



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Patologia e Medicina Legal
Programa de Pós-Graduação em Patologia



CINDY MAKI SATO

**Estimativa do intervalo *post mortem* mínimo em situações
forenses por meio da análise histológica dos dentes**

Ribeirão Preto
2023

CINDY MAKI SATO

**Estimativa do intervalo *post mortem* mínimo em situações forenses
por meio da análise histológica dos dentes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de “Mestre em Ciências”, área de concentração em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Mardegan
Issa

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves
da Silva

Ribeirão Preto

2023

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

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a) Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Sato, Cindy Maki

Estimativa do intervalo post mortem mínimo em situações forenses por meio da análise histológica dos dentes / Cindy Maki Sato; orientador João Paulo Mardegan Issa; coorientador Ricardo Henrique Alves da Silva. -- São Paulo, 2023.

84 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Ciências Forenses. 2. Odontologia Legal. 3. Biologia Molecular. 4. Histologia. 5. Odontoblastos. I. Issa, João Paulo Mardegan, orient. II. da Silva, Ricardo Henrique Alves, coorient. III. Título.

Folha de Aprovação

Cindy Maki Sato

Estimativa do intervalo *post mortem* mínimo em situações forenses por meio da análise histológica dos dentes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de “Mestre em Ciências”, área de concentração em Patologia Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora

- 1) Prof.(a) Dr.(a).: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____
- 2) Prof.(a) Dr.(a).: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____
- 3) Prof.(a) Dr.(a).: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatoria

Dedico este trabalho aos meus maiores exemplos de dedicação, àqueles que sonharam este momento junto comigo e que se esforçam incansavelmente pelos nossos sonhos: **meus pais**.

Agradecimentos

A **Deus** por abençoar a minha vida com saúde.

À **minha família**, o meu bem maior. Meus maiores exemplos de amor, respeito e valores. É sempre por vocês.

Ao **Victor Jacometti** por me ensinar nas mais diversas áreas da vida. Em meu amigo de departamento, encontrei o meu amor. Que em todos os grandes momentos eu possa compartilhá-los com você, Bê, sempre.

Aos amigos de departamento: **Antônio, Fayla, Giullia, Júlia, Juliane, Isabela, Letícia, Leonardo, Mirela, Paulo, Pedro e Renata**, pela amizade única construída durante esses anos juntos.

Ao Prof. Dr. **João Paulo Mardegan Issa** pela orientação de meu mestrado e pela doação de materiais que viabilizaram a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Ricardo Henrique Alves da Silva**, coorientador desta pesquisa, que difundiu a Odontologia Legal e abriu portas para que eu pudesse adentrar nesta área tão grandiosa. Obrigada, Prof. Ricardo, por ser apaixonado nessa área e influenciar pessoas. Obrigada por me acolher na família #odontolegalforpusp 🦴, certamente foram anos de muito conhecimento.

Ao Dr. **Dimitrius Leonardo Pitol** pela amizade construída, coorientação e companhia em longas etapas laboratoriais.

À Prof^a. Dr^a. **Karina Fittipaldi Bombonato Prado**, pela colaboração e pelos valiosos ensinamentos que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Universidade de São Paulo (USP)** pela estrutura, pelo incentivo à pesquisa e por permitir estar entre profissionais renomados e capacitados.

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)** e ao **Departamento de Patologia e Medicina Legal**, pela oportunidade de ingressar no programa de pós-graduação.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP)**, ao **Departamento de Biologia Básica e Oral (DBBO)**, ao **Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal (DESCOL)**, ao **Laboratório de Pesquisas Morfológicas e Laboratório de Histotecnologia** – ambos coordenados pelo Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa (auxílio FAPESP n. 2011/01512-0, N. 2011/10336-0 e N. 2012/02206-2), por disponibilizarem meios, locais de trabalho e materiais essenciais para execução desta pesquisa.

Ao **Comitê de Integridade Científica (CIP)** e Boas Práticas em Pesquisa da FMRP-USP, pela aprovação do trabalho que foi desenvolvido sob preceitos éticos e legais.

Ao **Biobanco de Dentes Humanos da FORP-USP**, especialmente a Prof^a. Dr^a. Silmara Aparecida Milori Corona e Sr^a. Renata Fernandes, por viabilizarem a coleta das amostras desta pesquisa.

Às instituições que permitiram a coleta de amostras e aos respectivos responsáveis: **Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD** (Prof. Dr. **Jorge Liporaci**), **Associação Odontológica de Ribeirão Preto – AORP** (Prof. Dr. **Paulo Faria**) e **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP-USP** (Sr^a. Rosangela Aparecida Frenezin).

Aos colegas e amigos que conheci durante a coleta de amostras e que se dispuseram a ajudar: **André Fressatti, Camila Martinatti, Luana Carolline, Tarcísio Quaranta, Vitória Borges e Raquel Cassiani.**

À **Prefeitura** do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e aos **funcionários do Viveiro de Mudanças**, sob responsabilidade do Sr. Antônio Justino, que permitiram a execução da pesquisa em simulações forenses.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), ao Laboratório de Química Analítica Instrumental e Aplicada, em especial a Prof^a. Dr^a. **Márcia Veiga, Letícia Miranda Rodrigues e Caio Pinke** pela gentil contribuição nesta pesquisa.

À **CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

(Carl Sagan)

RESUMO

SATO, C. M. **Estimativa do intervalo *post mortem* mínimo em situações forenses por meio da análise histológica dos dentes.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

O intervalo *post mortem* (IPM) é a estimativa do tempo decorrido entre o óbito e o encontro do corpo. Os dentes são elementos com características de perenidade, e são capazes de se manterem íntegros em variadas situações adversas. Sendo assim, a presente pesquisa objetivou verificar a possibilidade de estimar o IPM mínimo (IPM_{mín}) por meio de análises histológicas de tecidos dentais em situações de inumação e submersão, para simular situações habituais da prática forense. Foram obtidos 110 dentes, os quais foram divididos em quatro grupos: controle (T0), um mês (T1), três meses (T2) e seis meses (T3). A amostra-controle foi composta por 10 dentes. Para os demais grupos (T1, T2 e T3), foram divididos em outros três subgrupos: controle, inumados e submersos. Para cada subgrupo, 10 amostras foram utilizadas. Após decorrido o tempo em cada situação adversa, os elementos foram processados e obtidas lâminas histológicas. O Teste ANOVA de um fator e o Teste de Tukey foram realizados na análise quantitativa de fibras colágenas da dentina e diferenças estatisticamente significantes foram observadas ($\alpha=5\%$), sendo possível a estimativa do IPM_{mín} em três meses pela contagem superior a 1300000 pixels em dentes submersos, e em inumados, superior a 800000 pixels. Pela análise qualitativa, estimou-se o IPM_{mín} de dentes submersos em seis meses pela ausência de pré-dentina, ligamento periodontal e reabsorção parcial do cimento. Em dentes inumados, o IPM_{mín} de três meses indicou a ausência de ligamento periodontal e reabsorção parcial do cimento, e o IPM_{mín} de seis meses foi marcado pela ausência de remanescente pulpar e pré-dentina.

Palavras-chave: Ciências Forenses. Odontologia Legal. Odontoblastos. Afogamento. Biologia Molecular. Histologia.

ABSTRACT

SATO, C. M. **Estimation of the minimum post-mortem interval in forensic situations through histological analysis of the teeth.** Master's thesis, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 2023.

Post-mortem interval (PMI) estimates the time between death and finding the body. Teeth are elements with perennial characteristics and can remain intact in various adverse conditions. Therefore, the present research aimed to verify the possibility of estimating the minimum PMI (PMI_{min}) through histological analyses of dental tissues in burial and submersion conditions to simulate conditions common in forensic practice. One hundred ten teeth were obtained, which were divided into four groups: control (T0), one month (T1), three months (T2), and six months (T3). The control sample consisted of 10 teeth. The other groups (T1, T2, and T3) were divided into three different subgroups: control, buried, and submerged. For each subgroup, ten samples were used. After the time spent in each adverse condition, the elements were processed, and histological blades were obtained. The one-way ANOVA test and the Tukey test were performed in the quantitative analysis of dentin collagen fibers, and statistically significant differences were observed ($\alpha=5\%$), making it possible to estimate the PMI_{min} in three months by counting more than 1300000 pixels in submerged teeth, and in buried ones, greater than 800000 pixels. Through the qualitative analysis, the PMI_{min} of submerged teeth was estimated in six months due to the absence of pre-dentin, periodontal ligament, and partial cementum resorption. In buried teeth, the three-month PMI_{min} indicated the absence of periodontal ligament and partial cementum resorption. The absence of pulp remnants and pre-dentin featured the six-month PMI_{min} .

Keywords: Forensic Sciences. Forensic Dentistry. Odontoblasts. Drowning. Molecular Biology. Histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Isopor com gelo seco, com amostras no interior do tubo plástico

Figura 2 – Diagrama de divisão dos grupos amostrais, de acordo com o tempo/grupo (T0, T1, T2 e T3) e situação/subgrupo (controle, inumados e submersos)

Figura 3 – Tecido de poliéster com tramas hexagonais e velcro. Etiqueta de identificação quanto ao sexo do doador (M – masculino) e idade (22 – vinte e dois), data da coleta após a exodontia (14/08/21), e data em grifo amarelo, referente à inserção em situação adversa (04/11/21)

Figura 4 – Viveiro de peixe de aço inoxidável, corrente de ferro e cadeado

Figura 5 – Inserção de amostras na situação de afogamento

Figura 6 – Dente com corte no sentido coronal inserido no cassete histológico

Figura 7 – Corte do bloco de parafina no micrótomo

Figura 8 – Dentina, pré-dentina e câmara pulpar vistas a partir de imagem com microscopia polarizada utilizando a coloração PSR. 40x – Escala 100µm. Características da amostra – grupo: T2, subgrupo: enterrados, sexo feminino, 23 anos

Figura 9 – Exclusão de áreas demarcadas pelo *software* (setas) e excluídas para contagem em pixels. 40x – Escala 100µm. A: setas indicam as áreas a serem excluídas. B: imagem A após a exclusão. C: setas indicam áreas de tecido sugestivo de remanescente pulpar a serem excluídas. D: imagem C após a exclusão

Figura 10 – pHmetro utilizado na análise de água e solo

Figura 11 – Boxplot contagem de fibras colágenas (em pixels) em dentina do subgrupo “controle”, de acordo com o tempo estudado (T0, T1, T2 e T3)

Figura 12 – Boxplot contagem de fibras colágenas (em pixels) em dentina dos subgrupos em T1, T2 e T3

Figura 13 – Região do complexo dentino-pulpar do subgrupo “controle” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C, D, E e F: T1; G e H: T2; I e J: T3

Figura 14 – Região do terço apical do subgrupo “controle” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C e D: T1; E e F: T2; G e H: T3

Figura 15 – Região do complexo dentino-pulpar do subgrupo “submersos” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C e D: T1; E, F, G e H: T2; I e J: T3

Figura 16 – Região do terço apical do subgrupo “submersos” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C e D: T1; E e F: T2; G e H: T3

Figura 17 – Região do complexo dentino-pulpar do subgrupo “inunados” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C e D: T1; E e F: T2; G e H: T3

Figura 18 – Região do terço apical do subgrupo “inunados” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C e D: T1; E e F: T2; G e H: T3

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características da amostra quanto ao sexo e idade, divididos por grupos e subgrupos

Tabela 2 – Contagem de colágeno e desvio padrão (em pixels) dos subgrupos por tempo

Tabela 3 – Análise qualitativa por subgrupos (controle, submersos e inumados) e grupos (T0, T1, T2 e T3)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------|---|
| ANOVA | Análise de Variância |
| C | <i>Celsius</i> |
| C | Cimento |
| CAAE | Certificado de Apresentação para Apreciação Ética |
| CaCl₂ | Cloreto de cálcio |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| D | Dentina |
| DNA | <i>Deoxyribomucleic acid</i> |
| DP | Desvio padrão |
| EDTA | Etilenodiamino tetra-acético |
| FORP | Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto |
| HE | Hematoxilina-eosina |
| INTERPOL | <i>International Criminal Police Organization</i> |
| IPM | <i>Intervalo post mortem</i> |
| IPM_{mín} | <i>Intervalo post mortem mínimo</i> |
| LP | Ligamento periodontal |
| MEC | Matriz extracelular |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| P | Polpa |
| PD | Pré-dentina |
| PSR | Picro Sirius Red |

| | |
|-------------|--|
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| Od | Odontoblastos |
| T | Tempo |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| USP | Universidade de São Paulo |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|--------------------------------------|
| ° | Graus |
| - | Menos |
| % | Porcentagem |
| ™ | <i>Trade Mark</i> (Marca registrada) |
| μ | Micrômetro |
| ® | Registrado |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 | A Odontologia no âmbito forense..... | 19 |
| 1.2 | Estrutura dental e aspectos histológicos..... | 20 |
| 1.3 | Intervalo <i>post mortem</i> | 22 |
| 2 | OBJETIVO | 25 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| 3.1 | Aspectos éticos..... | 26 |
| 3.2 | Amostragem..... | 26 |
| 3.2.1 | CrITÉRIOS de inclusÃO..... | 26 |
| 3.2.2 | CrITÉRIOS de exclusÃO..... | 26 |
| 3.2.3 | Coleta e armazenamento..... | 27 |
| 3.3 | Situações: controle e situações adversas..... | 28 |
| 3.4 | Preparo histológico..... | 31 |
| 3.5 | Análise microscópica..... | 33 |
| 3.5.1 | Análise quantitativa..... | 33 |
| 3.5.2 | Análise qualitativa e estimativa do IPM _{mín} | 36 |
| 3.6 | Análise de pH de água e solo..... | 36 |
| 4 | RESULTADOS | 38 |
| 4.1 | Caracterização da amostra e das situações forenses..... | 38 |
| 4.2 | Quantificação de fibras colágenas..... | 39 |
| 4.3 | Parâmetros histológicos qualitativos..... | 42 |
| 4.4 | Análise estatística..... | 51 |
| 5 | DISCUSSÃO | 52 |
| 6 | CONCLUSÃO | 62 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 63 |
| 8 | APÊNDICES | 71 |

| | |
|--|----|
| Apêndice A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto..... | 71 |
| Apêndice B – Emenda do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa..... | 74 |
| Apêndice C – Termo de consentimento livre e esclarecido..... | 80 |
| Apêndice D – Solicitação de acesso às dependências do Viveiro de Mudanças e execução da pesquisa..... | 82 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Odontologia no âmbito forense

De acordo com as diretrizes preconizadas pela Organização Internacional de Polícia Criminal (INTERPOL), a Papiloscopia, Odontologia Legal e Análise Genética compreendem métodos primários de identificação humana (INTERPOL, 2018; FORREST, 2019). Tais métodos recebem essa designação por possuírem caráter autossuficiente em um processo de identificação. Uma vez confirmada a identidade de um suspeito por um dos métodos citados, não há necessidade de validação do resultado por outro método (FORREST, 2019; GREENE; ALYS, 2017).

A Odontologia Legal participa tanto como método primário de identificação, como também na formação do perfil biológico, com o objetivo de reduzir o universo de suspeitos de determinada vítima (TINOCO, 2019; AVON, 2004).

Em casos em que há tentativa de ocultação de cadáver, como em casos de inumação e submersão de corpos, os quais se encontram fragmentados ou em decomposição, os remanescentes podem perder sua integridade e, conseqüentemente, comprometer a identificação pelas impressões digitais (MONTELIUS; LINDBLÖM, 2012).

Além disso, a delonga na localização de corpos influencia diretamente na intervenção ambiental e decomposição dos tecidos moles. Portanto, a estimativa do IPM pela cronotanatognose, que envolve a análise de fenômenos e sinais cadavéricos gerais, pode ser limitada em alguns casos. Outrossim, locais diversos promovem estágios de decomposição incertos (DARUGE; DARUGE-JÚNIOR; FRANCESQUINI-JÚNIOR, 2019).

Os elementos dentais são capazes de suportar as mais variadas situações, como altas temperaturas, ambientes úmidos e ação de fungos e bactérias (MONTELIUS; LINDBLÖM, 2012; MALAVER; YUNIS, 2003; WURMB-SCHWARK *et al.*, 2003; MENON; PRADO; SILVA, 2011; DRANCOURT *et al.*, 2017). Assim, torna-se vantajosa a aplicação da Odontologia para comparação

de registros *ante mortem* e *post mortem*, ou para o estudo da biologia molecular, pela análise genética a partir do tecido pulpar e degradação celular dos tecidos, dado que os elementos dentais sofrerão baixa influência ambiental.

1.2 Estrutura dental e aspectos histológicos

Uma das maiores virtudes do método de identificação pela Odontologia é a sua aplicabilidade em diversas situações adversas, tais como incineração, imersão, traumas, mutilações e decomposição (REESU; AUGUSTINE; URS, 2015). Os dentes são estruturas altamente mineralizadas e as mais resistentes do corpo humano, que suportam a ação do tempo, possuem durabilidade, longevidade e alta resistência às situações extremas de degradação (GIL-BONA; BIDLACK, 2017; HINCHLIFFE, 2011; VAVPOTIČ *et al.*, 2009).

A propriedade de resistência conferida ao elemento dental é devido a sua composição (CARRASCO *et al.*, 2017). Em adultos saudáveis, a composição do esmalte se divide em: 96% de fosfato de cálcio (matéria inorgânica), 3% de água e 1% corresponde à matriz orgânica (GIL-BONA; BIDLACK, 2017). Já a dentina é composta por: 70% matéria inorgânica, 20% matéria orgânica e 10% de água (NANCI, 2018).

A rica composição de matriz inorgânica confere ao esmalte a característica de insolubilidade em diversas situações ambientais. Suas proteínas se mantêm preservadas entre o tecido densamente mineralizado, sendo comparativamente superior ao tecido ósseo nesse quesito, no qual apenas 45% são compostos por matéria inorgânica (GIL-BONA; BIDLACK, 2017; DEMARCHI *et al.*, 2016).

A dentina é um tecido mineralizado a base de colágeno e apresenta uma matriz extracelular composta por 90% de colágeno tipo I (LINDE, 2018; MAZZONI *et al.*, 2015). Ainda que possua uma porcentagem maior de matéria orgânica quando compara ao esmalte, Menon *et al.* (2018) observou a região do complexo dentino-pulpar (dentina, pré-dentina, câmara pulpar e tecido pulpar remanescente) em dentes inumados em até 3 meses, e concluíram que a região também resiste às situações adversas (MENON; PRADO; SILVA, 2011).

O cimento é uma estrutura que recobre a região radicular do dente, e possui estrutura similar à composição do osso: compreende de 45-50% matéria inorgânica, 50-55% matéria orgânica e água (RISTOVA; JOSHEVA; BROZEK-MUCHA, 2022). Por conseguinte, o conjunto das estruturas e as características que as constituem, conferem alta resistência ao dente e se tornam objetos de estudos na área das Ciências Forenses.

Sendo assim, Malaver & Yunis (2003) verificaram a possibilidade da polpa, dentina e cimento de corpos em processo de putrefação servirem como fonte de material genético para identificação humana. Os autores analisaram a presença de DNA mitocondrial na dentina, em razão dos processos odontoblásticos ricos em mitocôndrias e no cimento, devido a presença de células do ligamento periodontal ancoradas à estrutura (MALAVER & YUNIS, 2017).

Os autores acima concluíram que as estruturas dentais conferem uma maior resistência, manutenção e acesso ao material genético, mesmo em situações ambientais adversas, ainda que sob mecanismos tafonômicos destrutivos (fenômenos cadavéricos) (MALAVER & YUNIS, 2017).

No âmbito das análises histológicas, Vavpotič *et al.* (2009) realizaram análise em nível molecular para quantificação de odontoblastos de amostras submetidas a duas diferentes temperaturas: ambiente e refrigerada (4 graus *Celsius*). Os autores desenvolveram um modelo de regressão linear relativo aos valores de densidade de odontoblastos e concluíram que a queda no número de células é diretamente proporcional ao tempo decorrido (VAVPOTIČ *et al.*, 2009).

Carrasco *et al.* (2017) investigaram alterações quantitativas e qualitativas da polpa. Por meio da coloração Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômio de Masson, respectivamente, observaram o número de odontoblastos e densidade do tecido conjuntivo pulpar. Os autores relataram, de forma inédita, o IPM através dos dentes pelo período de 6 meses em ambiente controlado. Os resultados obtidos consistiram em queda gradual do número de odontoblastos e, em contrapartida, o aumento da quantidade de colágeno com o transcorrer do tempo (CARRASCO *et al.*, 2017).

Atualmente, 28 tipos de colágenos foram identificados e o colágeno tipo I é o mais abundante no corpo humano (NANCI, 2018). O colágeno é sintetizado por diversas células mesenquimais (fibroblastos, cementoblastos, odontoblastos e outros) ou por mediadores inflamatórios (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; NANCI, 2018). Nakamura *et al.* (2021) concluíram que a autólise é um processo regulatório crucial no mecanismo do colágeno tipo I em células do ligamento periodontal (NAKAMURA *et al.*, 2021).

Sendo assim, considerando a possibilidade de estimativa do IPM por meio de análise histológica dos tecidos dentais, bem como, a capacidade estrutural dos dentes de resistirem às situações ambientais adversas, novos estudos em nível celular de análise são fundamentais para que a Odontologia possa auxiliar no direcionamento e conhecimento dos fatos após a morte.

1.3 Intervalo *post mortem*

Quando restos humanos são encontrados, peritos ou especialistas são requisitados para determinar a identidade do indivíduo e investigar as circunstâncias do óbito. Além disso, os peritos estudam a Tanatologia e os fenômenos cadavéricos (cronotanatognose) para estimar o tempo decorrido desde a morte do indivíduo (KULSHRESTHA; CHANDRA, 1987; SZELECZ *et al.*, 2018).

O período entre o óbito e o encontro do corpo é denominado “intervalo *post mortem* (IPM)” (KULSHRESTHA; CHANDRA, 1987). A estimativa do IPM é relevante no âmbito forense por contribuir na reconstituição das circunstâncias em casos de mortes violentas ou suspeitas, com objetivo de excluir ou limitar o universo de suspeitos, além de auxiliar no estabelecimento da veracidade de informações fornecidas por testemunhas (YOUNG *et al.*, 2013; GARRIDO; NAIA, 2014).

Em 1894, o pioneiro dos estudos de estágios de decomposição do corpo, o entomologista forense Jean Pierre Mégnin, estimou o IPM de uma criança recém-nascida encontrada em Paris. Reuniu informações decorrentes da quantidade de insetos e ácaros que recobriam o corpo da vítima, e comparou

com o laudo de necropsia emitido por um patologista (MÉGNIN, 1894; SZELECZ *et al.*, 2018; PEROTTI, 2009).

Alguns pesquisadores utilizam o termo “IPM mínimo” (IPM_{min}) para pesquisas que envolvem a área da Entomologia Forense (MOORE; ADAM; DRIJFHOUT, 2004; AMENDT *et al.*, 2006; SZELECZ *et al.*, 2017). De acordo com Amendt *et al.* (2006), o IPM_{min} é baseado na estimativa dos estágios de maturação de moscas necrófagas, ou seja, o cálculo indica a colonização pelos primeiros insetos no cadáver até o exame perinecroscópico. Dessa forma, o período mínimo entre o óbito e o encontro do corpo é calculado (AMENDT *et al.*, 2006).

A estimativa de IPM pode ser realizada pelas técnicas cronotanatógnicas (FRANÇA, 2004). De acordo com França (2004), a estimativa do momento da morte é dividida entre recente (estudo dos fenômenos abióticos imediatos e consecutivos) e não-recente (estudo das fases da putrefação e dos estágios de metamorfose da fauna entomológica).

Com efeito, a acurácia da estimativa do IPM diminui com o tempo transcorrido entre o óbito e o encontro do cadáver. O estudo da cronotanatógnose depende da preservação morfológica do cadáver, que por sua vez, depende de fatores internos e externos (SZELECZ *et al.*, 2018).

Em situações que os corpos perderam a morfologia devido à carbonização ou estado avançado de putrefação, a estimativa do IPM pelas técnicas de cronotanatógnose ficam comprometidas (SZELECZ *et al.*, 2018; GARRIDO; NAIA, 2014). Então, técnicas que possuem os remanescentes ósseos como pilares dessa investigação são relatadas na literatura científica, tais como métodos bioquímicos, radioquímicos e histológicos (CAPPELA *et al.*, 2015).

Métodos bioquímicos consistem, principalmente, na quantificação de material genético (BORGES, *et al.*, 2021; BIANCHI *et al.*, 2022), análise proteômica (PROCOPIO *et al.*, 2018) e datação por radiocarbono (CATTANEO, 2007; SZELECZ *et al.*, 2018; UBELAKER; WU, 2020; CAPPELA *et al.*, 2015).

Os métodos radioquímicos, por meio de medições de radioisótopos, como o isótopo radioativo Estrôncio-90 (MACLAUGHLIN-BLACK *et al.*, 1992; UBELAKER; BUCHHOLZ; STEWART, 2006), e a espectroscopia de absorção (no infravermelho) em estudos de formação óssea (BAPTISTA *et al.*, 2021) e de fluorescência em hemoglobinas (DONNO *et al.*, 2022).

Métodos histológicos se baseiam em análise de autólise celular, inerentes ao fenômeno da decomposição (ALLAM; ALI; ALI, 2022; PRIETO-BONETE; PEREZ-CARCELES; LUNA, 2015; MAHALAKSHMI *et al.*, 2016; YADAV *et al.*, 2015). Na Odontologia, métodos de análise histológica foram relatados em células epiteliais da gengiva (MAHALAKSHMI *et al.*, 2016; YADAV *et al.*, 2015) e em tecidos dentais (VAVPOTIČ *et al.*, 2009; CARRASCO *et al.*, 2017).

Conforme exposto, nota-se a variabilidade dos métodos de estimativa de IPM na integralidade de estágios de putrefação do corpo. No entanto, quando se trata de remanescentes ósseos, torna-se um desafio no âmbito forense. As técnicas relatadas na literatura científica possuem desvantagens em termos de confiabilidade e precisão. Portanto, novos métodos precisam ser estudados para que auxiliem, de forma que a combinação de diferentes métodos possa fornecer um valor acurado à prática pericial (YADAV *et al.*, 2015).

2 OBJETIVO

Avaliar histologicamente o complexo dentino-pulpar (câmara pulpar, pré-dentina e dentina) e região apical do cemento de terceiros molares completamente formados, submetidos a situações forenses simuladas de inumação e “afogamento” (submersão em água), nos intervalos de tempo de um, três e seis meses a fim de estimar, por meio de análises quantitativas e qualitativas, parâmetros de IPM_{min} .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, a fim de cumprir todas as exigências da Resolução nº466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012). Teve como número de aprovação CAAE 46694021.7.0000.5440 (Apêndice A).

A pesquisa, no decorrer de sua execução, foi alterada em relação ao número amostral e local a ser inserido para simulação de situações adversas (inumação e submersão). Portanto, o projeto de pesquisa foi novamente submetido à análise por meio de uma emenda, tendo uma resposta positiva à alteração (Apêndice B).

3.2 Amostragem

A amostra foi composta de dentes extraídos por indicações terapêuticas, oriundos de pacientes que passaram por intervenção cirúrgica na FORP-USP, e doados ao Biobanco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP). Os indivíduos foram previamente informados sobre a pesquisa por meio de um termo de consentimento livre e esclarecido e, mediante o aceite para doação, assinaram o documento de doação (Apêndice C). As amostras foram coletadas entre junho de 2021 e julho de 2022.

3.2.1 Critérios de inclusão

As amostras consistiram em terceiros molares, inferiores ou superiores, hígidos, de indivíduos entre 18 e 45 anos, com formação completa (ápices radiculares totalmente formados).

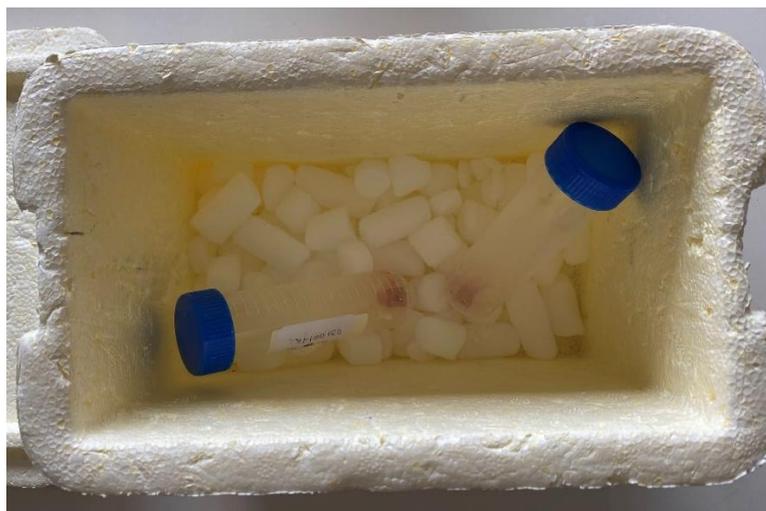
3.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da presente pesquisa elementos dentais com presença de restaurações, cáries, fraturas radiculares ou coronais e outros danos decorrentes do ato cirúrgico, além da presença de alterações morfológicas e patológicas que pudessem comprometer a análise.

3.2.3 Coleta e armazenamento

Os dentes foram coletados de forma individualizada e identificados de acordo com o sexo e idade do doador. Imediatamente após a extração, os dentes foram inseridos em um tubo plástico de 50ml e armazenados em isopor com gelo seco (Figura 1), para mitigar a progressão das alterações celulares.

Figura 1 – Isopor com gelo seco, com amostras no interior do tubo plástico



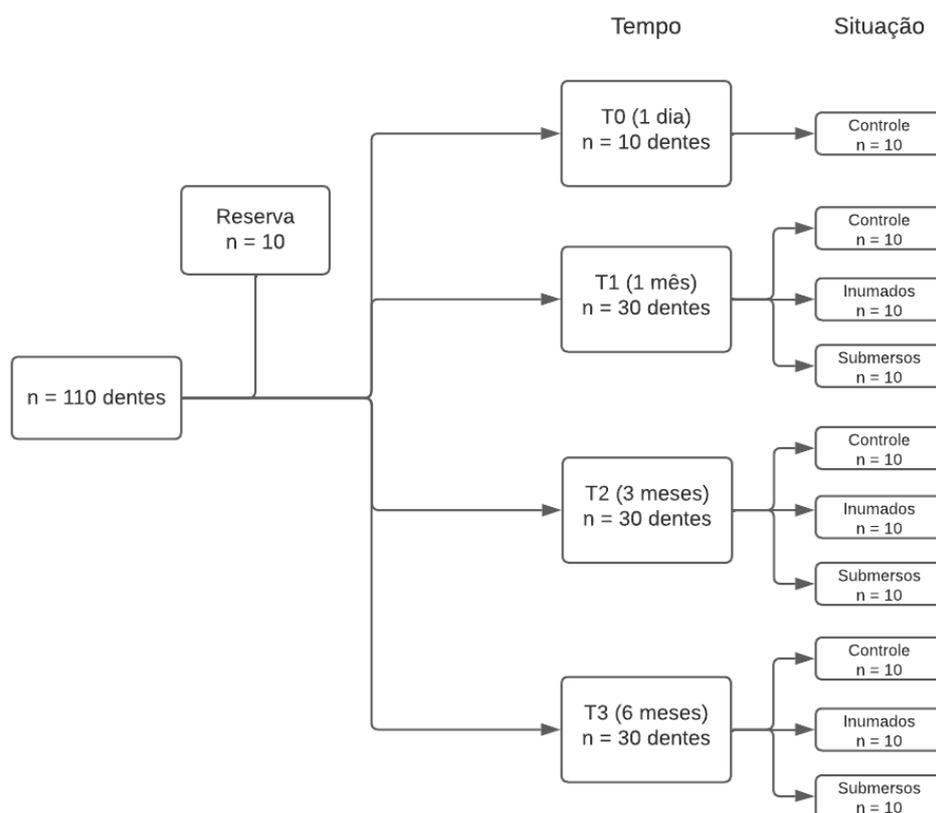
Fonte: De autoria própria, 2022

Após a coleta de cada amostra, os dentes foram armazenados em *freezer* -80°C, até a obtenção do n amostral de cada grupo (n= 33) – 10 dentes para cada uma das três situações, divididos em subgrupos: controle, submersos e inumados, e três elementos para reserva, sendo um para cada subgrupo.

As amostras foram divididas de forma aleatória, estratificada e por blocos, em quatro grupos: T0 (até um dia), T1 (primeiro mês), T2 (terceiro mês) e T3 (sexto mês). Dentre os grupos de tempo, foi realizada uma subdivisão:

inundados (n=10), submersos (n=10) e controle (n=10). Dessa forma, restaram 30 dentes em diferentes situações adversas em cada grupo (Figura 2).

Figura 2 – Diagrama de divisão dos grupos amostrais, de acordo com o tempo/grupo (T0, T1, T2 e T3) e situação/subgrupo (controle, inundados e submersos)



Fonte: De autoria própria, 2022

3.3 Situações: controle e situações adversas

A pesquisa contou com quatro grupos controle, divididos em: T0, T1, T2 e T3. Após a retirada do *freezer* -80°C, as amostras controle ficaram em temperatura ambiente, em tubo plástico e alojadas no Laboratório de Histotecnologia da FORP-USP.

As situações adversas de inumação e submersão foram simuladas no Viveiro de Mudas da USP (Apêndice D), nos períodos T1, T2 e T3. As amostras foram inseridas, separadamente, em pequenos sacos de tecido de poliéster com

etiqueta de identificação, de acordo com o sexo e idade de cada doador, data da exodontia e data de inserção nas situações adversas.

Os sacos que alojaram os dentes foram confeccionados com tecido de poliéster tramado em rede e com furos hexagonais (Figura 3). Tais características permitem a passagem de terra, umidade e a bioturbação, proporcionando uma simulação fidedigna.

Figura 3 – Tecido de poliéster com tramas hexagonais e velcro. Etiqueta de identificação quanto ao sexo do doador (M – masculino) e idade (22 – vinte e dois), data da coleta após a exodontia (14/08/21), e data em grifo amarelo, referente à inserção em situação adversa (04/11/21)



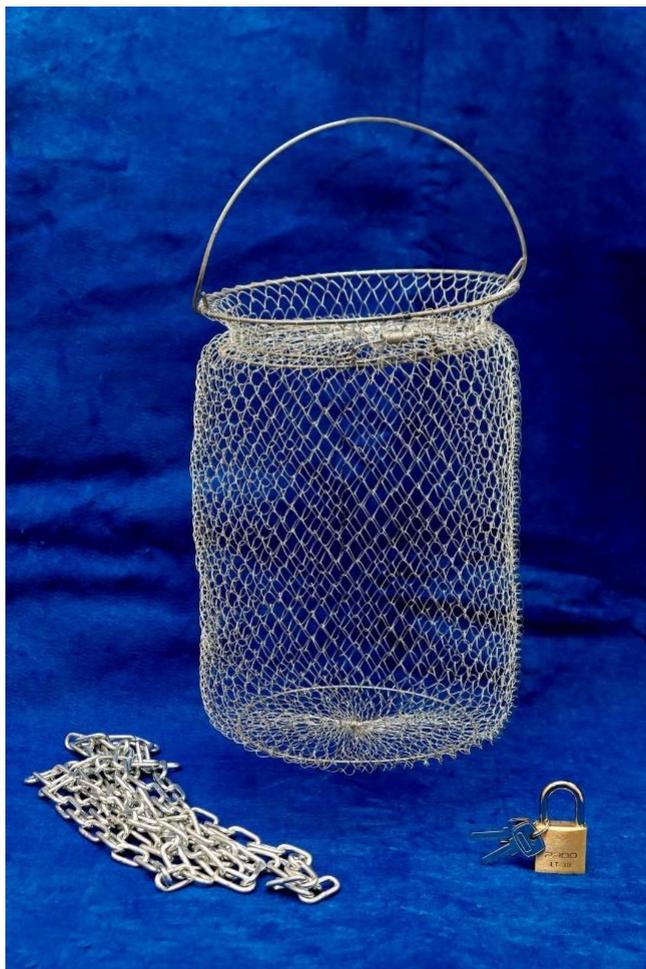
Fonte: De autoria própria, 2021

Para a situação de inumação, escavações foram realizadas em lotes de solo do Viveiro de Mudanças da USP, com dimensões de 30 centímetros de profundidade e 30 centímetros de largura. Os elementos dentais foram inseridos na escavação, de forma individual e com seus respectivos dados de identificação, até completarem o período de um, três e seis meses na situação forense simulada.

Para simular o afogamento, elementos dentais foram submersos em um lago no Viveiro de Mudanças – USP. Para alojar as amostras, foram utilizados sacos de poliéster e as respectivas fichas de identificação, de acordo com os dados do doador e a data de inserção na situação (Figura 3).

Foi utilizado um viveiro de peixes, confeccionado com aço galvanizado, para alojar as amostras submersas pelos períodos de um, três e seis meses. Uma corrente de ferro de quatro metros e cadeado foram utilizados para fixação do viveiro de peixes em árvore próxima ao lago (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – Viveiro de peixe de aço inoxidável, corrente de ferro e cadeado



Fonte: De autoria própria, 2021

Figura 5 – Inserção de amostras na situação de afogamento



Fonte: De autoria própria, 2021

3.4 Preparo histológico

As etapas de preparo histológico foram realizadas no Laboratório de Pesquisas Morfológicas e no Laboratório de Histotecnologia da FORP-USP. As amostras foram fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% por 24 horas após a retirada das situações forenses, e seguidas pela descalcificação em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10%.

Após 24 semanas imersas no EDTA, com trocas semanais da solução, os elementos dentais atingiram uma consistência borrachóide. Foi possível, portanto, realizar um corte único dos elementos dentais, no sentido coronal e méso-distal, no centro do dente.

As amostras foram inseridas individualmente em cassete histológico (Figura 6), para serem introduzidas nas etapas de desidratação, diafanização e impregnação, no processador de tecido (LEICA TP1020, LEICA™, Alemanha). Seguiu-se à inclusão das amostras em blocos de parafina.

Figura 6 – Dente com corte no sentido coronal inserido no cassete histológico

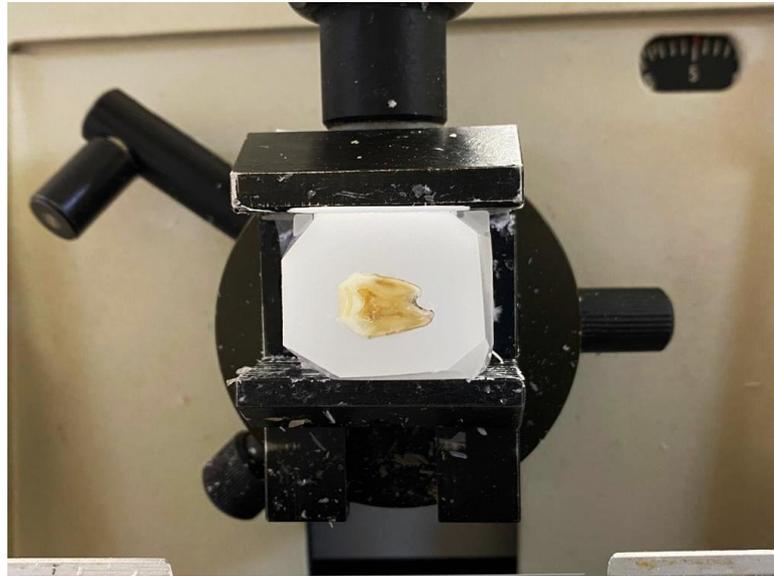
Legenda – Dados correspondentes: A – situação de afogamento (submerso); F – indivíduo do sexo feminino; 22 (vinte e dois): idade na data da exodontia; 22/11/21 – data da exodontia



Fonte: De autoria própria, 2022

Após a obtenção dos blocos de parafina, prosseguiu-se ao corte dos elementos com o micrótomo (LEICA RM2025, LEICA™, Alemanha), no sentido méso-distal e em espessura de seis micrômetros para obtenção de lâminas histológicas. Os cortes foram realizados de forma seriada e escalonada, para evitar o enviesamento da amostra (Figura 7).

Figura 7 – Corte do bloco de parafina no micrótomo



Fonte: De autoria própria, 2022

Para a coloração das lâminas com HE e Picro Sirius Red (PSR), iniciou-se pelo processo de desparafinização com xilol, hidratação em álcool em sequência decrescente de concentração (100%, 90%, 80%, 70%) e lavagem em água corrente. Após, iniciou-se a coloração com hematoxilina por três minutos. Lavagem em água corrente, e, coloração com eosina por seis minutos. A coloração com PSR teve duração de uma hora. O processo das colorações se sucedeu pela imersão da lâmina em série alcoólica crescente (70%, 80%, 90% e 100%) e diafanização com xilol. Finalizou-se com a selagem da lâmina, ou seja, a inserção da lamínula sobre o tecido corado.

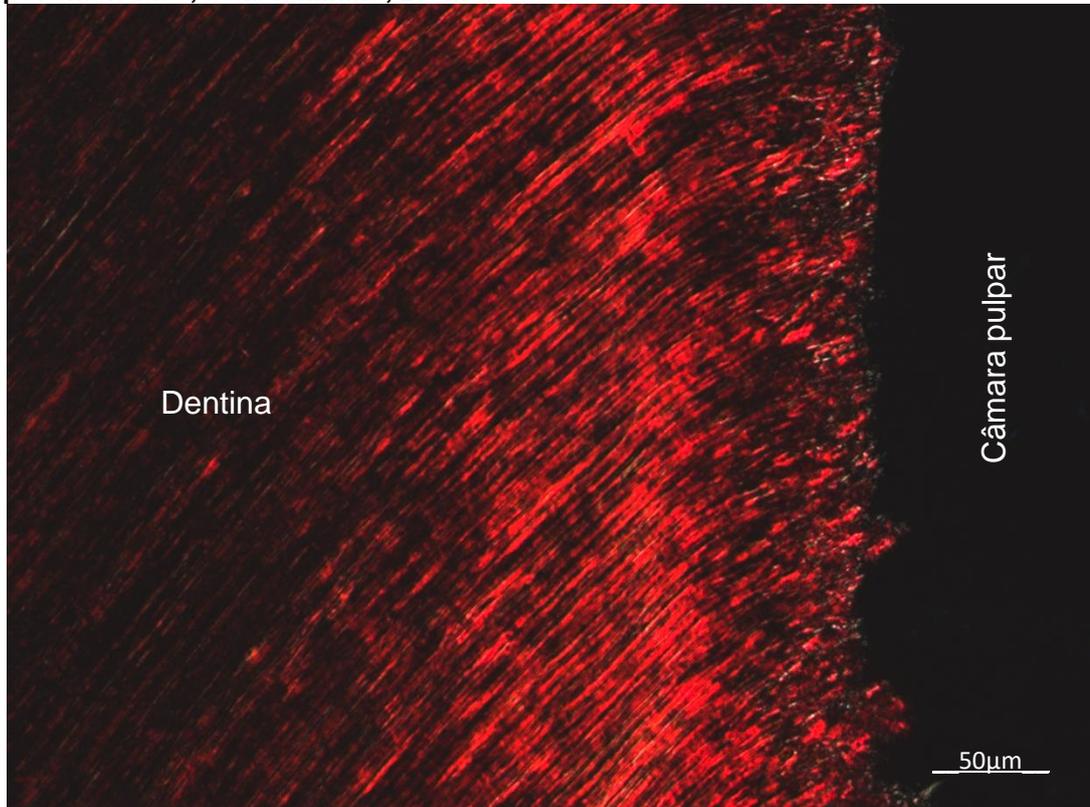
3.5 Análise microscópica

Após concluídas essas etapas, as lâminas histológicas foram analisadas no Laboratório de Microscopia da FORP-USP, utilizando-se um microscópio (AXIO IMAGER Z2, Zeiss, Alemanha) para obtenção de imagens.

3.5.1 Análise quantitativa

O software *AxioVision Program* (Zeiss, Alemanha) foi utilizado para quantificar as fibras colágenas presentes na dentina adjacente à câmara pulpar, por meio da coloração PSR em microscopia polarizada (Figura 8).

Figura 8 – Dentina e câmara pulpar vistas a partir de imagem com microscopia polarizada utilizando a coloração PSR. 40x – Escala 100µm. Características da amostra – grupo: T2, subgrupo: enterrados, sexo feminino, 23 anos

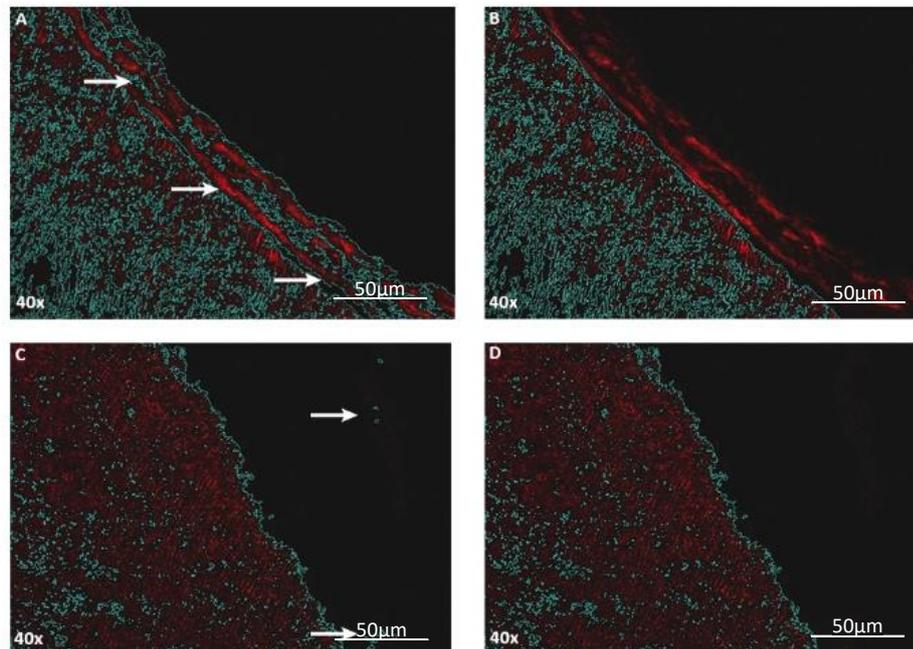


Fonte: De autoria própria, 2023

Dois cortes escalonados de cada elemento foram analisados em microscópio com objetiva de 40x, em cada corte, seis imagens foram obtidas das regiões coronal mesial e distal, radicular mesial e distal, teto e assoalho da câmara pulpar, com intuito de abranger a área do complexo dentino-pulpar a ser analisada. Portanto, doze imagens e medidas de cada elemento dental compuseram a média de uma amostra.

Através da ferramenta *Automatic Measurement Programs*, a região da dentina foi demarcada. Em imagens em que a área excedeu os limites de interesse (áreas em que as fibras sugerissem restos pulpares), o contorno foi realizado manualmente para exclusão (Figura 9).

Figura 9 – Exclusão de áreas demarcadas pelo *software* (setas) e excluídas para contagem em pixels. 40x – Escala 100µm. A: setas indicam as áreas a serem excluídas. B: imagem A após a exclusão. C: setas indicam áreas de tecido sugestivo de remanescente pulpar a serem excluídas. D: imagem C após a exclusão



Fonte: De autoria própria, 2023

As medidas foram obtidas em pixels e os dados foram tabulados em uma planilha do *software* Excel® (*Microsoft Corp.*, Redmond, WA, USA). Para cada elemento, foi calculada a média e desvio padrão de 12 medidas. A partir do resultado obtido para cada dente, foi calculada a média da amostra total para cada grupo das situações adversas submetidas.

As variáveis de interesse (tempo e quantidade de pixels) tiveram sua normalidade analisadas por meio de inspeções visuais de histogramas e Q-Q *plots*. Foi realizado o Teste de correlação de Pearson entre tempo e contagem – em pixels – de colágeno, contabilizados por situações forenses submetidas (controle, submersos e inumados). O nível de significância estabelecido foi de $\alpha=5\%$. Para verificar a significância estatística das diferenças entre subgrupos e tempos, foi realizado o Teste de Análise de Variância (ANOVA) de um fator e Teste de Tukey. Toda a estatística descritiva e inferencial foi realizada pelo *software* Rstudio versão 4.1.0© (Rstudio, Inc. *software*).

A avaliação do IPM_{\min} nesta análise quantitativa foi verificada por meio de limiares de contagem de fibras colágenas em pixels, do menor período

possível. A verificação de diferença estatisticamente significativa pelo Teste ANOVA foi decisivo para a predição do IPM_{\min} .

3.5.2 Análise qualitativa e estimativa do IPM_{\min}

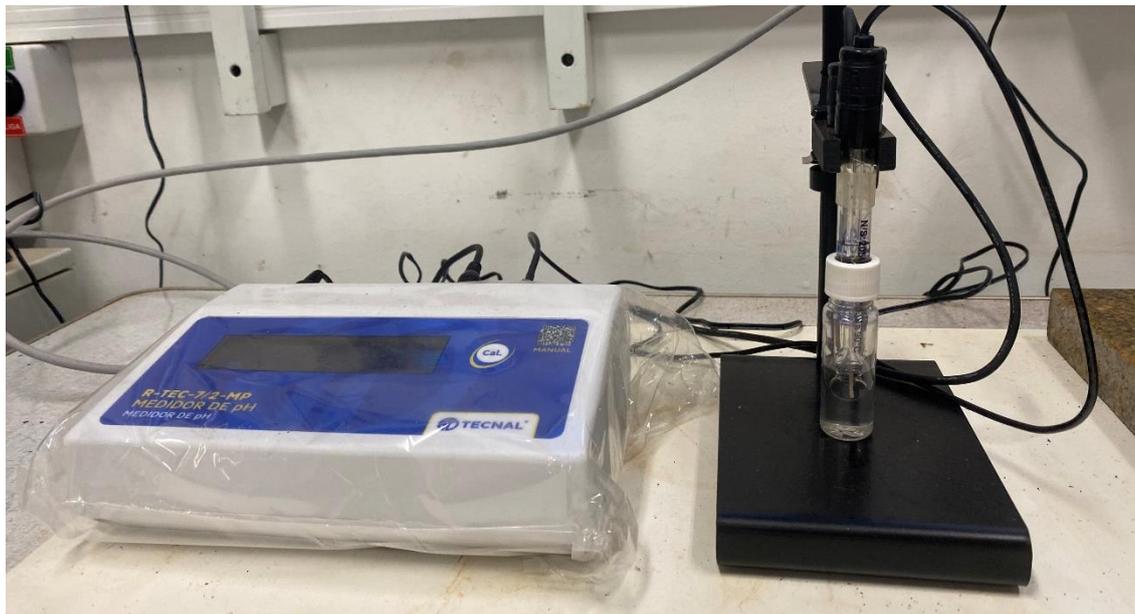
Lâminas com coloração HE do complexo dentino-pulpar e região apical do cimento, com objetivas de 10x e 40x, foram analisadas por meio de parâmetros histológicos. Os dados coletados consistiram nas características quanto a presença ou ausência de estruturas sugestivas de polpa, pré-dentina, cimento e ligamento periodontal. Tais dados também foram tabulados em uma nova planilha do *software* Excel® (*Microsoft Corp., Redmond, WA, USA*) e submetidos à estatística descritiva.

Os parâmetros para avaliação do IPM_{\min} foram considerados quando as estruturas analisadas (polpa, pré-dentina, cimento ou ligamento periodontal) relataram, pela primeira vez na tabela, ausência total das estruturas.

3.6 Análise de pH de água e solo

As análises de pH de água e solo foram realizadas no Laboratório de Química Analítica Instrumental e Aplicada, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. O medidor de pH R-TEC-7/2-MP Tecnal foi utilizado (TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil) (Figura 10).

Figura 10 – pHmetro utilizado na análise de água e solo



Fonte: De autoria própria, 2023

A técnica foi empregada conforme o Manual de Métodos de Análise de Solos da Embrapa (TEIXEIRA *et al.*, 2017), em inclinação a 91% e temperatura a 21,1°C. Para a mensuração do pH de solo, foi utilizada uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂). Três amostras de solo e de água foram utilizadas para medição do pH e o desvio padrão de cada elemento foi calculado.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra e das situações forenses

A amostra foi composta por um total de 110 dentes recém-extraídos. Onze amostras foram excluídas: um elemento do grupo “T2 – inumados” e dois do grupo “T3 – submersos” foram perdidos durante a inserção nas respectivas situações forenses, oito elementos foram excluídos por falha no corte histológico ou pela delonga no processo de desmineralização do esmalte. Portanto, a amostra final foi composta de 99 dentes, dos quais, 55 eram provenientes de indivíduos do sexo masculino e 44 do sexo feminino.

As características das amostras distribuídas por grupos e subgrupos estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características da amostra quanto ao sexo e idade, divididos por grupos e subgrupos

Legenda – T0: controle, T1: 1 mês, T2: 3 meses, T3: 6 meses. M: masculino, F: feminino

| Grupos | Sexo | | Idade Média | Desvio padrão |
|--------------|-----------|-----------|-------------|---------------|
| | M | F | | |
| T0 | 7 | 3 | 30,1 | 6,3 |
| T1 | 23 | 7 | 25,8 | 7,4 |
| T2 | 10 | 20 | 25,6 | 6,2 |
| T3 | 15 | 14 | 25,4 | 6,1 |
| Subgrupos | Sexo | | Idade Média | Desvio padrão |
| | M | F | | |
| Controle | 21 | 19 | 26,0 | 6,4 |
| Submersos | 19 | 10 | 27,2 | 7,9 |
| Inumados | 15 | 15 | 25,0 | 5,6 |
| Total | 55 | 44 | 26,0 | 6,6 |

Fonte: De autoria própria, 2023

O grupo T0 apresentou uma faixa etária mais elevada em relação aos outros grupos e subgrupos (Tabela 1). No entanto, a amostra total teve uma média de idade de 26,0 anos, valor similar à faixa etária entre as situações forenses e grupos de tempo. As situações forenses foram caracterizadas pelo

pH da água igual a 6,24 (DP: 0,09), e o solo, quando mensurado com CaCl₂, pH: 5,21 (DP: 0,18).

4.2 Quantificação de fibras colágenas

No total, 1188 (mil cento e oitenta e oito) imagens com coloração PSR foram analisadas com intuito de quantificar as fibras colágenas presentes na dentina próxima a câmara pulpar em pixels.

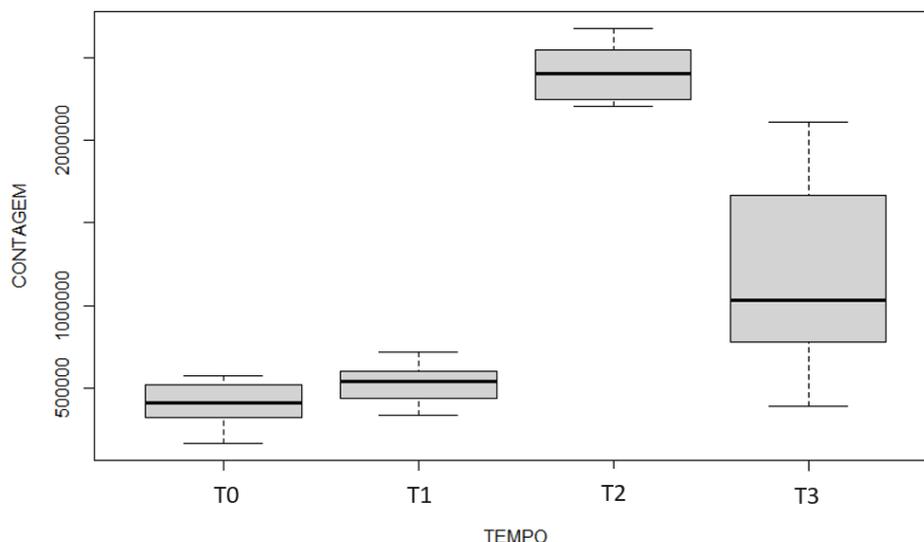
Para compreender o padrão que as fibras colágenas se comportam após a morte (período em que há supressão de sangue e oxigênio, como no momento da extração), o subgrupo controle foi estudado nos períodos T0, T1, T2 e T3. As variáveis tempo e quantidade de pixels apresentaram tendência à distribuição normal. O Teste ANOVA de um fator foi executado e os resultados estão representados na Tabela 2 e gráfico *boxplot* na Figura 11.

Tabela 2 – Contagem de colágeno e desvio padrão (em pixels) dos subgrupos por tempo
Legenda – Letras diferentes em maiúsculo indicam as diferenças das colunas, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas em tempos dentro de um subgrupo. *valores estatisticamente significantes (Teste ANOVA). DP: desvio padrão

| | T0 | T1 | T2 | T3 | Valor-p |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| Controle (DP) | 396840.1 ^a (176383.7) | 535611.0 ^{Aa} (217682.6) | 2408496.3 ^{Ab} (424402.3) | 1158726.5 ^{Ac} (419457.7) | <0,001* |
| Submersos (DP) | NA | 375199.7 ^{Aa} (187071.9) | 1817492.0 ^{Bb} (565851.3) | 1555148.9 ^{Ab} (511939.4) | <0,001* |
| Inumados (DP) | NA | 142469.1 ^{Ba} (75843.1) | 951422.6 ^{Cb} (163493.3) | 625951.0 ^{Bc} (252880.4) | <0,001* |
| Valor-p | - | <0.001* | <0.001* | <0.01* | - |

Fonte: De autoria própria, 2023

Figura 11 – *Boxplot* contagem de fibras colágenas (em pixels) em dentina do subgrupo “controle”, de acordo com o tempo estudado (T0, T1, T2 e T3)



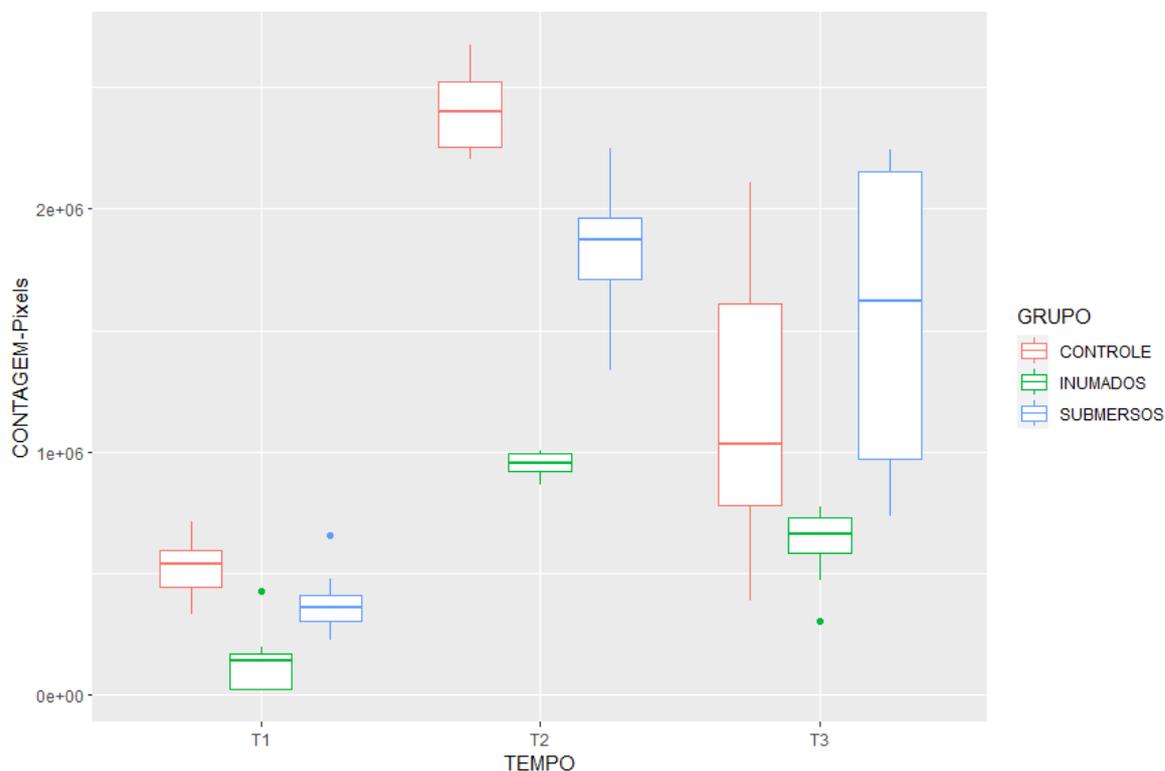
Fonte: De autoria própria, 2023

No momento da remoção do freezer -80°C até um dia (T0), as fibras colágenas se concentram entre 300000 e 500000 pixels. Após um mês, no T1, a contagem em pixels não apresentou diferença estatisticamente significativa entre ambos os períodos. No entanto, três meses após a extração (T2), a quantidade de fibras colágenas atingiu seu ápice, com contagem em pixels estatisticamente significativa entre os grupos T0 e T1.

Em T3, período de seis meses em temperatura ambiente, observou-se o decréscimo no quantitativo de fibras colágenas, bem como uma maior dispersão dos dados. Apresentou diferença estatisticamente significativa com os demais períodos (T0, T1 e T2) (Tabela 2, Figura 11).

A Tabela 2 apresenta também as médias e os respectivos desvios padrão de cada situação forense, em relação aos grupos de tempo, e a Figura 12 representa o gráfico de *boxplot* com os subgrupos (controle, submersos e inumados) em T1, T2 e T3.

Figura 12 – Boxplot contagem de fibras colágenas (em pixels) em dentina dos subgrupos em T1, T2 e T3



Fonte: De autoria própria, 2023

O subgrupo “submersos” em água, quando comparado entre grupos de tempo, apresentou diferença significativa apenas em T1 com os outros períodos (T2 e T3) (Tabela 2). Quando comparado aos demais subgrupos (controle e inumados), apresentou índices menores que “controle” em T1 e T2, e, índices superiores ao subgrupo “inumados”. No entanto, em T3, apresentou um comportamento atípico quando comparado aos outros subgrupos especificamente nesse sexto mês (Figura 12).

Em T1, o subgrupo “submersos” não apresentou diferença estatisticamente significativa com as amostras-controle, apenas com inumados. Em T2, houve diferença entre os três subgrupos, e em T3, apresentou diferença somente com o subgrupo “inumados” (Tabela 2).

O subgrupo “inumados” em grupos de tempo (T1, T2 e T3) apresentou diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos. Quando comparado com os demais subgrupos, apresentou diferenças em todas as situações e em todos os períodos (Tabela 2). Nota-se que o subgrupo

“insumados” demonstrou, em todos os grupos de tempo estudados, o menor índice de colágeno, quando contado em pixels (Figura 12).

4.3 Parâmetros histológicos qualitativos

As estruturas analisadas são sugestivas de presença ou ausência de polpa (ou restos pulpares anucleados), pré-dentina, cimento e ligamento periodontal. Os dados foram tabulados de acordo com os grupos de tempo e subgrupos de situações forenses, e estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise qualitativa por subgrupos (controle, submersos e insumados) e grupos (T0, T1, T2 e T3)

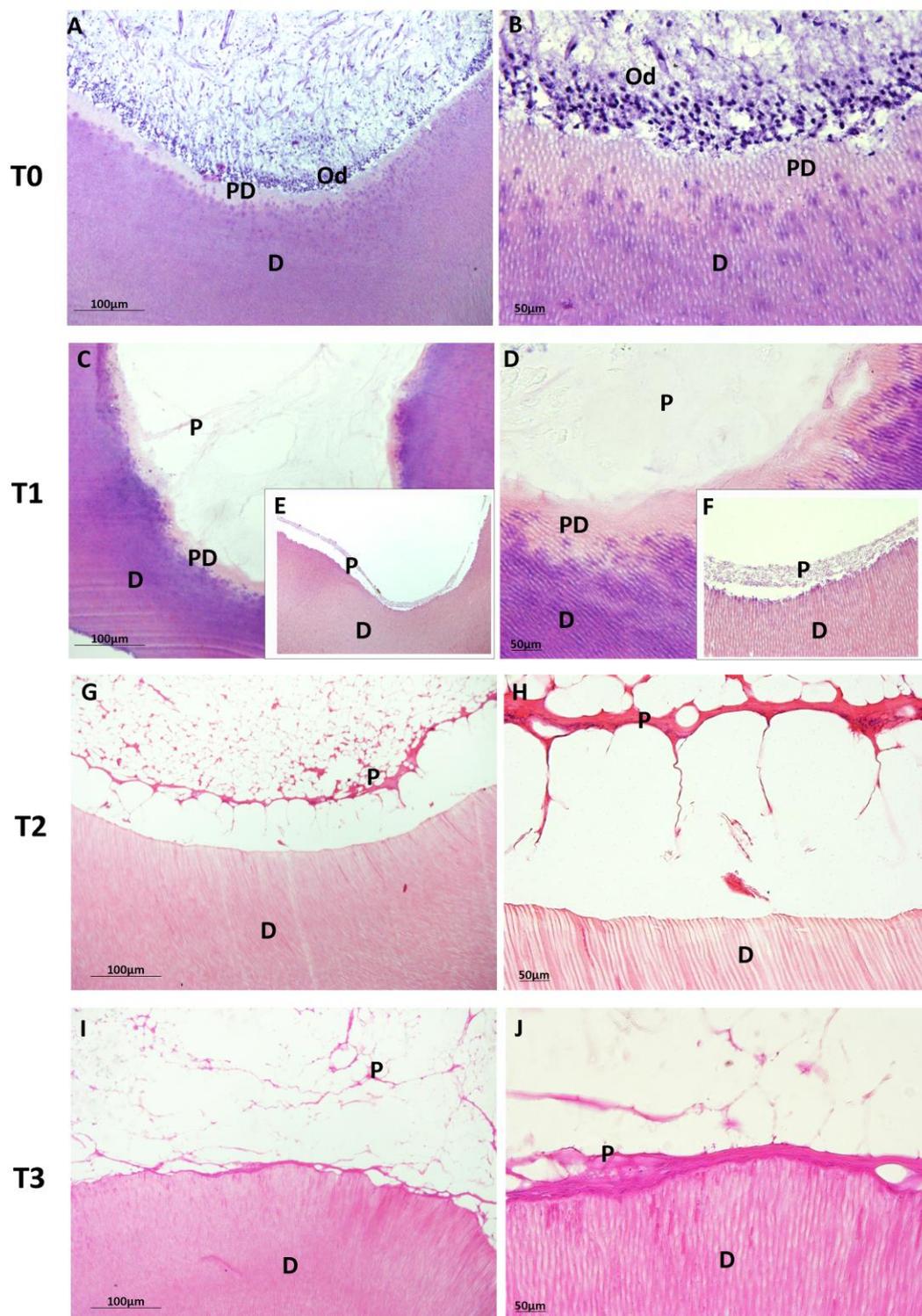
| Subgrupos | Grupos | Polpa | | Pré-dentina | | Cimento | | Lig. Periodontal | |
|-----------|--------|-------|-----|-------------|-----|---------|-----|------------------|-----|
| | | Sim | Não | Sim | Não | Sim | Não | Sim | Não |
| Controle | T0 | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| | T1 | 10 | 0 | 5 | 5 | 10 | 0 | 9 | 1 |
| | T2 | 8 | 2 | 2 | 8 | 9 | 1 | 9 | 1 |
| | T3 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Submersos | T1 | 10 | 0 | 9 | 1 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | T2 | 6 | 4 | 8 | 2 | 10 | 0 | 4 | 6 |
| | T3 | 1 | 9 | 0 | 10 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| Insumados | T1 | 7 | 3 | 4 | 6 | 10 | 0 | 1 | 9 |
| | T2 | 3 | 7 | 1 | 9 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | T3 | 0 | 10 | 0 | 10 | 8 | 2 | 0 | 10 |

Fonte: De autoria própria, 2023

As imagens histológicas do complexo dentino-pulpar foram realizadas na região do assoalho da câmara pulpar e no terço apical (região do cimento e do ligamento periodontal). As Figuras 13 a 18 representam características mais frequentes observadas em cada subgrupo de situações forenses, comparadas com o grupo “controle” (T0), e períodos de tempos representados por grupos, como pode ser observado na Tabela 3.

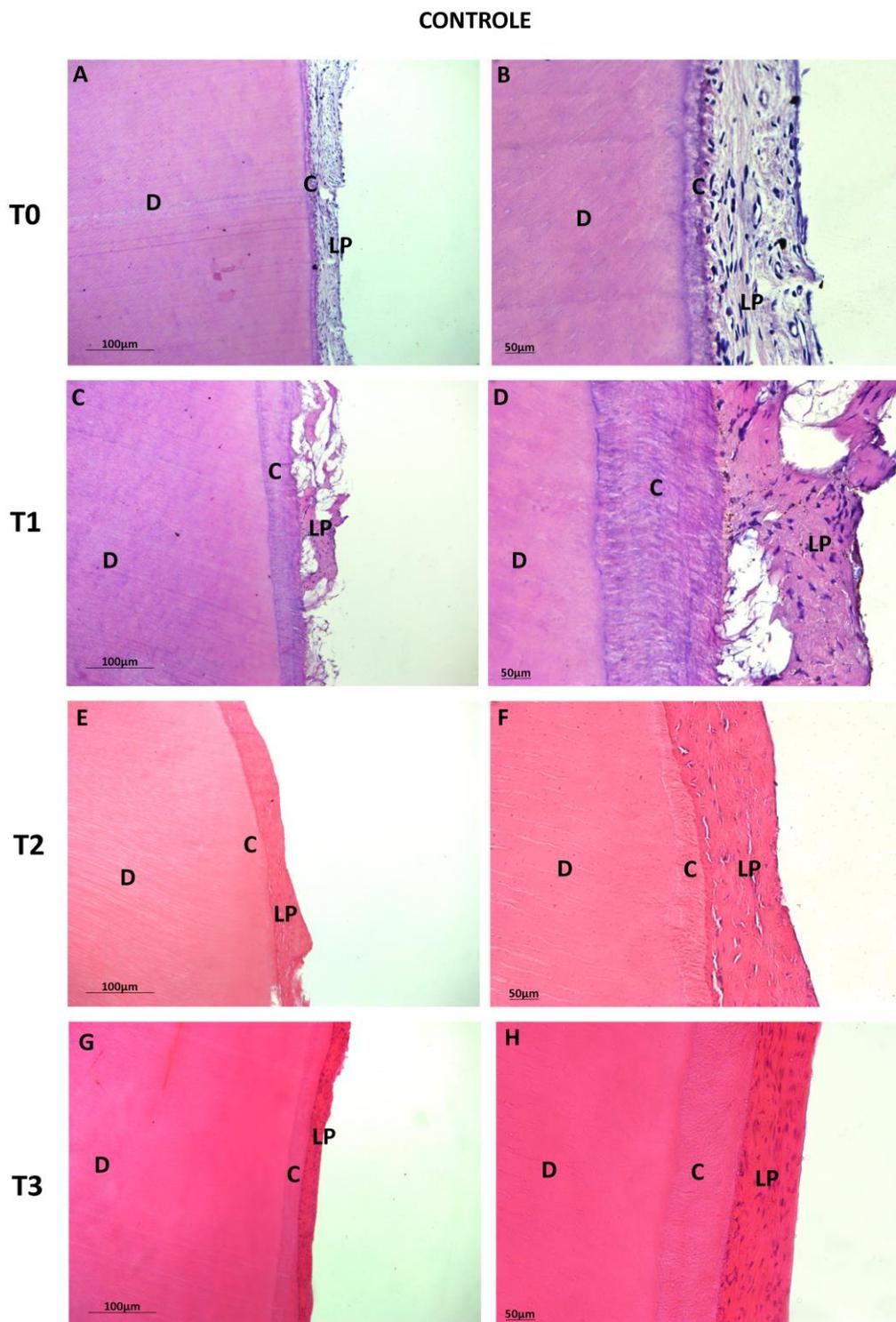
Figura 13 – Região do complexo dentino-pulpar do subgrupo “controle” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C, D, E e F: T1; G e H: T2; I e J: T3
 Legenda – P: polpa, Od: odontoblastos, PD: pré-dentina, D: dentina

CONTROLE



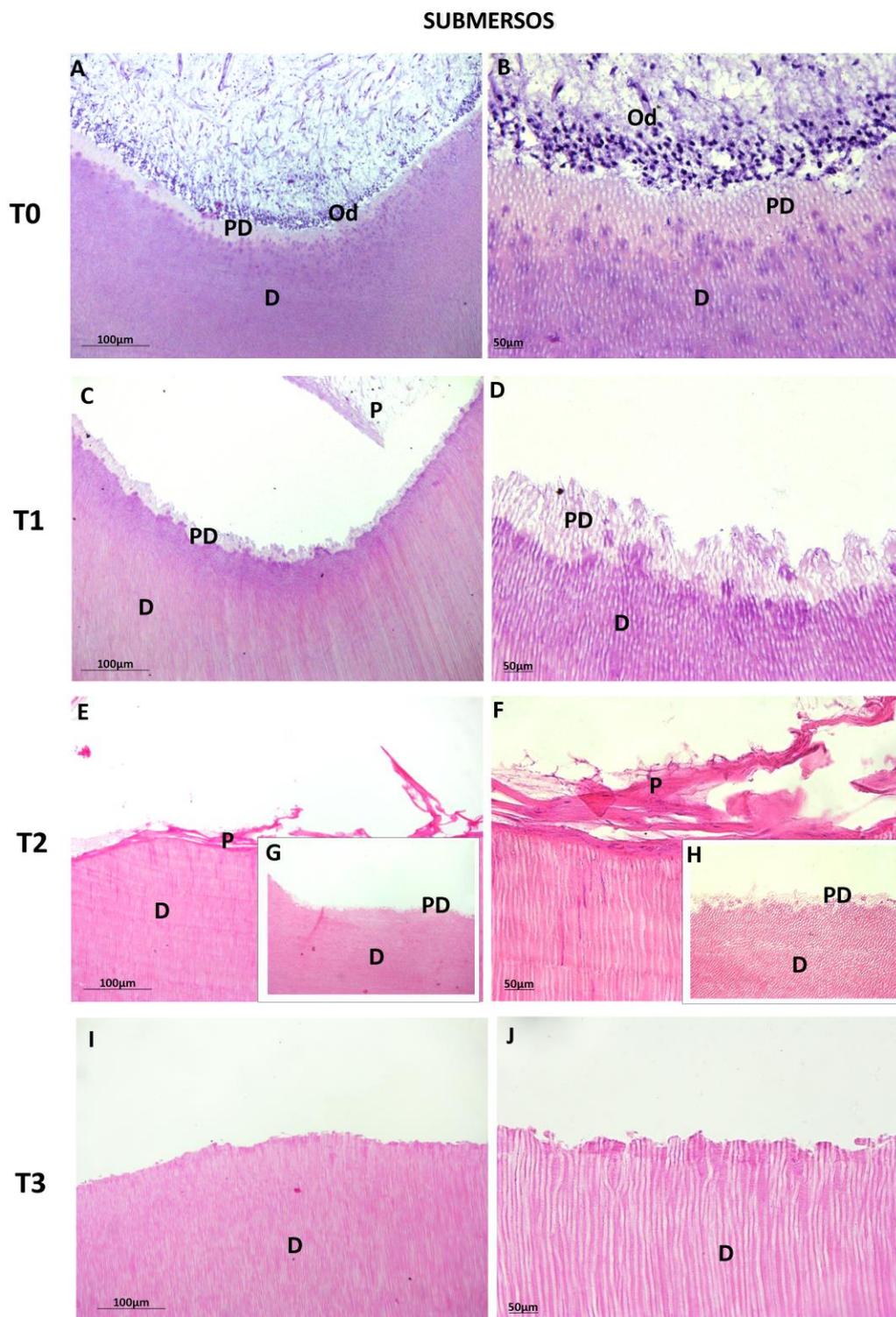
Fonte: De autoria própria, 2023

Figura 14 – Região do terço apical do subgrupo “controle” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C e D: T1; E e F: T2; G e H: T3
Legenda – D: dentina, C: cimento, LP: ligamento periodontal



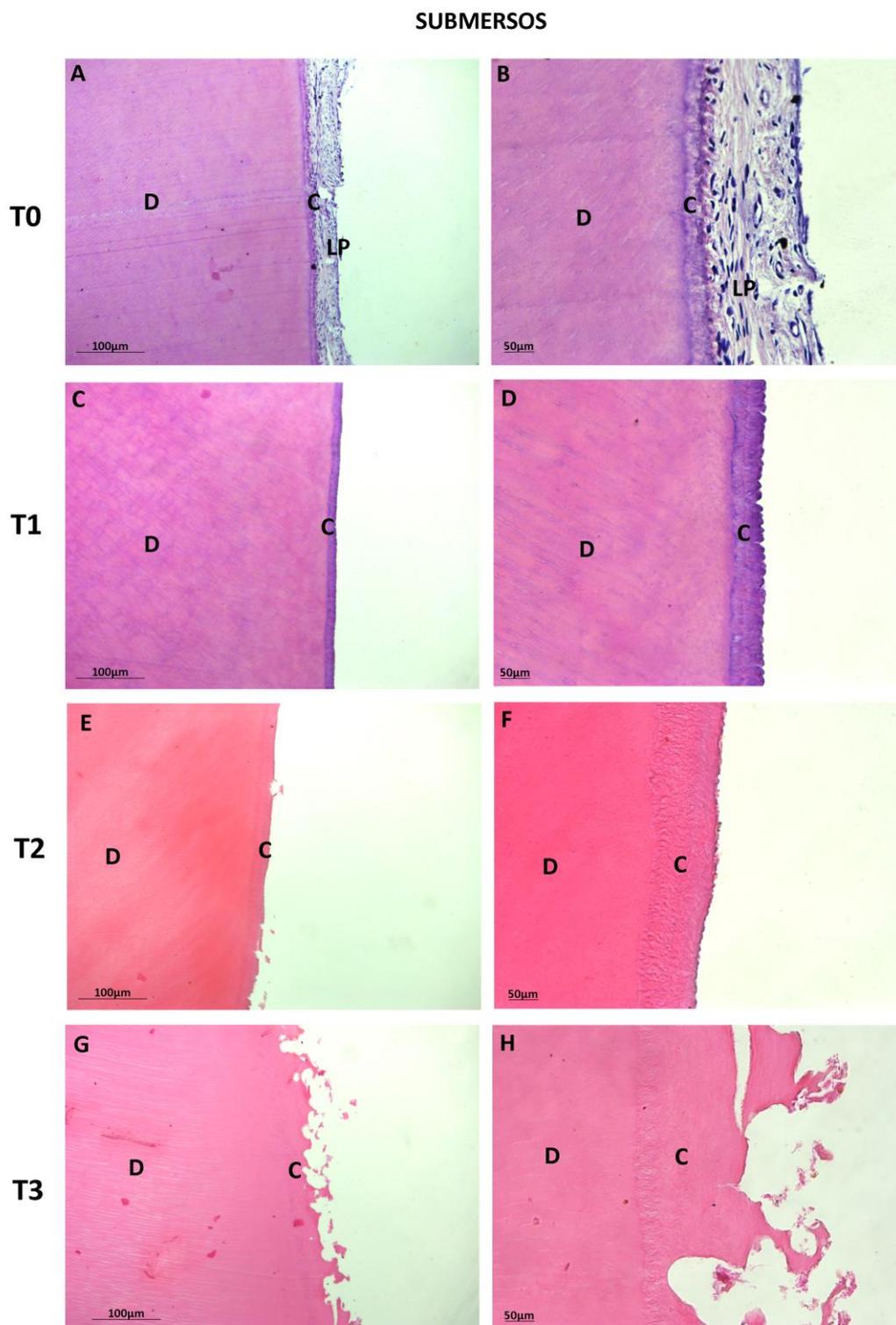
Fonte: De autoria própria, 2023.

Figura 15 – Região do complexo dentino-pulpar do subgrupo “submersos” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C e D: T1; E, F, G e H: T2; I e J: T3
 Legenda – P: polpa, Od: odontoblastos, PD: pré-dentina, D: dentina



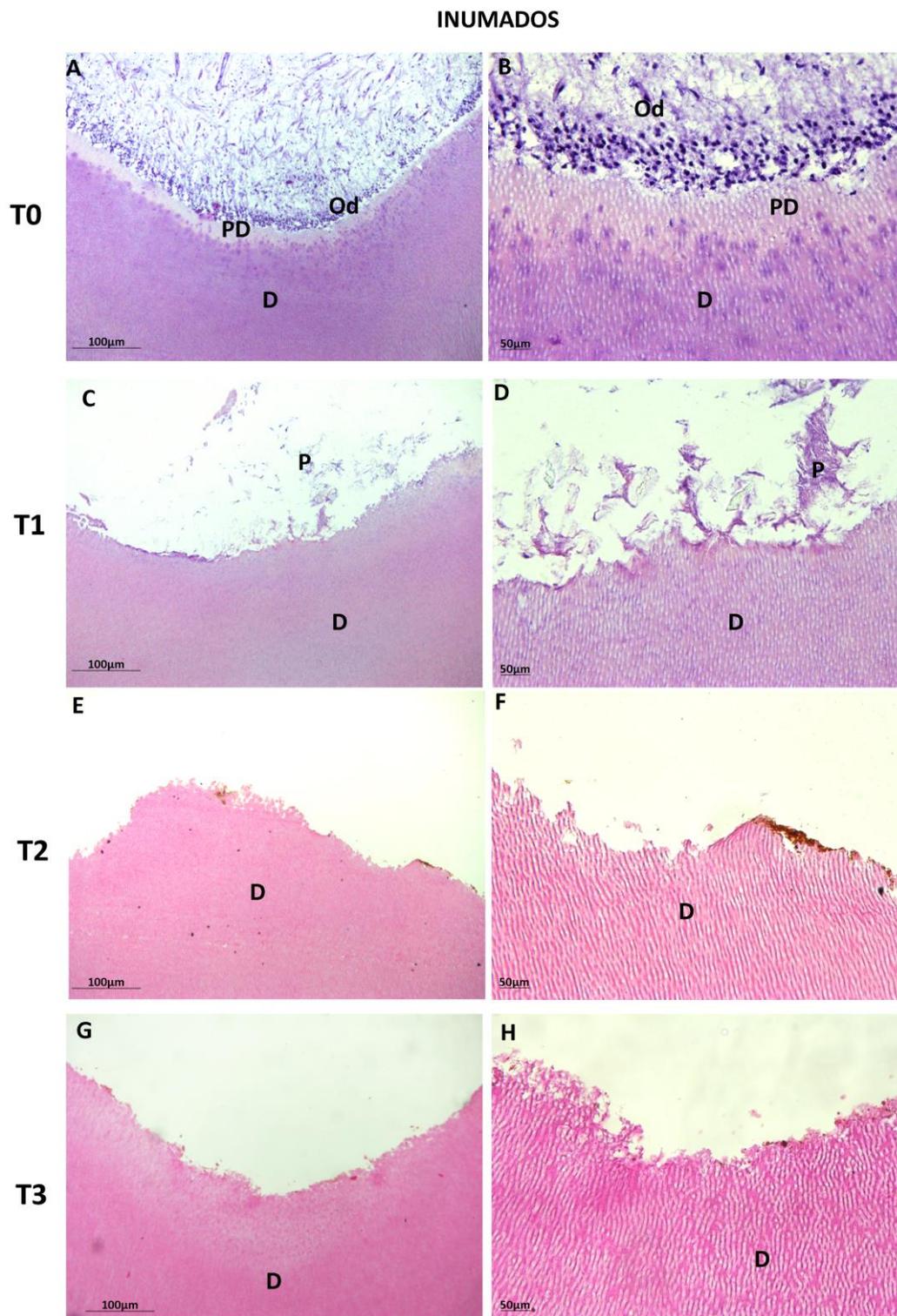
Fonte: De autoria própria, 2023

Figura 16 – Região do terço apical do subgrupo “submersos” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C e D: T1; E e F: T2; G e H: T3
Legenda – D: dentina, C: cimento, LP: ligamento periodontal



Fonte: De autoria própria, 2023

Figura 17 – Região do complexo dentino-pulpar do subgrupo “inumados” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C e D: T1; E e F: T2; G e H: T3
 Legenda – P: polpa, Od: odontoblastos, PD: pré-dentina, D: dentina

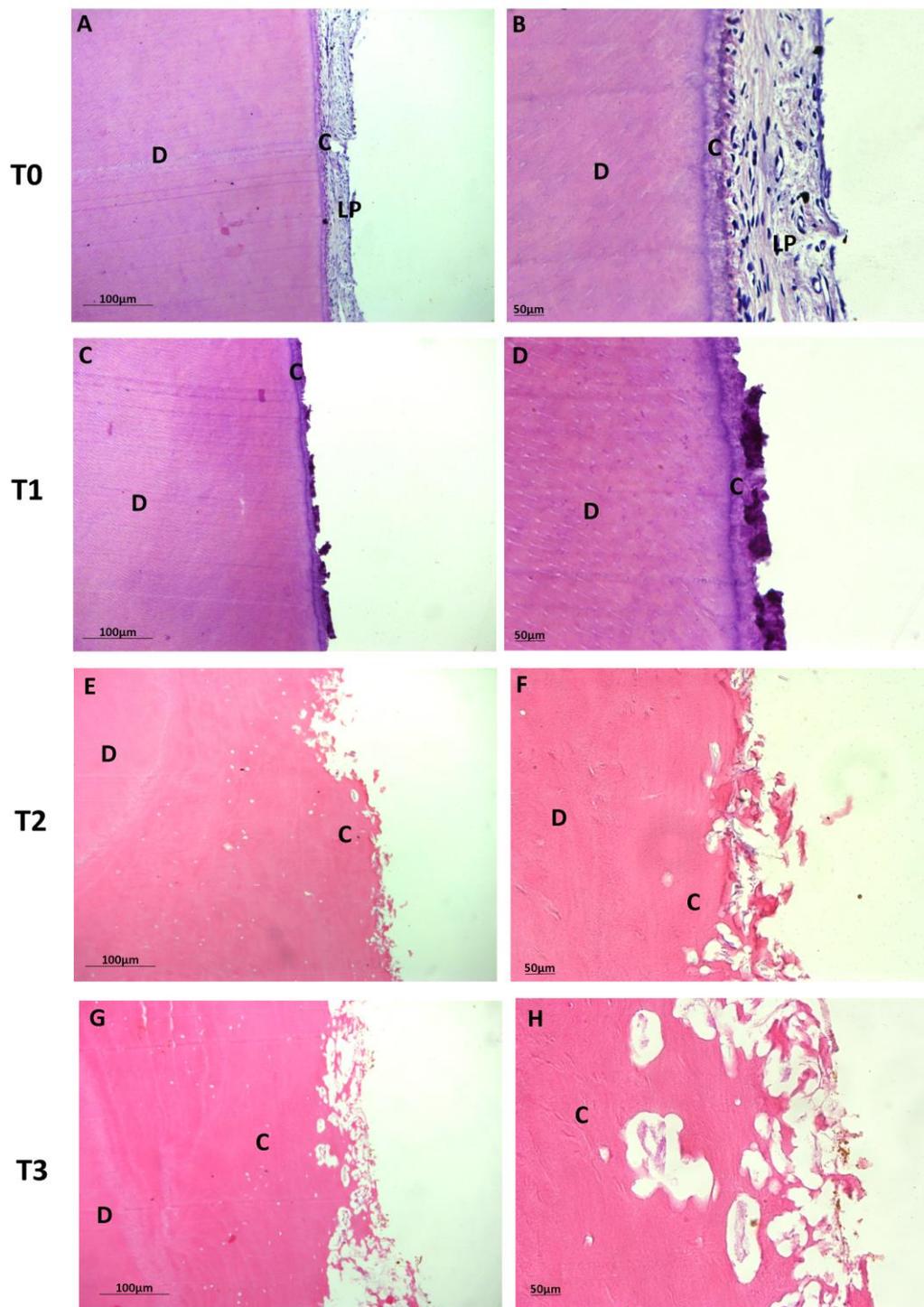


Fonte: De autoria própria, 2023

Figura 18 – Região do terço apical do subgrupo “inunados” em coloração HE. 10x (à esquerda) e 40x (à direita). A e B: T0; C e D: T1; E e F: T2; G e H: T3

Legenda – D: dentina, C: cemento, LP: ligamento periodontal

INUMADOS



Fonte: De autoria própria, 2023

As características das estruturas mais frequentes do subgrupo “controle” estão representadas pelas Figuras 13 e 14, pela região do complexo dentinopulpar e região do terço apical, respectivamente. Em T0, apresentou integridade em todas as estruturas analisadas. A polpa continha camada de odontoblastos com núcleos intactos e fibras aderidas à câmara pulpar, onde foi possível observar, por meio da coloração HE, a pré-dentina em todas as amostras do grupo (Figura 13A e 13B).

Em T1, apresentou desuniformidade quanto à integridade da polpa. Observou-se camada odontoblástica próxima à dentina, mas, a presença de restos pulpares com ausência de núcleos foi a característica mais recorrente. Não é possível, portanto, constatar a presença de camada de odontoblastos, como foi possível em T0. A pré-dentina demonstrou estar na linde nesse grupo de tempo, portanto, as Figuras 13C, 13D, 13E e 13F apresentam ambas as características.

No período T2, três meses após a retirada das amostras das situações forenses, o subgrupo “controle” apresentou resultado positivo a restos pulpares superior ao resultado negativo. No entanto, quanto a pré-dentina, apresentou baixo índice (quase nulo) de presença dessa matriz (Figura 13G e 13H).

Após seis meses submetidos em situações forenses, os parâmetros de regressão se tornam mais consolidados. Em T3, a presença de restos pulpares é uma característica específica da amostra-controle em seis meses. A pré-dentina não esteve presente em nenhuma amostra desse subgrupo (Tabela 3, Figura 13I e 13J).

Quando analisado o terço apical do dente, o subgrupo “controle” não apresentou grandes variações na estrutura do cemento e do ligamento periodontal. Em T0, ambas as estruturas se apresentaram íntegras, com presença de regiões violáceas, com tons mais escuros, sugestivas de núcleos celulares do ligamento periodontal corados pela hematoxilina (Figura 14A e 14B).

Em T1 (Figuras 14C e 14D), a presença do cemento foi unânime neste grupo e o ligamento periodontal, por sua vez, esteve presente em nove das 10 amostras (Tabela 3). No período T2, o cemento e ligamento periodontal

estiveram presentes na maioria das amostras (Figuras 14E e 14F). Em T3, ambas as estruturas estiveram presentes integralmente no subgrupo “controle” (Figuras 14G e 14H).

As características mais frequentes do subgrupo “submersos” estão representadas pelas Figuras 15 e 16. Em T1, foi constatada a presença de restos pulpares em todas as amostras. Algumas regiões apresentaram regiões violáceas mais escuras, em formatos elípticos, que sugeriram núcleos em decomposição. A pré-dentina esteve presente em nove das 10 amostras, sendo superior aos demais subgrupos (Tabela 3, Figura 15C e 15D).

Em T2, as características passam a se dissemelharem. É o período em que é observado maiores variações entre as estruturas analisadas em todos os subgrupos (Tabela 3). Em “submersos” a presença de restos pulpares apresentou maior frequência e estão representadas pelas Figuras 15E e 15F. A presença de pré-dentina é uma característica constante de amostras dessa situação forense, e estão representadas pelas Figuras 15G e 15H.

No período T3, foi constatada a presença de restos pulpares em apenas uma das 10 amostras. A pré-dentina esteve ausente em todas as amostras da situação de dentes submersos em água por seis meses (Tabela 3, Figuras 15I e 15J). Quando analisadas as estruturas do terço apical, o cemento no subgrupo “submersos”, esteve presente em todos os períodos estudados (Tabela 3, Figura 16). No entanto, o período T3 é caracterizado pela reabsorção parcial dessa estrutura em todo o grupo amostral (Figuras 16G e 16H).

O ligamento periodontal apresentou uma divergência entre os períodos T1 e T2, como se observa na Tabela 3: em um mês (T1), o subgrupo marcou a ausência em sua totalidade (Figuras 16C e 16D), ao passo que, em três meses (T2), relatou-se presença dessa estrutura, apesar da menor proporção – quatro de 10 amostras – portanto, as Figuras 16E e 16F estão representadas pela ausência do ligamento periodontal. Em T3, esteve ausente em todos os dentes analisados (Figuras 16G e 16H).

No subgrupo “inúduados”, em T1, a presença de restos pulpares foi inferior quando comparado aos demais subgrupos (controle e submersos). Sete amostras apresentaram restos pulpares sem núcleos, enquanto três não apresentaram nenhuma evidência deste tecido. Ademais, a ausência de pré-

dentina foi superior ao número constatado dessa estrutura (Tabela 3, Figura 17C e 17D).

Em T2, houve uma queda no número de presença de restos pulpares em dentes inumados, assim como apenas uma amostra apresentou a pré-dentina (Tabela 3, Figura 17E e 17F). O período T3 é marcado pela ausência total de restos pulpares e da pré-dentina, quando analisado o complexo dentino-pulpar de dentes submetidos à situação de inumação (Figura 17G e 17H).

A região do terço apical no subgrupo “inumados” é caracterizada pela presença de cimento nos três períodos estudados. Com exceção de T3 que apresentou ausência em duas amostras, em T1 e T2, constatou-se a presença do cimento nas 10 amostras estudadas. Contudo, observa-se uma reabsorção parcial desta estrutura com início em T2 (Figuras 18E e 18F) e sucedido pelo período T3 (Figuras 18G e 18H). O ligamento periodontal esteve presente em apenas uma amostra do período T1. Os demais períodos (T2 e T3) foram caracterizados pela inobservância desta estrutura (Tabela 3, Figura 18).

4.4 Análise estatística

O Coeficiente de Correlação de Pearson foi realizado entre duas variáveis de escala métrica (tempo e quantidade de pixels) da análise quantitativa das fibras colágenas. O coeficiente entre tempo e subgrupo “controle” foi de 0.4344153, indicando uma correlação fraca entre as variáveis.

Entre a variável “tempo” e “submersos”, a correlação de Pearson foi de 0.5981992, indicando uma correlação moderada. Por fim, entre “tempo” e “inumados”, a correlação foi 0.4153299, também apontando uma correlação fraca. Diante desses valores, não se optou por fazer gráfico de correlação.

5 DISCUSSÃO

A estimativa do IPM é um grande desafio no âmbito forense (WANG *et al.*, 2022). As limitações advêm do avançado estágio de decomposição e à putrefação atípica em ambientes externos. Isto porque, a duração dos estágios de decomposição da morte depende, dentre outros fatores, da temperatura, umidade e acesso da microbiota cadavérica ao corpo (SZELECZ *et al.*, 2018; MEGYESI; NAWROCKI; HASKELL, 2005).

Nos casos em que os corpos são encontrados em ambientes externos, como submersos em água ou inumados sob a terra, a aplicação da Odontologia Legal é vantajosa para o exame pericial, tendo em vista que os elementos dentais são capazes de suportarem diversas situações forenses (MALAVER; YUNIS, 2003; DRANCOURT *et al.*, 2017).

A característica de perenidade atribuída aos dentes sobrevém de sua alta composição inorgânica, principalmente do esmalte e do cimento (GIL-BONA; BIDLACK, 2017). Apesar de não possuírem a mesma porção de matriz inorgânica, ambas são estruturas mais externas ao dente e possuem a função em comum de proteção dos tecidos dentais internos (NANCI, 2018).

Desse modo, estudos com dentes em situações forenses se tornam promissores para auxiliar a instrução criminal (YOUNG *et al.*, 2013; GARRIDO; NAIA, 2014), e alguns estudos de estimativa do IPM a partir da análise histológica dos dentes foram descritos na literatura científica (VAVPOTIČ *et al.*, 2009; MENON; PRADO; SILVA, 2011; YOUNG *et al.*, 2013; CARRASCO *et al.*, 2017).

Ressalta-se que o estudo do IPM_{\min} descrito por alguns pesquisadores corresponde à análise do nível mais avançado de maturação da mosca necrófaga do cadáver em evidência (MOORE; ADAM; DRIJFHOUT, 2004; AMENDT *et al.*, 2006; SZELECZ *et al.*, 2017). Todavia, o estudo do IPM_{\min} realizado neste trabalho é uma analogia aos descritos pela Entomologia Forense, por buscarem uma finalidade em comum: a estimativa do menor período possível entre o óbito e o encontro do cadáver.

Até o momento, não se constataram estudos que utilizam o termo “ IPM_{\min} ” para análises a nível celular ou por quantificação de estruturas, no entanto, é

possível que a aplicação desta terminologia possa ser oportuna para estimar propriamente o período mínimo do IPM por meio dos dentes.

No que concerne à estimativa do IPM pela análise histológica dental, Carrasco *et al.* (2017) observaram o comportamento do tecido pulpar de dentes mantidos em temperatura ambiente por um dia, um mês, três meses e seis meses, e os resultados relatados ratificam em partes com os achados da presente pesquisa.

Os autores acima descreveram as alterações qualitativas da polpa, com foco em odontoblastos: em 24 horas, a matriz extracelular (MEC) se apresentou homogênea e com grande número de núcleos distribuídos pelo tecido conjuntivo (CARRASCO *et al.*, 2017). Assim como é possível observar na Figura 13, os resultados da presente pesquisa demonstraram integridade pulpar com regiões violáceas sugestivas de núcleos de células bem difundidos por todo tecido pulpar.

Na análise de um mês, observou-se o início da perda da homogeneização da MEC com áreas de vacuolização (CARRASCO *et al.*, 2017). Em T1, apesar da polpa estar presente em todas as situações controle (Tabela 3), é importante salientar que a presença dessa estrutura nesta análise não revela, necessariamente, a presença de núcleos. A polpa dental pode estar representada por restos pulpares sem células nucleadas (Figura 13).

A presença de restos pulpares se repetiu integralmente no subgrupo “submersos” em T1, e em “inumados”, a degradação foi comparativamente mais ativa que nos demais subgrupos, pois, ao observar a Tabela 3, verifica-se que há amostras inumadas que não apresentaram restos pulpares.

Em três meses, Carrasco *et al.* (2017) indicaram que os núcleos – antes bem conservados – não apresentaram morfologia bem definida, com cromatina irregular e MEC com áreas desagregadas. Os achados do presente estudo indicaram que no subgrupo “controle” se inicia a perda de remanescente pulpar (Tabela 3, Figura 13).

Nas situações de simulações forenses, os subgrupos “submersos” e “inumados” apresentaram menor frequência de constatação de remanescente pulpar em três meses. Nota-se que o subgrupo “inumados” apresentou um número de amostras inferior aos demais subgrupos (Tabela 3), mas ainda em T2, não é possível inferir um IPM_{\min} pela ausência da polpa (Figura 13).

Na análise de seis meses, a MEC apresentou área totalmente desagregada, baixa densidade nuclear e aparência fibrosa do tecido (CARRASCO *et al.*, 2017). Apesar disso, esteve presente nas amostras de Carrasco *et al.* (2017) assim como no subgrupo “controle” da presente pesquisa. Em seis meses, ainda foi possível constatar a presença de restos pulpare, não sendo um parâmetro possível, portanto, para indicar o IPM_{\min} em situações controladas pela ausência desta estrutura (Tabela 3, Figura 13).

Não obstante que em situações forenses, o tecido pulpar se apresentou em apenas uma amostra do subgrupo “submersos”, ao passo que fora inexistente em todas as amostras do subgrupo “inunados” (Tabela 3). Por conseguinte, infere-se que é possível estimar o IPM_{\min} de seis meses em dentes inunados por meio da ausência total do tecido pulpar (Figura 13).

Além da análise qualitativa do tecido pulpar, Carrasco *et al.* (2017) avaliaram a densidade do tecido conjuntivo da polpa por meio da coloração Tricrômio de Masson em um período de seis meses. O Tricrômio de Masson é um corante para distinguir diferentes tipos de tecidos conjuntivos, enquanto o PSR, utilizado na presente pesquisa, é específico para coloração de fibras colágenas (LATTOUF *et al.*, 2014).

A quantificação fibras colágenas nesta pesquisa foi realizada na dentina adjacente à câmara pulpar. Apesar de ser uma região distinta daquela de Carrasco *et al.* (2017), é possível que os resultados de ambas as pesquisas possuam associação, tendo em vista a proximidade das áreas estudadas.

A partir do comportamento de fibras colágenas do subgrupo “controle”, teve-se como parâmetro o aumento de fibras colágenas quantificadas em pixels entre T0 e T2, e apresentou um decréscimo entre T2 e T3 (Tabela 2, Figura 11). No estudo de Carrasco *et al.* (2017), a porcentagem do colágeno em seis meses foi significativamente maior que os demais períodos.

Pelo Teste ANOVA de um fator, constatou-se diferença estatisticamente significativa entre o subgrupo “controle” e os períodos estudados, exceto entre T0 e T1 (Tabela 2). É possível que os dados relatados nesta pesquisa possam auxiliar na estimativa do IPM_{\min} , principalmente no que tange o período T2 (acima de 2000000 pixels), tendo em vista que em T0 e T1 (abaixo de 1000000 pixels) podem conflitar com períodos superiores a T3, que carecem de serem estudados para que seja possível observar o decréscimo das fibras colágenas.

Assim como sugeriram Carrasco *et al.* (2017) para a execução da pesquisa em diferentes situações ambientais, a análise quantitativa de pixels do presente trabalho revelou que o comportamento do subgrupo “controle” se reproduziu em situações forenses de submersão e inumação – apesar de algumas amostras do subgrupo “submersos” estarem além da contagem em seis meses quando comparado ao terceiro mês (Tabela 2, Figura 12).

Ainda assim, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tempo e subgrupos, o que pode indicar possíveis caminhos para a estimativa de IPM_{\min} nestes períodos e situações estudados. No subgrupo “submersos”, a diferença estatisticamente significativa se observou entre T1 e T2; T1 e T3 (Tabela 2). O número elevado de fibras colágenas (acima de 1300000 pixels) pode inferir um IPM_{\min} de três meses. A quantidade de pixels superior ao limiar citado ocorre também em seis meses, mas, o IPM_{\min} é, invariavelmente, o menor período possível.

No subgrupo “inumados”, o Teste ANOVA de um fator indicou diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos estudados (Tabela 2). Isso revela que é possível a estimativa do IPM_{\min} em três meses, quando a quantificação de fibras colágenas é superior a 800000 pixels, considerando que a tendência observada a partir de três meses é a redução de pixels (Figura 12).

O Teste de Correlação de Pearson demonstrou uma correlação fraca entre as variáveis “tempo” e “situação”. As razões para tal podem estar associadas ao comportamento do aumento da quantidade de fibras colágenas em até três meses, e o início de decréscimo a partir deste período, conferindo um padrão não-linear entre as variáveis (Figuras 11 e 12).

A correlação moderada entre “tempo” e subgrupo “submersos” (0.5981992) pode ser explicada pelas amostras em T3 que estão além do intervalo de T2 (Figura 12). Especificamente neste sexto mês, a contagem de fibras colágenas apresentou um comportamento atípico quando comparada aos demais subgrupos (controle e inumados).

Acredita-se, portanto, que as informações já descritas por Carrasco *et al.* (2017), somadas aos dados deste trabalho, podem aumentar o conjunto de características dos tecidos dentais nos períodos descritos, e possivelmente, o estabelecimento de métodos confiáveis da estimativa do IPM_{\min} por intermédio de análise histológica dos dentes.

Cabe ressaltar que a justificativa de ter analisado a região da dentina próxima a polpa é, justamente, a observação das alterações decorrentes da decomposição do tecido pulpar e seus anexos após a supressão de sangue e oxigênio. Nessa perspectiva, a presente pesquisa buscou também analisar o comportamento e o padrão de decomposição da pré-dentina (Tabela 3).

As alterações encontradas no tecido pulpar demonstraram que as amostras são influenciadas pelas situações do local em que o elemento dental é encontrado. No entanto, a pré-dentina não acompanhou esse comportamento. Em T1 e T2, o subgrupo “submersos” se destacou pela presença quando comparado às outras situações estudadas (Tabela 3, Figura 15).

Isto reflete nos estudos que envolvem essa estrutura, como exemplo, a estimativa da idade por meio da racemização do ácido pela dentina e cimento (HELFMAN & BADA, 1976). A análise qualitativa da pré-dentina deste estudo propõe que pesquisas que envolvem essa estrutura talvez possam ser mais bem conservadas em água ao invés de ambiente seco.

Essa hipótese se fundamenta na observação da presença de pré-dentina no subgrupo “submersos” em T1 e T2, que pressupõe menor reabsorção interna da dentina. No entanto, em seis meses é o período em que houve reabsorção total dessa estrutura, em quaisquer subgrupos (Tabela 3, Figura 15). Portanto, o IPM_{\min} a partir da ausência dessa estrutura – tanto em situações controladas, como em situações adversas de submersão e inumação – é de seis meses.

A presença de pré-dentina, no entanto, não está associada ao aumento observado de colágeno tipo I na região da dentina (Tabelas 2 e 3). No subgrupo “submersos” a manutenção de pré-dentina em T2 foi mais frequente que nos demais subgrupos, enquanto a contagem de pixels de fibras colágenas no subgrupo “controle”, neste mesmo período, fora superior.

Ainda não se conhece razões para o aumento de fibras colágenas em até três meses na região da dentina, mas, um estudo realizado por Nakamura *et al.* (2021) associou a autofagia ao favorecimento da síntese de colágeno tipo I no ligamento periodontal. A autofagia é um termo genérico para as vias em que os materiais citoplasmáticos são transferidos aos lisossomos em células animais (NAKAMURA *et al.*, 2021). Trata-se do principal sistema de decomposição intracelular cujo objetivo é, segundo Mizushima & Komatsu (2011), além da

eliminação de materiais, a adaptação metabólica, controle de qualidade intracelular e homeostase.

Nesse sentido, ao fazer uma analogia com o estudo de Nakamura *et al.* (2021) com o aumento do colágeno tipo I na dentina apresentado nos três subgrupos até T2 (Figuras 11 e 12), pode ser explicado pela autofagia das células como odontoblastos e fibroblastos da polpa, em uma tentativa de se adaptarem à inibição de circulação e nutrientes decorrentes da morte. A partir de três meses, a tendência à queda de contagem de fibras colágenas pode ser explicada pelo próprio processo de autólise decorrente dos fenômenos cadavéricos destrutivos da morte (FRANÇA, 2004).

Apesar de a pesquisa de Nakamura *et al.* (2021) estar associada ao ligamento periodontal quando em processo de autofagia, até o momento não foram encontradas na literatura científica razões para que ocorra a síntese e o aumento de colágeno em dentina, conforme observado no presente estudo, após a cessão da circulação. É possível que o estudo realizado em ligamento periodontal também possa ser aplicado à autofagia da dentina. No entanto, estudos específicos nesse assunto são necessários para elucidação das causas desse fenômeno.

Assim como o tecido pulpar, o ligamento periodontal é uma estrutura que se destacou pela forte influência que sofre pelo meio em que se encontra (Tabela 3). Trata-se de um tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, que se localiza entre o cemento e osso alveolar, e atua como uma barreira biológica protetiva (NAKAMURA *et al.*, 2021).

Um fato interessante observado na presente pesquisa é que, apesar de ser um tecido conjuntivo – isto é, mais susceptível à degradação do que tecidos mineralizados – o ligamento periodontal esteve presente nas amostras controle até o sexto mês (Tabela 3, Figura 14). Tal informação é relevante pois, segundo Malaver & Yunis (2017), o ligamento periodontal pode fornecer material genético para fins de identificação humana. No entanto, para fins de estimativa de IPM_{\min} , não foi possível deduzir em situações controladas.

Em situações forenses, todavia, a análise do ligamento periodontal apresentou resultados relevantes para estimativa de IPM_{\min} . No subgrupo “submersos”, apesar dessa estrutura estar ausente em T1, em T2 foi relatada a presença em quatro amostras, e posteriormente, em T3 ocorreu a ausência total

da estrutura (Tabela 3, Figura 16). Desse modo, é possível inferir que a estimativa do IPM_{\min} de amostras submersas pela ausência de ligamento periodontal é de seis meses. No subgrupo “inutados”, a ausência do ligamento periodontal se deu em três e seis meses (Tabela 3, Figura 18), portanto, o IPM_{\min} estimado nesta situação forense é de três meses.

Na análise qualitativa do terço apical, também foi observada a presença do cimento, que demonstrou uma alta resistência no subgrupo “controle” aos períodos estudados, não sendo, portanto, um parâmetro para a estimativa do IPM_{\min} . O cimento também foi constatado em situações forenses, exceto em duas amostras do subgrupo “inutados” (Tabela 3). Apesar de não ter sido observada a ausência total do cimento nas estruturas, uma característica específica foi verificada em amostras submersas e inutadas.

No subgrupo “submersos”, em T3, notou-se uma reabsorção parcial do cimento em todas as amostras (Figura 16). Essa característica foi observada também no subgrupo “inutados”, em T2 (Figura 18). À vista disso, é possível estimar o IPM_{\min} a partir da reabsorção parcial do cimento de dentes submersos em seis meses, e, em dentes inutados, em três meses.

Segundo Manoilescu *et al.* (2015), em estágios avançados de putrefação, o cimento é caracterizado por cavidades em sua superfície. No entanto, não especificaram em quanto tempo após a morte isso acontece. A conservação do cimento em T3 no subgrupo “controle”, ratifica que o cimento é uma estrutura de inserção importante para a proteção dos tecidos mais internos do dente (MALAVER & YUNIS, 2017).

As estruturas acima descritas (tecido pulpar, ligamento periodontal e cimento) apresentaram características regressivas mais relevantes em amostras inutadas, seguidas pelas submersas (exceto em pré-dentina) e pelas amostras-controle (Figuras 14, 16 e 18). Desse modo, propõe-se que as alterações nos dentes são mais expressivas a depender das condições do local em que o elemento dental é encontrado.

Manoilescu *et al.* (2015) descreveram as alterações estruturais no dente de acordo com fatores biológicos e físicos. Os fatores biológicos dizem a respeito aos animais e aos insetos que podem danificar os tecidos duros com mordeduras, fenômenos estes denominados bioturbação. Sobre os fatores físicos, os autores afirmaram que a água pode alterar a coloração do dente

devido a deposição de minerais no esmalte e na dentina; e o solo em que é inumado o elemento dental foi caracterizado entre ácidos, neutros/alcalinos e solo arenoso (MANOILESCU; ION; IOAN, 2015).

De acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (2023), os dentes desta pesquisa foram inumados em solo classificado como latossolo, vermelho-podzólico e estruturado, caracterizados pela acidez e coloração vermelha. O solo estruturado é descrito pela presença de macroagregados, ou seja, poros grandes pelos quais a água e o ar podem se mover livremente, e raízes de plantas encontram caminhos para crescer (KOTCHETKOFF-HENRIQUES; JOLY; BERNACCI, 2005).

É possível que a característica de solo estruturado em que foram submetidas as amostras possa ter colaborado para a biotubação por anelídeos, insetos e outros animais. A ausência total do ligamento periodontal no subgrupo “inumados” em T2, demonstrou ser uma estrutura influenciada pela situação de inumação, possivelmente pela bioturbação existente no solo em que foi submetido (Tabela 3, Figura 18). Sem a proteção biológica conferida pelo ligamento periodontal, o cimento fica exposto e sujeito às intempéries e aos fenômenos tafonômicos.

Segundo Manoilescu *et al.* (2015), em solos ácidos ocorre a descalcificação e perda de esmalte, mas, em contrapartida, há a preservação de tecidos moles. Em solos neutros, alcalinos e arenosos, os dentes se mantêm íntegros devido a sua composição por hidroxiapatita, que é um composto rico em material inorgânico (MANOILESCU; ION; IOAN, 2015). Portanto, a caracterização dos meios em que foram submetidas as amostras é essencial para análise de diferentes aspectos da decomposição dos dentes.

A análise de pH de solo e água foi realizada com intuito de pormenorizar as propriedades do meio e fornecer dados específicos para futuros estudos. O pH do solo em que os dentes foram inumados foi igual a 5,21 (DP: 0,18), corroborando com a característica de acidez pelo Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (2023), e o pH da água igual a 6,24 (DP: 0,09). Na Figura 16 e 18, em seis meses de incubação em água e em três meses inumados em solo, respectivamente, observou-se a reabsorção parcial do cimento.

Apesar do estudo de Manoilescu *et al.* (2015) tratar sobre a descalcificação de esmalte, ao fazer uma analogia ao cimento – também pela

sua alta composição mineral – é possível que a reabsorção parcial seja influenciada pela característica levemente ácida do solo e da água. No entanto, estudos em locais com pH neutros e básicos devem ser realizados para verificar tal constatação.

As amostras desta pesquisa foram inseridas em água doce. Alvarez-García *et al.* (1996) também realizaram uma pesquisa com dentes submersos e observaram a disponibilidade do material genético para análise. Concluíram que em amostras submersas não há diferença significativa quanto a incubação em água doce ou salgada (ALVAREZ-GARCÍA, 1996).

Após expostos e discutidos todos os resultados, cabe ressaltar ainda que existe a necessidade de reduzir a falta de acurácia da estimativa do IPM (YADAV *et al.*, 2015). Esta pesquisa teve como objetivo a análise de alterações tardias, considerando que em remanescentes ósseos e dentais a estimativa do IPM é um desafio nas ciências forenses, e a obtenção de uma estimativa de IPM pode ser essencial se outras evidências forem escassas (SZELECZ *et al.*, 2018).

Apesar de observar as alterações tardias, a presente pesquisa contou com a coleta cuidadosa e individual dos dentes, inseridas em gelo seco – com a tentativa de reduzir as regressões celulares, pois é resfriado a temperatura inferior a -78°C – até o armazenamento em *freezer* -80°C da FORP-USP, posto que células podem ser criopreservadas por até um ano quando armazenadas nessa temperatura (SIMIONE, 1992; JANG *et al.*, 2017).

Quanto a amostragem, sugere-se que em estudos futuros os pesquisadores insiram um número amostral maior para cada situação forense, tendo que em vista que neste trabalho, a inserção dos elementos dentais em situações forenses culminou com a perda de algumas amostras, refletindo na carência de um dado do subgrupo “submersos”.

A presente pesquisa apresentou algumas limitações: o método histológico é um método invasivo e a sua preparação envolve o corte e destruição do dente (CARRASCO *et al.*, 2017). Neste sentido, quando um remanescente dental é encontrado, sugere-se a correta fixação do vestígio por meio de fotografias e tomada de medidas, antes de prosseguir ao processamento histológico.

Outra limitação foi relativa à delonga na descalcificação das amostras. O uso do quelante EDTA a 10% para esse fim se fundamenta na preservação da

morfologia estrutural dos tecidos (KHAN *et al.*, 2022). No entanto, a composição rica em matriz inorgânica do esmalte (GIL-BONA; BIDLACK, 2017), somado à robustez da estrutura dos terceiros molares, implicaram na manutenção em solução por 24 semanas. Para fins periciais, segundo Garrido & Naia (2014), é importante que a investigação seja eficiente e objetiva.

De acordo com Procopio *et al.* (2018), a estimativa do IPM sofre com a baixa confiabilidade dos métodos, especificamente quando os tecidos estão decompostos. A análise dental em situações forenses, principalmente em estágios avançados de decomposição, onde parâmetros regressivos são constatados predominantemente em cimento e polpa, pode contribuir para a estimativa do IPM_{mín} em até seis meses, quando aliado a outros métodos já consagrados.

Desse modo, é desejável que estudos de alterações histológicas de dentes sejam realizados em novos intervalos temporais, com intuito de averiguar a progressão das alterações principalmente em situações de temperatura ambiente (controle), onde será possível observar a degradação pulpar e de tecido periodontal. O período da reabsorção total do cimento também pode ser oportuno para estimativa do IPM_{mín}, principalmente em dentes submersos e inumados.

Cabe ressaltar que o intuito deste trabalho foi simular situações em que fossem encontrados dentes avulsos em situações forenses. No entanto, faz-se necessário frisar que estudos em cadáveres nessas situações podem fornecer dados mais fidedignos com a realidade, devido aos tecidos de proteção e sustentação que circundam o dente. No entanto, esta pesquisa se torna fundamental pois as regressões histológicas descritas nas situações forenses em seis meses são inéditas na literatura científica.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que características e parâmetros histológicos qualitativos e quantitativos de tecidos dentais foram observados para estimativa de IPM_{\min} em situações forenses. Em dentes submersos em água, o IPM_{\min} de três meses foi caracterizado pela contagem de fibras colágenas superior a 1300000 pixels, e em seis meses pela ausência de pré-dentina, ligamento periodontal e reabsorção parcial do cimento. Em dentes submetidos à simulação de inumação, o IPM_{\min} de três meses indicou a ausência de ligamento periodontal, reabsorção parcial do cimento e contagem de fibras colágenas da dentina acima de 800000 pixels; o IPM_{\min} de seis meses foi marcado pela ausência de remanescente pulpar e pré-dentina.

7 REFERÊNCIAS

ALLAM, F. A. F. A.; ALI, D. M.; ALI, S. F. E. S. Drowning versus postmortem submersion: Biochemical and histopathological examination and estimation of postmortem intervals (an experimental study). **Legal Medicine**, v. 59, 2022.

ALVAREZ-GARCÍA, A. *et al.* Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. **International Journal of Legal Medicine**, v. 109, n. 3, p. 125–9, 1996.

AMENDT, J. *et al.* Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. **International Journal of Legal Medicine**, v. 121, p. 90-104, 2007.

AVON, S.L. Forensic odontology: The roles and responsibilities of the dentist. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 70, n. 7, p. 453-8, 2004.

BAPTISTA, A. *et al.* Estimation of the post-mortem interval in human bones by infrared spectroscopy. **International Journal of Legal Medicine**, v. 136, p. 309-17, 2021.

BELCASTRO, G. *et al.* Application of Micro-Computed Tomography for the Estimation of the Post-Mortem Interval of Human Skeletal Remains. **Biology**, v. 11, n. 8, p. 1105, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012**. Brasília: Presidência da República. Disponível em: <https://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>. Acesso em: 13 de julho de 2022.

BIANCHI, I. *et al.* Dental DNA as an Indicator of Post-Mortem Interval (PMI): A Pilot Research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 12896, 2022.

BORGES, B. S. *et al.* Post-mortem interval and its relation with the RNA degradation in the dental pulp in submerged teeth. **Arab Journal of Forensic Sciences & Forensic Medicine**, v. 3, n. 1, p. 68–76, 2021.

CAPPELLA, A. *et al.* The comparative performance of PMI estimation in skeletal remains by three methods (C-14, luminol test and OHI): analysis of 20 cases. **International Journal of Legal Medicine**, v. 132, p. 1215-24, 2018.

CARRASCO, P. A. *et al.* Histological transformations of the dental pulp as possible indicator of post mortem interval: a pilot study. **Forensic Science International**, v. 279, p. 251–257, 2017.

CATTANEO, C. Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. **Forensic Science International**, v. 165, n. 2–3, p. 185–193, 2007.

DARUGE, E.; DARUGE-JÚNIOR, E.; FRANCESQUINI-JÚNIOR, L. **Tratado de Odontologia Legal e Deontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 740-69, 2019.

DEMARCHI, B. *et al.* Protein sequences bound to mineral surfaces persist into deep time. **eLife**, v. 5, p. e17092, 2016.

DONNO, A. *et al.* Spectrophotometric analysis of post-mortem lividity: A new objective measure to define time of death. **Forensic Science International**, v. 340, p. 111422, 2022.

DRANCOURT, M. *et al.* Dental pulp as a source of low-contaminated DNA. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 63-7, 2017.

EMBRAPA SOLOS. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS)**. Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/solos/sibcs>. Acesso em: 14 de mar. de 2023.

FORREST, A. Forensic odontology in DVI: current practice and recent advances. **Forensic Sciences Research**, v. 4, n. 4, p. 316–30, 2019.

França GV. **Medicina legal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GARRIDO, R. G.; NAIA, M. J. T. Cronotanatognose: a influência do clima tropical na determinação do intervalo post-mortem. **Lex Humana**, v. 6, n. 1, p. 180-95, 2014.

GIL-BONA, A.; BIDLACK, F. B. Tooth enamel and its dynamic protein matrix. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1–25, 2020.

GREENE, K. S.; ALYS, L. **Missing Persons: A handbook of research**. New York: Routledge, p. 188-99, 2017.

HELFMAN, P. M.; BADA, J. L. Aspartic acid racemisation in dentine as a measure of ageing. **Nature**, v. 262, p. 5566, p. 279-81, 1976.

HINCHLIFFE, J. Forensic odontology, part 2. Major disasters. **British Dental Journal**, v. 210, n. 6, p. 269-74, 2011.

INTERNACIONAL CRIMINAL POLICE ORGANIZATION (INTERPOL). **Disaster victim identification**. Lyon: INTERPOL DVI guide, annexure 12, 2018. Disponível em: <<https://www.interpol.int/How-we-work/Forensics/Disaster-Victim-Identification-DVI>>. Acesso em: 17 de julho de 2022.

JANG, T. H. *et al.* Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, v. 6, n. 1, p. 12-8, 2017.

KHAN, M. I. *et al.* Tooth decalcification: A correlation between weight loss in a decalcified tooth with different decalcifying agents. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 12, p. 748-52, 2022.

KOTCHETKOFF-HENRIQUES, O.; JOLY, C. A.; BERNACCI, L. C. Relação entre o solo e a composição florística de remanescentes de vegetação natural no Município de Ribeirão Preto, SP. **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, n. 3, p. 541-62, 2005.

KULSHRESTHA, P.; CHANDRA, H. Time since death. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 8, p. 233-8, 1987.

LATTOUF, R. *et al.* Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 751-8, 2014.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 6^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. 9^a ed., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

MACLAUGHLIN-BLACK, S. M. *et al.* Strontium-90 as an indicator of time since death: A pilot investigation. **Forensic Science International**, v. 57, n. 1, p. 51–56, 1992.

MAHALAKSHMI, V. *et al.* Assessment of histological changes in antemortem gingival tissues fixed at various time intervals: A method of estimation of postmortem interval. **Journal of Forensic Dental Sciences**, v. 8, n. 2, p. 114, 2016.

MALAVAR, P. C.; YUNIS, J. J. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. **Croatian Medical Journal**, v. 44, n. 3, p. 306–9, 2003.

MANOILESCU, I.; ION, A.; IOAN BG. Post-mortem changes in teeth- forensic

issues. **International Journal of Medical Dentistry**, v. 5, n. 4, p. 249-51, 2015.

MAZZONI, A. *et al.* Role of Dentin MMPs in Caries Progression and Bond Stability. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 2, p. 241-51, 2015.

MÉGNIN, J. P. **La faune des cadavres-application de l'entomologie a la médecine légale**. Paris: Gauthier-Villars et fils, 1894.

MEGYESI, M. S.; NAWROCKI, S. P.; HASKELL, N. H. Using accumulated degree-days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains. **Journal of Forensic Science**, v. 50, p. 1–9, 2005.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, p. 728-41, 2011.

MENON, L. M. L.; PRADO, K. F. B.; SILVA, R. H. A. Avaliação histológica da dentina e do cimento após diferentes tempos de inumação: estudo in vitro. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 8, n. 2, p. 131-7, 2011.

MOORE, H. E.; ADAM, C. D.; DRIJFHOUT, F. P. Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using "fingerprint" cuticular hydrocarbon analysis. **Forensic Science International**, v. 240, p. 48-53, 2014.

MONTELIUS, K.; LINDBLOM, B. DNA analysis in disaster victim identification. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 8, n. 2, p. 140–7, 2012.

NAKAMURA, T. *et al.* Autophagy facilitates type I collagen synthesis in periodontal cells. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1291, 2021

NANCI, A. **Ten Cate's oral histology: development, structure, and function**. 9^a ed., St. Louis, Missouri: Elsevier, p. 373-7, 2018.

PEROTTI, M.A. Mégnin re-analysed: the case of the newborn baby girl. **Experimental and Applied Acarology**, v. 49, p. 37–44, 2009.

PRIETO-BONETE, G.; PEREZ-CARCELES, M. D.; LUNA, A. Morphological and histological changes in eye lens: Possible application for estimating postmortem interval. **Legal Medicine**, v. 17, n. 6, p. 437–442, 2015.

PROCOPIO, N. et al. Forensic proteomics for the evaluation of the post-mortem decay in bones. **Journal of Proteomics**, v. 177, p. 21–30, 2018.

REESU, G. V.; AUGUSTINE, J.; URS, A. B. Forensic considerations when dealing with incinerated human dental remains. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 29, p. 13–17, 2015.

REVISÃO da lei de parcelamento, uso e ocupação do solo. Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, 2019. Disponível em:

<https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/files/splan/planod/solo-produto-4.pdf>.

Acesso em: 14 de mar. de 2023.

RISTOVA, M.; JOSHEVA, D.; BROZEK-MUCHA, Z. Dental cementum examination with SEM/EDX for unraveling details along the lifeline to assist identification of a female individual. **Forensic Science International**, v. 330, p. 111103, 2022.

SIMIONE, F.P. Key issues relating to the genetic stability and preservation of cells and cell banks. **Journal of Parenteral Science and Technology**, v. 46, n. 6, p. 226–32, 1992.

SZELECZ, I. *et al.* The importance of *Saprinus semistriatus* (Coleoptera: Histeridae) for estimating the minimum post-mortem interval. **Legal Medicine**, v. 30, p. 21-7, 2017.

SZELECZ, I. *et al.* Comparative analysis of bones, mites, soil chemistry, nematodes and soil micro-eukaryotes from a suspected homicide to estimate the post-mortem interval. **Scientific Reports**, v. 8, n. 25, p. 1-14, 2018.

TEIXEIRA, P. C. *et al.* **Manual de métodos de análise de solo**. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

TINOCO, R. L. R. Identidade e Identificação Humana. *In:* DARUGE, E.; DARUGE-JÚNIOR, E.; FRANCESQUINI-JÚNIOR, L. **Tratado de Odontologia Legal e Deontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 353-69, 2019.

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

UBELAKER, D. H.; WU, Y. Fragment analysis in forensic anthropology. **Forensic Sciences Research**, v. 5, n. 4, p. 260-5, 2020.

VAVPOTIČ, M.; TURK, T.; MARTINČIČ, D.Š.; BALAŽIĆ, J. Characteristics of the number of odontoblasts in human dental pulp post-mortem. **Forensic Science International**, v. 193, n. 1–3, p. 122–6, 2009.

WANG, Z. *et al.* Advances in artificial intelligence-based microbiome for PMI estimation. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1034051, 2022.

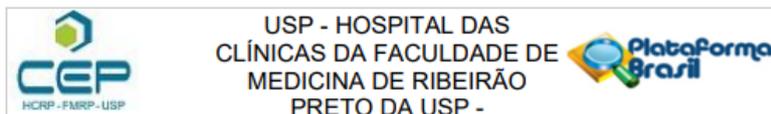
WURMB-SCHWARK, N. VON *et al.* Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones. **Legal Medicine**, v. 5, p. 169–72, 2003.

YOUNG, S. T. *et al.* Estimating postmortem interval using RNA degradation and morphological changes in tooth pulp. **Forensic Science International**, v. 229, n. 1–3, p. 163-6, 2013.

YADAV, A. B. *et al.* Histological assessment of cellular changes in postmortem gingival specimens for estimation of time since death. **The Journal of Forensic Odonto-stomatology**, v. 33, n. 1, p. 19, 2015.

8 APÊNDICES

Apêndice A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INTERVALO POST MORTEM SOB SIMULAÇÕES DE CONDIÇÕES FORENSES POR UM PERÍODO DE 6 MESES

Pesquisador: CINDY MAKI SATO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46694021.7.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.748.841

Apresentação do Projeto:

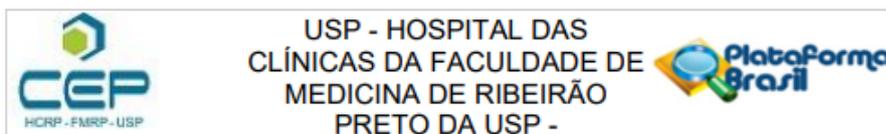
Os autores pretendem avaliar as condições de dentes (terceiro molar de 36 participantes) que deverão ser submetidos a extração para outros fins, expostos a condições adversas, como a imersão no lago do campus da USP, por até 6 meses, para simular as condições de cadáveres encontrados e que têm de ser identificados. Segundo os autores, a polpa dentária oferece condições favoráveis de conservação de células e do DNA, que pode ser explorada na medicina forense.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar, in vivo, terceiros molares recém-extraídos e seus tecidos (esmalte e complexo dentino-pulpar), no tocante à relação de alterações teciduais e a degradação do núcleo, odontoblastos e outros tipos celulares, bem como seus arranjos e características de túbulos dentinários, assim como observar o tempo de mudança do padrão de bactérias residentes durante 6 meses em situações simuladas de inumação e submersão, afim de estimar o tempo decorrido desde a sua extração – simulando, no estudo, a morte do indivíduo em condições adversas.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.748.841

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Realizada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os autores obtiveram a concordância do Biobanco de Dentes Humanos da FORP-USP para o fornecimentos dos dentes para o estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória constam do protocolo de pesquisa.

Consta ainda do protocolo TCLE elaborado pelo biobanco que fornecerá as amostras dos dentes.

Recomendações:

A liberação dos dentes pelo Biobanco, sem consultar o doador para novo consentimento, está restrita àqueles que optaram por não ser consultados a cada projeto de pesquisa, do contrário, o doador do dente terá de ser consultado sobre a eventual doação para essa pesquisa

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como demais documentos, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

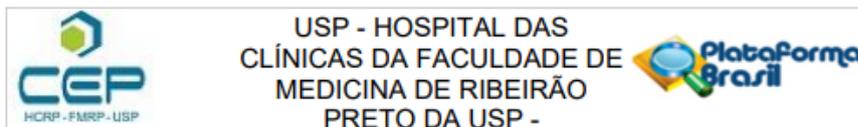
Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|-----------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1716411.pdf | 11/05/2021 16:49:07 | | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Declaracao_Biobanco_CINDY.pdf | 11/05/2021 16:48:14 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_de_Pesquisa_CINDY.pdf | 10/05/2021 21:57:25 | CINDY MAKI SATO | Aceito |

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.748.841

| | | | | |
|---|------------------------------------|------------------------|-----------------|--------|
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Biobanco.pdf | 10/05/2021 21:57:03 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Outros | Dispensa_CINDY.pdf | 06/05/2021 11:14:42 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_Rosto.pdf | 09/04/2021 12:47:02 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Declaração do Patrocinador | Carta_de_Doacao_JOAOPAULOMISSA.pdf | 29/03/2021 13:40:43 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Orçamento | Orcamento.pdf | 29/03/2021 13:40:29 | CINDY MAKI SATO | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

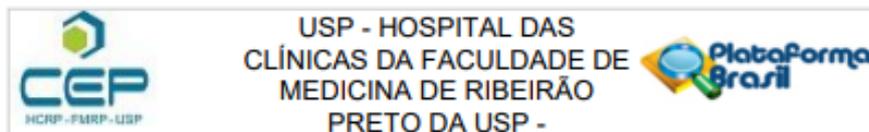
Não

RIBEIRAO PRETO, 01 de Junho de 2021

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Apêndice B – Emenda do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: INTERVALO POST MORTEM SOB SIMULAÇÕES DE CONDIÇÕES FORENSES POR UM PERÍODO DE 6 MESES

Pesquisador: CINDY MAKI SATO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46694021.7.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.114.461

Apresentação do Projeto:

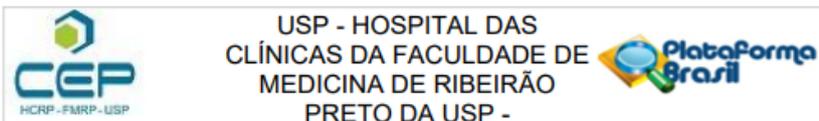
Trata-se de EMENDA ao projeto de pesquisa conforme documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1849924_E1.pdf de 11/11/2021.

JUSTIFICATIVA DA EMENDA:

Meu nome é Cindy Maki Sato, sou mestranda em Patologia Experimental pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal (FMRP), orientada pelo prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa (FORP).

O presente documento refere-se ao projeto, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HCFMRP-USP, com o objetivo de estimar o intervalo post mortem sob condições forenses (de inumação e submersão) utilizando dentes. No projeto inicial, consta-se: "A amostra de análise neste tópico divide-se em N=36 (3 elementos para 3 situações, em 4 períodos de tempo) terceiros molares, extraídos com indicação terapêutica." No entanto, com a retomada de atividades presenciais de cursos de especialização, houve o aumento de cirurgias de 3° molares. Sendo assim, com o intuito de aumentar o poder estatístico da amostra e com resultados mais embasados, o presente documento tem o objetivo de alterar a amostra para N=130. Sendo que 100 serão destinados à análise (controle: 10; mês 1: 30 (3 situações); mês 2: 30 (3 situações) e; mês 3: 30 (3 situações)) e outros 30 elementos para testes

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



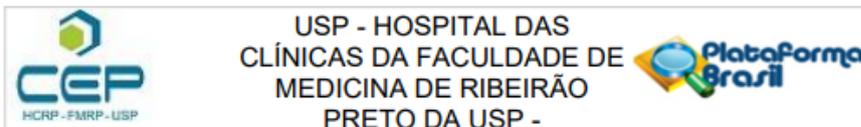
Continuação do Parecer: 5.114.461

(técnica de desmineralização, coloração e cortes) e reservas. As 3 situações mencionadas são: in situ, inumação e submersão. Os dentes serão doados pelo Biobanco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP). Ademais, as situações de submersão e inumação serão realizadas no Lago do Viveiro de Mudas do Campus da Universidade. Anteriormente, o projeto de pesquisa constava que seria realizado no Lago do Campus, no entanto, com a infestação de carrapato estrela e, com a disponibilidade de ser realizado no Viveiro de Mudas, local monitorado 24 horas pela Guarda Universitária, decidiu-se modificar a localização das situações.

RESUMO DO PROJETO DE PESQUISA

Seguindo os protocolos da Organização Internacional de Polícia Criminal (INTERPOL) para identificação de vítimas de desastres em massa, tanto naturais como aqueles decorrentes de falhas humanas e mecânicas, a Odontologia é de fundamental importância para identificação de vítimas, bem como em casos isolados, quando são encontradas inumadas ou em meios aquáticos, e os corpos já se encontram em um avançado estado de putrefação, em virtude do meio e sua biodiversidade. O uso de elementos dentais para a identificação humana se deve a alta resistência do esmalte dentário, sendo esta a estrutura mais mineralizada e resistente do corpo humano. Devido à sua alta resistência e proteção, o complexo dentinopulpar se mantém como uma fonte adequada de DNA para pesquisa, dado que os odontoblastos se preservam mesmo no período post mortem. Sendo assim, a utilização da biologia molecular para análise e quantificação das células presentes, mais especificamente os odontoblastos no complexo dentino-pulpar, podem apresentar evidências para a estimativa de tempo decorrido após o acidente, podendo direcionar e auxiliar na resolução de questões jurídicas e conhecimento dos fatos. O presente trabalho visa acompanhar e analisar 100 amostras de terceiros molares hígidos, com ápices completamente formados e com indicação terapêutica de extração, em situações de inumação e afogamento no lago do Viveiro de Mudas da Universidade de São Paulo (USP) em Ribeirão Preto - São Paulo. Seguir-se-á pelo período de tempo de 24 horas, sendo 10 elementos para amostra controle, num período de tempo de até um dia (tempo 0). Após serão analisados o primeiro (tempo 1), terceiro (tempo 2) e sexto mês (tempo 3), com 30 amostras para cada mês (10 submersos, 10 inumados e 10 in situ), com o intuito de direcionar o conhecimento dos fatos em relação ao tempo desde o desastre. Espera-se dos resultados de elementos em tais condições adversas a mudança no padrão dos odontoblastos, tanto em sua morfologia, como em seu número com o decorrer do tempo em relação à amostra controle, devido ao processo natural de degradação e também pela ação dos microorganismos presentes em cada situação adversa. Serão observados o processo de autólise do

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 5.114.461

núcleo, o padrão de bactérias e microrganismos presentes nos túbulos dentinários e análise do padrão de fibras colágenas.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1849924_E1.pdf de 11/11/2021

Objetivo Primário:

Avaliar, in vivo, terceiros molares recém-extraídos e seus tecidos (esmalte e complexo dentino-pulpar), no tocante à relação de alterações teciduais e a degradação do núcleo, odontoblastos e outros tipos celulares, bem como seus arranjos e características de túbulos dentinários, assim como observar o tempo de mudança do padrão de bactérias residentes durante 6 meses em situações simuladas de inumação e submersão, afim de estimar o tempo decorrido desde a sua extração – simulando, no estudo, a morte do indivíduo em condições adversas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1849924_E1.pdf de 11/11/2021

Riscos:

O projeto não possui nenhum tipo de desconforto ou riscos a nenhum dos envolvidos, visto que, será realizado apenas a partir de dentes previamente diagnosticados e indicados para extração terapêutica.

Benefícios:

A estimativa do intervalo após a morte por meio de remanescentes dentais de um desastre auxilia na solução de casos. Nesse contexto, faz-se necessário o emprego de novas técnicas, como o uso da biologia molecular na prática pericial. O desenvolvimento em pesquisa na estrutura do complexo dentino-pulpar poderá auxiliar na estimativa de tempo decorrido após um acidente ou homicídio em tentativa de omitir o corpo do cadáver em rios, lagos e até mesmo sob o solo. Assim, estudos mais representativos envolvendo o processo de decomposição das estruturas dentais, com simulação de situações forenses, pode melhorar a estimativa do período post mortem do indivíduo, direcionando as buscas para resolução de questões jurídicas. Portanto, pesquisas carecem de serem realizadas, visto que na literatura científica a representação de incubação de dentes em situações forenses é brevemente relatada. Estudos que buscam novos métodos devem ser executados a fim de avançar e acrescentar para o

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.114.461

campo forense, além de permitir a devolução correta de remanescentes mortais aos entes queridos da vítima.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1849924_E1.pdf de 11/11/2021.

EMENDA

Meu nome é Cindy Maki Sato, sou mestranda em Patologia Experimental pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal (FMRP), orientada pelo prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa (FORP).

O presente documento refere-se ao projeto, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HCFMRP-USP), com o objetivo de estimar o intervalo post mortem sob condições forenses (de inumação e submersão) utilizando dentes.

No projeto inicial, consta-se: "A amostra de análise neste tópico divide-se em N=36 (3 elementos para 3 situações, em 4 períodos de tempo) terceiros molares, extraídos com indicação terapêutica." No entanto, com a retomada de atividades presenciais de cursos de especialização, houve o aumento de cirurgias de 3° molares.

Sendo assim, com o intuito de aumentar o poder estatístico da amostra e com resultados mais embasados, o presente documento tem o objetivo de alterar a amostra para N=130. Sendo que 100 serão destinados à análise (controle: 10; mês 1: 30 (3 situações); mês 2: 30 (3 situações) e; mês 3: 30 (3 situações)) e outros 30 elementos para testes (técnica de desmineralização, coloração e cortes) e reservas. As 3 situações mencionadas são: in situ, inumação e submersão.

Os dentes serão doados pelo Biobanco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP). Ademais, as situações de submersão e inumação serão realizadas no Lago do Viveiro de Mudas do Campus da Universidade. Anteriormente, o projeto de pesquisa constava que seria realizado no Lago do Campus, no entanto, com a infestação de carrapato estrela e, com a disponibilidade de ser realizado no Viveiro de Mudas, local monitorado 24 horas pela Guarda Universitária, decidiu-se modificar a localização das situações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos da emenda foram devidamente apresentados ao CEP, são eles:

| | | |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO | | |
| Bairro: MONTE ALEGRE | | CEP: 14.048-900 |
| UF: SP | Município: RIBEIRAO PRETO | |
| Telefone: (16)3602-2228 | Fax: (16)3633-1144 | E-mail: cep@hcrp.usp.br |



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.114.461

- Emenda1.pdf;
- Oficio_ViveirodeMudas.pdf;
- Declaracao_Biobanco.pdf;
- Projeto_de_Pesquisa_CINDY.pdf.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, a EMENDA submetida em 11/11/2021, assim como o Projeto de pesquisa Versão 2 – 09/11/2021, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda ao Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---------------------------------------|------------------------|-----------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1849924_E1.pdf | 11/11/2021 16:31:44 | | Aceito |
| Outros | Emenda1.pdf | 11/11/2021 16:30:16 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Declaração de concordância | Oficio_ViveirodeMudas.pdf | 11/11/2021 16:25:11 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Declaracao_Biobanco.pdf | 11/11/2021 16:24:55 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_de_Pesquisa_CINDY.pdf | 11/11/2021 16:22:01 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaderosto_atual.pdf | 03/11/2021 16:05:22 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / | TCLE_Biobanco.pdf | 10/05/2021 21:57:03 | CINDY MAKI SATO | Aceito |

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.114.461

| | | | | |
|----------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------|--------|
| Justificativa de Ausência | TCLE_Biobanco.pdf | 10/05/2021 21:57:03 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Outros | Dispensa_CINDY.pdf | 06/05/2021 11:14:42 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Declaração do Patrocinador | Carta_de_Doacao_JOAOPAULOMISSA.pdf | 29/03/2021 13:40:43 | CINDY MAKI SATO | Aceito |
| Orçamento | Orçamento.pdf | 29/03/2021 13:40:29 | CINDY MAKI SATO | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 19 de Novembro de 2021

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Apêndice C – Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
BIOBANCO DE DENTES HUMANOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Biobanco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, convida você _____, natural de _____, nascido em ___/___/___, sexo _____ residente à _____, telefone (____) _____ portador(a) do RG _____, a consentir (concordar) que o(s) dente(s) extraído(s) _____, com grau de irrupção _____ por indicação terapêutica (incluso ou irrompido)

(tratamento) para a melhoria de sua saúde, como documentado em seu prontuário, possa(m) ser coletado(s) e armazenado(s) para ser(em) utilizado(s) pelos alunos desta Faculdade em treinamento(s) pré-clínico(s) e/ou pesquisa(s). O(s) dente(s) será(ão) armazenado(s) individualmente e identificado(s) por códigos, garantindo o seu anonimato. Não sendo de sua vontade concordar com a coleta do(s) dente(s) extraído(s), você não sofrerá nenhum prejuízo ou penalidade. A utilização deste(s) dente(s) em pesquisa(s) deverá ser previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, sendo sua identidade preservada na divulgação.

Solicito que manifeste o seu desejo quanto às seguintes alternativas:

- () I- Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa
() II- Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa

A utilização do(s) dente(s) armazenado(s) será para aprimoramento de técnicas (tipos de tratamentos) e materiais empregados nas diversas áreas da Odontologia. Para conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do(s) dente(s) armazenado(s), você poderá entrar em contato com o Biobanco de Dentes Humanos da FORP-USP, localizado à Avenida do Café s/n, bairro Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP, telefone (16) 3315-0274, atendimento de segunda à sexta-feira, das 8h às 12h e das 13h às

| | | | |
|--------------|-------------|-------------|-------------------------|
| | | | |
| Participante | Responsável | Pesquisador | Supervisor Banco Dentes |

17h. Em casos onde houver implicações com os participantes da pesquisa, o Biobanco juntamente com o Comitê de Ética alertarão ao responsável pela pesquisa da necessidade de informar aos participantes da pesquisa a respeito dos resultados obtidos. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir de pesquisa(s) poderão ser utilizados em pesquisas futuras.

A retirada do consentimento de utilização do(s) dente(s) poderá ser realizada por escrito, a qualquer momento, desde que não tenha ocorrido sua destruição, sem prejuízo(s) ou penalidade(s) em caso de sua desistência. O prazo de armazenamento do(s) dente(s) é indeterminado. Caso ocorra transferência do(s) dente(s) armazenado(s) entre Biobancos, sempre que possível, você será comunicado.

O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão institucional, com o objetivo de avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, a fim de garantir a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do(s) participante(s) da(s) pesquisa(s), localizado à Avenida do Café s/n, bairro Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP, telefone (16) 3315-0493, atendimento de segunda à sexta-feira, das 13h às 17h, endereço eletrônico cep@forp.usp.br

Obrigado por ler e/ou ouvir estas informações. Se quiser consentir (concordar) que o(s) dente(s) extraído(s) possa(m) ser empregado(s) em pesquisa(s), assine este Termo de Consentimento e, no caso de menores, também o Termo de Assentimento e devolva-o(s) ao Biobanco de Dentes Humanos.

Este Termo deverá ser assinado em duas vias idênticas, sendo uma retida pelo participante da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada no Biobanco.

Nome do consentidor ou responsável: _____
Assinatura _____ Data: _____

Nome da criança/adolescente : _____
Assinatura _____ Data: _____

Nome da pessoa que obteve o consentimento: _____
Assinatura _____ Data: _____

Nome do Supervisor do Biobanco: _____
Assinatura _____

Apêndice D – Solicitação de acesso às dependências do Viveiro de Mudas e execução da pesquisa



OFÍCIO

SOLICITAÇÃO DE MUDANÇA DE LOCAL PARA PESQUISA

À Prefeitura do Campus USP de Ribeirão Preto

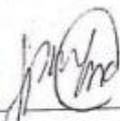
Eu, Prof. Dr. **João Paulo Mardegan Issa**, docente do Departamento de Biologia Básica e Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), a aluna, **Cindy Maki Sato**, mestranda na área de Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal, pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), sob minha orientação, e Dr. **Dimitrius Leonardo Pitol**, técnico do Laboratório de Pesquisas Morfológicas do Departamento de Biologia Básica e Oral, pesquisador participante, vimos, por meio deste, solicitar o acesso ao **VIVEIRO DE MUDAS**, localizado no campus da Universidade, para fins de pesquisa do projeto intitulado "INTERVALO POST MORTEM SOB SIMULAÇÕES DE CONDIÇÕES FORENSES POR UM PERÍODO DE 6 MESES".

O presente projeto previamente possuía autorização para adentrar às dependências do Lago da USP (Anexo 1). Entretanto, com a infestação de carrapato estrela e ainda, possíveis intervenções e manuseamento nos materiais da pesquisa – por se tratar de um local aberto e onde, possivelmente, há pesca clandestina; considerando também a disponibilidade do Lago do Viveiro de Mudas pelo técnico agrícola responsável, **Antônio Justino da Silva**, o presente documento visa requisitar o acesso ao local supracitado.

Declaramos que a pesquisadora tem ciência a respeito de uso de E.P.I.'s (equipamento de proteção individual) ao adentrar a área do Viveiro de Mudas.

Diante o exposto, solicitamos a apreciação, autorização, acesso e uso das dependências do Viveiro de Mudas USP Ribeirão Preto.

Ribeirão Preto, 04 de novembro de 2021



Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa
Departamento de Biologia Básica e Oral
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto



Antonio Justino da Silva
Técnico Agrícola
Comissão de Meio Ambiente