e a análise de fragmentos das amostras foram realizadas seguindo protocolo experimental em colaboração com o Laboratório de Genética Forense da Universidade Federal de Alagoas.

3.9. Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente por Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico) para averiguar a influência da utilização ou não do produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) na estabilização do DNA de tecidos dentais humanos em diferentes condições de temperatura e períodos de tempo. Optou-se pela realização desse teste, pois ao realizar o teste Kolmogorov-Smirnov para observar a homogeneidade da amostra, os valores da quantificação não apresentaram distribuição normal. O teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) foi utilizado para as comparações. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS para Windows, versão 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. Resultados

A primeira análise para observação da etapa de extração do DNA foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, sendo possível observar, pelo rastro de DNA após exposição do gel em luz ultravioleta, indícios da presença de DNA genômico em diferentes concentrações nas amostras.

As fotografias da eletroforese do grupo amostral formado pelo dente íntegro (amostras de 1 a 80) estão demonstradas nas Figuras 12, 13, 14 e 15.

Figura 12 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 1 a 20

Figura 13 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 21 a 40

Figura 14 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 41 a 60

Figura 15 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 61 a 80

As fotografias da eletroforese do grupo amostral formado pela polpa dental (amostras 81 a 160) estão demonstradas nas Figuras 16, 17, 18 e 19.

Figura 16 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 81 a 100

Figura 17 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 101 a 120

Figura 18 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 121 a 140

Figura 19 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 141 a 160

Na Figura 20 é possível observar a fotografia da eletroforese em gel de agarose do grupo controle positivo (amostras 161 a 165).

Figura 20 - Fotografia em gel de agarose a 1% evidenciando DNA genômico nas amostras 161 a 165

Posteriormente a indicação da presença de DNA genômico nos géis de agarose foi realizada a quantificação das amostras por meio da PCR Tempo Real. Nas curvas de dissociação apresentadas nas duas reações de quantificação, ao observar a relação entre os padrões utilizados, foi constatado que houve boa padronização nessa etapa laboratorial, conforme Figuras 21 e 22.

Figura 21 - Curvas de dissociação dos padrões de DNA utilizados na quantificação das amostras 1 a 84

Figura 22 - Curvas de dissociação dos padrões de DNA utilizados na quantificação das amostras 85 a 165

As curvas de dissociação das 165 amostras formadas durante a quantificação pela PCR Tempo Real estão demonstradas nas Figuras 23 e 24.

Figura 23 - Curvas de dissociação da quantificação das amostras 1 a 84

Figura 24 - Curvas de dissociação da quantificação das amostras 85 a 165

Os valores da quantificação pela PCR Tempo Real foram expressos em ng/ μ L. A quantidade de DNA foi bastante variável entre as amostras, confirmando os dados apresentados na primeira análise realizada nos géis de agarose. Os valores de DNA genômico presentes nos grupos amostrais estão expressos no Quadro 9.

Quadro 9 - Quantificação do DNA genômico por PCR Tempo Real das 160 amostras

Amostra	Quantificação	Amostra	Quantificação	Amostra	Quantificação	Amostra	Quantificação
1	2735,85	6	18,31	11	136,66	16	3,37
2	5507,48	7	61,40	12	967,16	17	5,95
3	1698,04	8	11,31	13	919,87	18	20,07
4	2383,50	9	8,32	14	3624,29	19	3,67
5	299,24	10	3,53	15	2314,62	20	3,28
21	223,20	26	974,05	31	627,42	36	331,41
22	2,01	27	132,04	32	587,29	37	1691,35
23	451,26	28	302,21	33	383,63	38	221,26
24	2060,21	29	365,77	34	372,43	39	381,33
25	256,31	30	2008,06	35	437,37	40	259,96
41	515,07	46	835,75	51	227,39	56	2469,45
42	609,96	47	12,13	52	681,44	57	1481,12
43	2680,45	48	231,49	53	122,90	58	7,30
44	875,33	49	20,81	54	258,13	59	160,09
45	338,08	50	1422,97	55	197,62	60	312,77
61	1476,68	66	363,23	71	1200,67	76	1526,61
62	524,08	67	110,04	72	833,11	77	541,65
63	989,03	68	860,16	73	2742,30	78	1240,22
64	1946,95	69	712,03	74	522,53	79	449,63
65	402,78	70	44,97	75	24,53	80	847,53
81	911,21	86	345,08	91	96,92	96	54,62
82	3109,87	87	17,08	92	123,44	97	3726,58
83	1886,18	88	1,58	93	3197,95	98	209,04
84	1760,72	89	43,00	94	283,83	99	757,86
85	0,04	90	4,95	95	2696,83	100	377,39
101	2920,68	106	1099,32	111	717,91	116	1601,79
102	1772,62	107	357,75	112	44,07	117	1511,18
103	0,01	108	315,16	113	2644,33	118	1112,39
104	450,76	109	29,24	114	472,86	119	747,72
105	1581,47	110	95,59	115	1675,02	120	681,34
121	4096,96	126	3490,40	131	939,75	136	3,05
122	10246,88	127	2088,11	132	1900,87	137	3608,06
123	1634,22	128	1376,50	133	1,11	138	2853,02
124	469,46	129	3118,75	134	801,61	139	537,84
125	634,90	130	1229,78	135	296,55	140	284,45
141	205,13	146	2179,44	151	306,96	156	1,78
142	1168,10	147	717,68	152	6,13	157	165,94
143	1624,33	148	392,17	153	446,45	158	1153,20
144	2348,26	149	615,55	154	707,57	159	1071,88
145	1740,07	150	319,87	155	506,74	160	628,62

Quantificação por PCR Tempo Real do grupo controle está expressa no Quadro 10.

Quadro 10 - Quantificação do DNA genômico por PCR Tempo Real do grupo controle positivo

Amostra	Quantificação
161	398,92
162	366,00
163	899,95
164	648,51
165	397,64

A partir dos dados da quantificação dos grupos amostrais (dente íntegro e polpa dental) a análise estatística foi realizada e os valores obtidos estão demonstrados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Média e desvio padrão da quantificação de DNA genômico por PCR Tempo Real do grupo dente íntegro, amostras 1 a 80.

Dias	Dente íntegro			
	Allprotect		Sem produto	
	4-8°C	23-34°C	4-8°C	23-34°C
1	1064,62±461,64 ^{da}	481,62±52,87 ^{da}	921,12±204,95 ^{da}	577,06±279,95 ^{da}
7	1067,90±290,18 ^{da}	598,59±372,29 ^{da}	418,08±161,08 ^{da}	756,42±343,70 ^{da}
30	297,49±98,57 ^{da}	1592,52±616,95 ^{da}	886,14±473,76 ^{da}	7,26±3,23 ^{ub}
180	1003,77±428,06 ^{daub}	2524,82±854,32 ^{da}	504,63±274,24 ^{ubda}	20,57±10,48 ^{ub}

Letras minúsculas diferença estatística entre colunas

Letras maiúsculas diferença estatística entre linhas

Tabela 4 - Média e desvio padrão da quantificação de DNA genômico por PCR Tempo Real do grupo polpa dental, amostras 81 a 160.

Dias	Polpa dental			
	Allprotect		Sem produto	
	4-8°C	23-34°C	4-8°C	23-34°C
1	394,77±116,57 ^{da}	1110,83±467,40 ^{da}	604,28±231,91 ^{da}	1130,88±189,15 ^{da}
7	1417,17±356,73 ^{da}	1345,13±516,23 ^{da}	844,94±341,35 ^{da}	379,41±190,53 ^{da}
30	787,97±325,76 ^{da}	1279,79±686,13 ^{da}	1457,28±738,56 ^{da}	1025,09±685,44 ^{da}
180	3416,48±1826,41 ^{da}	1533,69±519,53 ^{da}	2260,70±454,02 ^{da}	82,33±66,08 ^{da}

Letras minúsculas diferença estatística entre colunas

Letras maiúsculas diferença estatística entre linhas

Na segunda etapa laboratorial em que foram analisados os fragmentos de 37 amostras observou-se que apesar da variação na quantidade de DNA existente, foi possível a análise dos alelos das quatro regiões selecionadas, conforme expresso no Quadro 11. As imagens da eletroforese pelo equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer podem ser observadas nas Figuras 25 a 37.

Quadro 11 - Análise dos marcadores selecionados nas 37 amostras

Amostra	Marcador FGA		Marcador D3S1358		Marcador D7S820		Marcador D16S539	
	Alelos		Alelos		Alelos		Alelos	
5	22	23	14	15	9	11	9	12
7	20	21	14	17	10	12	9	11
15	21	26	15	18	7	10	8	11
16	20	22	15	17	8	11	9	13
21	20	22	15	17	10	10	9	11
28	22	22	16	17	8	11	10	12
31	22	24	16	17	11	11	9	14
40	19	22	17	17	11	12	9	11
41	20	23	16	17	9	13	9	12
46	21	24	13	16	12	12	12	12
54	23	31,2	15	18	10	11	9	11
56	24	26	15	18	10	10	10	12
62	17	22	16	18	10	10	9	9
70	24	26	14	17	11	12	11	12
71	23	26	16	17	8	10	12	13
79	18	24	14	15	10	11	12	12
85	19	21	15	16	8	10	11	13
88	22	26	14	15	8	12	9	11
92	19	21	15	17	11	12	11	12
96	22	24	15	16	11	11	9	10
104	23	23	15	16	9	10	11	13
109	23	43,2	15	18	10	12	11	12
111	19	24	15	17	10	12	9	11
118	19	25	16	17	8	10	12	13
123	19	24	15	17	10	12	9	11
129	23	23	15	18	11	12	11	12
134	20	24	15	19	8	11	11	13
139	21	22	15	16	10	12	10	11
144	20	22	14	17	11	11	11	12
150	24	25	15	18	7	10	9	11
153	23	26	15	16	12	12	11	11
160	24	25	14	18	11	12	10	10
161	25	26	16	18	11	11	8	11
162	25	26	15	17	11	11	9	13
163	25	26	16	18	11	11	8	11
164	20	25	15	18	9	11	9	12
165	20	25	15	18	9	11	9	12

Figura 25 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 41, 46 e 05

Figura 26 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 161, 162 e 163

Figura 27 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 153, 16 e 160

Figura 28 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 28, 31 e 40

Figura 29 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 56, 62 e 07

Figura 30 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 129, 134 e 139

Figura 31 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 85, 88 e 92

Figura 32 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 164, 165 e 21

Figura 33 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 144, 15 e 150

Figura 34 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 111, 118 e 123

Figura 35 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 70, 71 e 79

Figura 36 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer das amostras 54, 104 e 109

Figura 37 - Análise de fragmentos no equipamento ABI Prism 310 Genetic Analyzer da amostra 96

5. Discussão

A definição do perfil genético possui um poder elevado para a diferenciação dos seres humanos. A molécula de DNA apresenta considerável estabilidade química, e a diversidade de fontes biológicas para sua obtenção possibilita o seu uso nos casos de investigações forenses (Corach, 1997; Jobim *et al.*, 1999; Brkié *et al.*, 2002; Jobim *et al.*, 2006; Dolinsky e Pereira, 2007; Koch e Andrade, 2008; Dias, 2009; Girish *et al.*, 2010).

Para a área de Odontologia Legal, os elementos dentais são importantes fontes para análises genéticas, podendo ser o material responsável para a elucidação de casos de identificação (Pardini *et al.*; Miyajima *et al.*, 2001; Muruganandhan e Sivakumar, 2011; Manjunath *et al.*, 2011; Datta e Datta, 2012). No relato de Brkié *et al.* (2002), a identificação pericial de uma vítima estrangeira carbonizada após acidente de carro só foi possível por meio da análise do DNA extraído da polpa dental, devido à ausência de registros odontológicos e datiloscópico

Outro importante caso de utilização do DNA extraído de tecidos dentais para identificação humana foi o de uma vítima de homicídio, que teve o corpo carbonizado, e o exame de DNA só foi possível usando a polpa dental de um terceiro molar não irrompido (Sweet e Sweet, 1995). Segundo Gaytmenn e Sweet, (2003) e da Silva *et al.* (2012) há a possibilidade de extração de DNA de diferentes regiões do dente. No entanto, autores já haviam relatado que a extração a partir de polpas dentais possui grande importância e efetividade (Lessig e Edelmann, 1995), assim como foi demonstrado nos relatos de Brkié *et al.* (2002) e Sweet e Sweet (1995). Portanto, por tal motivo, no presente estudo optou-se pela utilização de tal região dental.

No presente trabalho a extração do DNA foi realizada utilizando o Qiaamp[®] DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), tal material é comercializado para possibilitar, de maneira rápida e eficaz, a extração de DNA com alta qualidade de diversos tipos de amostras (Qiagen, 2010). O emprego de kits comerciais tem se tornado frequente na tentativa de padronização dos procedimentos de extração e também visa diminuir o tempo laboratorial (Cotton *et al.*, 2000), sendo o seu uso recomendado em protocolos internacionais de investigação criminal (Interpol, 2009).

Dentre as metodologias que utilizam dentes na extração do DNA, o uso da polpa dental ganha destaque por possibilitar a obtenção de material genético com alto peso molecular (Malaver e Yunis, 2003). Segundo Hanaoka *et al.* (1995), a

variação na quantidade de DNA está relacionada ao volume da polpa dental, sendo que dentes que apresentam volume pulpar menor fornecem quantidade menor de DNA. No presente trabalho, os volumes das polpas dentais não foram mensurados, no entanto, a formação dos grupos amostrais foi realizada de maneira aleatória, o que permitiu a distribuição adequada dessa variável.

No estudo de Pötsch *et al.* (1992), as amostras dentais forneceram quantidades que variaram de 6 a 50µg de DNA, valores próximos ao observado por Hanaoka *et al.* (1995), que obtiveram uma variação entre 3 e 40µg na extração de DNA de polpas dentais. Já no presente estudo, no qual a quantificação foi realizada pela utilização de PCR Tempo Real, técnica considerada bastante sensível (Novais *et al.*, 2004), a variação encontrada foi mais acentuada, sendo obtidos valores que variaram entre 0,01 e 10246,88ng/µL.

Outro importante dado do presente trabalho é que, das 165 extrações de DNA realizadas, duas amostras de polpa dental apresentaram valores de quantificação muito inferiores às demais. No entanto, ao observar as amostras que estavam submetidas às mesmas condições de armazenamento (mesmo grupo), constatou-se que não houve correlação entre a baixa quantidade dessas amostras e as situações de exposição (produto, tempo e temperatura). O fato de não haver correlação entre a quantidade de DNA dessas duas amostras e as variáveis de exposição sugere que nesses dois casos a baixa quantificação de DNA pode estar relacionada a eventuais processos que poderiam ter degradado esse DNA após a extração, visto que no gel de agarose, apesar de não ser um método quantitativo, foi visualizada a presença de DNA genômico nos dois casos.

Tal ocorrência destaca a importância da utilização, quando possível, da polpa dental, pois caso tal evento ocorresse em mais amostras, ainda haveria a possibilidade extração de material genético usando como fonte biológica outra parte do dente (Smith *et al.*, 1997; De Leo *et al.*, 2000; Corte-Real *et al.*, 2012). No presente estudo, mesmo conservando o remanescente dental, o qual tornaria possível outra extração de DNA, optou-se em manter os dados originais das duas amostras, visto que a comparação utilizando a quantificação a partir de uma nova extração não seria interessante nesse estudo, uma vez que o novo DNA extraído seria oriundo de outra região dental, e não da polpa.

Além disso, na etapa laboratorial em que houve análise automática dos fragmentos, a amplificação dos quatro marcadores selecionados foi possível em

todas as 37 amostras testadas, incluindo uma que apresentava baixa quantidade de DNA. A possibilidade da análise de regiões mesmo em baixas concentrações de material evidencia a importância das reações de amplificação (Morling, 2009) e confirma a sensibilidade da técnica utilizando laser para análise de STRs em comparação às metodologias padrões (Butler, 2004, 2005, 2007; Koch e Andrade, 2008; Oliveira, 2009)

Vale ressaltar que o objetivo principal da pesquisa era avaliar se havia diferença na quantidade de DNA entre os grupos expostos e não expostos ao produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) nas diferentes condições de armazenamento. A análise dos fragmentos de algumas amostras representativas usando número limitado de marcadores foi realizada como forma de complementação da pesquisa, visto que a determinação dos alelos dessas regiões polimórficas não era o foco principal do estudo.

Alguns trabalhos (Schwartz *et al.*, 1991; Pfeiffer *et al.*, 1999; Nakanish *et al.*, 2003; Bender *et al.*, 2004; Musse, 2007, Alaeddini *et al.*, 2010) têm evidenciado como os fatores ambientais relacionados ao tempo, umidade e temperatura podem influenciar na qualidade e quantidade de DNA após a extração. O conhecimento desses fatores torna-se importante para a definição de protocolos de armazenamento que mantêm a estabilidade o material genético.

Diferentemente do observado por Hanaoka *et al.* (1995), que manteve dentes armazenados em temperatura ambiente e o fator tempo não influenciou na quantidade de DNA extraído, Pfeiffer *et al.* (1999), ao armazenar dentes no solo constatou que após seis semanas de armazenamento a concentração de DNA foi reduzida em 90%. Os resultados do presente estudo também evidenciaram degradação associada ao fator tempo quando os dentes íntegros ficaram armazenados em temperatura ambiente. Nessa condição houve diminuição na leitura de DNA nas amostras armazenados por 30 e 180 dias em relação às armazenadas no período de 1 a 7 dias ($p=0,04$).

Em relação à variável temperatura, Schwartz *et al.* (1991) observaram, além de pH, umidade, condições de solo e tempo de inumação, que a variação de 4°C, 25°C e 37°C não foi determinante para a obtenção de DNA com alto peso molecular a partir das polpas dentais. No presente trabalho, apesar de ter sido possível a obtenção de DNA, houve diferença de $p=0,016$ entre as amostras mantidas a temperatura ambiente em relação às refrigeradas, tanto nos dentes íntegros que

ficaram armazenados sem a utilização do produto por 30 dias quanto nas polpas dentais mantidas sem o produto durante 180 dias.

Pelo fato da temperatura influenciar nas quantidades de DNA, o armazenamento em ambiente seco e em baixas temperaturas para a conservação do material biológico é indicado (Höss *et al.*, 1996; Willerslev *et al.*, 1999; Nagy, 2010). No entanto, sabe-se que algumas situações podem dificultar a manutenção das amostras em condições adequadas e em baixas temperaturas, como nos casos em que o acesso ao local com os materiais necessários não é possível (Grotzer *et al.*, 2000).

Nesse contexto, a utilização de produtos que estabilizam as moléculas de DNA seria uma alternativa para a manutenção da qualidade da amostra até que a mesma possa ser transportada para os laboratórios competentes (Grotzer *et al.*, 2000). Nesse sentido, testes envolvendo a eficiência desses produtos devem ser realizados na tentativa de justificar o seu uso.

Na literatura são poucos os estudos que avaliam a eficiência do produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany). Neste estudo foi possível observar que nos dentes íntegros mantidos refrigerados não houve uma melhoria significativa na quantidade de DNA ao se utilizar o produto, assim como no armazenamento da polpa dental, em que o uso ou não do produto não evidenciou diferenças significativas em ambas às condições de temperatura. Esses resultados são similares ao encontrado no estudo de Mee *et al.* (2011), que não observaram diferenças na qualidade do DNA extraído ao comparar a utilização ou não do produto, antes do congelamento em amostra de tecidos mamários.

Em contrapartida, alguns testes observando a estabilização de RNA (Medeiros *et al.*, 2003; Mutter *et al.*, 2004; Nagy, 2010) utilizando o produto RNAlater® (Ambion, Inc., Austin, TX), já foram realizados. Esse produto é considerado similar ao Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) e em estudo preliminar comparativo não foi evidenciada diferença significativa na estabilização de DNA, RNA e proteínas entre ambos (Gelbart *et al.*, 2012).

No estudo de Grotzer *et al.* (2000), não foi observada diferença entre a qualidade do RNA isolado em amostras de células tumorais armazenadas em temperatura ambiente com solução estabilizadora RNAlater® (Ambion, Inc., Austin, TX) durante 7 dias e amostras congeladas a -70°C. Vale destacar que esses autores não utilizaram na comparação um grupo sem produto no armazenamento em

temperatura ambiente. Tal fato poderia evidenciar a indiferença no uso do produto nesse período,

Apesar dos autores terem avaliado o produto similar na estabilidade do RNA (Grotzer *et al.*, 2000), na presente pesquisa no intervalo de tempo de 7 dias a utilização do Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) nas amostras também não evidenciou melhora significativa na estabilização do DNA que justificasse seu uso.

Mutter *et al.* (2004), ao testar a utilização do produto RNAlater® (Ambion, Inc., Austin, TX) também não evidenciou diferença significativa em sua utilização em curto período de tempo ao comparar amostras deixadas no produto durante 24 e 72 horas e amostras sem o produto, congeladas e em temperatura ambiente.

Além disso, neste estudo optou-se por analisar períodos maiores de tempo, uma vez que segundo Nagy (2010), os testes realizados até o momento com esses estabilizadores não incluíam esses dados. Observou-se que, nos dentes íntegros mantidos em temperatura ambiente por 30 e 180 dias, a utilização do produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) mostrou diferença significativa na quantidade de DNA ($p=0,008$), o que indicaria dessa forma seu uso, quando os mesmos precisam ser mantidos nessa condição por períodos prolongados.

No entanto, apesar dessa diferença evidenciada no armazenamento por 30 e 180 dias em temperatura ambiente, em relação a outros métodos de conservação o produto ainda é considerado caro, o que não justificaria o seu uso, pois nesse intervalo de tempo as amostras já poderiam ser enviadas para local adequado e armazenadas seguindo os protocolos padrões de congelamento.

No estudo em que o RNAlater® (Ambion, Inc., Austin, TX) foi utilizado antes do congelamento de amostras, houve maior recuperação de RNA em comparação as amostras apenas congeladas (Medeiros *et al.*, 2003), diferentemente do observado por Mee *et al.* (2011), que não observaram diferenças ao utilizar o Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) antes do congelamento.

No presente estudo não foi considerada a utilização do produto em amostras congeladas, uma vez que, no contexto forense, o armazenamento do tecido nesses conservantes seria interessante até que amostra pudesse ser congelada ou transportada até o laboratório, ao existir a possibilidade de congelamento ou mesmo de refrigeração, visto que nessa pesquisa nas amostras refrigeradas (4 a 8°C) o uso

do produto não foi relevante, não há justificativa para o gasto extra com a utilização do produto.

Nos trabalhos envolvendo amostras biológicas para aplicação de testes genéticos, um cuidado importante é a manutenção da qualidade do material. Ao optar pela extração de DNA de tecidos dentais, subentende-se que outras fontes mais comuns, por exemplo, extração de DNA pelo sangue, esteja inviável e consequentemente existe a chance de exposição prévia a fatores de degradação nesse material (Ludes *et al.*, 1993).

Por esse motivo, toda atenção em relação à preservação dessas amostras devem ser tomadas visando não prejudicar as futuras etapas laboratoriais (Lee e Ladd, 2001; da Silva *et al.*, 2007). Destaca-se dessa forma que mais estudos relacionados a métodos de preservação devem ser realizados, a fim de garantir um método confiável para a preservação das amostras, especificamente em relação aos produtos estabilizadores, que os resultados têm mostrado que a efetividade ainda é limitada e requer mais investigações.

6. Conclusão

Conclui-se que a utilização do produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) mostrou diferença significativa na estabilização do DNA nas amostras de dentes íntegros armazenadas em temperatura ambiente durante 30 e 180 dias, enquanto que nas demais condições testadas, os resultados não evidenciaram justificativas para o uso do produto.

Referências Bibliográficas

Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA-a review. *Forensic Sci Int Genet.* 2010;4(3):148-57.

Alonso A, Martin P, Albarrán C, García P, Primorac D, García O, Fernández de Simón L, García-Hirschfeld J, Sancho M, Fernández-Piqueras J. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. *Croat Med J.* 2003;44(3):273-80.

Applied Biosystems. Quantifiler Kits User's Manual. 2012. Life Technologies Corporation. Disponível em: <http://www.invitrogen.com> [acessado em 8 de fevereiro de 2013].

Bender K, Farfán MJ, Schneider PM. Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Sci Int* 2004;139:135-40.

Benecke M. Forensic DNA Samples: Collection and Handling. *Encyclopedia of Diagnostic and Proteomics*; 2005.

Boyd C, Boyd DC. Theory and the scientific basis for forensic anthropology. *J Forensic Sci.* 2011;56(6):1407-15.

Bray D, Hopkin K, Albert B. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre: Artmed; 2011.

Brkić H, Petrovecki V, Gusić S. Dental identification of the carbonized body: case review. *Acta Stomat Croat.* 2002;36:127-8.

Butler JM. Forensic DNA Typing: biology, technology and genetics of STR markers. San Diego: Academic Press; 2005.

Butler JM. Fundamentals of forensic DNA typing. California: Academic Press; 2009.

Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci.* 2006;51(2):253-65.

Butler JM. Short tandem repeat analysis for human identity testing. *Curr Protoc Hum Genet.* 2004;Chapter 14:Unit 14.8.

Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques.* 2007;43(4):ii-v.

Carey L, Mitnik L. Trends in DNA forensic analysis. *Electrophoresis.* 2002;23(10):1386-97.

Cerri PS, de Faria FP, Villa RG, Katchburian E. Light microscopy and computer three-dimensional reconstruction of the blood capillaries of the enamel organ of rat molar tooth germs. *J Anat.* 2004;204(Pt 3):191-5.

Corach D. Additional approaches to DNA typing skeletal remains: the search for "missing" persons killed during the last dictatorship. *Electrophoresis.* 1997;18(9):1608-12.

Corte-Real A, Anjos MJ, Vieira DM, Gamero JJ. The tooth for molecular analysis and identification: a forensic approach. *J Forensic Odontostomatol.* 2012;30(1):22-8.

Cotton EA, Allsop RF, Guest JL, Frazier RR, Koumi P, Callow IP, Seager A, Sparkes RL. Validation of the AMPFISTR SGM plus system for use in forensic casework. *Forensic Sci Int.* 2000;112(2-3):151-61.

Cury PR, Furuse C, Araújo NS. Técnica e aplicação da reação da polimerase em cadeia na área odontológica. *Revista Odontológica de Araçatuba.* 2005;26(2):34-9.

Daruge Júnior E, Gonçalves RJ, Daruge E, Francesquini MA, Francesquini Junior L. Identificação humana pelos eventos odontológicos e alterações dentárias de um método computadorizado. *Rev. Cons. Reg. Odontol. Pernamb.* 2001;4(2):99-106.

da Silva RHA, Queizi R, Bertolacini CDP, Carvalho SPM, Gasque KCS, de Almeida-e-Silva CT, Bicudo LAR. Human identification analysis using PCR from the root portion of dental elements under different conditions of temperature and exposure time. *RSBO.* 2012;9(1):67-73.

da Silva RHA, Sales-Peres A, de Oliveira RN, de Oliveira FT, Sales-Peres SH. Use of DNA technology in forensic dentistry. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(3):156-61.

Datta P, Datta SS. Role of deoxyribonucleic acid technology in forensic dentistry. *J Forensic Dent Sci.* 2012;4(1):42-6.

De Leo D, Turrina S, Marigo M. Effects of individual dental factors on genomic DNA analysis. *Am J Forensic Med Pathol.* 2000;21(4):411-5.

Dias FD. A importância do DNA como método de identificação forense na odontologia legal. [Monografia]. Manaus: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas; 2009.

Dolinsky L, Pereira L. DNA forense: artigo de revisão. *Revista Saúde & Ambiente.* 2007;2(2):11-22.

Gaytmenn R, Sweet D. Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *J Forensic Sci.* 2003;48(3):622-5.

Gelbart NG., Mondala TS, Kurian SM, Olthoff KM, Abecassis M, Salomon DR. Comparison of RNA, DNA, small RNA (including miRNA) and protein yields from liver biopsy samples using two commercially available tissue preservation reagents: RNeasy and Allprotect. Disponível em: <http://transplant-genomics.genetics.ucla.edu/files/RNeasyvsAllProtectComparison.pdf>

Girish KL, Rahman FS, Tippu SR. Dental DNA fingerprinting in identification of human remains. *J Forensic Dent Sci.* 2010;2(2):63–8.

Grotzer MA, Patti R, Geoerger B, Eggert A, Chou TT, Phillips PC. Biological stability of RNA isolated from RNeasy-treated brain tumor and neuroblastoma xenografts. *Med Pediatr Oncol.* 2000;34(6):438-42.

Hanaoka Y, Inoue M, Tsai TH, Minaguchi K. Fundamental and practical study for DNA analysis using tooth as a source of DNA. *Nihon Hoigaku Zasshi.* 1995;49(1):1-10.

Hinchliffe J. Forensic odontology, Part 1. Dental identification. *Br Dent J.* 2011;210(5):219-24.

Holland MM. Molecular analysis of the human mitochondrial DNA control region for forensic identity testing. *Curr Protoc Hum Genet.* 2012;Chapter 14:Unit14.7.

Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(7):1304-7.

International Criminal Police Organization (INTERPOL). Interpol handbook on DNA data exchange and practice: recommendations from the Interpol DNA monitoring expert group. Lyon: OIPC - Interpol; 2009.

Jobim LF, Costa LR, Silva M. Identificação Humana. 1ª ed. Campinas: Millenium; 2006.

Jobim LF, Jobim MR, Brenner C. Identificação Humana pelo DNA. Ed. Impa; 1999.

Jobim LF. DNA & crime. In: Figini ARL, Silva JRL, Jobim LF, Silva M. Identificação humana. 2ª ed. Campinas: Millennium; 2003:280-4.

Johnson ABH, Walter LRR. Fundamentos da biologia molecular. Porto Alegre: Artmed; 2011.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2008.

Kahana T, Grande A, Tancredi DM, Penalver J, Hiss J. Fingerprinting the deceased: traditional and new techniques. *J Forensic Sci.* 2001;46(4):908-12.

Koch A, Andrade FM. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. *RBAC.* 2008;40(1):17-23.

Lee HC, Ladd C. Preservation and collection of biological evidence. *Croat Med J.* 2001;42(3):225-8.

Lessig R, Edelmann J. Individualisation of dental tissue-an aid for odontological identification? *J Forensic Odontostomatol.* 1995;13(1):1-3.

Ludes B, Pfitzinger H, Mangin P. DNA fingerprinting from tissues after variable postmortem periods. *J Forensic Sci.* 1993;38(3):686-90.

Malaver PC, Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croat Med J.* 2003;44(3):306-9.

Manjunath BC, Chandrashekar BR, Mahesh M, Vatchala Rani RM. DNA profiling and forensic dentistry-a review of the recent concepts and trends. *J Forensic Leg Med.* 2011;18(5):191-7.

Medeiros M, Sharma VK, Ding R, Yamaji K, Li B, Muthukumar T, Valderde-Rosas S, Hernandez AM, Muñoz R, Suthanthiran M. Optimization of RNA yield, purity and mRNA copy number by treatment of urine cell pellets with RNAlater. *J Immunol Methods.* 2003;279(1-2):135-42.

Mee BC, Carroll P, Donatello S, Connolly E, Griffin M, Dunne B, Burke L, Flavin R, Rizkalla H, Ryan C, Hayes B, D'Adhemar C, Banville N, Faheem N, Muldoon C, Gaffney EF. Maintaining Breast Cancer Specimen Integrity and Individual or Simultaneous Extraction of Quality DNA, RNA, and Proteins from Allprotect-Stabilized and Nonstabilized Tissue Samples. *Biopreserv Biobank.* 2011;9(4):389-98.

Melani RFH. Identificação humana em vítimas de carbonização: análise odonto-legal através da microscopia eletrônica [Tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da Universidade de Campinas; 1999.

Miyajima F, Daruge E, Daruge Júnior E. A importância da odontologia na identificação humana: relato de um caso pericial. *Arq Odontol.* 2001;37(2):133-42.

Morling N. PCR in forensic genetics. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 2):438-40.

Muruganandhan J, Sivakumar G. Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry. *J Forensic Dent Sci*. 2011;3(1):38-45.

Musse JO. A influência do meio aquático nos processos de identificação humana: estudo epidemiológico e laboratorial (recuperação do DNA) [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2007.

Mutter GL, Zahrieh D, Liu C, Neuberg D, Finkelstein D, Baker HE, Warrington JA. Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics*. 2004;5:88.

Nagy ZT. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Org Divers Evol*. 2010;10(1):91-105.

Nakanishi A, Moriya F, Hashimoto Y. Effects of environmental conditions to which nails are exposed on DNA analysis of them. *Leg Med (Tokyo)*. 2003;5 Suppl 1:S194-7.

Novais CM, Pires-Alves M, Silva FF. PCR em tempo real-Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 2004;33:10-3.

Oliveira ARR. Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real [Dissertação]. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2009.

Pakendorf B, Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:165-83.

Pardini VC, Ferreira ACS, Gomes KB, Rodríguez SLB. Uso do DNA proveniente de polpa dentária para identificação humana: relato de caso e técnica. *Rev Cons Reg Odontol Minas Gerais*. 2001;7(1):33-5.

Pfeiffer H, Hühne J, Seitz B, Brinkmann B. Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int J legal Med*. 1999;112(2):142-4.

Pötsch L, Meyer U, Rothschild S, Schneider PM, Rittner C. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *Int J Legal Med*. 1992;105:139-43.

Primorac D, Schanfield MS. Application of forensic DNA testing in the legal system. *Croat Med J*. 2000;41(1):32-46.

Qiagen Sample & Assay Technologies. Allprotect Tissue Reagent® Handbook. 2011. Disponível em: [http://www.qiagen.com/Search.aspx?q="Allprotect%20Tissue%20Reagent%20Handbook%20-%20\(EN\)"&Category=KnowledgeSupport#&&p=0](http://www.qiagen.com/Search.aspx?q=) [acessado em 2 de fevereiro de 2013].

Qiagen Sample & Assay Technologies. Qiaamp® DNA Micro Handbook. 2010. Disponível em: <http://www.qiagen.com/Search.aspx?q=qiaamp%25C2%25AE%2520dna%2520micro%2520handbook&c=%7BF74CDA83-B2E2-47CD-B9DA-E186DC170BFF%7D#&&p=0> [acessado em 2 de fevereiro de 2013].

Qiagen Sample & Assay Technologies. RNAlater® Handbook. 2006. Disponível em: [http://www.qiagen.com/Search.aspx?q="RNAlater%20Handbook%20-%20\(EM\)"&Category=KnowledgeSupport#&&p=0](http://www.qiagen.com/Search.aspx?q=) [acessado em 2 de fevereiro de 2013].

Qiagen Sample & Assay Technologies. Stabilization of biomolecules in various sample materials. 2008. Disponível em: [http://www.qiagen.com/Search.aspx?q="Stabilization%20of%20biomolecules%20in%20various%20sample%20materials%20-%20\(EN\)"&Category=KnowledgeSupport#&&p=0](http://www.qiagen.com/Search.aspx?q=) [acessado em 2 de fevereiro de 2013].

Schwartz TR, Schwartz EA, Mieszerski L, McNally L, Kobilinsky L. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci.* 1991;36(4):979-90.

Silva RFD, Pereira SDDR, Mendes SDSC, Marinho DEA, Daruge Júnior E. Radiografias odontológicas: fonte de informação para a identificação humana. *Odontol. clín.-cient.* 2006;5(3):239-42.

Silva SCP. A contribuição da perícia odontológica na identificação de cadáveres [Dissertação]. Cidade do Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2007.

Smith BC, Holland MM, Sweet DL, Dizinno JA. DNA and the forensic odontologist. In: Bowers CM, Bell GL. *Manual of Forensic Odontology*. 3ª ed. Ontario: Manticore Publisher; 1997.

Stigler SM. Galton and identification by fingerprints. *Genetics.* 1995;140(3):857-60.

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature.* 1999;402(6760):371-2.

Sweet DJ, Sweet CH. DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene. *J Forensic Sci.* 1995;40(2):310-4.

Vanrell JP. *Odontologia Legal e Antropologia Forense*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Weedn VW. Postmortem identifications of remains. *Clin Lab Med.* 1998;18(1):115-37.

Willerslev E, Hansen AJ, Christensen B, Steffensen JP, Arctander P. Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(14):8017-21.

Glossário

Ácido desoxirribonucleico (DNA) - Composto orgânico cujas moléculas contêm as instruções genéticas que coordenam o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos e alguns vírus. O seu principal papel é armazenar as informações necessárias para a construção das proteínas e RNAs.

Ácido ribonucleico (RNA) – Molécula responsável pela síntese de proteínas da célula.

Água Milli-Q - Água deionizada que foi purificada em um sistema Milli-Q fornecido pela Millipore Corporation.

Alelo - Formas alternativas do mesmo gene.

Amplificação – Método de criação de múltiplas cópias.

Base nitrogenada - Composto cíclico contendo nitrogênio, parte constituinte do nucleotídeo. No DNA podem ser de quatro tipos: Adenina, Timina, Citosina e Guanina.

Cromossomo - Longa sequência de DNA, que contém vários genes, e outras sequências de nucleótidos (nucleotídeos) com funções específicas nas células dos seres vivos.

Datilosopia - Processo de identificação humana por meio das impressões digitais.

Degradação – Quebra ou fragmentação de moléculas de DNA por meios físicos ou químicos.

Eletroforese em gel - Técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial.

Gene - Unidade fundamental da hereditariedade, formado por uma sequência específica de ácidos nucleicos, que são as biomoléculas mais importantes do controle celular, pois contêm a informação genética.

Genoma – Conjunto de toda informação hereditária de um organismo que está codificada em seu DNA.

Locus - Local fixo no cromossomo onde está localizado determinado gene ou marcador genético.

Nucleotídeo - Monômeros do DNA ou RNA constituídos por uma base nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato.

PCR Tempo Real – Técnica laboratorial baseada no princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para multiplicar ácidos nucleicos associada a uma técnica para detecção e quantificação por fluorescência do DNA obtido.

Polimorfismos – Variações que servem de base para a diferenciação entre os indivíduos.

Primer – iniciadores para o processo de replicação do DNA são segmentos de ácidos nucleicos, com 1 a 60 nucleotídeos.

Quantificação – Verificação da quantidade de DNA obtido após processos de extração.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) - Método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA, permite por meio de etapas de variação de temperatura, a duplicação de cadeias de DNA *in vitro*.

Taq DNA polimerase - Enzima termoestável, utilizada na amplificação de fragmentos de DNA através da técnica de PCR.

Apêndice

Apêndice A – Termo de Doação dos Dentes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES

Eu, _____

_____, portador(a) do RG _____, paciente da clínica de cirurgia da FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – SP, dão o(s) meu(s) dentes(s) terceiros molares para a pesquisadora Andrea Sayuri Silveira Dias Terada, aluna da pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, declarando que este(s) dente(s) foi (foram) extraídos por indicação terapêutica.

Estou ciente de que estes dentes serão utilizados para a realização da pesquisa intitulada “**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE TECIDOS DENTÁRIOS HUMANOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO UTILIZANDO O PRODUTO ALLPROTECT TISSUE REAGENT®**”, que tem como finalidade avaliar a qualidade do produto Allprotect Tissue Reagent® em conservar dentes, os dentes ficarão armazenados nesse produto em diferentes temperaturas e período de tempo e depois será analisado se o DNA foi mantido estável no dente.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura

AVENIDA DO CAFÉ S/Nº

14040-904 – RIBEIRÃO PRETO – S P – BRASIL

Anexo

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of.ATAc.CEP/16011/FORP-USP/26.04.2011

CHLS/fdc

Ref. processo n.º 2011.1.364.58.7

CAAE n.º 0020.0.138.000-11

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 119.ª Sessão, realizada em 14 de abril de 2011, aprovou o desenvolvimento do projeto de pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado *"Avaliação da capacidade de extração de DNA a partir de tecidos dentários humanos em diferentes condições de armazenamento utilizando o produto Allprotect Tissue Reagent®"*.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de serem entregues, na secretaria do CEP, o **Relatório Parcial** em **14/01/2012** e o **Relatório Final** em **14/10/2012**, com os respectivos formulários preenchidos pelo pesquisador responsável.

Lembramos ainda que, quando da submissão do relatório a este Comitê, quaisquer inclusões ou modificações no projeto original deverão ser comunicadas e justificadas ao CEP, através do formulário supracitado.

FABRÍCIO DIAS DE CARVALHO

Secretário "ad hoc" do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilm.ª Sr.ª

PG. ANDREA SAYURI SILVEIRA DIAS TERADA (Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva)

Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social

desta Faculdade

AVENIDA DO CAPÉ, S/N.º - TEL. (16) 3602-4123 / 3963 - FAX (16) 3602-4102
14040-904 - RIBEIRÃO PRETO - SP - BRASIL