



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FORENSI
Coordinatore: Prof. Giovanni Arcudi

XIX ciclo

**Utilizzabilità dei denti come
matrice alternativa nelle indagini
tossicologiche forensi**

Dottorando
Dott. Gianni Pecorilli

Docente Guida/Tutor:
Dott.ssa Valeria Ottaviano

Introduzione

Le matrici biologiche, sulle quali viene effettuata la ricerca tossicologica, possono essere distinte in “convenzionali” o classiche e “non convenzionali”.

Le prime sono costituite da fluidi biologici quali il sangue e l’urina (nel cadavere si possono prelevare anche la bile e l’umor vitreo), substrati oramai universalmente utilizzati e sui quali vi è ampia convergenza sia nell’approccio analitico - metodologico, sia nell’interpretazione dei risultati.

Tra le matrici non convenzionali si annoverano invece le formazioni cheratiniche, la saliva ed il sudore.

La scelta, quando possibile, del campione biologico sul quale eseguire la ricerca è vincolata sia dalla disponibilità del campione, che dalla finalità dell’accertamento.

Quando si utilizza il sangue le informazioni che si ottengono, sono essenzialmente quelle della “attualità d’uso” di

una determinata sostanza; condizione richiesta specificatamente in molti dispositivi legislativi per l'applicazione delle relative sanzioni.

Il problema principale del prelievo ematico è costituito dalla sua invasività, che impone ovvie limitazioni di utilizzazione.

L'urina è a sua volta molto utile quando l'obiettivo dell'indagine sia quello di verificare, ad esempio, se un soggetto abbia fatto uso di una o più sostanze, in un intervallo cronologico più ampio rispetto a quanto dimostrabile dal campione ematico.

Un risultato positivo nell'urina, infatti, indica che vi è stata assunzione o somministrazione o esposizione ad una certa sostanza ma non dà informazioni sullo stato "attuale" del soggetto.

Il prelievo dell'urina è semplice, non invasivo e consente di ottenere grandi volumi di campione con elevate concentrazioni

delle sostanze indagate e dei loro metaboliti, grazie ai fenomeni di filtrazione e concentrazione renale.

Limiti di tale matrice sono la possibilità di facile adulterazione del campione, attraverso ad esempio la diluizione e/o l'uso di sostanze mascheranti e sostanze interferenti.

I risultati ottenuti, inoltre, come già sopra riportato, non sono correlabili alla concentrazione ematica né, quindi, alle manifestazioni clinico - sintomatologiche del soggetto assuntore.

Tra le matrici cosiddette alternative, le formazioni pilifere sono di larga utilizzazione in tossicologia forense, in quanto permettono, con le dovute cautele, di ottenere informazioni di tipo "storico" relativamente alle abitudini tossicomane di un soggetto.

Analogamente stanno trovando le indagini sulle unghie che, sia pure orientativamente, consentono di attestare un uso di sostanze pregresso e più o meno continuato.

Recentemente sono stati avviati numerosi studi al fine di valutare la possibilità di effettuare analisi chimico - tossicologiche sulla saliva.

Infine, una ricerca sperimentale pubblicata dall'Istituto Superiore di Sanità, ha fornito dati incoraggianti circa l'utilizzo dei denti in tossicologia forense.[1]

I denti, a motivo della loro precipua composizione che li rende particolarmente resistenti agli agenti aggressivi esterni ed al tempo sono, tra i resti scheletrici, quelli che si rinvencono con maggiore frequenza ed anche in migliore stato di conservazione.[2]

Si è pensato allora, di effettuare sui denti un particolare studio di ricerca, analogamente a quanto è stato fatto per le matrici cheratiniche, indirizzato a scoprire se in essi sia dimostrabile la deposizione di sostanze esogene, ad esempio droghe d'abuso come oppiacei e cocaina, al fine di capire se essi,

alla stregua delle unghie, dei capelli o dei peli, possano essere considerati degli organi di accumulo.

L'idea di studiare questa insolita matrice biologica per le indagini di laboratorio, scaturisce da due principali considerazioni: la prima, di carattere fisiologico, legata alla struttura dentaria ed al suo metabolismo; la seconda, di carattere clinico, suggerita dall'osservazione che i tossicodipendenti presentano generalmente un colore dei denti più scuro rispetto a quello della popolazione media di riferimento.

In merito alla prima delle due considerazioni sopra menzionate, si ricorda che i denti, sotto il profilo anatomico, sono costituiti da una “*porzione coronale*” - formata da uno strato esterno di smalto ed uno interno di dentina - e da una “*porzione radicolare*” - formata da uno strato esterno di cemento e da uno interno, sempre di dentina.(Fig. 1)

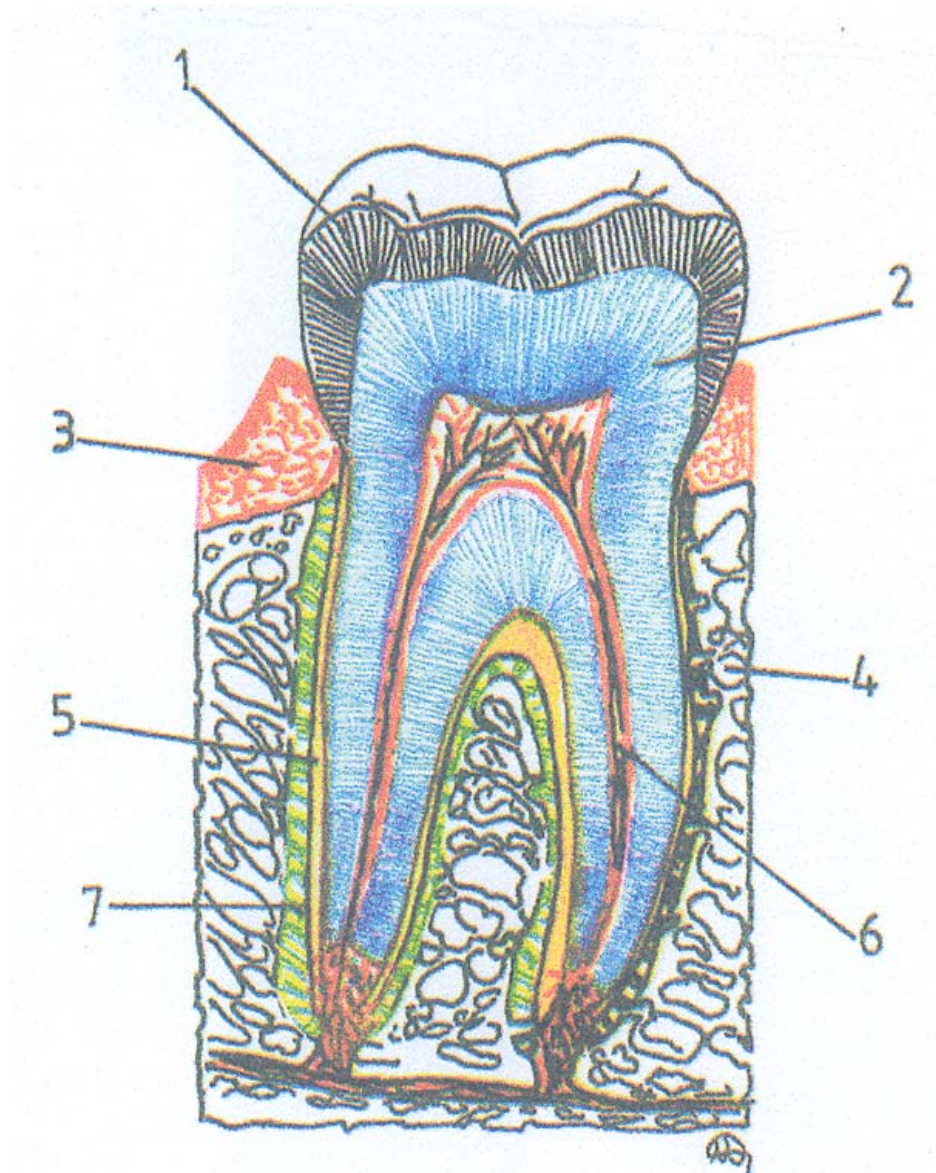


Fig. 1 - Dente e paradenzio:

- 1) Smalto; 2) Dentina; 3) Gengiva; 4) Osso Alveolare;
5) Cemento; 6) Polpa (nervi e vasi ematici); 7) Periodonto.

La dentina, che quindi rappresenta il nucleo dell'architettura dentale, forma una cavità centrale che racchiude la polpa dentaria, costituita a sua volta da vasi e nervi che provvedono al suo ricambio metabolico.

Attraverso il cosiddetto forame apicale, localizzato a livello della punta di ciascuna radice, i denti ricevono innervazione ed irrorazione sanguigna da un peduncolo neuro-vascolare, composto da una terminazione di tessuto nervoso, un'arteriola ed una venula.

Quindi anche i denti, e più precisamente la loro porzione dentinale, alla stregua di tutti gli altri organi e tessuti del corpo umano, sono soggetti ad un continuo ricambio metabolico, condizione essenziale per la loro vitalità.

Per quanto riguarda invece, la seconda considerazione che ha dato impulso alla presente indagine, ovvero l'osservazione clinico - odontoiatrica, questa ha evidenziato che la dentatura dei

tossicodipendenti, confrontata con quella di soggetti non facenti uso di sostanze stupefacenti, presenta un cromatismo tendente al giallo ocra.

I metodi di sbiancamento dentario solitamente impiegati nella pratica odontoiatrica nei casi di iper-pigmentazione dello smalto che utilizzano, ad esempio, il perossido di carbamide o il perossido di idrogeno, non sortiscono alcun effetto sbiancante nei riguardi della dentatura dei tossicodipendenti.

Sulla scorta di tale osservazione, si è ipotizzato che il motivo di tale maggiore pigmentazione dei denti in questi soggetti e l'inefficacia dei trattamenti di sbiancamento, possano essere ricondotte a deposizioni di xenobiotici a livello degli strati sottostanti lo smalto, ovvero a livello della dentina che, come sopra menzionato, è soggetta ad un continuo "rifornimento" metabolico.

In conseguenza di quanto sopra, abbiamo voluto verificare sperimentalmente l'apporto vascolare di sostanze esogene e loro metaboliti a livello della polpa dentaria ed il loro eventuale accumulo nella dentina.

Ai fini di tale dimostrazione, si è provveduto a reperire denti molari in quanto, essendo dotati di una maggiore quota di dentina, avrebbero consentito un recupero eventuale di xenobiotici tale da escludere false negatività legate alla sensibilità analitica.

Sono stati quindi raccolti:

1. denti di soggetti viventi risultati all'anamnesi tossicodipendenti da cocaina, estratti ambulatorialmente con il consenso degli stessi, a causa di carie destruenti;
2. denti prelevati da cadaveri di soggetti che erano andati incontro all'exitus a causa di overdose di stupefacenti (confermata con indagini tossicologiche);

3. denti estratti da soggetti sicuramente non tossicodipendenti (controllo).

Materiali e metodi

Il materiale dentario è stato raccolto in sede ambulatoriale ed autoptica.

Le analisi sono state condotte presso il laboratorio di Tossicologia Forense dell'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" nel corso del XIX ciclo del dottorato di ricerca (anni 2003 – 2006).

Tutti i solventi ed i reagenti impiegati sono di grado di purezza analitico, in dotazione al laboratorio.

Le analisi sono state eseguite in gascromatografia-spettrometria di massa con apparecchiatura Agilent mod. 6890 – 5973.

I cromatogrammi sono stati acquisiti in scansione totale (*total ion*) in impatto elettronico con un range di masse da 40 m/z a 450 m/z.

Gli standard di riferimento utilizzati sono stati acquistati dalla ditta SIGMA – Aldrich e/o dalla ditta S.A.L.A.R.S.

Preparazione dei campioni

Sono stati raccolti 5 denti estratti da tossicodipendenti, 2 denti prelevati da cadaveri per i quali era richiesto l'esame tossicologico e 5 denti di pazienti sicuramente non tossicodipendenti, utilizzati come controllo.

Le estrazioni sono state eseguite in anestesia locale utilizzando infiltrazione di mepivacaina o articaina; in alcuni casi l'anestesia plessica è stata preceduta da spray di lidocaina come anestetico di superficie.

Ciascun elemento dentario, dopo l'estrazione, è stato messo in contenitore chiuso con alcol etilico assoluto o, nel caso dei reperti autoptici, alcol etilico denaturato.

Tale procedura è stata effettuata al fine di precipitare e rimuovere la polpa dentaria che, essendo costituita da elementi vascolari, avrebbe potuto inficiare l'interpretazione dei risultati analitici.

Sono stati analizzati, separatamente, i singoli elementi dentari e le rispettive soluzioni alcoliche di conservazione.

Per l'analisi, queste ultime sono state evaporate a secco, in corrente di azoto, a temperatura ambiente ed il residuo è stato ripreso con 100 μ l di metanolo per essere sottoposto ad analisi mediante gascromatografia - spettrometria di massa.

I denti, invece, preventivamente trattati con ultrasuoni per eliminare il tartaro eventualmente presente e residui esterni di placca batterica e sangue, sono stati lavati singolarmente con

soluzione di ipoclorito di sodio al 5% su vortex e sciacquati con acqua corrente a 35°C .

Dopo asciugatura in stufa a 86°C per 30 minuti, ciascuno è stato pesato e quindi tritato, dapprima grossolanamente e, successivamente polverizzato mediante “ball-mill” (mulino a palle) per 3.5 minuti alla frequenza di 30/minuto (mixer mill MM 200, Retsch, GmbH & Co., Haan, Germany).

Il materiale polverizzato, nuovamente pesato, è stato sottoposto a digestione/estrazione mediante soluzione di HCl 0,1M e, dopo mescolamento su vortex, è stato tenuto in stufa a 56°C per una notte.

Le soluzioni acide risultanti dalla digestione sono state tamponate a pH6 con NaOH 1M e tampone fosfato 0,1M a pH6 per essere purificate mediante eluizione su fase solida utilizzando colonnine di estrazione Bon-Elut Certify da 130 mg e le

metodiche previste dalla casa costruttrice per l'estrazione della cocaina e suo metabolita.

Gli eluati sono stati evaporati a secco a temperatura ambiente, in corrente di azoto e sono stati ripresi con 50 μ l di BSTFA-1% TMCS per formare prodotti silil-derivati idonei alla rivelazione mediante spettrometria di massa.

Risultati

I pesi dei denti estratti, dopo decontaminazione sono riportati nella sottostante tabella 1.

Tabella n. 1: pesi in grammi dei denti molari dopo decontaminazione

Tossicodipendenti					Cadaveri		Controllo				
Td1	Td2	Td3	Td4	Td5	M1	M2	C1	C2	C3	C4	C5
1,24	0,97	1,34	1,18	1,53	1,67	1,75	1,81	1,46	1,82	1,78	1,65

Dopo la frammentazione e la polverizzazione, il materiale ha presentato, in media una perdita ponderale del 10%, come mostrato in tabella 2.

Tabella n. 2: pesi in grammi dei denti molari dopo polverizzazione

Tossicodipendenti					Cadaveri		Controllo				
Td1	Td2	Td3	Td4	Td5	M1	M2	C1	C2	C3	C4	C5
1,10	0,87	1,20	1,05	1,36	1,50	1,55	1,64	1,31	1,63	1,61	1,48

L'analisi mediante gascromatografia - spettrometria di massa delle soluzioni alcoliche di conservazione dei denti di tutti i soggetti viventi (positivi e controlli) ha mostrato la presenza di sostanze contenute nella polpa dentaria quali: caffeina, antiinfiammatori, lidocaina, mepivacaina ed articaina (queste ultime impiegate nella fase anestetica precedente l'estrazione del dente) (fig. n. 2 – 3 – 4).

Fig. 2

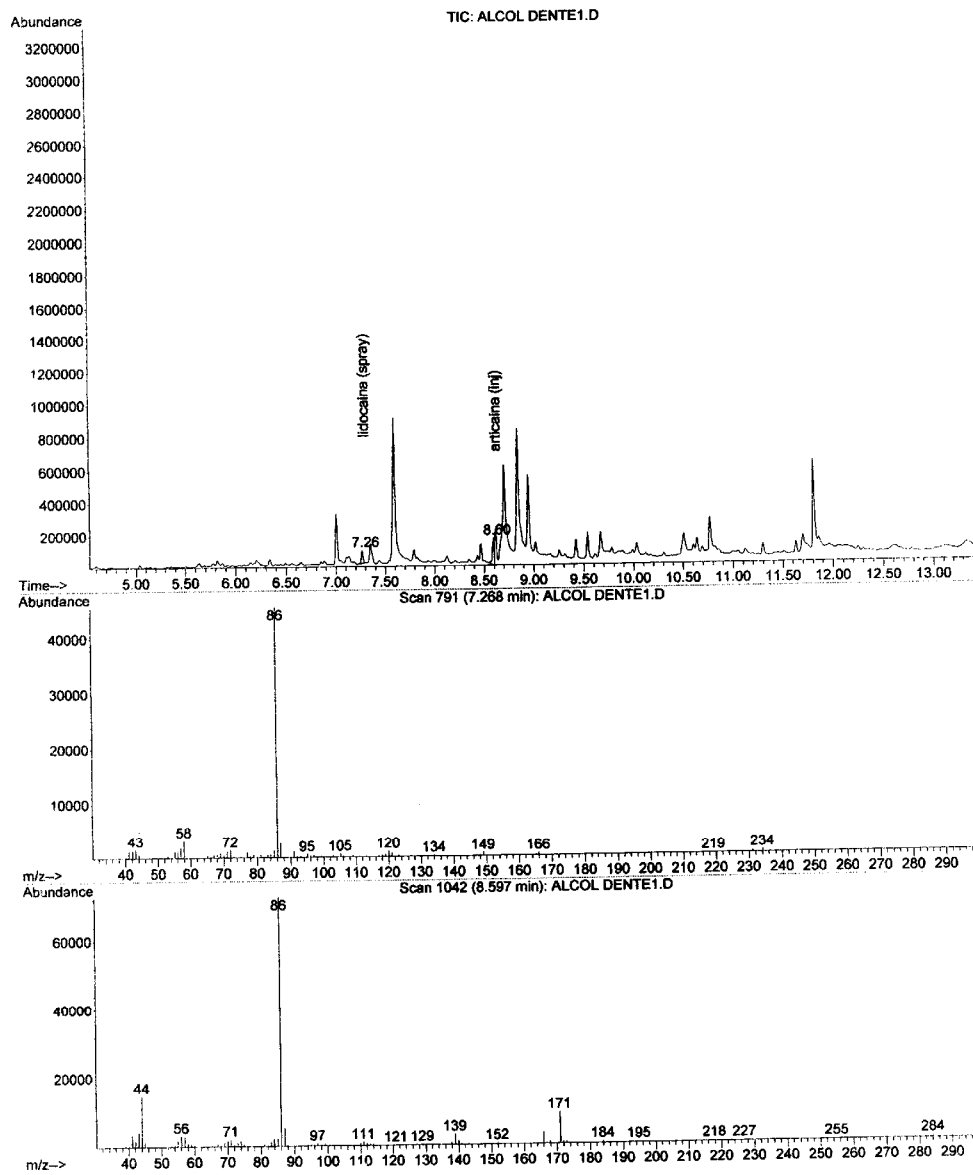


Fig. 3

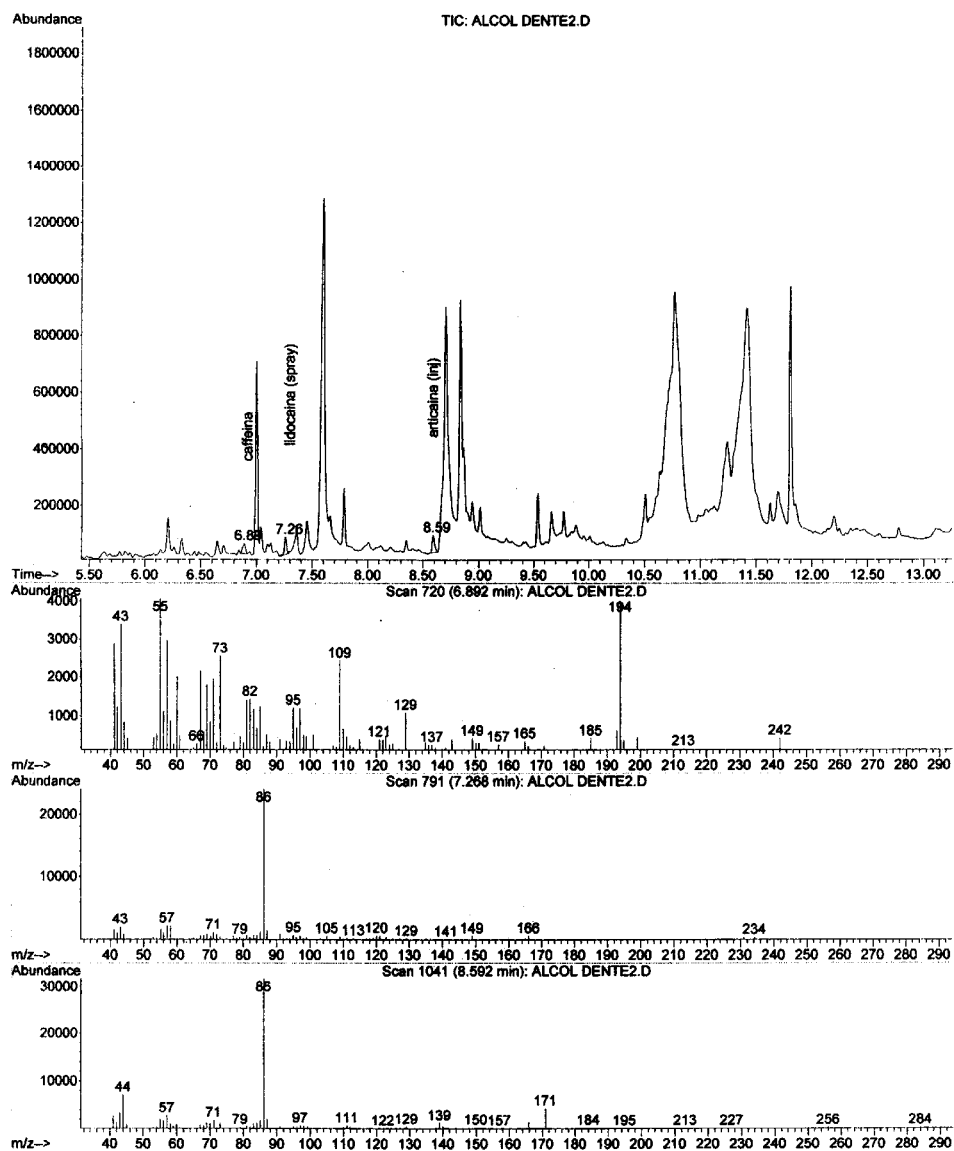
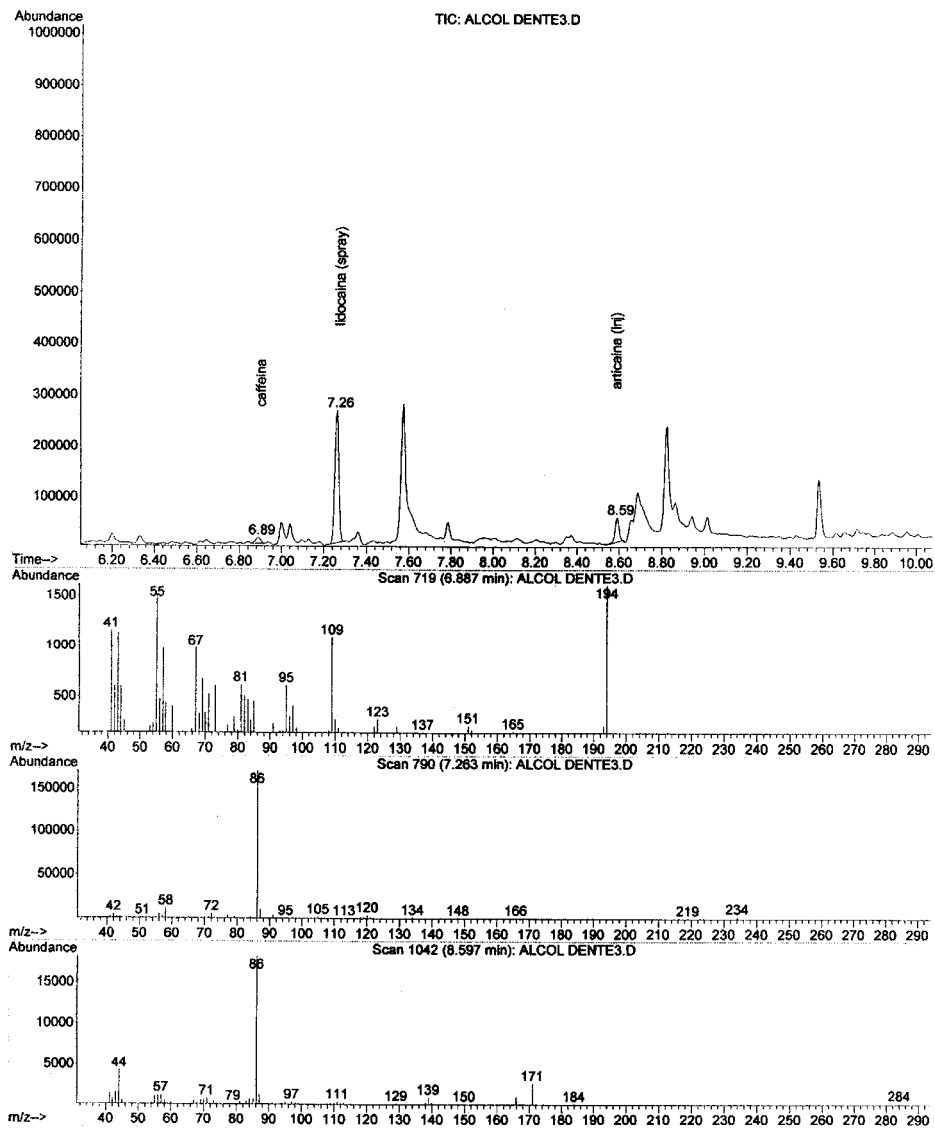


Fig. 4



Nei denti dei cinque soggetti con anamnesi positiva per uso di sostanze stupefacenti è stata riscontrata la presenza di cocaina e del suo metabolita benzoilecgonina (fig. n. 5 - 6 - 7) così come in quelli prelevati in sede autoptica dai due deceduti per i quali l'esame tossicologico ha confermato l'uso di tale sostanza (fig. n. 8 - 9 - 10).

L'analisi gas-cromatografica dei denti dei cinque soggetti con anamnesi negativa (controlli) ha confermato l'assenza di sostanze esogene (fig. n. 11 - 12 - 13 - 14 - 15).

Fig. 5

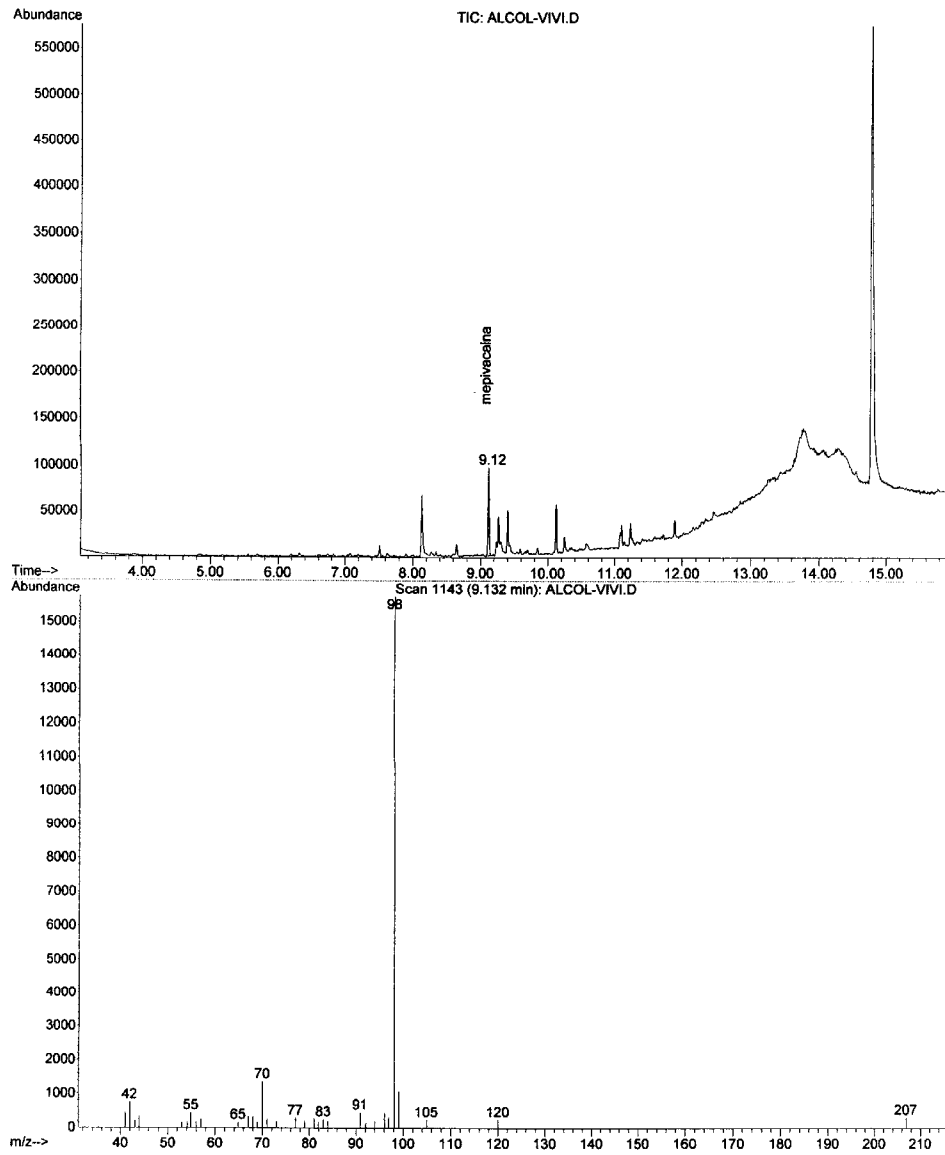


Fig. 6

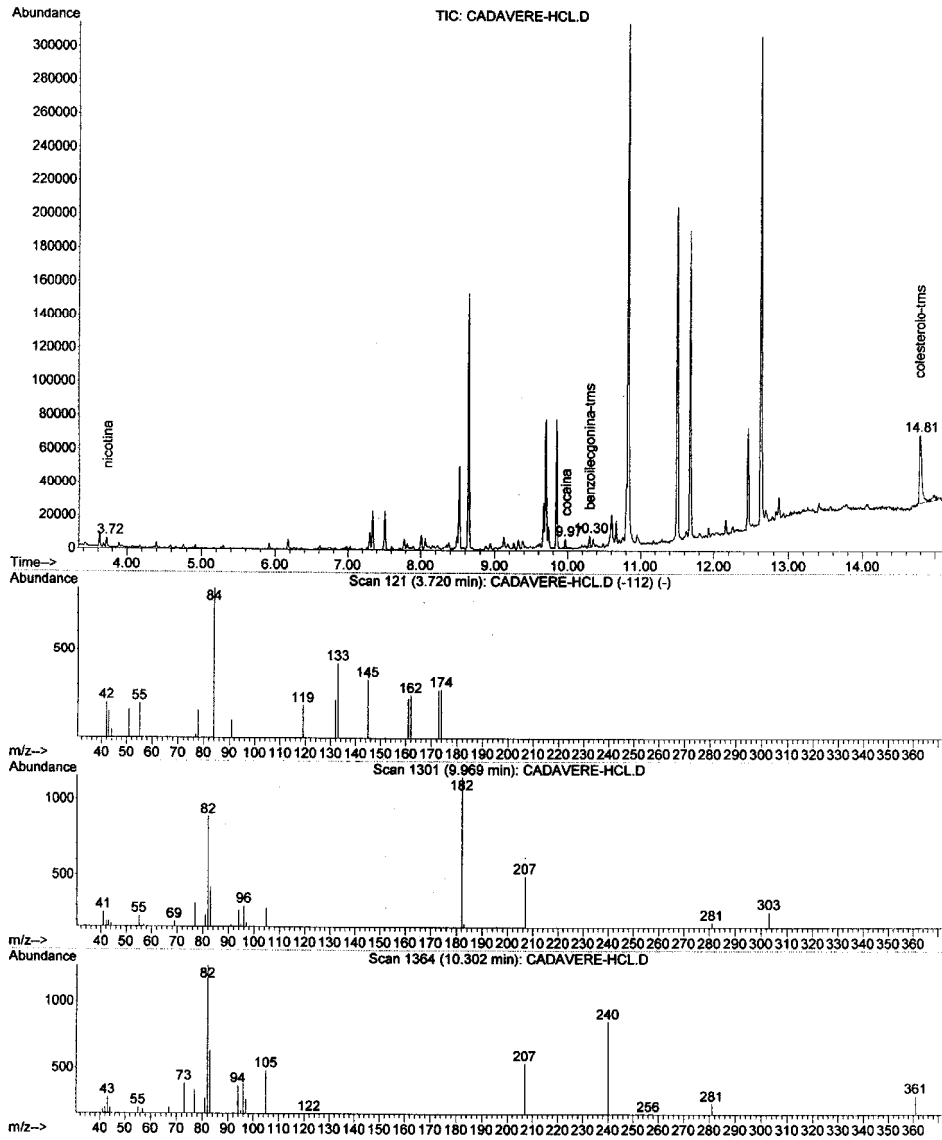


Fig. 7

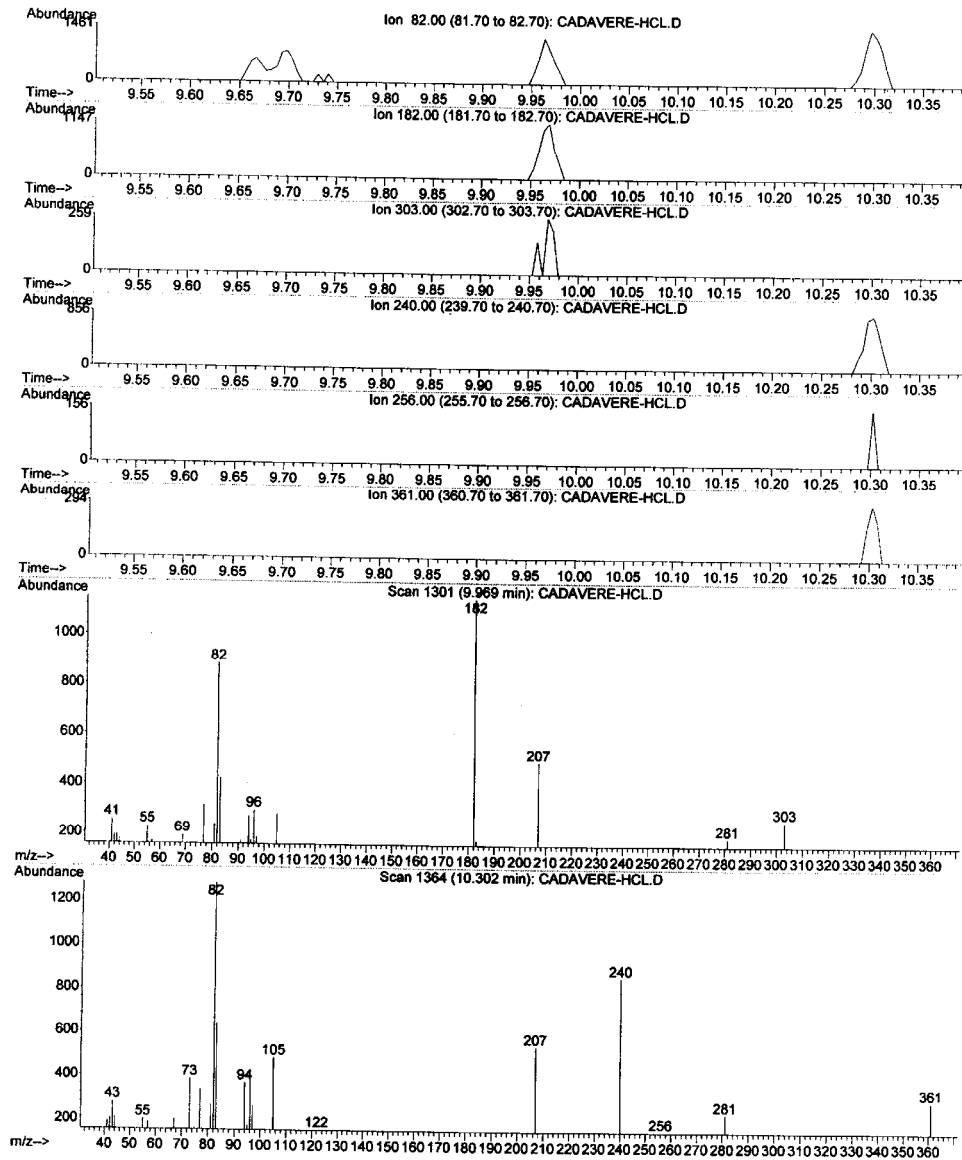


Fig. 8

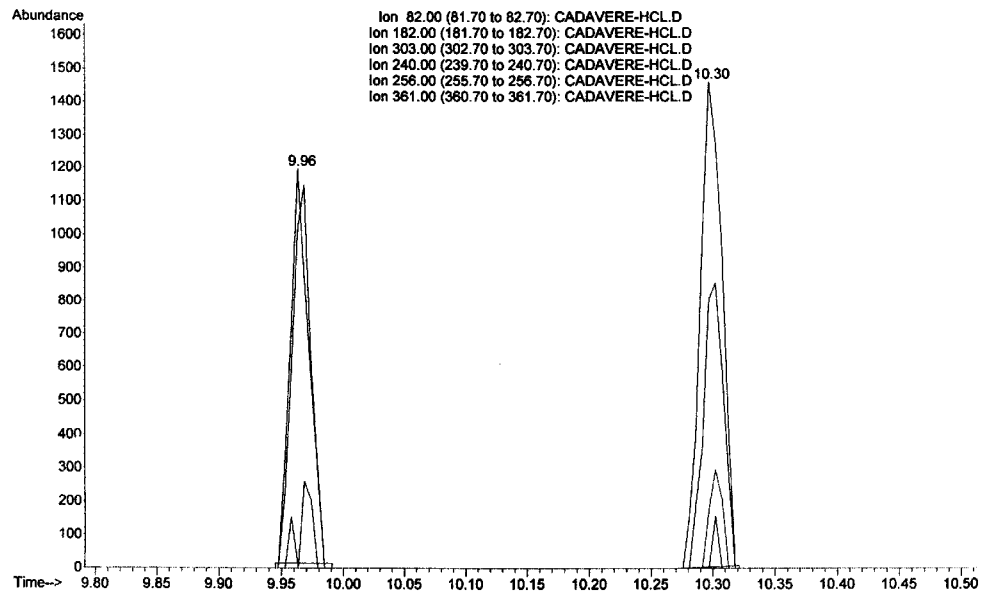


Fig. 9

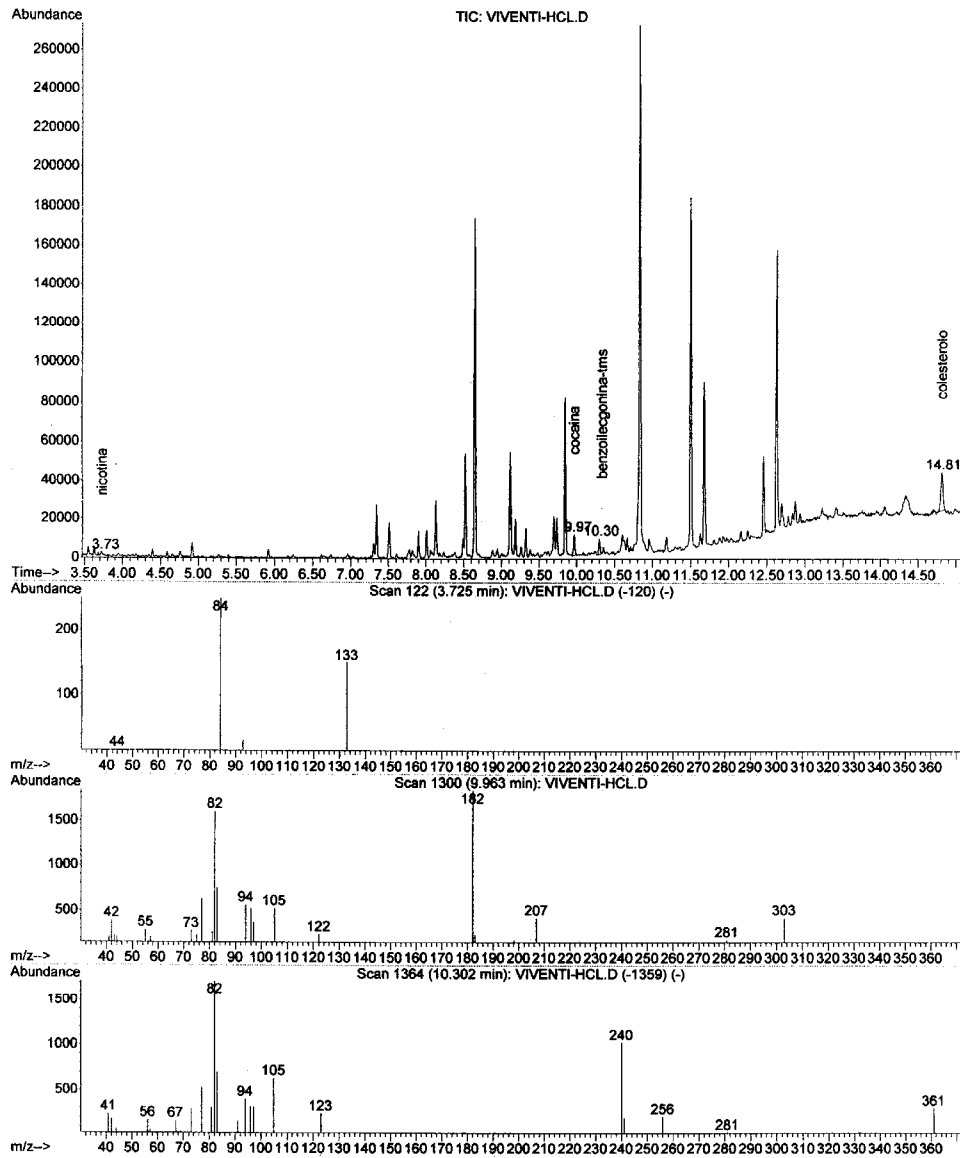


Fig. 10

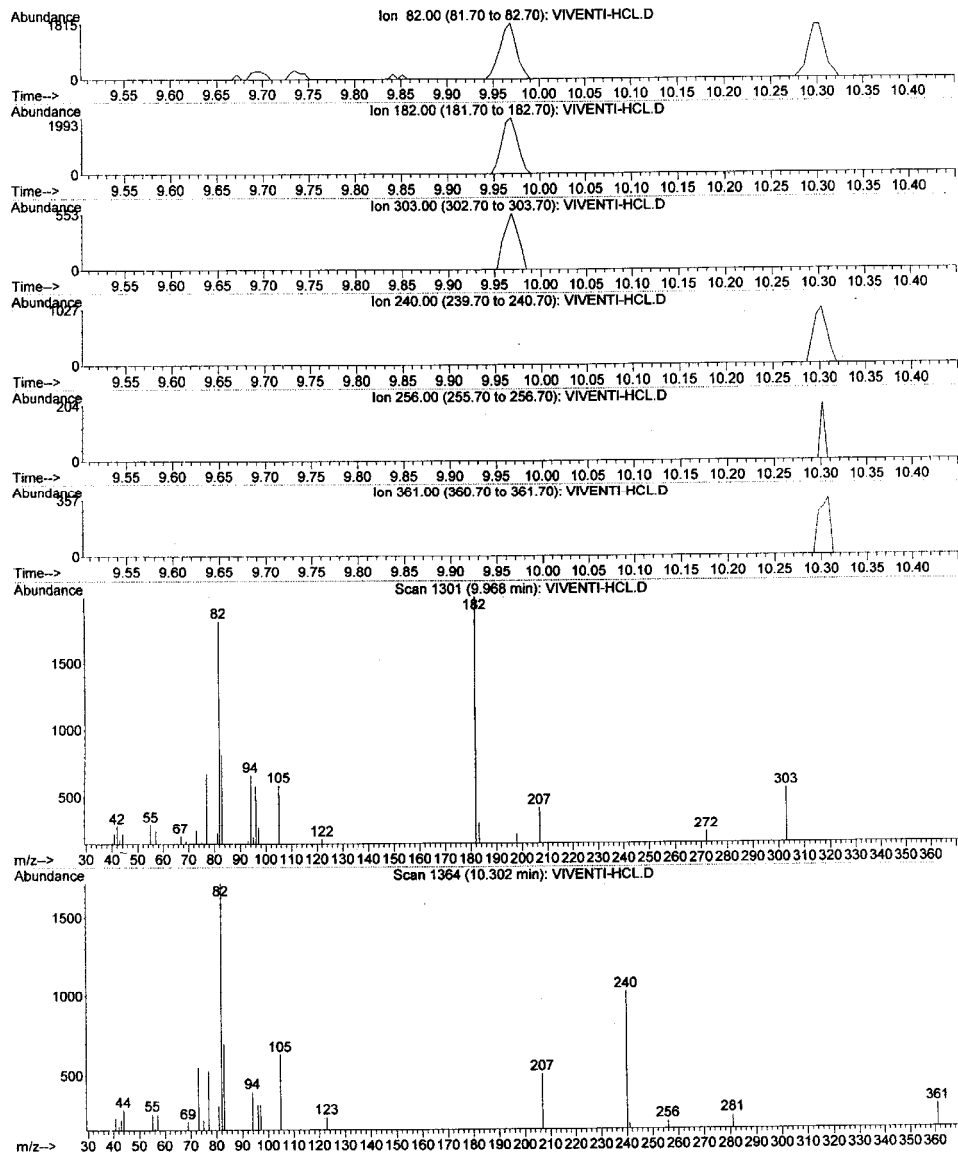


Fig. 11

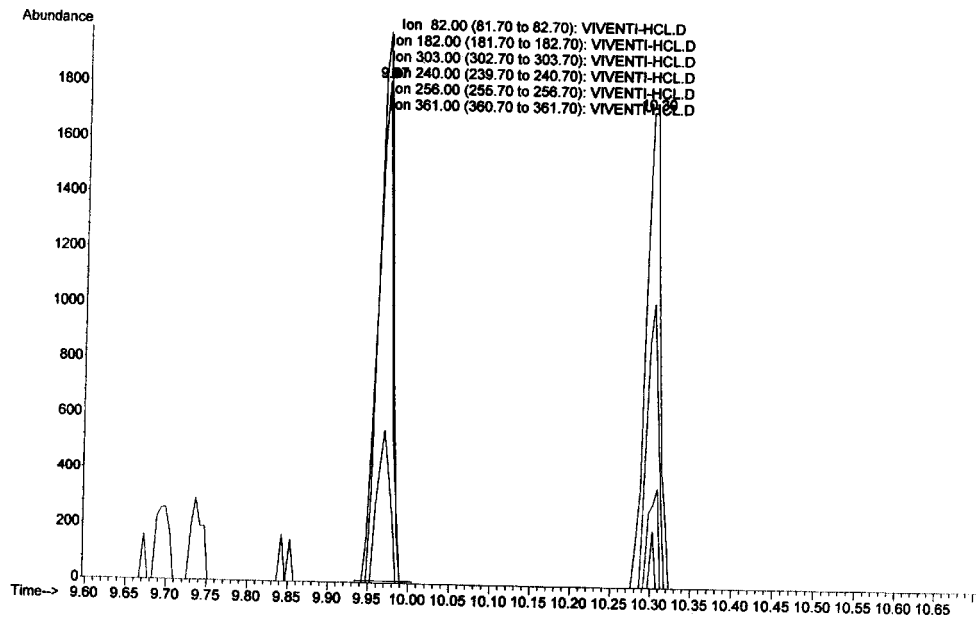


Fig. 12

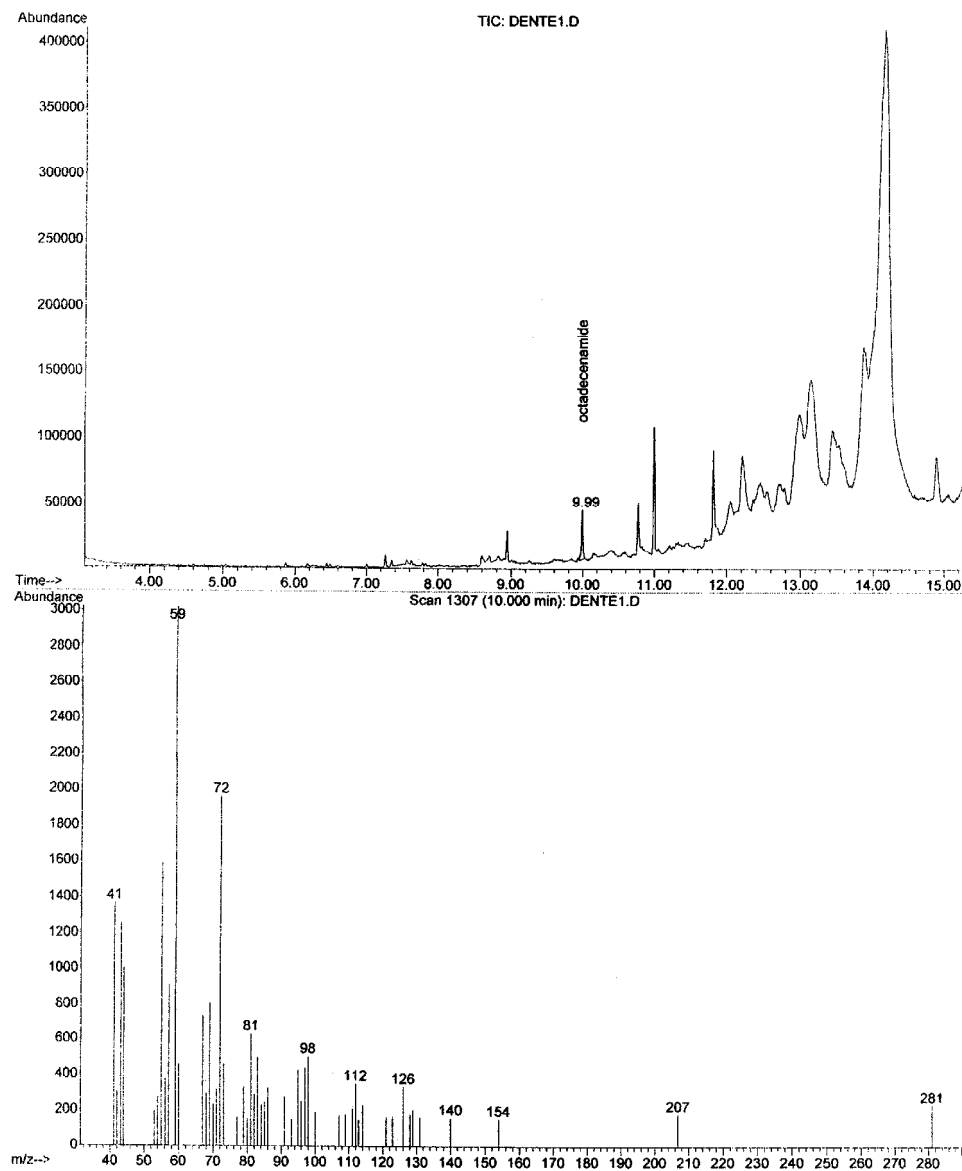


Fig. 13

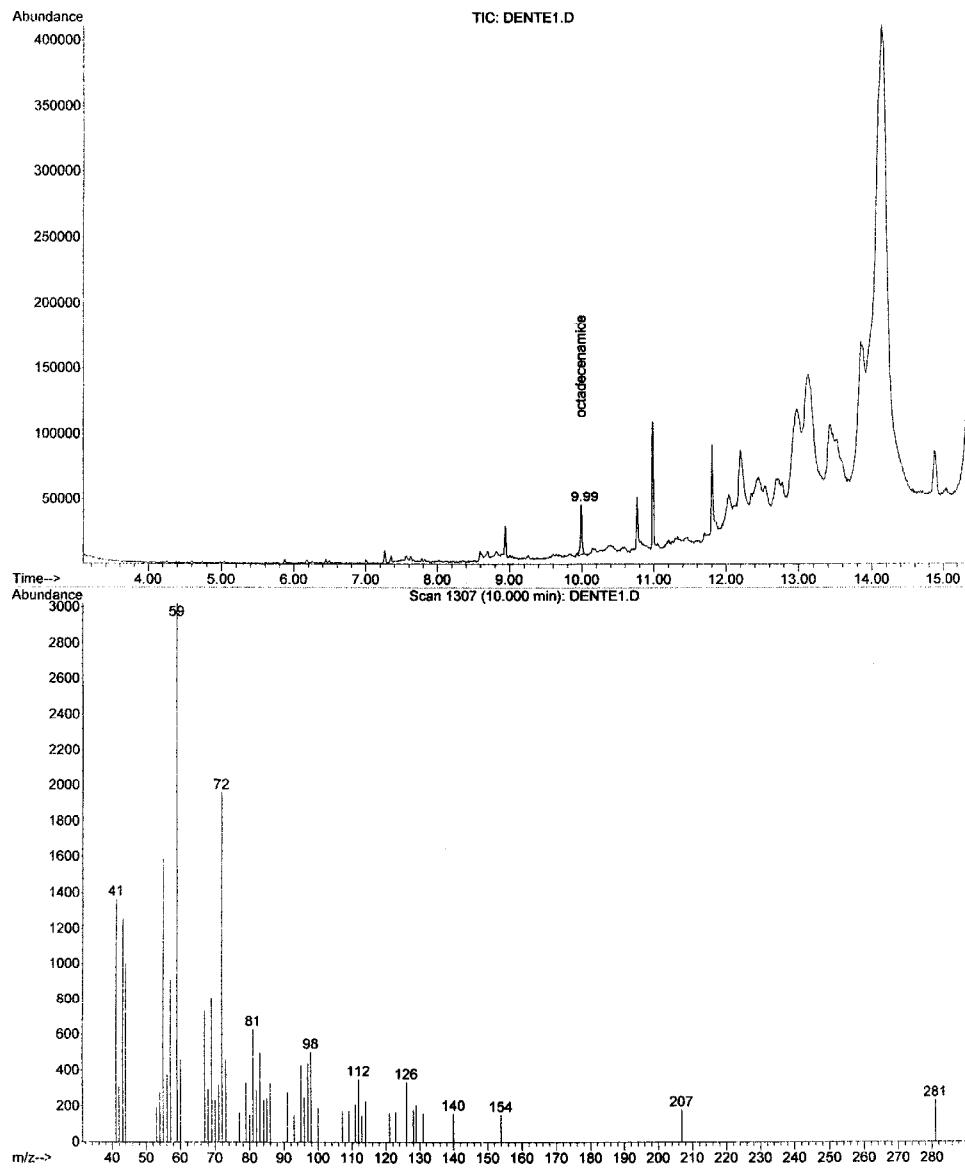


Fig. 14

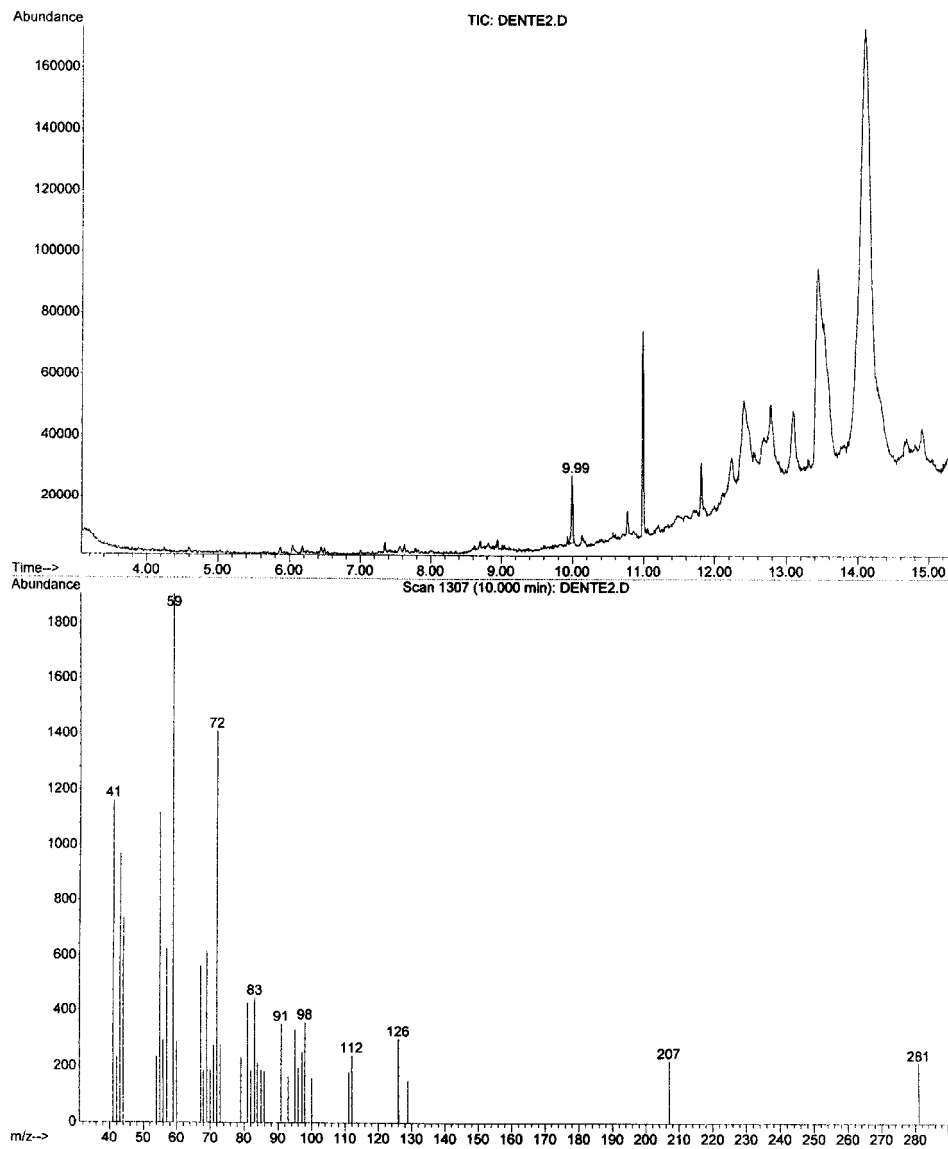
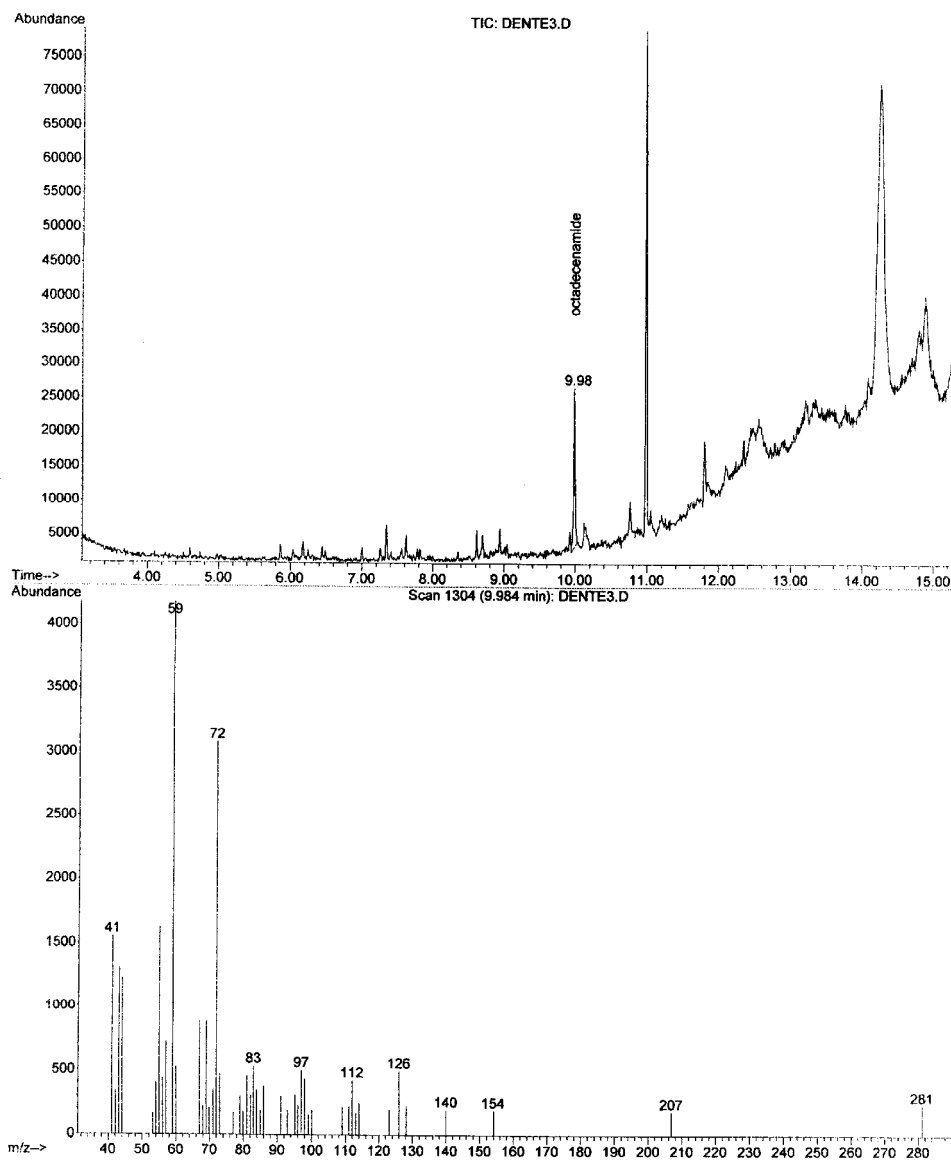


Fig. 15



Discussione

La possibilità di impiegare matrici che consentano l'investigazione della esposizione a droghe o, più in generale, a xenobiotici, può essere di grande rilevanza nel campo medico-legale e tossicologico-forense.

La presenza e la disposizione di una droga all'interno del corpo umano ed eventuali associazioni con effetti clinici e/o soggettivi è stata classicamente rivelata dall'analisi del sangue e dell'urina, visto che non era sempre possibile (per la difficoltà e/o invasività) campionare altre matrici biologiche e fluidi.

Non di meno, negli ultimi 20 anni, la misura della concentrazione di droghe in fluidi e matrici diversi dal sangue e dall'urina (le cosiddette matrici non convenzionali) ha ottenuto un'importanza crescente.

Uno dei punti cruciali nell'applicazione dell'analisi delle droghe nelle matrici non convenzionali, era la possibilità di

ampliare la finestra temporale dall'assunzione: da ore o giorni, come nel caso del sangue e dell'urina, a settimane e mesi, come nel caso delle unghie e dei capelli, o del meconio nei neonati.

Nel caso particolare di dover stabilire una esposizione cronica passata alle droghe di abuso, sia nei viventi che nei cadaveri, i capelli sono considerati giustamente la matrice di scelta.

Recentemente, in uno dei soli tre lavori pubblicati su argomenti affini alla presente tesi, i denti decidui sono stati proposti come matrice alternativa per misurare la nicotina e la cotinina al fine di seguire l'esposizione cronica al fumo di tabacco ambientale durante l'intera infanzia.

In tale lavoro è stato sviluppato e validato un metodo in gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) per la determinazione di questi 2 biomarkers nei denti.

Infatti, uno studio della penetrazione di molecole marcate con C14 nei denti decidui ed in quelli permanenti, ha dimostrato il potenziale di questa matrice biologica come un importante deposito di sostanze esogene che si possono accumulare sia nella polpa che nei tessuti calcificati.[3]

Scopo della presente tesi era di verificare se le sostanze d'abuso eventualmente riscontrate nei denti riflettessero molecole farmacologiche circolanti in una fase acuta e presenti nei vasi della polpa, o se rappresentassero sostanze che durante la vita fossero penetrate nei denti e si fossero accumulate nella dentina e/o nello smalto.

Lo studio effettuato e riportato in questo lavoro ha cercato, quindi, di esplorare la questione non risolta, presentando un metodo affidabile e valido per la determinazione di sostanze stupefacenti nei denti per mezzo della GC-MS.

I campioni dentari sono stati reperiti sia in sede autoptica sia in sede ambulatoriale dove venivano sottoposti ad estrazioni dentarie soggetti affetti da carie destruenti.

Sono stati prelevati in sede autoptica denti molari di due soggetti deceduti il cui esame tossicologico aveva riscontrato, nei fluidi biologici convenzionali, la presenza di cocaina e del suo metabolita benzoilecgonina.

I partecipanti ambulatoriali, informati sulla finalità dello studio, hanno dato il consenso a donare i denti estratti ed hanno compilato un questionario riguardante l'eventuale uso di droga (tipo di consumo, età iniziale e finale del consumo e data di interruzione dell'abitudine).

I denti di controllo sono stati ottenuti da donatori volontari con anamnesi negativa per uso di sostanze stupefacenti.

Tra i pazienti intervistati per la partecipazione allo studio i cinque soggetti con anamnesi positiva per uso di droghe che

hanno accettato di donare i loro denti hanno dichiarato di aver fatto uso di cocaina.

Tutti i denti sono stati messi individualmente in soluzione alcolica al fine di essiccare e separare la polpa dentaria estraendone le sostanze circolanti in essa contenute.

I risultati ottenuti hanno confermato il tipo di assunzione dichiarato e l'accumulo della cocaina e del suo metabolita benzoilecgonina nella dentina.

Infatti, la cocaina ed il suo metabolita sono stati riscontrati soltanto negli estratti ottenuti dai denti privati della polpa, decontaminati e polverizzati dei cinque soggetti con anamnesi positiva.

Nell'alcol di conservazione, invece, sono state identificate soltanto le sostanze circolanti nel sangue al momento dell'estrazione.

Infatti, nella polpa dentaria di tutti i soggetti viventi (positivi e controlli) cui era stata praticata un'anestesia locale prima dell'avulsione, sono stati identificati i farmaci somministrati (mepivacaina, lidocaina, articaina) e sostanze assunte dagli stessi domiciliarmente (caffeina, anti-infiammatori).

Nelle polveri dentarie (dentina e smalto) dei controlli, non sono state riscontrate sostanze di origine esogena, mentre in quelle dei soggetti positivi viventi e cadaveri sono state individuate la cocaina e la benzoilecgonina.

Conclusioni

I risultati conseguiti tramite le analisi di laboratorio effettuate su materiale dentario, attraverso l'utilizzazione della gascromatografia – spettrometria di massa, consentono di sostenere che i denti possono essere utilizzati in ambito medico legale, sia per individuare sostanze circolanti nel sangue (tramite analisi della polpa), sia per dimostrare assunzioni croniche di sostanze stupefacenti, in particolare la cocaina ed il suo principale metabolita, la benzoilecgonina (tramite analisi della dentina e dello smalto), anche se non più presenti nel circolo ematico al momento dell'indagine.

Appare evidente, quindi, che la possibilità di conoscere le sostanze circolanti nella polpa dentaria, consente di rilevarne la cosiddetta attualità d'uso, mentre il riscontro di accumulo di xenobiotici nella dentina, è indicativo di assunzione cronica pregressa.

La dimostrazione di questo ultimo aspetto, è di indubbia importanza pratica specie nello studio di resti umani scheletrici, carbonizzati o putrefatti, o comunque quando potrebbe essere difficile ottenere informazioni circa le abitudini all'assunzione di droghe che potrebbero restringere il campo delle indagini a determinati ambienti sociali e costituire una prova per la ricostruzione di un profilo biologico o addirittura condurre ad ipotesi sulla causa di morte.

Bibliografia

- (1) M. Pellegrini, A. Casa et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 40: 662 – 668, 2006.
- (2) C. Cattaneo, F. Gigli, F. Lodi, M. Grandi, J. Forensic Odonto-Stomatol. 21: 1 -5, 2003.
- (3) K.O. Haustein, G. Thiele, U. Stangel, Int. J. Clin. Pharmacol. 32: 483-487, 1994.

INDICE

Introduzione	pag.	1
Materiali e metodi	pag.	10
Preparazione dei campioni	pag.	11
Risultati	pag.	15
Discussione	pag.	32
Conclusioni	pag.	38
Bibliografia	pag.	40