



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MACERATA**

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Diritto e Innovazione**

**CURRICULUM DIRITTO E INNOVAZIONE SOCIALE**

**CICLO XXXVI**

**TITOLO DELLA TESI**

*Determinazione post-mortale dell'uso e dell'abuso di droghe sui tessuti dentari*

**SUPERVISORE DI TESI**

**Chiar.mo Prof. Mariano Cingolani**

**DOTTORANDO**

**Dott. Ilenia Bianchi**

**COORDINATORE**

**Chiar.mo Prof. Massimo Meccarelli**

**ANNO 2024**



# Indice

<i>Abstract</i> .....	pag. 3
1. Introduzione .....	pag. 5
1.1 Tossicologia post-mortale ed implicazioni giuridiche .....	pag. 5
1.2 Tossicologia forense su matrici alternative.....	pag. 15
1.3 Istologia del dente.....	pag. 18
1.4 Fisiologia del complesso pulpo-dentinale.....	pag. 25
1.5 Stato dell'arte: denti come matrice alternativa alle indagini forensi.....	pag. 28
2. Scopo della ricerca.....	pag.32
3. Materiali e Metodi.....	pag. 39
3.1 Raccolta del campione.....	pag. 39
3.2 Reagenti per analisi tossicologiche.....	pag. 42
3.3 Preparazione dei campioni.....	pag.43
3.4 Analisi tossicologiche sulla polpa dentale.....	pag. 47
3.5 Quantificazione delle sostanze all'interno della polpa.....	pag. 50
3.6 Analisi tossicologiche sui tessuti mineralizzati.....	pag.52
4 Risultati.....	pag. 53
4.1 Risultati sulle polpe dentali.....	pag. 54
4.2 Risultati sui tessuti mineralizzati del dente .....	pag. 56
4.3 Confronto con le matrici classiche [sangue/ capelli].....	pag. 60
5 Discussione dei risultati.....	pag. 64
6 Conclusioni.....	pag. 74
BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA.....	pag. 75

## **Abstract**

Background: Post-mortem toxicology constantly deals with the research of reliable alternative matrices useful for pathologists in cases in which the classic matrices for forensic toxicology [in particular blood and hair] are not more available (e.g. carbonized or skeletonized corpses, human remains, exhumed bodies, etc.). Teeth can be applied as an alternative matrix since they are highly resistant, available, and stable after death. Dental enamel, dentine or pulp could disclose acute or chronic drugs assumption, given the different tissues constitution. The previous literature does not provide information on the pharmacokinetics of substances and on the mechanism and site of incorporation of xenobiotics into dental tissues.

Scope: This pilot research aims to investigate whether in the pulp can be detected the same substances found in blood in drug related death cases. Secondly the study aims to disclose possible deposited drugs in the hard tissues of the tooth (dentine and/or enamel), the related degrees of accumulation in different dental tissue, thus contributing to reconstruct the drug abuse history (timing, e.g.) .

Materials and Methods: The study experimented with a novel method to separately analyse enamel, dentin, and pulp tissues, that was applied to 10 teeth collected during autopsies of drug-related deaths along with blood and hair samples for classic toxicological analyses. Each tooth was prepared by the same forensic odontologist using diamond and multi-blade burs on a turbine above an amalgam aspirator coated with filter paper. Teeth were divided into two longitudinal halves and pulp was extracted from the chamber and roots. The enamel was separated from the coronal dentin by pulverization. The coronal secondary dentin was separated from the primary dentin pulverizing an inner layer of approximately 1,5 mm coronal and 1 mm cervical thickness. The residual outer coronal dentin was separated from the roots by pulverization and then the roots were pulverize with a hammer. Each dental tissue was extracted with acid for cocaine, opiates, and metabolites and analyzed by gas chromatography (GC) and liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry (HR-MS). The results were then compared with those obtained from blood and hair samples.

Results: Preliminary results demonstrated that teeth are different from any other classic matrix (blood and hairs) and the qualitative correlation in detecting substances between pulp/blood and dental hard tissues/hair suggests that they can be useful in post-mortem evaluation for both acute and chronic assumptions of drugs. The most significant result is that the mechanism of accumulation of substances in mineralized tissues seems to be influenced by the type of

molecule and the method of assumption. The innovative method for dental tissues separation is absolutely promising to study the different accumulation of substances in teeth, possibly disclosing both acute and chronic assumption in forensic cases of drugs related cases.

The main limitation of this study is the in vivo experimentation, since the study is based on teeth extracted for toxicological purposes in cases of real drug-related deaths. This factor determines not only a limited availability of the sample, but also an uncontrollable variability on the nature of the substances detected and, above all, the absence of anamnestic information of the subjects to compare the results in dental hard tissues with the time, rates and method of assumption during life.

Further research is necessary to systematically investigate the distribution of different substances within the mineralized tissues of the tooth. It seems appropriate to improve the sample relating to cocaine intake in order to create a statistical linear regression model between the quantity detected in the dental pulp and in the peripheral blood. Finally, we should proceed with the preparation of a research project that includes the study of teeth extracted from living subjects in dental care (for clinical reasons) with a known and documented history of chronic substance intake to delve deeper into the meaning of accumulation within dental hard tissues.

# 1. Introduzione

## 1.1 Tossicologia post-mortale ed implicazioni giuridiche

La Tossicologia Forense è una branca della tossicologia al servizio delle scienze forensi e volta a rispondere a quesiti di interesse giuridico, individuando ed interpretando una relazione causa-effetto tra la presenza di un “veleno”, o più ampiamente inteso come qualsiasi sostanza esogena di interesse tossicologico [xenobiotico], e un danno alla salute o la morte di una persona.

Il Tossicologo Forense è quindi colui che non solo effettua l’analisi di campioni biologici e non biologici, che seleziona ed applica le più appropriate tecniche immunochimiche, spettroscopiche (UV e IR), gascromatografiche o di cromatografia liquida accoppiate alla spettrometria di massa sulla base dell’evoluzione tecnologica e delle conoscenze teorico-tecniche prodotte in letteratura, ma soprattutto che ha il delicato nonché arduo compito di interpretare i risultati ottenuti dalle analisi effettuate in termini di nesso causale medico-legale.

Storicamente, la Tossicologia Forense divenne una disciplina scientifica nei primi anni dell’800, grazie al contributo del Professore di Medicina Legale alla Sorbona di Parigi, il medico spagnolo Mathieu Orfila, che nel 1814 pubblicò il “*Traité des poisons*” [Trattato dei veleni e tossicologia generale] [1]. Il Professor Orfila è considerato il padre della tossicologia forense ed all’interno del suo trattato definisce un veleno come “*qualsiasi sostanza che assunta in piccole dosi o tramite specifiche vie di somministrazione cagiona in un essere vivente, problemi di salute o addirittura la morte*” ampliando quello che fino ad allora era il comune concetto di *veleno*, ma non solo. Il trattato offriva per la prima volta un approccio sistematico allo studio, ricerca, analisi e classificazione della natura chimica, fisica e fisiologica dei “veleni” rinvenibili nel materiale cadaverico suddividendoli in sei classi in base alla loro azione lesiva in relazione alla causa di morte. Il suo lavoro rivoluzionò le tecniche di analisi e di

ricerca generica delle sostanze esogene (screening) su reperti cadaverici fino ad allora adottate e determinò la nascita di questa disciplina scientifica ponendo le basi per quelli che oggi sono gli standard per una *prova* di identificazione un'adeguata ai fini forensi, ovverosia una garanzia della qualità delle indagini tossicologiche ai fini forensi e sostenibile in un'aula di Tribunale [2]. Il Tossicologo Forense diventa quindi colui che *“deve mirare a perfezionare il processo necessario a stabilire l'avvelenamento, al fine di rivelare il crimine e di aiutare il magistrato a punire i colpevoli”* [1].

Nel corso degli anni, la comunità dei tossicologi forensi notò che l'individuazione e la determinazione qualitativa e quantitativa delle sostanze nei tessuti cadaverici (organi e fluidi) non era sufficiente per rispondere in tema di nesso di causa tra lesività biochimica e morte o effetti psico-fisici. Dall'attenzione al puro dato analitico quindi, la ricerca si concentrò anche sullo studio della localizzazione, distribuzione ed eliminazione delle diverse sostanze, del loro metabolismo e, soprattutto, dell'interpretazione del loro significato nei casi di intossicazione sia sul vivente che nel cadavere [3-4].

Difatti, l'identità della sostanza e la quantità riscontrata nel campione analizzato spesso non sono dati sufficienti per concludere se la concentrazione riscontrata di quell'esogeno sia tale da poter cagionare la morte del soggetto. La determinazione della tossicità di una sostanza su un organismo vivente non è un processo standard od univoco: qualsiasi sostanza esogena potrebbe rivelarsi “tossica” alterando lo stato di salute psico-fisica di una persona fino a causarne la morte se assunta nella giusta concentrazione e tramite un'appropriata via di somministrazione [5].

Soprattutto nell'ambito della tossicologia post-mortale (PM), questo aspetto dicotomico tra scelta ed analisi della matrice cadaverica e la sua interpretazione medico-legale risulta estremamente amplificato rispetto alla tossicologia forense applicata su soggetto vivente: è la

natura intrinseca dei campioni post-mortali a comportare difficoltà ulteriori nell'interpretazione del dato analitico [6-8].

L'analisi tossicologica post-mortale mira a rilevare la presenza di possibili xenobiotici, farmaci ed altri composti potenzialmente tossici nei campioni biologici prelevati durante l'accertamento autoptico ed a quantificare le concentrazioni delle sostanze rilevate nell'organismo per contribuire alle indagini sulla causa o concausa di morte o sulle condizioni psicofisiche del soggetto al momento della morte [6-8].

Tuttavia, i substrati post-mortali risultano meno "stabili" nell'accumulo di alcune sostanze (in particolar modo per la cocaina, l'eroina, il metadone, alcuni antidepressivi e antipsicotici e benzodiazepine) dato che il fenomeno "morte" determina numerosi artefatti (ad es. autolisi cellulare, coagulazione sanguigna, ipostasi) che influenzano la presenza, la concentrazione [9-14] finanche la natura stessa (conversione dei metaboliti) [15] dello xenobiotico nei diversi distretti corporei e quindi nei campioni autoptici prelevati per le analisi.

La ridistribuzione post-mortale delle sostanze dal sangue o dagli organi "serbatoio" verso il sangue ed i tessuti circostanti è una delle complicità PM più attenzionate [16]. Tale fenomeno determina un aumento o una diminuzione delle concentrazioni tissutali e sanguigne PM e di conseguenza una maggiore probabilità di misinterpretare il reale dosaggio ed effetto della sostanza sul soggetto in vita. Le caratteristiche della sostanza stessa influenzano la proporzione di ridistribuzione PM che essa può subire: ad esempio, le sostanze lipofile e alcaline hanno un elevato volume di distribuzione (Vd) e tendono a soffrire maggiormente questo fenomeno. Anche la sede anatomica influenza notevolmente questo fenomeno: le matrici centrali presentano una ridistribuzione maggiore a causa della loro vicinanza agli organi toraco-addominali. È anche importante considerare le caratteristiche dell'individuo come età, grasso corporeo e stato nutrizionale, poiché anch'esse influenzano la ridistribuzione post-mortem [10]. Tuttavia esistono alcuni metodi per controllare eventuali "falsi" positivi o negativi delle

concentrazioni post-mortali di una sostanza. Il sangue periferico subisce una minore ridistribuzione post-mortem rispetto al sangue centrale, come quello cardiaco o epatico [10]. Il metodo più utilizzato per stimare la ridistribuzione post-mortem dei composti è calcolare il rapporto C/P [ovverosia il rapporto tra centro e periferia] e prevede il prelievo di molteplici campioni di una stessa matrice da sedi corporee differenti (ad es. sangue dal muscolo cardiaco, dall'arteria femorale, dall'arteria succlavia, ecc...) e la comparazione dei risultati ottenuti [9, 11, 13]. Maggiore è questa proporzione, maggiore è la ridistribuzione post-mortem subita dallo xenobiotico. Una proporzione inferiore o uguale a 1 è coerente con un'analisi con ridistribuzione bassa o inesistente. Quindi se le concentrazioni rilevate nei siti periferici sono significativamente inferiori rispetto al cuore rispetto, è plausibile sospettare una redistribuzione PM delle sostanze [11, 13].

Non solo, il processo di decomposizione (autolisi e progressiva putrefazione del corpo) può aumentare o ridurre i livelli di concentrazione delle diverse sostanze nei diversi distretti anatomici: la formazione post-mortale di alcol da parte dei batteri è ben nota da un lato [17], dall'altro anche i batteri stessi possono degradare i farmaci e i loro metaboliti così come i tessuti biologici (bioconversione post-mortem), con progressiva distruzione della massa solida, accumulo di lipidi ed ammine e produzione di fluidi che possono determinare un mascheramento dei livelli di concentrazione tissutale fino ad una diminuzione tale da non poter più essere rilevabile [4, 14, 16-17]. In alcuni casi dipende anche dalle caratteristiche fisico-chimiche della sostanza assunta (come le proprietà acide/basiche delle molecole, la liposolubilità, i legami proteici formati, ecc...): se ad esempio la molecola è volatile, essa può disperdersi dall'organismo molto rapidamente dopo la morte [13-14, 16].

Da ciò, nel corso degli anni si è reso necessario rielaborare le conoscenze relative ai siti anatomici di prelievo, alle modalità di campionamento e conservazione dei campioni post-mortali, alle matrici da selezionare ed alla validazione dei metodi di analisi tossicologiche su



tessuti/fluidi non integri o alterati per facilitare l'interpretazione del dato analitico PM a fini forensi [10, 13, 18-22].

Ulteriore fattore, è la difficoltà di determinare se la quantità della sostanza assunta sia la causa o la concausa di morte del soggetto. Per discriminare se una certa sostanza è stata assunta in concentrazioni terapeutiche, tossiche o fatali, è necessario sapere se il soggetto in vita assumeva la sostanza "abituamente". In questi casi, un soggetto cronicamente esposto a determinate sostanze potrebbe averne sviluppato una forma di tolleranza per cui, per ottenere l'effetto terapeutico o stupefacente cui è aduso, è necessario aumentarne progressivamente il dosaggio. Nel caso della morfina e della cocaina ad esempio, qualsiasi concentrazione assunta da un soggetto è potenzialmente fatale perché queste sostanze determinano un "adattamento" dell'organismo in risposta alla dose assimilata. Tuttavia, le due sostanze si differenziano nella definizione della causa di morte: l'intossicazione acuta da cocaina infatti raramente si rivela essere la diretta causa dei morte di un soggetto, piuttosto determinata delle complicazioni cardiache che ne derivano dal prolungato uso [23-24]. La dose tossica o letale di ogni sostanza esogena va quindi indagata ed interpretata considerando caso per caso lo stato di salute e le specifiche abitudini di assunzione del soggetto in vita e per questo è fondamentale riuscire a delineare un quadro anamnestico di uso/abuso cronico o saltuario della sostanza selezionando specifiche matrici tossicologiche PM che offrano una finestra di rilevabilità della sostanza di settimane/mesi/anni precedenti all'epoca del decesso [21-22].

In questo senso, la scelta della matrice o delle matrici PM più affidabili, la più adeguata tecnica di analisi ed una corretta interpretazione di tutti i dati anamnestici del soggetto sono parametri fondamentali per prevenire eventuali anomalie dei risultati.

Il sangue femorale è considerato il *gold standard* poiché meno soggetto alla redistribuzione post-mortem e permette di correlare l'interpretazione del dato analitico con le condizioni peri-mortali del soggetto. Tuttavia, non permette di ricostruire la storia di assunzione cronica o saltuaria del soggetto, permettendo una ristretta finestra di rivelabilità di qualche ora (matrice utile per l'intossicazione acuta) [10, 25]. Il sangue cardiaco (sito anatomico centrale) ed il sangue iliaco (sito periferico) risultano essenziali per la stima del fenomeno di redistribuzione [10]. Il sangue è quindi la matrice più affidabile per identificare e quantificare gli xenobiotici nelle analisi di conferma, correlando le sue concentrazioni PM con quella somministrata in vita (AM) nella fase peri-mortale [10]. Altre matrici, come gli organi o altri fluidi biologici, possono essere utilizzate nei casi in cui il sangue non siano più disponibili. Di solito quando il cadavere viene ritrovato dopo un intervallo post-mortem più lungo (ad es. mesi) ovvero in condizioni post-mortali avanzate (ad es. avanzato stato di putrefazione), queste ulteriori matrici possono essere utilizzate per lo screening generico delle sostanze, poiché, a causa dei vari cambiamenti post-mortali, le loro concentrazioni spesso non corrispondono allo stato ante-mortem [10]. Il prelievo della bile è semplice durante l'autopsia e presenta concentrazioni più elevate rispetto al sangue utili per lo screening delle sostanze. Inoltre, la bile è meno soggetta a contaminazioni da proliferazioni batteriche. È una matrice indicata nella ricerca di sostanze con emivita breve quando è presente un periodo di sopravvivenza del soggetto più lungo, perché permette di rilevare le molecole nel tempo che intercorre tra l'ingestione e la morte dell'individuo. Tuttavia, è soggetta all'“effetto matrice”, ovvero l'accumulo di sostanze all'interno del fluido modifica le caratteristiche chimico-fisiche della sostanza/analita di interesse determinando ad alto rischio di errore quantitativo. Per questo, il campione di bile deve solitamente essere diluito per essere correlato con il sangue. Ulteriormente, ancora poche conoscenze sugli effetti dell'escrezione biliare, dell'affinità dei composti per gli epatociti e dei trasportatori di membrana sono disponibili in letteratura [10, 25]. Le urine sono utili in

caso di overdose o nella ricostruzione della storia AM del soggetto (fino ad alcuni giorni prima del decesso) perché solitamente il tempo di sopravvivenza del soggetto non è sufficiente perché la sostanza sia completamente eliminata dall'organismo e quindi possono rilevare basse concentrazioni di molte sostanze. Tuttavia, il prelievo delle urine su cadavere non è sempre possibile per la scarsa resistenza PM del fluido biologico [10, 25].

Le matrici cheratinizzate, soprattutto i capelli e (meno) i peli, sono ormai entrate a fare parte dei prelievi tossicologici routinari, sebbene ancora definite tra le cosiddette matrici “alternative” [24]. L'analisi dei capelli fornisce informazioni utili sulla storia di abuso e tossicodipendenza perché forniscono una finestra più ampia per il rilevamento delle sostanze che si depositano nei capelli attraverso la circolazione sanguigna nel corso della vita del soggetto. La sostanza depositata è molto stabile e può essere rilevata dopo un periodo di tempo più lungo rispetto ad altri campioni biologici, quali saliva, sangue ed urina. Inoltre, l'analisi segmentale del capello può rappresentare la somministrazione di farmaci multipli o singoli assunti in fasi successive o contemporaneamente (considerando la crescita del capello che avviene dal cuoio capelluto verso l'estremità e con una velocità di circa 1 cm al mese) [26-27].

Secondo le attuali linee guida [24] e la solida evidenza scientifica, i risultati ottenuti con le analisi condotte su queste matrici biologiche, per comodità definite “convenzionali”, sono ampiamente accettati dalla comunità scientifica e soprattutto giuridica.

Tuttavia, soprattutto nei casi di tossicologia post-mortem, data l'ampia variabilità cadaverica, è sempre opportuno tenere presente che il dato negativo non necessariamente rispecchia l'assenza della sostanza. È quindi compito specifico del tossicologo forense quello di fornire l'adeguato grado di “dubbio” nella relazione causale tra uomo ed agente tossico ovvero ricercare la presenza e la quantità degli xenobiotici in qualsiasi substrato disponibile, sia esso

biologico o meno, in riferimento alle precise fattispecie giuridiche per cui viene incaricato di rispondere.

Tali fattispecie giuridiche che coinvolgono la tossicologia post-mortale hanno sempre una rilevanza penale: in particolar modo, rispondere alla domanda sulla causa di morte e circostanze di morte incaricata dal Pubblico Ministero.

Vi sono inoltre alcune implicazioni ulteriori previste dalla legge che impongono un accertamento sulla vittima in relazione alla presenza o meno di sostanze nell'organismo o/ed eventuale correlazione con le condizioni psico-fisiche al momento del decesso. Alcuni esempi possono essere i casi di incidente stradale e procedibilità del reato di lesioni personali o omicidio stradale (artt. 589bis e 590 bis c.p. per cui *“Chiunque, ponendosi alla guida di un veicolo a motore in stato di ebbrezza alcolica o di alterazione psicofisica conseguente all'assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope ai sensi rispettivamente degli articoli 186, comma 2, lettera c), e 187 del decreto legislativo 30 aprile 1992, n. 285, cagioni per colpa a taluno una lesione personale, è punito con la reclusione da tre a cinque anni per le lesioni gravi e da quattro a sette anni per le lesioni gravissime”*); alcune specifiche circostanze aggravanti dei casi di violenza a sfondo sessuale previste dall'art. 609ter del c.p. per cui *“La pena stabilita dall'articolo 609 bis è aumentata di un terzo se i fatti ivi previsti sono commessi: ...uso di armi o sostanze alcoliche, narcotiche o stupefacenti o di altri strumenti o sostanze gravemente lesivi della salute della persona offesa”* che prevedono la ricerca di sostanze esogene (come ad es. stupefacenti o narcotici) dolosamente somministrate alla vittima per ridurne l'attenzione, la reattività, finanche la coscienza a favore dell'atto illecito. Nel caso di infortuni sul lavoro, la responsabilità penale vede come normativa di riferimento il D.Lgs. 81/2008, c.d. *“Testo Unico in materia di salute e sicurezza sul lavoro”*, coordinato con il D.Lgs. n. 106/2009 e successive integrazioni e modificazioni: le ipotesi più frequentemente sanzionate dalla legge penale potrebbero essere legate ai reati di lesioni od omicidio colposi per colpa del

datore di lavoro o degli addetti alla sicurezza sul posto di lavoro, ad esempio determinate dalla mancata adozione di misure di sicurezza idonee per la tutela della salute del lavoratore sul luogo di lavoro (per negligenza, omissione).

Non solo, ma soprattutto in ambito di tossicologia post-mortale, le sostanze di interesse possono essere tra le più variabili come ad es. farmaci che normalmente sono prescritti a scopo curativo con precisa posologia ovvero metalli inalati in ambienti di lavoro, accidentalmente o da inquinamento ambientale [28]. L'indagine deve essere quindi svolta non solo nell'ambito delle sostanze stupefacenti e psicotrope ormai note, continuamente aggiornate e contenute nelle Tabelle allegate al *Testo Unico delle leggi in materia di disciplina degli stupefacenti e sostanze psicotrope, prevenzione, cura e riabilitazione dei relativi stati di tossicodipendenza DPR 9 ottobre 1990, n. 309 (Gazzetta Ufficiale 31 ottobre 1990, n. 255 - S.O. n. 67 - aggiornato al D.L. 15 settembre 2023, n. 123)*, ma deve essere eseguita a più ampio spettro soprattutto quando si ottengono risultati negativi in caso di una morte sospetta. Tali Tabelle infatti contengono l'elenco delle sostanze stupefacenti e psicotrope collegate al sistema sanzionatorio per gli usi illeciti poste sotto controllo internazionale e nazionale (dalla I alla IV); la tabella dei medicinali a base di sostanze attive stupefacenti e psicotrope di corrente impiego terapeutico ad uso umano o veterinario ed il regime di dispensazione ad uso di medici, farmacisti e operatori del settore farmaceutico. Dopo l'entrata in vigore del Regolamento delegato (UE) 2023/196 della Commissione del 25 novembre 2022, a modifica dei Regolamenti (CE) n. 273/2004 e n. 111/2005, determinati *precursori di droghe* sono stati inseriti nell'elenco delle sostanze classificate come illecite pericolose e che necessitano di più attento monitoraggio. Le sostanze elencate nell'allegato I al Regolamento (CE) n. 273/2004 ed al Regolamento (CE) n. 111/2005 sono suddivise in categorie per le quali si applicano misure preventive e sanzionatorie distinte, basate sul livello di minaccia di ogni sostanza specifica e sull'impatto sul commercio lecito. Le

sostanze della Categoria 1 sono sottoposte alle misure di controllo e di monitoraggio più rigorose. Il Regolamento approvato 2023/196 include nella Categoria 1 dei precursori di droghe le sostanze 4-AP, 1-boc-4-AP e norfentanil (che possono essere utilizzate per la sintesi dello stupefacente fentanil e dei suoi analoghi) e le sostanze DEPAPD e PMK etil glicidato (utilizzate per la sintesi di metamfetamina, amfetamina e MDMA, alcune delle droghe più comuni prodotte illecitamente nell'Unione europea che normalmente non hanno una produzione, un commercio od un uso leciti noti).

In questo scenario rischioso e difficile da interpretare, in Italia sono state elaborate ed emanate dal Gruppo Tossicologi Forensi Italiani, specifiche linee guida [24]. Tali indicazioni, attualmente in vigore e progressivamente aggiornate, garantiscono un controllo della qualità delle procedure, dei campioni da prelevare, delle metodiche ed analisi raccomandate per la lavorazione dei campioni post-mortali.

## **1.2 Tossicologia forense su matrici alternative**

In alcuni casi particolari casi, le indagini tossicologiche e la scelta delle matrici più affidabili sono estremamente condizionate dalla completa, o quasi, distruzione delle matrici cadaveriche “convenzionali”. La reperibilità di queste matrici presenta infatti forti limitazioni dovute alla conservazione del corpo PM, al tempo trascorso dalla morte (PMI – post mortem interval) ed alle circostanze di morte. Pochissime matrici biologiche resistono inalterate ai fenomeni putrefattivi avanzati, alle alte temperature, ad ambienti estremamente umidi o estremamente secchi, alla scheletrizzazione dei corpi, resti umani/scheletrici, esumazione ovvero all’azione della macrofauna in ambiente aperto [24, 29-30].

Per superare queste circostanze, ormai da molti anni, la comunità scientifica dei tossicologi forensi si concentra sulla ricerca e sullo studio approfondito di altre matrici biologiche definite “alternative” che siano semplici da raccogliere, conservare e gestire, che permettano di ampliare la finestra di rilevabilità delle sostanze, e che siano più resistenti ai fenomeni post-mortali e reperibili su cadavere [22, 31-42].

Alcune di queste matrici sono già ben note alla comunità scientifica e giuridica, e vengono regolarmente utilizzate come matrici di supporto in casi forensi a seconda della necessità e delle circostanze: ad esempio, il contenuto gastrico (vomito o aspirato gastrico) è utile nei casi di intossicazione orale e a scopo di screening, poiché le sostanze possono essere individuate nello stomaco prima di essere metabolizzate [10].

Le matrici cheratinizzate come i capelli, abbiamo visto che sono ormai ampiamente utilizzate anche su cadavere e previste tra i prelievi raccomandati dalle Linee Guida [24].

Tra le matrici “alternative” cheratinizzate, grande attenzione al momento viene posta nelle unghie, tessuto sempre più utilizzato in tossicologia forense post-mortale come matrice complementare. Come i capelli infatti, consentono un'indagine retrospettiva sull'abuso cronico di sostanze che possono accumularvisi stabilmente per lunghi periodi di tempo. Tuttavia, non sono ancora stati completamente chiariti i meccanismi di incorporazione delle sostanze nelle unghie, ma alcune recenti ricerche hanno contribuito ad una migliore comprensione di come gli xenobiotici potrebbero essere assimilati all'interno della matrice, suggerendo tre potenziali meccanismi: contaminazione da sudore, incorporazione dal letto ungueale e incorporazione dalla matrice germinale [41-42]. Inoltre, nel corso degli anni sono stati validati alcuni metodi di analisi su queste matrici che rendono più affidabile il dato rilevato [43].

L'umor vitreo è considerato un'altra interessante matrice alternativa e può essere utilizzato sia per il rilevamento di xenobiotici che per la stima dell'intervallo post-mortem, che può essere stimato dalle concentrazioni di albumina e potassio [10, 44]. È facile da prelevare su cadavere e soprattutto scarsamente suscettibile alla contaminazione batterica ed alla redistribuzione post-mortale. Risulta quindi una matrice molto stabile nell'intervallo di tempo post-mortale. Ciò è dovuto alla sua posizione lontana dagli organi addominali, alla scarsa vascolarizzazione ed alla protezione del bulbo oculare. Tuttavia, le concentrazioni nel sangue e nell'umor vitreo non possono essere correlate per tutte le sostanze, come la morfina e il diazepam, che hanno concentrazioni più elevate nell'umor vitreo rispetto al sangue. In questa correlazione interferiscono anche il tempo di sopravvivenza, le interazioni farmacologiche delle patologie oftalmiche e l'intervallo post-mortale (PMI). Un'altra applicazione interessante è il tempo di sopravvivenza stimato (PMI) grazie al rapporto tra la concentrazione delle sostanze nel sangue e la concentrazione nell'umor vitreo [44]. L'applicazione dell'umor vitreo a fini tossicologici è rilevante anche per il dosaggio dell'etanolo post-mortale, che è soggetto a neoformazione per



azione di batteri e quindi spesso le concentrazioni riscontrate nei tessuti PM non corrispondono con quelle AM (ante-mortem) [10].

Anche le ossa (corticale e midollo osseo) rientrano tra le matrici alternative oggetto di studi. Il midollo osseo, protetto dalla più resistente componente compatta, rappresenta una valida alternativa quando il sangue non è disponibile [45]. Tuttavia, le concentrazioni ematiche risultano tendenzialmente superiori a quelle ossee ma con una relazione lineare tra le due differenti concentrazioni, e quindi correlabile. Tuttavia, è da considerarsi l'elevata difficoltà ed invasività del prelievo osseo (solitamente in sito femorale).

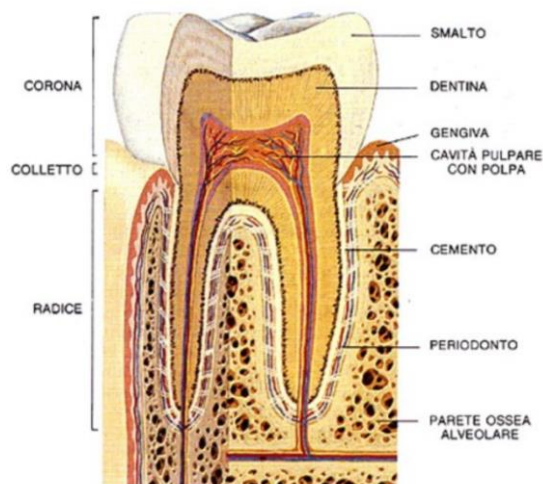
Lo studio approfondito di queste matrici ne ha evidenziato le potenzialità nell'affiancare le matrici biologiche classiche nella tossicologia forense post-mortale. Tuttavia, la letteratura disponibile non è al momento esaustiva e soprattutto insufficiente un numero adeguato di studi di validazione. Questa mancanza, ne rende difficile l'interpretazione quantitativa dei risultati e conseguentemente inficia la loro solidità scientifica nei casi giuridici.

In conclusione, unghie, ossa e similmente denti, sono ad oggi molto attenzionati dalla comunità scientifica dei tossicologi forensi in quanto rappresentano i siti anatomici più resistenti alla decomposizione cadaverica e spesso le uniche matrici disponibili nei casi di corpi ampliamenti distrutti o putrefatti. Tuttavia, l'utilizzo di matrici alternative richiede ancora la validazione di metodologie di analisi sempre più sensibili, uno studio più approfondito della correlazione dose assunta/concentrazione rilevata ed una conoscenza scientifica della farmacocinetica e del meccanismo di assimilazione/assorbimento delle diverse sostanze all'interno dei differenti substrati biologici per un'interpretazione dei risultati affidabile e scientificamente sostenibile ai fini forensi e giuridici [46].

### 1.3 Istologia del dente

I denti sono strutture anatomiche ed istologiche complesse designate nel loro insieme, con le basi ossee (mandibola e mascella), muscoli masticatori e mimici e lingua, a molte funzioni organiche, in particolare quella masticatoria, fonatoria, deglutitoria, di suzione, ecc... Il dente può essere suddiviso in due componenti anatomiche principali: la corona e la radice, la cui transizione è segnata da un'area circolare per i 360° dell'elemento dentario che presenta un restringimento del diametro (colletto cervicale). La corona è la parte che emerge dall'osso alveolare della mascella o della mandibola ed è a contatto con l'esterno della cavità orale; la radice si è ancora all'interno dell'osso alveolare ed alla gengiva aderente di rivestimento tramite una struttura fibrosa chiamata "legamento parodontale" e si trova a contatto con le strutture interne dell'organismo attraverso piccoli fori alla base delle radici (forami apicali) tramite i quali il fascio vascolo-nervoso entra all'interno del dente [47]. La radice è quindi "coperta" da osso e tessuto connettivo fino alla giunzione amelo-cementizia (in situazione fisiologica), cioè nel punto di passaggio tra lo smalto ed il cemento a livello del colletto cervicale. La porzione di dente esposta al cavo orale è la corona (e quindi lo smalto). La giunzione amelo-cementizia rimane comunque coperta da gengiva non aderente al dente, formandosi quindi una zona di passaggio chiamata "solco gengivale" che è a contatto con l'esterno ma profonda e difficile da raggiungere.

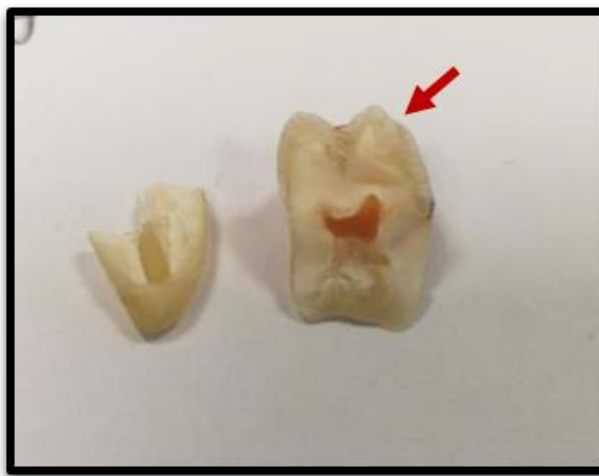
La struttura istologica del dente è altrettanto complessa e caratterizzata da strati concentrici, ciascuno dei quali presenta caratteristiche fisiche, chimiche ed organiche differenti (Fig. 1).



**Fig. 1** Schema tridimensionale dell'anatomia dentale [<https://www.centroodontoiatricovullo.com/it/news-11/anatomia-del-dente.html>]

Procedendo in direzione corono-apicale: la corona è rivestita da uno strato esterno costituito unicamente da sostanza inorganica altamente mineralizzata ed organizzata in strutture nastriformi disposte perpendicolarmente alla polpa dentale, “prismi dello smalto”. I prismi sono costituiti da cristalli di idrossiapatite (ricchi in carbonato di calcio, fosfato di calcio e fluoruro di calcio), al 5° posto della scala di durezza di Mohs. Gli ameloblasti sono le cellule epiteliali specializzate alla sintesi dei cristalli di idrossiapatite. Queste ricoprono l'intera superficie del dente in via di sviluppo, ovvero sia ancora contenuto completamente all'interno dell'osso alveolare, e cristallizzano una matrice amorfa, ricca di proteine ma priva di cellule e vasi, modificando il pH da leggermente acido a fisiologico [48]. Lo smalto maturo è completamente privo di cellule, vasi e nervi ma presenta una piccola percentuale di proteine: amelogenina, smaltina e perlecano. Via via che gli strati più coronali dello smalto sono completi, ovvero sia completamente convertiti in prismi di idrossiapatite, la spinta eruttiva del dente espone la corona all'esterno del cavo orale, degradando le cellule ameloblastiche fino a completa eruzione. Per questo motivo, lo smalto non può rigenerarsi e non può essere sostituito. Tuttavia, la struttura prismatica è molto serrata e la porosità dello smalto scarsissima, tale da proteggere le strutture

sottostanti del dente, grazie alla “durezza” e compattezza dei cristalli di idrossiapatite proprio perché costituisce la superficie esterna del dente a contatto con l’esterno del cavo orale e detta “occlusale”, ovvero sia la struttura preposta al contatto con gli altri elementi dentali e sottoposta a continue forze masticatorie [49]. Lo spessore dello smalto è inferiore nella regione del colletto cervicale e più spesso nelle superfici masticatorie (margine incisale, cingoli, superficie occlusale e cuspidi). Grazie alla rilevante componente di calcio all’interno dello smalto, questo strato ha un aspetto bianco opaco tipico rispetto agli altri strati sottostanti, più giallastri (Fig. 2).



**Fig. 2** Dettaglio di un dente tagliato longitudinalmente che evidenzia la differenza di colore tra smalto, esterno (freccia rossa) e tessuti interni.

Questa tipica struttura, unica in tutto l’organismo, garantisce allo smalto una grande resistenza alle forze fisiche ed alle alte temperature; tuttavia, subisce l’usura nel tempo (lungo tempo in assenza di fattori di rischio) e soprattutto l’azione delle sostanze acide, che abbassando il pH salivare demineralizzano la struttura prismatica e aumentano la porosità del tessuto [50].

La dentina è prodotta da cellule specializzate chiamate odontoblasti e circonda l’intera struttura del dente. Anatomicamente costituisce la “camera pulpare” ovvero sia la cavità che ospita il tessuto più interno del dente (il vero “cuore vitale”), chiamato “polpa dentale” e che si ritrova

sia all'interno della corona che delle radici. È quindi possibile distinguere una dentina coronale ed una dentina radicolare: la dentina coronale è rivestita e protetta dall'esterno dallo smalto, mentre la dentina radicolare è ricoperta dal cemento adeso all'interno dell'alveolo osseo tramite il legamento parodontale [51]. La dentina è composta per il 70-80% da idrossiapatite e per il 20-30% da materiale organico e acqua. Questa composizione rende la dentina molto simile al tessuto osseo ma presenta minor resistenza e maggiore elasticità dello smalto sebbene sia più dura dell'osso. Questo tessuto è costituito da microscopici canali, detti "tubuli dentinali", che si irradiano dall'interno del dente (dalla polpa) verso l'esterno perpendicolarmente alla polpa: nella dentina coronale hanno un andamento sigmoidale, che diventa più rettilineo a livello della radice. Il diametro dei tubuli è massimo vicino alla polpa (2,5  $\mu\text{m}$ ) e si riduce progressivamente fino a 0,9  $\mu\text{m}$  in prossimità dello smalto o del cemento. I tubuli contengono processi odontoblastici detti fibre di Tomes (lunghe propaggini che si dipartono dalle cellule odontoblastiche situate nella periferia della polpa dentaria), fluido dentinale (simile al plasma sanguigno), fibre nervose e microcircolo sanguigno, indispensabili per il nutrimento e per la sensibilità della dentina. Una guaina, chiamata guaina di Neumann, circonda e separa questo ambiente dal tubulo dentinale mineralizzato circostante. I tubuli sono delimitati da dentina detta "peritubulare", una struttura altamente mineralizzata e scarsa in componente organica; ma la maggior parte della dentina è costituita da dentina detta "intertubulare" (tra i tubuli), che possiede una maggiore componente connettivale costituita da fibre di collagene orientate perpendicolarmente rispetto ai tubuli. La dentina è prodotta dagli odontoblasti (cellule specializzate) durante l'odontogenesi ma, a differenza di quanto avviene per lo smalto, al termine della formazione primaria, le cellule non finiscono intrappolate nella matrice dentinale fino a completa degenerazione. La deposizione di dentina avviene in direzione centripeta, cioè dall'esterno delle strutture dentali (smalto o cemento) verso l'interno (polpa). Al termine della formazione della dentina sia coronale che radicolare, i corpi delle cellule odontoblastiche si

posizionano a livello dell'interfaccia pulpo-dentinale disponendosi in uno strato cellulare attivo e compatto "a palizzata". Oltre al corpo, dove risiede il nucleo, queste cellule presentano peculiari estensioni citoplasmatiche (processi/fibre di Tomes) che si estendono all'interno dello strato dentinale attraverso i tubuli. Questo permette alle cellule odontoblastiche di rimanere attive e vitali per tutta la vita di un individuo, continuando a depositare dentina anche dopo la formazione primaria del dente maturo. In seguito a stimoli irritativi provenienti dall'esterno, gli odontoblasti riprendono la deposizione di dentina peritubulare riducendo il calibro dei tubuli (chiudendo la comunicazione tra polpa e dentina con il processo chiamato "sclerosi dentinale") nel tentativo di proteggere il dente [52]. In base alla fase di sviluppo del dente, la dentina può essere suddivisa in dentina primaria, che viene depositata dagli odontoblasti durante il processo di dentinogenesi (formazione del dente) a partire da una matrice organica chiamata pre-dentina e si localizza immediatamente al di sotto dello smalto e del cemento; la dentina secondaria, invece, viene deposta (molto lentamente) durante tutto l'arco della vita di un individuo adulto, a partire dalla completa formazione del dente fino alla morte del soggetto (o del dente). Questa dentina si localizza soprattutto a livello del tetto e del pavimento della camera pulpare (coronale), a livello più centrale del dente ed a contatto con la polpa. Essa è responsabile della progressiva diminuzione delle dimensioni della camera pulpare stessa correlabile con la stima dell'età del soggetto [52-57]. Il tasso di deposizione è più veloce per la dentina primaria rispetto alla secondaria che viene deposta maggiormente a livello coronale rispetto alle radici e presenta comunque una significativa variabilità individuale, con una media di 0,8 micrometri di spessore al giorno [58]. Infine può essere depositata dentina terziaria, ovverosia dentina reattiva che viene deposta in seguito ad insulti esterni (batterici, fisici, chimici) e la quantità e la sede di deposizione sono in funzione della localizzazione e della durata dello stimolo. La dentina è uno strato sensibile e meno resistente rispetto allo smalto proprio per la presenza dei tubuli

dentinali. Di conseguenza, qualsiasi alterazione dello smalto consente l'esposizione della dentina ad elementi chimici e microbiologici.

La polpa è il tessuto più interno dei denti ed è costituita da sostanza amorfa, tessuto connettivo lasso, fibre collagene, fascio vascolo-nervoso e cellule (fibroblasti, cellule del sistema immunitario, cellule mesenchimali e lo strato di cellule odontoblastiche). La polpa si estende dalla corona alla/e radice/e dei denti all'interno della camera pulpare (nella corona) e dei canali radicolari (radici). Le radici presentano un'apertura alla prossimità dell'apice, il forame apicale, che consente l'ingresso all'interno della polpa di arterie, vene, vasi linfatici e nervi, cruciali per mantenere la vitalità del dente ed il metabolismo attivo delle cellule odontoblastiche e non. Ulteriormente, la polpa può essere divisa anatomicamente in quattro zone: lo strato odontoblastico, la zona mesenchimale (strato acellulare di Weil), la zona ricca di cellule e il nucleo. Gli odontoblasti sono allineati alla periferia della polpa e producono dentina secondaria o terziaria; il secondo strato è prevalentemente acellulare e presenta tessuto connettivo lasso con fibre nervose e piccoli vasi sanguigni; l'area più interna è più cellulare e presenta un ricco apporto vascolare e nervoso, simile al nucleo pulpare situato al centro della camera pulpare. Nella radice sono normalmente presenti due tipi di fibre nervose: le fibre mieliniche (sensitive) e le fibre non mielinizzate (del sistema nervoso simpatico). Le fibre mieliniche sono di origine trigeminale, dai rami mandibolare e mascellare del nervo trigemino. I corpi cellulari si trovano nel ganglio trigeminale e ramificazioni terminali entrano nella polpa avvolgendo gli odontoblasti [47, 50, 52].

Il cemento riveste la dentina radicolare dalla giunzione amelo-cementizia fino ai forami apicali. È simile alla struttura e composizione delle ossa scheletriche. Presenta cellule specializzate, i cementociti, che occupano le "lacune" ed è composto da una sostanza inorganica e materiale

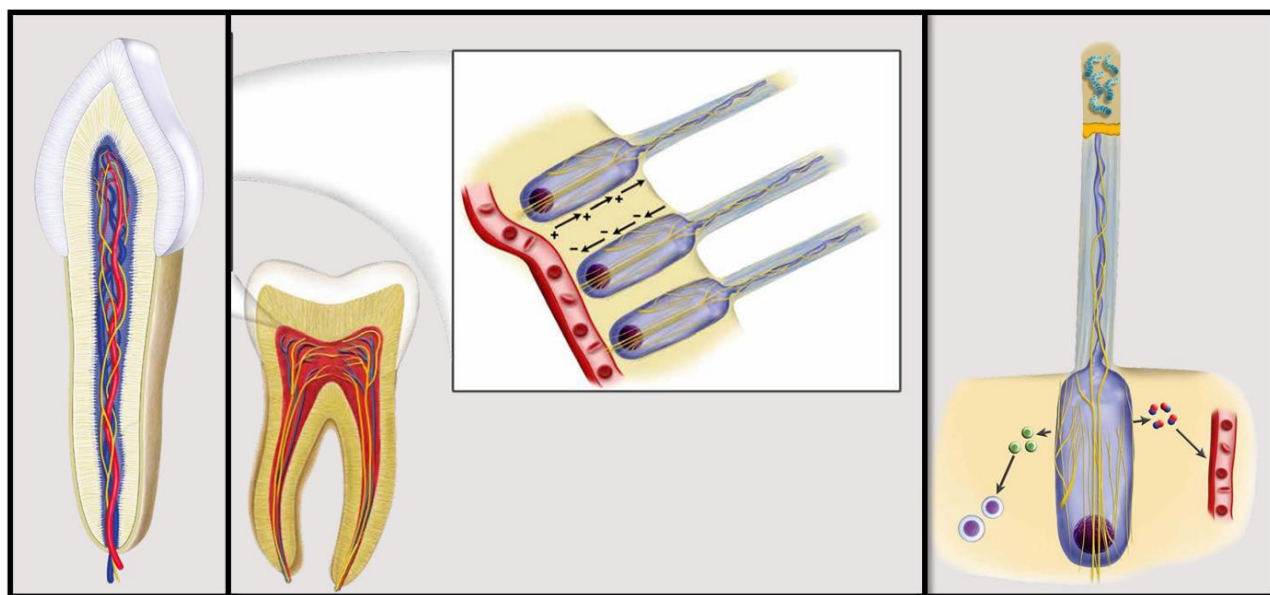
organico mineralizzato. Con l'invecchiamento, molti cementociti muoiono e il cemento perde la sua popolazione rigenerativa di cellule. Questa struttura presenta alcuni canalicoli accessori che possono essere presenti in numero diverso e sono localizzati lateralmente. Nell'odontogenesi, i canali accessori laterali si formano quando la guaina radicolare incontra un vaso sanguigno.

Il legamento parodontale è una struttura connettivale, che collega il cemento radicolare all'osso alveolare. È composta da un complesso di cellule (fibroblasti, osteoblasti, cementoblasti, residui del Malassez, macrofagi, eosinofili, mastocellule), fibre nervose e vasi sanguigni e linfatici, immersi in una matrice extracellulare prevalentemente formata da fasci di fibre connettivali. È situato tra l'osso alveolare proprio e il cemento radicolare e lo spazio in cui si dispone ha un'ampiezza di circa 0,25 mm e una forma a clessidra. Questa struttura collega il dente all'osso mediante fasci di fibre collagene e fibre elastiche [47, 50, 52].



## 1.4 Fisiologia del complesso pulpo-dentinale

In un dente vitale, la polpa e la dentina creano un complesso detto “pulpo-dentinale” (Fig. 3) [59].



**Fig. 3** Da sinistra verso destra: rappresentazione grafica del complesso pulpo-dentinale; rappresentazione grafica dello scambio di liquidi interstiziali sostenuto dalla pressione capillare in prossimità dei tubuli dentinali; metabolismo attivo della cellula odontoblastica.

Ogni elemento dentale, in dentizione decidua o permanente, viene irrorato da una ramificazione dell'arteria mascellare interna che, passando attraverso i forami apicali delle radici e all'interno delle radici, attraversa gli strati più esterni della polpa per poi sfociare in un plesso capillare terminale nello strato sotto-odontoblastico. La densità capillare è quasi nulla nel centro della polpa, mentre aumenta in maniera esponenziale verso la periferia. Il completamento del circolo sanguigno è assicurato dalle vene pulpari che, passando attraverso le pareti radicolari (cemento), fuoriescono dall'apice e defluiscono nelle vene alveolari superiori e inferiori. Inoltre, dall'apice radicolare, passano fibre nervose di diametro variabile da 2 a 12 micron che, dapprima entrano raggruppate in un unico fascio, poi si ramificano in direzione apico-coronale

per distribuirsi uniformemente fino allo strato odontoblastico. Le fibre mieliniche sensitive, di afferenza trigeminale, circondano il corpo delle cellule odontoblastiche e si estendono fino alla prima porzione dei tubuli dentinali. Nel dente “giovane”, la maggior parte delle terminazioni nervose, per numero e concentrazione, si trova nei cornetti pulpare (a livello della camera pulpare) con il 40% dei tubuli dentinali innervati. Questa percentuale si riduce al 4,8% nelle porzioni laterali della polpa coronale ed all'1% nelle regioni cervicali [60].

Nel complesso pulpo-dentinale, costituito dallo strato odontoblastico, il processo di Tomes, vasi e nervi provenienti dalla polpa, fluido dentinale e tubuli dentinali all'interno della dentina, assistiamo ad un continuo scambio di liquidi interstiziali sostenuto dal circolo sanguigno all'interno di una cavità inestensibile (tubuli). La pressione pulpare, di circa 8-15 mmHg<sup>7</sup> in condizioni di salute, viene contrastata dalla pressione capillare e parte del liquido interstiziale trasuda all'interno dei tubuli dentinali per gradiente pressorio garantendo nutrimento ai processi odontoblastici. In questo modo, i processi odontoblastici possono continuare a depositare quantità variabili di dentina peritubulare nell'arco di tutta la vita di un individuo, provocando una riduzione crescente della pervietà dei tubuli in funzione dell'età, fino a una loro completa obliterazione. Lo stesso processo è quello che interessa anche la riduzione dell'ampiezza della polpa camerale per cui gli odontoblasti depongono dentina secondaria come processo fisiologico di invecchiamento del dente [59]. Non solo sostanze nutritive per gli odontoblasti, ma all'interno del fluido dentinale è possibile rilevare la presenza di altre molecole e sostanze filtrate direttamente dal circolo sanguigno periferico che entra in quello pulpare. Di conseguenza, è possibile che queste entrino nel metabolismo attivo di deposizione di dentina secondaria o peritubulare da parte degli odontoblasti accumulando all'interno della dentina più centrale diverse sostanze, come farmaci o sostanze di abuso.

In una situazione “patologica”, ovvero sia a seguito della perdita della protezione dello smalto esterno a livello della corona, l'esposizione della sottostante dentina e dei suoi tubuli alla cavità

orale compromette anche lo stato di salute dell'intero complesso pulpo-dentinale. L'aumento improvviso della conduttanza idraulica dei tubuli dentinali esposti all'esterno consente sia un lento flusso spontaneo del fluido verso l'esterno (dovuto al fatto che la pressione del tessuto pulpare è superiore alla pressione della cavità orale), sia rapidi spostamenti del fluido in risposta all'applicazione di stimoli dolorosi (termici, meccanici, osmotici, evaporativi). Quando la dentina diventa iperconduttiva, l'aumento del flusso del fluido verso l'esterno (che è il prodotto della conduttanza idraulica della dentina e della pressione del tessuto pulpare) tende inizialmente a liberare i tubuli da qualsiasi sostanza che potrebbe essersi diffusa attraverso la dentina verso la polpa (ad esempio i batteri che costituiscono la flora batterica del cavo orale). Ma in una fase successiva, le sostanze batteriche possono diffondersi facilmente e velocemente attraverso i tubuli dentinali ormai aperti e liberati dai fluidi per raggiungere la polpa [59].

Lo stesso meccanismo può essere preso in considerazione in caso di contaminazione esterna da parte di altri tipi di sostanze (come ad esempio farmaci o droghe assunte per via orale), che in condizioni non fisiologiche dello smalto potrebbe permettere l'ingresso di sostanze all'interno della polpa dentale che non derivano dal circolo sanguigno bensì attraversando gli strati più esterni della dentina (dalla dentina primaria, più periferica, alla dentina secondaria, più centrale e a contatto con la polpa) all'interno dei tubuli.

## **1.5 Stato dell'arte: denti come matrice alternativa alle indagini forensi**

Data la continua necessità di ricercare e studiare nuove matrici “alternative” che siano altamente resistenti alle condizioni post-mortali e che quindi siano largamente disponibili anche sui cadaveri severamente compromessi (da putrefazione, carbonizzazione, scheletrizzazione, esumazione, ecc...), i denti potrebbero offrire un utile ed interessante substrato per le indagini tossicologiche PM come matrice alternativa sia per i fluidi biologici comunemente utilizzati (sangue periferico) che per i capelli quando non fossero più reperibili.

Poiché molto poco è noto sull'interpretazione delle concentrazioni delle sostanze rilevabili nei denti e sulla finestra di rilevabilità di questa matrice, alcuni autori si sono concentrati sull'approfondimento della matrice dentale ed hanno pubblicato interessanti studi che producono dei risultati molto promettenti.

Garcia-Algar e coll [61] nel 2003 avevano già pubblicato uno studio sulla determinazione della nicotina e della cotinina nei denti decidui correlandone la presenza con l'esposizione al tabacco cumulativa della madre durante le fasi dello sviluppo fetale e del fumo passivo del bambino fino al momento della permuta dei denti.

Nel 2013, Zeren e coll [62] hanno studiato i livelli di EtG (etilglucuronide) nel tessuto dentale di soggetti consumatori. Sui 29 campioni dentali, 14 dei partecipanti erano consumatori di alcol non pericolosi, 9 erano consumatori di alcol, mentre 6 pazienti dichiaravano verbalmente di essere astemi. Le analisi dei tessuti dentali hanno rivelato livelli di EtG compresi tra EtG<LOD e 23,39 pg/mg ed è stato osservato che i livelli di EtG erano <LOD nei campioni dentali di 6 casi astemi.

Schüssl e coll [63] hanno dimostrato che 11 pazienti che avevano ricevuto una sola dose di 2 g di amoxicillina e 11 pazienti che avevano ricevuto una sola dose di 600 mg di clindamicina ad assunzione orale circa 60 minuti prima dell'estrazione del dente, presentavano

una concentrazione media di amoxicillina di 0,502  $\mu\text{g/g}$  nelle radici e 0,171  $\mu\text{g/g}$  nelle corone ed una concentrazione media di clindamicina era di 0,270  $\mu\text{g/g}$  nelle radici e 0,064  $\mu\text{g/g}$  nelle corone.

Nel frattempo, nel 2006 esce un lavoro di Pellegrini e coll [64] che elaborano una procedura per la determinazione degli oppiacei (6-monoacetilmorfina, morfina e codeina), della cocaina e dei loro metaboliti (benzoilecgonina e cocaetilene) nei denti umani basata sulla gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). Dopo l'aggiunta di nalorfina come standard interno, i campioni polverizzati venivano incubati in HCl a 37°C per 18 ore. Quindi, dopo aggiustamento del pH a 6, gli analiti venivano estratti con due volumi di 3 ml di cloroformio/isopropanolo (9:1). La cromatografia veniva eseguita su una colonna capillare di silice fusa e gli analiti sono stati determinati nella modalità di monitoraggio degli ioni selezionati (SIM). Il dosaggio è stato validato nell'intervallo da 7,5 (6,0 in caso di codeina) a 500 ng/g con recuperi medi assoluti compresi tra 74,1 e 92,1% per i diversi analiti e precisione e accuratezza sempre migliori del 15%. Il metodo applicato all'analisi dei denti di tossicodipendenti per valutare il consumo cronico pregresso mostra nel caso degli oppiacei, un intervallo di concentrazione era 36,5-570,0 ng/g per la 6-monoacetilmorfina, 8,7-154,8 ng/g per la morfina e 7,9-127,9 ng/g per la codeina; per la concentrazione di cocaina l'intervallo variava tra 5,6 e 57,2 ng/g con il suo principale metabolita benzoilecgonina che variava da 12,6 a 81,7 ng/g e il cocaetilene presente in un solo campione con un valore di 10 ng/g. Sulla stessa linea di ricerca, Tassoni e coll [65] nel 2017 propongono e validano il loro metodo di analisi per determinare la presenza di cocaina, oppiacei e loro metaboliti mediante una procedura basata sulla gascromatografia-spettrometria di massa (GC/MS). Il metodo è stato validato con una buona linearità compresa tra 0,1 e 2  $\mu\text{g/g}$  per tutte le sostanze ed il limite di detenzione variava da 0,03 a 0,04 ng/mg, mentre il limite di quantificazione era 0,1 ng/mg. Il metodo è stato applicato all'analisi di 10 denti di tossicodipendenti e di 10 soggetti non dipendenti (gruppo di

controllo). In tutti i campioni è stata rilevata la presenza di una o più sostanze di un abuso mentre tutti i soggetti dei gruppi di controllo hanno evidenziato l'assenza di sostanze.

Nel 2003, Cattaneo e coll [66] testarono 3 gruppi di denti per la determinazione della presenza di morfina e codeina: il primo gruppo era costituito da denti invecchiati artificialmente di individui noti per essere morti per overdose di eroina; il secondo gruppo era costituito da denti di individui senza storia di abuso di droghe; il terzo era costituito da denti provenienti da casi di resti bruciati, putrefatti e scheletrati rinvenuti in condizioni fortemente indicative di una morte correlata alla droga. I risultati hanno confermato la presenza di morfina e codeina nei gruppi 1 e 3, dimostrando che i denti potrebbero rappresentare una fonte affidabile per le indagini tossicologiche nella ricostruzione di storie di assunzione pregressa di sostanze.

Un simile risultato di stabilità delle matrici dentali è stato confermato anche da Cippitelli e coll [67] che nel 2018 presentarono i risultati ottenuti da campioni dentali estratti da un cadavere riesumato dopo circa 1 anno, su richiesta del Pubblico Ministero per valutare se la morte fosse stata causata dal consumo di droga. Le analisi tossicologiche sulla matrice dentale sono state associate anche ad altre matrici che riuscirono a reperire dal corpo PM, tra cui fegato, reni e capelli. L'analisi tossicologica sistematica (STA), che consisteva nell'estrazione liquida/liquida basica e acida e nell'analisi gascromatografica-spettrometria di massa (GC-MS), ha mostrato la presenza di oppiacei in ciascuna delle matrici analizzate.

Klima e coll [68] cercano di approfondire il meccanismo di incorporazione delle sostanze nei tessuti dentale per fornire informazioni utili all'interpretazione forense di questa matrice mettendo a punto uno studio pilota su 3 denti di soggetti tossicodipendenti. Uno dei tre campioni dentali presentava un trattamento endodontico, mentre degli altri due hanno potuto analizzare le polpe dentali separatamente dal resto del dente mineralizzato. I denti sono stati separati in radice, corona e materiale cariato. Nei tessuti duri dentali della corona e della radice, hanno rilevato la presenza di ben 11 sostanze con un'unica analisi (anfetamina, MDMA,

morfina, codeina, norcodeina, metadone, EDDP, fentanil, tramadolo, diazepam, nordazepam e prometazina) e le concentrazioni variavano da circa 0,13 pg/mg a 2.400 pg/mg. Hanno inoltre notato che le concentrazioni delle sostanze diminuivano seguendo l'ordine materiale cariato, radice e corona. Solo il dente trattato endodonticamente ha mostrato concentrazioni più elevate nella corona che nella radice. Dal confronto con altre matrici PM analizzate, tra cui sangue e capelli, hanno notato che la finestra di rilevabilità dei denti sembra sovrapporsi a quella di entrambi.

Quintela e coll [69] si concentrano sulla ricerca di benzodiazepine nei tessuti dentali mediante tecnica LC/MS/MS. Nel loro studio sono riusciti ad identificare e quantificare 16 tipi di benzodiazepine nei denti di pazienti in trattamento cronico con questi farmaci. Su 16 casi, 12 sono risultati positivi a qualsiasi benzodiazepina, mentre 4 erano negativi. Ciò significa che nonostante i denti possono essere un ottimo substrato, è necessario fare attenzione al rischio di falsi positivi.

Infine, Ottaviani e coll [70] sviluppano e validano un metodo di GC-MS per rilevare droghe d'abuso in un singolo campione di dente. Le polveri del dente sono state sottoposte ad idrolisi acida per rilevare oppiacei, cocaina e i loro metaboliti. I materiali dentali residui di queste analisi sono stati sottoposti ad estrazione di base per rilevare i prodotti della cannabis ( $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo, cannabidiolo e cannabinolo). Il metodo ha mostrato una buona linearità tra 0,05 e 2 ng/mg per tutte le sostanze. Il limite di rilevamento variava da 0,02 a 0,03 ng/mg e il limite di quantificazione era 0,05 ng/mg. L'applicazione del metodo a campioni di denti ottenuti da soggetti tossicodipendenti viventi ha mostrato ottimi risultati di ripetibilità, proponendosi utile anche per i casi post-mortem.

## 2 Scopo della ricerca

Lo scopo di questo progetto di ricerca è quello di porre l'attenzione sulle potenzialità ed i limiti dei *denti* applicati come matrice alternativa per le indagini tossicologiche post-mortali in caso di decessi droga-correlati.

Nell'ultimo ventennio la comunità scientifica dei tossicologi forensi si è costantemente dedicata alla ricerca ed allo studio di matrici post-mortali affidabili, stabili e disponibili anche su cadaveri estremamente alterati dai fenomeni putrefattivi avanzati, dalle alte temperature, da ambienti estremamente umidi o estremamente secchi, dalla scheletrizzazione, o in presenza di resti umani/scheletrici, di esumazione ovvero dell'azione della macrofauna in ambiente aperto (Fig. 4).



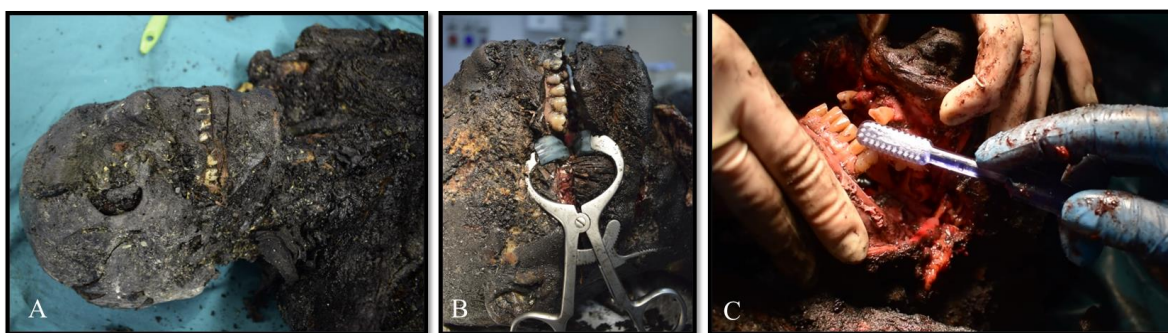
**Fig. 4** Alcuni casi di cadaveri altamente distrutti o decomposti. Panel A: corpo carbonizzato; Panel B: corpo in avanzato stato di decomposizione con iniziale scheletrizzazione del busto; Panel C: corpo in avanzato stato di putrefazione; Panel D: resti umani scheletrici; Panel E: cranio esumato quasi completamente scheletrizzato.



In questi particolari casi, le indagini tossicologiche e la scelta delle matrici più affidabili sono estremamente condizionate dalla completa, o quasi, distruzione dei fluidi biologici (sangue, urina, umor vitreo, bile) e degli organi interni (matrici routinariamente applicate su cadavere) [24, 29-30].

In questo scenario, i denti rappresentano una potenziale *matrice alternativa* per la tossicologia forense post-mortale applicabile sia nella diagnosi di intossicazione acuta che nella ricostruzione di una storia di abuso cronico di sostanze.

Da un lato, i denti risultano particolarmente resistenti agli agenti ambientali anche a condizioni estreme (ad esempio di calore, umidità, disidratazione, pressione, ampio intervallo post-mortale) e quindi facilmente reperibili e meglio conservati rispetto al resto dei tessuti post-mortali (talvolta l'unica matrice disponibile). Questo è garantito dalla loro strategica posizione anatomica all'interno del cavo orale, ricco di acqua per la presenza della lingua e protetto dai tessuti periorali (Fig. 5) [71-75] ed all'elevata mineralizzazione dei tessuti esterni della corona dentale che, non solo sono scarsamente suscettibili alle modificazioni post-mortali ed agli agenti ambientali, ma proteggono e conservano le strutture anatomiche interne (dentina e polpa dentale) [76-78].



**Fig. 5** Stato di conservazione degli elementi dentali in un corpo ampiamente carbonizzato. Panel A: i tessuti molli periorali e la lingua protrusa e serrata tra le arcate dentarie risultano ampiamente alterati dall'azione del calore e delle fiamme, al contrario i denti anteriori sono ancora presenti; Panel B: i denti postero-laterali risultano presenti e ben conservati all'interno del cavo orale; Panel C: i tessuti molli endorali ( di colore rosso acceso) risultano

molto meglio conservati dei tessuti molli periorali (quasi completamente carbonizzati) e gli elementi dentali anteriori sono presenti e ben conservati dal punto di vista anatomico.

Inoltre, la loro precipua stratificazione istologica permette di identificare diversi tessuti dentali con differenti caratteristiche fisiologiche ed anatomiche: la porzione radicolare degli elementi dentali è accolta all'interno dell'osso alveolare cui aderisce tramite il legamento parodontale e quindi completamente protetta ed isolata dall'ambiente esterno (cavo orale); la porzione coronale è invece a diretto contatto con l'esterno del cavo orale. Ulteriormente, la corona è costituita all'esterno dallo smalto, che è il tessuto più mineralizzato dell'organismo, privo di metabolismo attivo ed a bassa porosità. Riveste interamente lo strato dentinale coronale sottostante formando come una barriera protettiva dagli insulti esterni anche più estremi. Al di sotto si trova il complesso pulpo-dentinale che costituisce il vero organo vitale del dente dove avviene il continuo scambio metabolico di sostanze tra le due strutture che lo compongono. La dentina circonda interamente la polpa sia coronale che radicolare ed è un tessuto parzialmente mineralizzato e molto poroso poiché ricco di tubuli che permettono il passaggio del filtrato plasmatico proveniente dalla polpa centrale e che ne garantisce un metabolismo attivo per tutto l'arco della vita di un soggetto. Viene prodotta e depositata in direzione centripeta dalle cellule della polpa periferica (odontoblasti) e si distingue in "primaria" (più periferica) che viene depositata dal momento della formazione del dente fino alla completa maturazione, e "secondaria" (più centrale) che inizia dopo la completa maturazione dentale fino alla morte del soggetto. Il tasso di deposizione è più veloce per la dentina primaria rispetto alla secondaria che viene deposta maggiormente a livello coronale rispetto alle radici (nell'ordine delle decine di micron all'anno). La polpa è il tessuto più interno del dente ed al contrario degli altri tessuti dentali è costituita da matrice organica, fibre collagene, cellule, nervi e soprattutto vasi

sanguigni che arrivano dalla circolazione periferica ed entrano nel dente attraverso gli apici radicolari [47, 79].

La distinzione tra polpa e dentina permetterebbe di identificare su un unico campione due substrati completamente differenti per le indagini tossicologiche e, rispettivamente, la polpa per la ricerca della concentrazione sanguigna di una sostanza al momento del decesso, e la dentina come tessuto di accumulo nei casi di assunzione cronica nei soggetti tossicodipendenti.

Non solo, ma considerando quanto noto in merito alla stabilità post-mortale dell'umor vitreo [10, 28], la polpa sembra rispecchiare le stesse caratteristiche: scarsamente suscettibile alla contaminazione batterica esterna (eccetto nei casi di patologia dentale che determini una demineralizzazione dello smalto); scarsamente suscettibile alla redistribuzione post-mortale in quanto non solo lontana dagli organi addominali, ma vascolarizzata dal microcircolo pulpale e protetta dai tessuti mineralizzati circostanti con cui non si può determinare uno scambio passivo di sostanze per gradiente osmotico.

Dall'altro lato, alcuni autori hanno dimostrato che molte sostanze d'abuso e farmaci possono essere rilevate a livello dei denti [62-70]. Cattaneo e coll [66] hanno analizzato denti provenienti da casi di resti bruciati, putrefatti e scheletrati rinvenuti in condizioni fortemente indicative di una morte correlata alla droga per analizzare la presenza di morfina e codeina resti umani putrefatti e scheletrizzati non identificati. I risultati hanno mostrato che morfina e codeina potevano ancora essere identificate nei denti. Non solo, la finestra di rilevazione tossicologica (in particolare per anfetamine, MDMA, metadone ed EDDP) sembra sovrapporsi addirittura a quella dei capelli, superando le possibilità diagnostiche dei campioni ematici in ambito di assunzione cronica [68]. Questi risultati preliminari dimostrano un grande potenziale per i tessuti dentali che sembrano rappresentare una fonte affidabile di informazioni tossicologiche riguardanti la storia d'abuso di un individuo e potrebbero permettere di

differenziare una condizione di abuso cronico di sostanze da un'intossicazione acuta analizzando due substrati differenti (la dentina, ovverosia deposito assimilabile alle matrici cheratinizzate, e la polpa dentale, vascolarizzata dal sangue periferico) ma attraverso il prelievo di un unico campione, laddove il resto dei distretti risulti irreperibile o completamente alterato.

Tuttavia, i risultati preliminari ottenuti dai pochi studi in letteratura permettono al momento di affermare solo che a livello dei denti è possibile rilevare la presenza di sostanze.

Per una corretta interpretazione forense di questa matrice, è necessario approfondire e differenziare il grado di velocità e la percentuale di assimilazione di diversi farmaci/sostanze/metaboliti a livello della dentina radicolare/coronale e della polpa per distinguere il substrato più adeguato in ambito di diagnosi di overdose acuta o di intossicazione cronica. Ulteriori studi sono necessari per verificare se le sostanze rilevate nei denti riflettano le concentrazioni in circolo sanguigno nella fase acuta (e quindi presenti nei vasi sanguigni della polpa) oppure se rappresentano depositi all'interno della dentina e/o dello smalto, denotando quindi una storia di abuso cronico di sostanze. Inoltre, è necessario stabilire se vi sia correlazione quantitativa tra concentrazioni pulpari e vascolari periferiche. Mancano ancora adeguati livelli di evidenza scientifica sulla validazione delle metodiche di analisi classiche (come la gascromatografia e/o la cromatografia liquida ad alta risoluzione abbinate a spettrometria di massa) applicate sulla matrice dentale, spesso in presenza di una limitata quantità di campione.

Da esplorare anche il meccanismo di incorporazione delle sostanze all'interno dei tessuti dentali, i siti di deposito e le differenze fisico-chimiche tra le diverse componenti mineralizzate (smalto e dentine apposte in periodi di vita differenti).

Infine, è fondamentale conoscere anche gli effetti che il metodo di assunzione (ad es. per via orale o endovena) e la natura chimico-fisica delle specifiche sostanze assunte possono avere sul

meccanismo di assimilazione, e quindi la sede di accumulo, e quindi l'interpretazione del risultato analitico.

Sulla base della letteratura disponibile e delle conoscenze istologiche e fisiologiche dei tessuti dentali, i possibili meccanismi di assorbimento potrebbero essere solo due ma con una fondamentale differenza interpretativa per fini forensi:

- dall'interno: ovverosia dal flusso vascolare sistemico periferico che entra nel dente attraverso il forame apicale vascolarizzando la polpa dentale e le cellule in essa contenute (odontoblasti) che metabolizzano e depositano la dentina secondaria per tutta la vita di un individuo o che filtrano le sostanze all'interno dei tubuli dentali. Basti pensare ai casi di assunzione di tetracicline, farmaco antibiotico ampiamente utilizzato negli anni passati ed utilizzato ad oggi soprattutto nei casi di allergie agli antibiotici classici. L'incorporazione di questi farmaci all'interno della struttura minerale della dentina in formazione è una condizione ormai nota che comporta una pigmentazione dentale più scura a bande e su cui risultano inefficaci i classici metodi di sbiancamento, suggerendo che la deposizione di xenobiotici avvenga principalmente a livello degli strati sottostanti lo smalto, cioè la dentina [80-82]. Ulteriormente, i risultati ottenuti dallo studio di Klima e coll (2016) [68] sembrano sostenere l'ipotesi che l'assimilazione delle sostanze tossiche nei tessuti mineralizzati (dentina) avvenga principalmente attraverso l'apporto di sangue da parte dei vasi pulpari mentre lo smalto può essere considerato come una barriera protettiva che impedisce parzialmente la contaminazione coronale da parte di molecole provenienti dal fluido orale (ambiente esterno);
- dall'esterno: contaminazione dal cavo orale attraverso lo smalto che può aumentare la sua porosità a seguito di usura severa, al diminuire del pH salivare oppure dalla giunzione amelo-cementizia. Lo stesso studio di Klima e coll (2016) [68] riporta che le

concentrazioni maggiori delle sostanze rilevabili nei denti si accumulano nel tessuto carioso (patologia dentale dei tessuti duri che distrugge i prismi dello smalto e l'idrossiapatite dentinale, permettendo il passaggio dei batteri e delle loro tossine dall'esterno del cavo orale verso l'interno del dente fino alla polpa). Questo fattore può essere discriminante nello studio dell'influenza dei metodi di assunzione e della natura delle sostanze sulla localizzazione dei depositi dentali ed il loro meccanismo di accumulo (ad es. in caso di assunzione di una sostanza per via orale).

Per questo progetto di Dottorato, è stata sviluppata una ricerca pilota per analizzare separatamente i diversi tessuti dentali (smalto, dentina e polpa) ed indagare se nella polpa possano essere rilevate le stesse sostanze presenti nel sangue circolante in casi di morte per overdose/intossicazione acuta o per evidenziare eventuali depositi di xenobiotici nei tessuti duri del dente (dentina e/o smalto), contribuendo così a ricostruire la storia d'abuso cronico di sostanze ed il meccanismo e sito di assorbimento nel dente.

Lo studio è stato condotto *in vivo*, ovvero in casi di decessi droga-correlati per cui fosse richiesta un'indagine tossicologica su matrici classiche (in particolar modo sangue e capelli).

Il primo obiettivo è stato quello di mettere a punto un progetto di ricerca di base per indagare i risultati dei diversi tessuti dentali attraverso metodiche analitiche comunemente utilizzate e già validate in ambito di tossicologia forense.

Il secondo obiettivo è stato quello di confrontare i risultati ottenuti dai tessuti dentali con quelli ottenuti dal sangue (polpa) e dai capelli (smalto/dentina) per indagare le modalità di incorporazione ed accumulo delle sostanze esogene all'interno dei denti.

Data la conduzione *in vivo*, lo studio ha anche permesso di costruire un circoscritto profilo di incidenza delle sostanze coinvolte nei decessi droga-correlati.

### **3. Materiali e Metodi**

#### **3.1 Raccolta del campione**

Per la raccolta del campione autoptico si è proceduto con l'organizzazione di un progetto multicentrico e sono stati attivati due diversi Centri Forensi italiani: il Laboratorio di Identificazione Personale e Morfologia Forense dell'Università di Firenze ed il Laboratorio di Medicina Forense dell'Università di Macerata.

Sono stato estratti campioni dentali post-mortali in casi di autopsie di decessi droga-correlati.

I criteri di inclusione dei casi autoptici consistevano in tutti i decessi droga-correlati a prescindere dalla sostanza stupefacente sospetta di uso/abuso e tutti i casi di morte per altra causa ma di soggetti anamnesticamente conosciuti per l'uso/abuso di sostanze stupefacenti dove fossero richieste le indagini tossicologiche classiche con prelievo di campioni di sangue e capelli.

I criteri di inclusione degli elementi dentali consistevano:

- denti sani estratti integri (nessuna carie, trattamenti conservativi o endodontici, ecc...);
- assenza di usura severa.

I criteri di esclusione dei casi autoptici consistevano in tutti i decessi droga-correlati per cui non sono state richieste o eseguite le indagini tossicologiche classiche con prelievo di campioni di sangue e capelli.

I criteri di esclusione degli elementi dentali consistevano:

- denti affetti da patologia cariosa e/o usura severa;



- presenza di trattamenti conservativi o endodontici;
- soggetti che non soddisfacevano uno o più criteri di inclusione.

Dove possibile, sono stati raccolti i dati anamnestici dei soggetti deceduti: sesso, età, pregressa storia di tossicodipendenza o di disintossicazione, storia clinica riguardo le specifiche terapie farmacologiche seguite, patologie pregresse.

Per la selezione del dente post-mortale da estrarre sono stati presi in considerazione tutti i campioni disponibili senza selezionare il tipo di elemento dentale.

### 3.2 Reagenti per analisi tossicologiche

I reagenti per il pretrattamento e l'estrazione con tecnica SPE (Solid Phase Extraction) sono stati:

- Nalorfina [standard interno (IS) per l'analisi in GC-MS]
- Proadifen (SKF) [standard interno (IS) per l'analisi in UHPLC e GC-MS]
- MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamide)
- N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetammide (BSTFA) con 1% di trimetilclorosilano (TMCS)  
(acquistati da Sigma)

Gli standard di morfina, 6-monoacetilmorfina, metadone, EDDP, codeina, cocaina,  $\Delta^9$ -THC, alprazolam, clonazepam e quetiapina sono stati acquistati da Sigma.

Il metanolo e l'acqua per l'analisi, il metanolo per l'HPLC e l'acqua ultra pura per l'HPLC, il NaOH, l'esano e acetato di etile sono stati acquistati da Carlo Erba.

Tutti i reagenti erano di grado analitico e conservati secondo le istruzioni del produttore.

Infine, sono state utilizzate delle Cartucce ISOLUTE HCX (10 ml, 130 mg) prodotte da Sorbent Technology International (estrazione SPE).

### **3.3 Preparazione dei campioni**

Il protocollo di separazione dei tessuti dentali è innovativo ed originale. È stato elaborato e messo a punto durante il primo anno di percorso di ricerca.

Ciascun campione dentale estratto durante l'autopsia è stato accuratamente lavato con soluzione fisiologica e decontaminato in ipoclorito di sodio per 5-10 minuti.

A ciascun dente è stato assegnato un codice alfa-numericò per anonimizzare i dati del soggetto deceduto.

Ogni dente è stato preparato dallo stesso odontoiatra forense presso lo stesso riunito odontoiatrico, utilizzando frese diamantate e/o multilama montate su turbina. La separazione dei tessuti è avvenuta al di sopra di un aspiratore per amalgama acceso e rivestito da carta filtrante, senza acqua di raffreddamento.

I denti sono stati divisi in due metà longitudinali per accedere prima di tutto alla polpa. Con una fresa diamantata è stato effettuato un solco "guida" a 360° sulla superficie esterna del dente (Fig. 6). Il solco variava di spessore a seconda del tipo di dente. Non si è proceduto alla separazione completa del dente con la fresa per preservare la polpa dentale.



**Fig. 6** Procedura di preparazione del solco “guida” per separare il dente in due metà ed accedere alla polpa.

Una volta effettuato il solco “guida”, le due metà dentali sono state separate con un semplice colpo di martello su una leva da estrazione posizionata all’interno dell’area di minor resistenza ottenuta con il solco “guida”.

Quindi la polpa è stata estratta dalla camera e dalle radici con un escavatore, pinzette chirurgiche e tira-nervi (Fig. 7). Una volta estratta è stata inserita all’interno di una provetta su cui è stato riportato il codice alfa-numeric del caso di riferimento seguito dall’indicazione “P”.



**Fig. 7** Procedura di estrazione della polpa dentale.

Quindi, si è proceduto con la preparazione dei tessuti mineralizzati in smalto, dentina coronale periferica (considerando l’inclusione della sola dentina primaria già matura e completamente

formata [47, 52, 78-79]), dentina coronale centrale (considerando l'inclusione della dentina secondaria depositata nel corso della vita del soggetto [47, 52, 78-79]), dentina radicolare.

Partendo dai tessuti coronali, utilizzando una frese multi-lama su dente completamente asciutto:

- lo smalto è stato separato dalla dentina coronale periferica mediante polverizzazione. Lo strato di smalto è stato facilmente riconosciuto clinicamente dalla dentina sottostante grazie alla differente colorazione;
- la dentina coronale centrale (secondaria) è stata separata dalla dentina coronale periferica (primaria) polverizzando uno strato interno di circa 1,5 mm di spessore coronale e 1 mm di spessore cervicale, per approssimazione attraverso sonde millimetriche considerando che un isolamento preciso dei differenti strati dentinali richiederebbe l'utilizzo del microscopio [57-58];
- la dentina coronale periferica (primaria) residua è stata separata dalle radici mediante polverizzazione;
- e successivamente le radici sono state polverizzate con un martello. Considerando che il cemento non poteva essere contaminato né dall'interno né dall'esterno, l'intera radice è stata considerata come unico campione per l'analisi della sola dentina.

Una volta polverizzati i diversi tessuti, ciascun campione di polveri è stato inserito in un'apposita provetta su cui è stato riportato il codice alfa-numericò del caso di riferimento seguito dall'indicazione "S" per lo smalto, "DCC" per la dentina coronale centrale, "DCP" per la dentina coronale periferica, "DR" per la dentina radicolare (Fig. 8).



**Fig. 8** Campionamento dei differenti tessuti mineralizzati del dente.

### **3.4 Analisi tossicologiche sulla polpa dentale**

Ogni tessuto dentale è stato analizzato secondo il metodo validato dal Laboratorio For.Med.Lab. di Macerata sull'intero dente [65].

#### Estrazione in acqua ed acido formico

Ciascun campione pulpare è stato addizionato con 490 µl di acqua distillata/0,1% di acido formico e 10 µl di metanolo/0,1% di acido formico.

Sono stati aggiunti 20 ng di standard interno Proadifen (SKF).

I campioni pulpari sono stati incubati per 72 ore a 55° C.

Dopo l'incubazione, sono stati centrifugati a 14.000 giri al minuto in un'ultracentrifuga ed il surnatante è stato raccolto ed evaporato sotto flusso di azoto a 50°.

Successivamente, sono stati risospesi con 50 µl di fase mobile B (MeOH + 1% di acido formico) per l'iniezione cromatografica.

#### Estrazione con tecnica SPE (Estrazione in fase solida)

L'estrazione con tecnica SPE è stata eseguita per tutti i campioni di tessuto dentale.

Le miscele ottenute venivano fatte raffreddate a temperatura ambiente e poi neutralizzate con 2 ml di soluzione tampone fosfato a pH 6 e aggiunta di 130 ml di NaOH 2M a pH 6-7 (re- golato con NaOH).

Le colonne per l'estrazione SPE sono state condizionate in successione: metanolo (2 ml) e tampone fosfato a pH 6. I campioni sono stati poi eluati lentamente attraverso la colonnina sotto basso vuoto per almeno 2 minuti. È stato poi effettuato il lavaggio delle colonne con acqua (2 ml), HCl 0,1N (2 ml) ed infine metanolo (2 ml).

Sono state portate completamente a secco (5 minuti sotto vuoto completo), e gli analiti sono stati eluiti con 2,5 ml di una soluzione di diclorometano 2-propanolo (80:20) con idrossido di ammonio 2%.

Gli eluati destinati prima all'analisi con UHPLC-HR-MS (cromatografia liquida abbinata a spettrometria di massa ad alta risoluzione) sono stati fatti evaporare e direttamente analizzati.

I campioni destinati all'analisi con GC/MS (gascromatografia abbinata a spettrometria di massa) sono stati fatti completamente evaporare e poi derivatizzati con 30 ml di 1% + BSTFA TMCS a 60 °C per 20 minuti.

Per le analisi è stato utilizzato 1 microlitro dell'eluato derivatizzato.

#### Analisi e identificazione di oppiacei e metadone mediante UHPLC-HR-MS

Per l'analisi è stato utilizzato il sistema cromatografico Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (UHPLC) accoppiato con lo spettrometro di massa Thermo Exactive Plus Orbitrap (HR-MS). Le condizioni applicate per l'analisi cromatografica erano le seguenti: la colonna utilizzata è stata Kinetex Biphenyl 2,6 µm (50 x 2,1 mm) di Phenomenex; il flusso della colonna è stato impostato a 0,4 ml/min. Le fasi utilizzate sono state le seguenti: fase A: H<sub>2</sub>O + 0,1% acido formico; fase B: MeOH + 0,1% acido formico. La temperatura della colonna è stata impostata a 25°C. Il gradiente di eluizione è illustrato nella Tabella 1.



TEMPO (min)	FASE A (%)	FASE B (%)
0-0.5	98	2
0.5-10	0	100
10-12	0	100
12-13	98	2
13-15	98	2

**Tab. 1** Gradiente di eluizione UHPLC-HR-MS

Per l'identificazione degli analiti sono state utilizzate la massa esatta (EM) ottenuta dalla dissociazione indotta da collisione (50 eV) (In source CID), con un intervallo di accettazione di  $\pm 5$  ppm, e la produzione di ioni (PI). I valori monitorati per gli analiti sono stati i seguenti: 286.14377 (EM) (PI: 201.09101, 229.08592, 183.08044) per morfina; 300.15942 (EM) (PI 215.10666, 243.10157, 199.07536) per codeina; 310.21654 (EM) (PI: 105.03349, 219.11683, 195.11683) per metadone; e 354.24276 (EM) (PI:167.08553, 91.05423, 105.06988) per SKF (IS).

#### Analisi e identificazione di cocaina mediante GC-MS

I campioni che hanno riscontrato una positività allo screening per cocaina, sono poi stati nuovamente portati a secco sotto flusso di idrogeno, derivatizzati con MSTFA e riscaldati per 30 minuti a 60°C. 1  $\mu$ L di campione derivatizzato è stato iniettato nel GC-MS singolo quadrupolo ISQ (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). La colonna utilizzata è stata una capillare (ZB 5 MS 30 m X 0,25 mm X 0,25  $\mu$ m); l'elio come gas di trasporto a una velocità di flusso di 1,0 ml/min; il programma di temperatura è stato impostato come descritto nella Tabella 2. La modalità di iniezione è stata splitless; la scansione scelta era la

modalità Full Scan e l'intervallo degli spettri di massa era 40-500. I valori degli ioni monitorati sono stati i seguenti: m/z 82, 182, 303, 94 per la cocaina, m/z 196, 82, 317, 272 per la cocaetilene, 82, 240, 105, 122 per la benzoilecgonina e 86, 99, 165 per lo standard interno Proadifen (SKF).

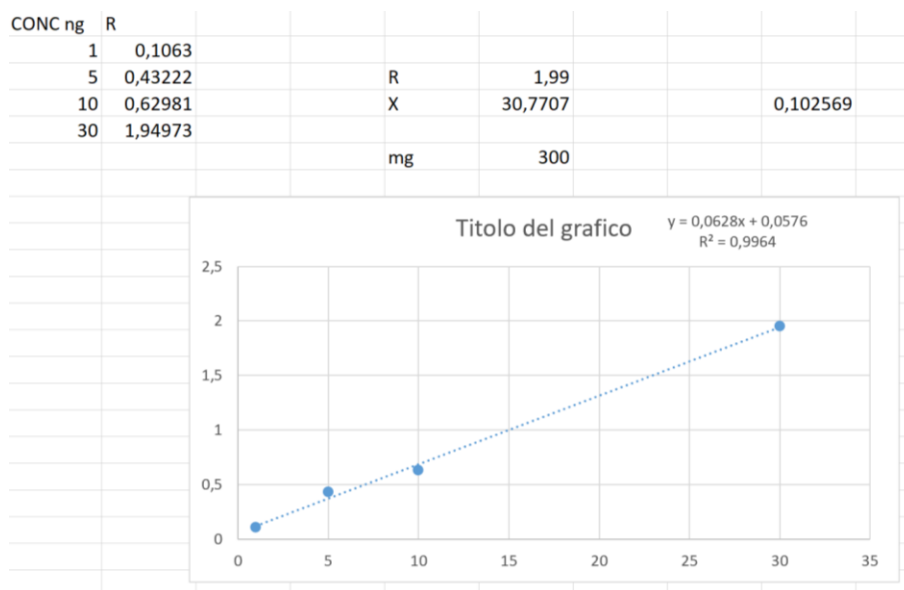
TEMPERATURA	VELOCITÀ (°C/MIN)	TEMPO DI MANTENIMENTO
100°C		1 min
220°C	40°C/min	1 min
320°C	20°C/min	6 min

**Tab. 2** Programma di temperatura: ricerca di cocaina in GC-MS.

### 3.5 Quantificazione delle sostanze all'interno della polpa

Per eseguire la quantificazione delle sostanze nei campioni delle polpe analizzati sono state preparate delle curve di calibrazione per ciascuna sostanza: morfina, con concentrazioni note di 1ng, 10 ng, 30 ng, 50 ng, 100 ng; codeina, con concentrazioni note di 1ng, 10 ng, 30, ng, 50 ng; metadone, con concentrazioni note di 1ng, 5 ng, 10 ng, 30 ng; cocaina, 100ng, 500 ng, 1000 ng, 2000 ng; i metaboliti 6-monoacetilmorfina (6-MAM), EDDP, benzoilecgonina, cocaetilene.

Per le curve di calibrazione preparate il coefficiente di determinazione è stato compreso tra 0.9933 e 0.9984 (Fig. 9)



**Fig. 9** Esempio della curva della sostanza “metadone”

### **3.6 Analisi tossicologiche sui tessuti mineralizzati**

Le analisi eseguite sui diversi campioni dei tessuti mineralizzati dei denti hanno seguito lo stesso protocollo di quelle eseguite sulle polpe e riportati nei sotto-capitoli 3.4 e 3.5 del manoscritto.

Non si è proceduto ad una quantificazione sistematica delle sostanze rilevate all'interno dei tessuti mineralizzati.

## **4. Risultati**

È stato collezionato ed analizzato un campione totale di 10 denti PM (post-mortali) cui è stata applicata la nuova tecnica di separazione dei tessuti dentali tramite strumentazione specialistica odontoiatrica.

Il metodo di analisi validato e perfezionato dal Laboratorio For.Med.Lab di Macerata ha mostrato elevata sensibilità per la rilevazione di sostanze anche per minime quantità di campioni (nell'ordine di 0,001 gr).

Le sostanze rilevate maggiormente coinvolte nei decessi droga-correlati sono risultati gli oppioidi e la cocaina.

## 4.1 Risultati sulle polpe dentali

### Cocaina

Codice ID	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
ILE 1 - P	0,023 gr	GCMS	COCAINA 24.5 ng/mg, BENZOILECGONINA
31T/21 - P	0,01 gr	UHPLC/HR-MS	COCAINA 2,78 ng/mg, BENZOILECGONINA
26T/22 - P	0,003 gr	UHPLC/HR-MS	BENZOILECGONINA 1,52 ng/mg

**Tab. 3** Riporta i risultati qualitativi e quantitativi ottenuti sulle polpe di soggetti che assumevano cocaina.

### Oppioidi

Codice ID	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
25T/22 - P	0,001 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE, EDDP
1T/21 - P	0,027 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE, EDDP
ILE 3 - P	0,009 gr	UHPLC/HR-MS	NEG

**Tab. 4** Riporta i risultati qualitativi ottenuti sulle polpe di soggetti che assumevano oppioidi.

### Cocaina/Oppioidi

Codice ID	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
ILE 4 - P	0,01 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
6T/22 - P	0,044 gr	UHPLC/HR-MS	EDDP
36T/22 - P	0,01 gr	UHPLC/HR-MS	MORPHINE 0,475 ng/mg, CODEINE 0,02 ng/mg, METHADONE, EDDP

**Tab. 5** Riporta i risultati qualitativi ottenuti sulle polpe di soggetti che assumevano sia cocaina che oppioidi.

## Controllo negativo

Codice ID	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
ILE 2 -P	0,01 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG

**Tab. 6** Riporta il risultato ottenuto sulla polpa di un soggetto che è risultato negativo all'assunzione di sostanze.

## 4.2 Risultati sui tessuti mineralizzati del dente

### Cocaina

TESSUTO	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
<b>ILE 1</b>			
S	0,114 gr	GCMS	NEG
DCP	0,366 gr	GCMS	NEG
DCC	0,022 gr	GCMS	COCAINA 0,066 ng/mg, BENZOILECGONINA
DR	0,041 gr	GCMS	NEG
<b>31T/21</b>			
S	0,176 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DCP	0,041 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DCC	0,029 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DR	0,25 gr	UHPLC/HR-MS	COCAINA 1,26 ng/mg, BENZOYLECGONINA
<b>26T/22</b>			
S	0,02 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DCP	0,132 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DCC	0,015 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DR	0,106 gr	UHPLC/HR-MS	BENZOiLECGONINA

**Tab. 7** Riporta i risultati qualitativi e dove possibile quantitativi ottenuti sui differenti tessuti mineralizzati del dente in soggetti che assumevano cocaina.



## Oppioidi

TESSUTO	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
<b>25T/22</b>			
S	0,027 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
DCP	0,158 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
DCC	0,002 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE, EDDP
DR	0,302 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>1T/21</b>			
S	0,026 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
DCP	0,071 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE EDDP
DCC	0,028 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
DR	0,086 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>ILE 3</b>			
S	0,0872 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DCP	0,4219 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DCC	0,0241 gr	UHPLC/HR-MS	6-MAM
DR	0,2207 gr	UHPLC/HR-MS	NEG

**Tab. 8** Riporta i risultati qualitativi ottenuti sui differenti tessuti mineralizzati del dente in soggetti che assumevano oppioidi.

## Cocaina/Oppiodi

TESSUTO	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
<b>ILE 4</b>			
<b>S</b>	0,059 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>DCP</b>	0,239 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>DCC</b>	0,09 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
<b>DR</b>	0,298 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>6T/22</b>			
<b>S</b>	0,064 gr	UHPLC/HR-MS	EDDP
<b>DCP</b>	0,472 gr	UHPLC/HR-MS	EDDP
<b>DCC</b>	0,106 gr	UHPLC/HR-MS	EDDP
<b>DR</b>	0,398 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>36T/22</b>			
<b>S</b>	0,038 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>DCP</b>	0,239 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>DCC</b>	0,053 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>DR</b>	0,195 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE

**Tab. 9** Riporta i risultati qualitativi ottenuti sui differenti tessuti mineralizzati del dente in soggetti che assumevano sia cocaina che oppioidi.

## Controllo negativo

Codice ID	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
<b>ILE 2</b>			
S	0,038 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
DCP	0,239 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
DCC	0,053 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
DR	0,195 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG

**Tab. 10** Riporta il risultato ottenuto sui differenti tessuti mineralizzati del dente di un soggetto che è risultato negativo all'assunzione di sostanze.

### 4.3 Confronto con le matrici classiche [sangue/ capelli]

#### Cocaina

TESSUTI	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
<b>ILE 1</b>			
CAPELLI	/	GCMS	COCAINA, BENZOILECGONINA
SANGUE PERIFERICO	/	GCMS	COCAINA 1100 ng/ml, BENZOILECGONINA 1088 ng/ml
P	0,023 gr	GCMS	COCAINA 24.5 ng/mg, BENZOILECGONINA
S	0,114 gr	GCMS	NEG
DCP	0,366 gr	GCMS	NEG
DCC	0,022 gr	GCMS	COCAINA 0,066 ng/mg, BENZOILECGONINA
DR	0,041 gr	GCMS	NEG
<b>31T/21</b>			
CAPELLI	/	UHPLC/HR-MS	COCAINA
SANGUE PERIFERICO	/	UHPLC/HR-MS	COCAINA 780 ng/ml, BENZOILECGONINA
P	0,01 gr	UHPLC/HR-MS	COCAINA 2,78 ng/mg, BENZOILECGONINA
S	0,176 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DCP	0,041 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DCC	0,029 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DR	0,25 gr	UHPLC/HR-MS	COCAINA 1,26 ng/mg, BENZOILECGONINA
<b>26T/22</b>			
CAPELLI	/	UHPLC/HR-MS	NEG
SANGUE PERIFERICO	/	UHPLC/HR-MS	BENZOILECGONINA 500 ng/ml
P	0,003 gr	UHPLC/HR-MS	BENZOILECGONINA 1,52 ng/mg
S	0,02 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DCP	0,132 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DCC	0,015 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
DR	0,106 gr	UHPLC/HR-MS	BENZOILECGONINA

**Tab. 11** Riporta il confronto tra i risultati ottenuti sui differenti tessuti dentali e quelli ottenuti sulle matrici classiche – capelli e sangue periferico nei soggetti che assumevano cocaina.

## Oppioidi

TESSUTI	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
<b>25T/22</b>			
<b>CAPELLI</b>	/	UHPLC/HR-MS	METADONE, EDDP, MORFINA, CODEINA
<b>SANGUE PERIFERICO</b>	/	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>P</b>	0,001 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE, EDDP
<b>S</b>	0,027 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>DCP</b>	0,158 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>DCC</b>	0,002 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE, EDDP
<b>DR</b>	0,302 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>1T/21</b>			
<b>CAPELLI</b>	/	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>SANGUE PERIFERICO</b>	/	UHPLC/HR-MS	METADONE 1800 ng/ml, EDDP 472 ng/ml, MORFINA 2538 ng/ml
<b>P</b>	0,027 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE, EDDP
<b>S</b>	0,026 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>DCP</b>	0,071 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE EDDP
<b>DCC</b>	0,028 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>DR</b>	0,086 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>ILE 3</b>			
<b>CAPELLI</b>	/		MORFINA, CODEINA, 6-MAM, COCAINA, BENZOILECGONINA
<b>SANGUE PERIFERICO</b>	/	UHPLC/HR-MS	MORFINA 700 ng/ml, CODEINA 8 ng/ml, 6-MAM, COCAINA 4,3 ng/ml, BENZOILECGONINA
<b>P</b>	0,0090 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>S</b>	0,0872 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>DCP</b>	0,4219 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>DCC</b>	0,0241 gr	UHPLC/HR-MS	6-MAM
<b>DR</b>	0,2207 gr	UHPLC/HR-MS	NEG

**Tab. 12** Riporta il confronto tra i risultati ottenuti sui differenti tessuti dentali e quelli ottenuti sulle matrici classiche – capelli e sangue periferico nei soggetti che assumevano oppioidi.

## Cocaina/Oppiodi

TESSUTI	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
<b>ILE 4</b>			
<b>CAPELLI</b>	/	GCMS	COCAINA, BENZOILECGONINA
<b>SANGUE PERIFERICO</b>	0,02 gr	UHPLC/HR-MS	MORFINA 220 ng/ml, CODEINA 46 ng/ml, 6-MAM 8 ng/ml, COCAINA 1,7 ng/ml, BENZOILECGONINA 1000 ng/ml,
<b>P</b>	0,01 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
<b>S</b>	0,059 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>DCP</b>	0,239 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>DCC</b>	0,09 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
<b>DR</b>	0,298 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>6T/22</b>			
<b>CAPELLI</b>	/	UHPLC/HR-MS	COCAINA, BENZOILECGONINA, MORFINA, 6-MAM
<b>SANGUE PERIFERICO</b>	0,01 gr	UHPLC/HR-MS	COCAINA 5 ng /ml, BENZOILECGONINA 1590 ng/ml, MORFINA 280 ng/ml
<b>P</b>	0,044 gr	UHPLC/HR-MS	EDDP
<b>S</b>	0,064 gr	UHPLC/HR-MS	EDDP
<b>DCP</b>	0,472 gr	UHPLC/HR-MS	EDDP
<b>DCC</b>	0,106 gr	UHPLC/HR-MS	EDDP
<b>DR</b>	0,398 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>36T/22</b>			
<b>CAPELLI</b>	/		NEG
<b>SANGUE PERIFERICO</b>	/	UHPLC/HR-MS	MORFINA 75 ng/ml, CODEINA, BENZOILECGONINA 242 ng/ml
<b>P</b>	0,01 gr	UHPLC/HR-MS	MORFINA 0,475 ng/mg, CODEINA 0,02 ng/mg, METADONE, EDDP
<b>S</b>	0,038 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE
<b>DCP</b>	0,239 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>DCC</b>	0,053 gr	UHPLC/HR-MS	NEG
<b>DR</b>	0,195 gr	UHPLC/HR-MS	METADONE

**Tab. 13** Riporta il confronto tra i risultati ottenuti sui differenti tessuti dentali e quelli ottenuti sulle matrici classiche – capelli e sangue periferico nei soggetti che assumevano sia cocaina che oppioidi.

## Controllo negativo

Codice ID	QUANTITA'	TIPO DI ANALISI	RISULTATI
<b>ILE 2</b>			
<b>CAPELLI</b>	/	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
<b>SANGUE PERIFERICO</b>	/	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
<b>P</b>	0,01 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
<b>S</b>	0,038 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	NEG
<b>DCP</b>	0,239 gr		
<b>DCC</b>	0,053 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	GCMS e UHPLC/HR-MS
<b>DR</b>	0,195 gr	GCMS e UHPLC/HR-MS	

**Tab. 14** Riporta il confronto tra i risultati ottenuti sui differenti tessuti dentali e quelli ottenuti sulle matrici classiche – capelli e sangue periferico in un soggetto che è risultato negativo all'assunzione di sostanze.

## 5 Discussione dei risultati

La ricerca pilota condotta in questo studio è una *ricerca di base* sviluppata per analizzare separatamente i diversi tessuti dentali (smalto, dentina periferica e centrale coronali, dentina radicolare e polpa) ed indagare se nella polpa possono essere rilevate le stesse sostanze presenti nel sangue circolante in casi di morte per overdose/intossicazione acuta o per evidenziare eventuali depositi di xenobiotici nei tessuti duri del dente (dentina e/o smalto), contribuendo così a ricostruire la storia d'abuso cronico di sostanze ed il meccanismo e sito di assorbimento nel dente. L'obiettivo primario era quello di mettere a punto protocollo innovativo di separazione dei tessuti dentali per studiarne il comportamento; l'obiettivo secondario era di confrontare i risultati ottenuti dai tessuti dentali con quelli ottenuti dal sangue (polpa) e dai capelli (smalto/dentina).

Il background a motivo di questa ricerca è la necessità di fornire informazioni in merito al grado di velocità e la percentuale di assimilazione di diversi farmaci/sostanze/metaboliti a livello dello smalto, della dentina radicolare/coronale e della polpa, distinguere il substrato utilizzabile in ambito di diagnosi di overdose acuta o intossicazione cronica, verificare se le sostanze rilevate nei denti riflettano le concentrazioni in circolo nella fase acuta (e quindi presenti nei vasi sanguigni della polpa) oppure se rappresentino depositi all'interno della dentina e/o dello smalto denotando quindi una storia di abuso cronico di sostanze, stabilire se vi sia correlazione quantitativa tra concentrazioni pulpari e vascolari periferiche, fortificare la letteratura che valida le metodiche di analisi classiche (come la gascromatografia e/o la cromatografia liquida ad a risoluzione abbinate a spettrometria di massa) applicate sulla matrice dentale in presenza di una limitata quantità di campione, esplorare anche il meccanismo di incorporazione delle sostanze all'interno dei tessuti dentali, i siti di deposito e le differenze



fisico-chimiche tra le diverse componenti mineralizzate (smalto e dentina apposta in periodi di vita differenti), conoscere anche gli effetti che il metodo di assunzione (ad es. per via orale o endovena) e la natura chimico-fisica delle specifiche sostanze assunte possono avere sul meccanismo di assimilazione, e quindi la sede di accumulo e l'interpretazione del risultato analitico.

Queste informazioni sono infatti necessarie per fornire ai medici legali una corretta interpretazione forense di queste matrici, che al momento sembrano substrati promettenti ma scarsamente conosciuti.

I risultati preliminari ottenuti da questo studio sono molto variabili considerando che la sperimentazione è stata condotta su casi autoptici reali, quindi senza il controllo e la selezione delle sostanze d'abuso e delle modalità di assunzione. Tuttavia è stato possibile osservare alcune aggregazioni utili tra i dati raccolti considerando che le principali sostanze rilevate sono state cocaina, oppioidi e loro metaboliti.

Il primo risultato fondamentale è la validazione del metodo di analisi del Laboratorio For. Med.Lab. di Macerata sui diversi tessuti mineralizzati e pulpari (e non sull'intero dente) che ha dimostrato come l'innovativa tecnica di separazione delle matrici dentali sia ripetibile ed affidabile nella determinazione di oppiacei, cocaina e rispettivi metaboliti anche su scarsissime quantità di tessuto (fino a un minimo di 0,001 gr).

L'unico campione di controllo acquisito da soggetto negativo all'assunzione di sostanze ha confermato l'assenza di sostanze in ogni tessuto dentale, sostenendo l'ipotesi di una correlazione tra assunzione sistemica e accumulo nelle matrici dentali (Tab 14).

Tuttavia, da considerare che due campioni pulpari, ILE3 ed ILE4 (rispettivamente Tab. 12 e Tab. 13) hanno dato esito negativo alla presenza di morfina, codeina, cocaina e benzoil, tutte sostanze che risultavano invece presenti nei rispettivi campioni di sangue.

Sebbene il numero di denti sia esiguo, non è quindi da escludersi la possibilità di falsi negativi: ovverosia casi in cui la polpa dia esito negativo nonostante il sangue riporti sostanze circolanti.

Questa informazione potrebbe essere determinata da diversi fattori. La quantità assunta dal soggetto che influenza la concentrazione circolante nel sangue e quindi quella che arriva a livello del microcircolo pulpare. Questo è plausibile considerando che i risultati riportati in Tabella 11 (soggetto che assumevano solo cocaina) mostrano come tra le sostanze rilevabili nel sangue periferico e nella polpa, vi sia una corrispondenza qualitativa ma non quantitativa. La polpa presenta concentrazioni molto minori rispetto al sangue, come si evidenzia ad esempio dal caso ILE1 con un rapporto di cocaina 1100 ng/ml e benzoilecgonina 1088 ng/ml nel sangue rispetto a cocaina 24.5 ng/mg e tracce di benzoilecgonina nella polpa. Questo potrebbe determinare una presenza di sostanza nella polpa talmente bassa in termini di concentrazione da non poter essere rilevata alle analisi. Tale sospetto sembra essere confermato dal fatto che nel sangue del campione ILE3 la quantità di cocaina era effettivamente bassa (4,3 ng/mL) così come per la benzoilecgonina (tracce) e per il campione ILE4 (cocaina 1,7 ng/mL). Questi risultati sembrerebbero sostenere l'ipotesi di una correlazione tra il sangue e la polpa e quindi un assorbimento dello xenobiotico dall'interno dell'organismo.

Tuttavia, questo fattore sembra non essere l'unico ad influenzare l'assenza di sostanza nella polpa: infatti, come si evince in Tabella 11, nei casi di soggetti che assumevano solo cocaina, è sempre stata rilevata una corrispondenza almeno qualitativa delle sostanze circolanti nel sangue e nella polpa non solo per la cocaina ma anche per il suo metabolita, la benzoilecgonina, anche a concentrazioni più basse rispetto a quelle rilevate nel sangue del campione ILE4 dove invece

non è stata trovata (ad esempio il sangue per il campione 31T/21 e per il campione 26T/22 in Tab 11 presentava rispettivamente tracce e 500 ng/mL; al contrario, il sangue del campione ILE4 ne presentava 1000 ng/mL). Questo diverso comportamento potrebbe essere spiegato dalla diversa categoria di cui fanno parte questi campioni: ovverosia, 32T/21 e 26T/22 assumevano solo e soltanto cocaina; al contrario, ILE4 assumeva anche oppioidi.

In merito a quest'ultima osservazione, vale la pena andare a considerare tabella per tabella (dalla 11 alla 13), ovverosia categoria per categoria.

La Tab. 11 mostra i 3 casi in cui la sostanza assunta era solo la cocaina e possiamo vedere che in tutti e tre i casi troviamo una correlazione qualitativa tra sostanze (cocaina) e suoi metaboliti (benzoilecgonina) nella polpa dentale e nel sangue periferico. Al contrario non vi è una correlazione quantitativa diretta ma i tassi di concentrazione più bassi nelle polpe decrescono o aumentano in maniera apparentemente direttamente proporzionale alla diminuzione o all'aumento della concentrazione delle sostanze rilevata nel sangue. Questo suggerisce la possibilità di una correlazione misurabile tra le diverse matrici e quindi applicabile per la ricostruzione delle condizioni del soggetto nella fase acuta dell'intossicazione (sangue/polpa). Così come sembra utile l'informazione relativa almeno al dente ILE3 per calcolare un cut-off di rilevabilità della sostanza (cocaina o benzoil) nella polpa rispetto al sangue. Come abbiamo detto, infatti, questo comportamento sembra supportare l'ipotesi che la polpa sia rappresentativa delle sostanze circolanti a livello sistemico e le concentrazioni molto minori nella polpa sembrano in linea con l'anatomia del microcircolo dentale e con la quantità di campione disponibile per le analisi (circa 0,02-0,003 g). Ulteriormente, nei casi ILE1 e 31T/21 (Tab. 11), abbiamo trovato una correlazione qualitativa tra le sostanze nei capelli e la dentina secondaria (dentina centrale – DCC) e della dentina della radice ma nessuna sostanza nello smalto. Questo sembra sostenere l'ipotesi di un assorbimento interno considerando che

solitamente la cocaina viene fumata, inalata o iniettata. Difatti, questi risultati preliminari supportano l'ipotesi che l'accumulo delle sostanze assunte cronicamente da un soggetto avvenga secondo una distribuzione topografica all'interno del dente che si estende dalle zone più apicali (dentina secondaria radicolare) a quelle più coronali (dentina secondaria coronale) per metabolismo attivo delle cellule odontoblastiche che filtrano dal sangue pulpare e depositano nuovo tessuto per tutto l'arco della vita del soggetto.

Questa teoria sembra in linea con i risultati ottenuti da Klima e coll [83] nel 2023, che hanno studiato la deposizione di alcune sostanze di abuso (anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilendiossiamfetamina (MDA), 3,4-metilendiossimetamfetamina (MDMA), 3,4-metilendiossi-N-etilamfetamina (MDEA), morfina, codeina, 6-acetilmorfina (6-MAM), cocaina e benzoilecgonina (BE)) nella dentina simulando vari modelli *in vitro* per indagare la relazione tra la quantità di xenobiotico depositata ed il tempo di contatto, nonché le proprietà delle sostanze applicate. Utilizzando due diversi modelli di perfusione artificiale (rispettivamente positiva e negativa), hanno simulato l'afflusso della sostanza attraverso il flusso sanguigno o proveniente dalla cavità orale verso la dentina. Il comportamento di anfetamine, oppiacei, cocaina e benzoilecgonina ha dimostrato che la deposizione della sostanza dipende probabilmente dalle sue proprietà fisico-chimiche, dalla durata del contatto attraverso il flusso sanguigno e dalle concentrazioni presenti nel sangue e nella cavità orale. Hanno notato che concentrazioni di sostanza più elevate nei denti possono derivare da un uso più frequente o più prolungato del farmaco.

Tuttavia, nello studio di Klima e coll. sembra mancare un parametro fondamentale: la presenza dello smalto. Da conoscenza istologica ed anatomica, lo smalto dovrebbe proteggere gli strati sottostanti dagli insulti fisici, microbiologici e chimici. La sua scarsa porosità lo rende uno strato estremamente duro, resistente e difficilmente penetrabile dalle sostanze. A meno che lo smalto stesso non sia danneggiato (ad esempio da severa usura o carie).

Come Klima e coll. hanno rilevato che la deposizione della sostanza nella dentina dipende probabilmente dalle sue proprietà fisico-chimiche, così anche lo smalto, dai risultati del nostro studio, sembra non essere immune a tutte le molecole provenienti dall'esterno (cavo orale), e di conseguenza anche i tessuti sottostanti come la dentina o la polpa.

La Tab. 12 riporta i risultati dei soggetti che assumevano oppioidi, ed in particolare metadone. Rispetto alla cocaina, il metadone e suoi metaboliti sono stati trovati in tutti i tessuti dentali, interni ed esterni, anche quando non sono rilevabili nel sangue periferico o nei capelli, suggerendo quindi una contaminazione dal cavo orale in linea con il metodo tipico di assunzione del metadone che avviene per via orale e principalmente attraverso soluzioni orali in cui è combinato con zuccheri – saccarosio.

L'ipotesi quindi che entrambi i meccanismi di assimilazione delle sostanze all'interno del dente (dentina o polpa) siano validi, è supportata anche dai risultati di Klima e coll sul tessuto carioso [68]: è possibile considerare che in caso di smalto integro e assunzione per via endovenosa non vi sia contaminazione esterna e quindi le concentrazioni rilevate corrispondano alle concentrazioni sistemiche del soggetto; al contrario, in caso di danneggiamento dello smalto dovuto ad usura o stato parodontale alterato con esposizione radicolare (condizioni orali spesso presenti nei cavi orali dei soggetto tossicodipendenti) ovvero a pH acido associati ad assunzione di sostanze per via orale con addizione di zuccheri [84], le concentrazioni rilevate nel dente non corrispondono direttamente a quelle assorbite dal circolo sistemico ma possono essere aumentate per contaminazione diretta.

L'ipotesi che il metodo di assunzione e la natura della molecola influiscano sulla contaminazione o meno dei tessuti dentali, sembra essere supportato proprio anche dai risultati

ottenuti nei soggetti che assumevano metadone associato a cocaina (Tab. 13), in cui anche il comportamento della cocaina risulta caotico e casuale nella distribuzione delle concentrazioni rispetto alla Tab. 11. Come anticipato sopra, il caso ILE4 ad esempio mostra non un comportamento anomalo della cocaina rispetto ai risultati precedenti (NEGATIVO sia nella polpa che nei tessuti duri), ma evidenzia la presenza di metadone nella maggior parte dei tessuti dentali duri (smalto, dentina periferica e dentina radicolare) quando non è presente né nel sangue (fase acuta) né nei capelli (fase cronica). Questo sembra supportare il fatto che l'ingresso della sostanza di metadone non possa essere avvenuta dall'interno e soprattutto che la possibile contaminazione non rispecchi una diretta correlazione con le altre matrici: il dente 6T/22 evidenzia la presenza di EDDP (metabolita del metadone) in alcuni tessuti dentari dai più interni ai più esterni (polpa, dentina centrale coronale, dentina periferica coronale e smalto) ma sia l'EDDP che il metadone sono assenti nei capelli e nel sangue. Considerando che l'EDDP viene prodotto per metabolismo attivo, questo suggerisce che sia stato assunto tempo prima dal soggetto, ad esempio mesi (tanto che non è rilevabile nella fase perimortale e non è nota la lunghezza dei capelli raccolti), sia stato metabolizzato nel sangue e da questo abbia contaminato tutti tessuti dentali fino a quelli più esterni (per affinità della molecola allo smalto o per compromissione dello smalto stesso). Similmente, il dente 25T/22, Tab. 12) mostra la presenza di EDDP nei capelli ma non nel sangue, mentre è presente nella polpa e nella dentina centrale coronale ma non negli strati esterni, dove invece è presente metadone.

Ulteriormente, sembrano molto interessanti anche i casi di morfina: Tab 12 il campione 25T/22 nei capelli, il campione 1T/21 nel sangue ed ILE3 nei capelli e nel sangue insieme alla 6-MAM; Tab 13 il campione ILE4 nel sangue, il campione 6T/22 nel sangue e nei capelli, 36T/22 nel sangue. La morfina non viene quasi mai rilevata nei campioni dentali eccetto nel caso 36T/22 nella polpa (che corrisponde alla distribuzione sanguigna) e nel caso ILE3 dove non vi

è morfina ma solo 6-MAM nella dentina centrale. I casi sono troppo pochi per sospettare ipotesi di alcun tipo, ma sicuramente la breve emivita della molecola nel circolo sanguigno (circa 2-4 ore) potrebbe aver influenzato anche la presenza o assenza nella polpa così come il suo metabolismo sanguigno in 6-MAM può essere indice che nella dentina del dente ILE3 si sia depositata dal flusso sanguigno dopo essere stata metabolizzata.

Il risultato principale quindi sembra essere che il metodo di assunzione della sostanza e la natura della sostanza stessa influiscano notevolmente sulla distribuzione nei diversi tessuti dentali: ad es. il metadone viene assunto per via orale e questo implica un'inevitabile contaminazione dello smalto esterno che deve essere considerata separatamente rispetto al processo di assimilazione dal flusso sanguigno, così come la morfina è difficilissima da rilevare se non nelle prime ore intorno alla morte.

Nel caso 26T/22 (Tab. 11) invece le sostanze sono state trovate nei tessuti duri dentali ma non nei capelli, ciò suggerisce forse una possibile finestra di assunzione dei farmaci ancora più ampia dei capelli, in linea con l'ipotesi che l'accumulo di sostanze assunte cronicamente si localizzi a livello della dentina secondaria che essendo depositata per tutto l'arco della vita a partire dal momento della completa formazione dei denti (circa 21-23 anni) rappresenta una sorta di memoria a "lunghissimo termine" per le storie di tossicodipendenza.

Dal punto di vista epidemiologico, è possibile osservare che le sostanze d'abuso maggiormente correlate alla mortalità del soggetto sono gli oppiacei e la cocaina, a conferma di quanto riportato nelle relazioni annuali al Parlamento. Niente ancora si può dire in merito all'incidenza delle "smart drugs" data la scarsa conoscenza di queste sostanze ed il loro difficile

riconoscimento nelle matrici tossicologiche classiche e maggiormente nel confronto con quelle alternative.

Lo studio presenta alcune limitazioni che dovranno essere superate da studi successivi. La disponibilità dei campioni raccolti *in vivo* e la differenziazione delle sostanze d'abuso d'interesse (già classificate come droghe- D.P.R. 309/1990 e modifiche- o nootrope) sono ancora ridotte per poter generalizzare i primi risultati ottenuti. Per colmare la carenza di Letteratura specifica sulla correlazione tra sostanze assunte e denti, sarà necessario ripetere le analisi su più campioni dello stesso soggetto per ciascuna sostanza rilevabile e su soggetti diversi che assumono la stessa sostanza. Questo è reso complicato dalle esigue quantità di tessuto dentale analizzabile e dalla variabilità dei risultati ottenuti a seconda della sostanza indagata o del metodo di assunzione. E' quindi fondamentale supportare i risultati con un adeguato ragionamento fisiologico ed istologico e programmare successive ricerche sistematiche sulle diverse sostanze.

Ulteriormente, la tecnica per la preparazione dentale richiede molto tempo.

Un'altra limitazione rilevante è che lo studio sperimentale è stato condotto su autopsie reali, quindi non abbiamo potuto avere a disposizione la storia medica dei soggetti o informazioni anamnestiche sui tempi, quantità e metodi di assunzione delle sostanze d'abuso nei casi di tossicodipendenza cronica per confrontare i risultati sui tessuti duri dentali con il tempo, le frequenze e la modalità di assunzione durante la vita. Sarebbe quindi opportuno realizzare un progetto di ricerca che coinvolga strutture odontoiatriche che operano su soggetti noti per storie di abuso cronico di sostanze e di cui possiamo ottenere informazioni in merito al tipo di sostanza ed alle modalità di assunzione, nel rispetto delle esigenze cliniche e dell'anonimato assoluto dei soggetti inclusi nello studio solo previa autorizzazione del/i Comitato/i Etico/i di pertinenza.



Tuttavia, le nuove informazioni ottenute dalla ricerca messa a punto durante il mio percorso di Dottorato permettono di focalizzare l'attenzione degli studi futuri, in vivo ed in vitro, necessari senza dubbio e per cui sto già provvedendo alla ideazione di progetti di ricerca di implemento.

## 6 Conclusioni

La matrice dentale è sicuramente diversa da qualsiasi altra matrice nota per la tossicologia post-mortem.

I risultati preliminari suggeriscono l'utilità dei denti nelle indagini tossicologiche post-mortali sia per intossicazione acuta (polpa dentale) che per assunzione cronica (tessuti mineralizzati – smalto e/o dentina).

Il risultato più significativo è che il meccanismo di assorbimento e accumulo dei farmaci nella polpa e nei tessuti mineralizzati sembra essere influenzato dal tipo di molecola e dalla modalità di assunzione. Il metadone, solitamente assunto per via orale, sembra penetrare nello smalto e favorire l'accumulo di altre sostanze associate (es. cocaina). In assenza di associazione con il metadone, la cocaina sembra accumularsi nella dentina secondaria attraverso il flusso sanguigno della polpa dentale e mostra corrispondenza qualitativa tra la determinazione di sostanza nella polpa e nel sangue periferico. Per quanto riguarda la correlazione quantitativa, questa necessita di un ampliamento del campione per l'uso di cocaina per poter costruire una formula di regressione valida.

Il metodo innovativo per la separazione dei tessuti dentali è assolutamente promettente per lo studio del meccanismo, delle vie, delle velocità e dei siti di incorporazione e delle caratteristiche fisico-chimiche dei tessuti dentali.

Sono necessarie ulteriori indagini sistematiche su diverse sostanze e in casi con anamnesi medica nota per comprendere meglio come interpretare il significato di questa matrice per scopi forensi

## **BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA**

1. Michaleas SN, Veskoukis AS, Samonis G, Pantos C, Androutsos G, Karamanou M. Mathieu Joseph Bonaventure Orfila (1787-1853): The Founder of Modern Toxicology. *Maedica (Bucur)*. 2022 Jun;17(2):532-537. doi: 10.26574/maedica.2022.17.2.532.
2. Frolidi R. *Lezioni di tossicologia forense*. 2011. G.Ciappichelli editore, Torino. Edizione V, p.10-11.
3. Dinovo EC, Cravey RH. *Forensic Toxicology in Death Investigation*.
4. Richardson T. Pitfalls in forensic toxicology. *Ann Clin Biochem*. 2000;37 ( Pt 1):20-44. doi:10.1258/0004563001901498.
5. Frolidi R. *Lezioni di tossicologia forense*. 2011. G.Ciappichelli editore, Torino. Edizione V, p.13.
6. Leikin JB, Watson WA. Post-mortem toxicology: what the dead can and cannot tell us. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2003;41(1):47-56. doi:10.1081/clt-120018270. -5
7. Yadav M, Tiwari A. Forensic toxicology and its relevance with criminal justice delivery system in India. *Forensic Res Criminol Int J*. 2017;4(4):122-128. DOI: 10.15406/frcij.2017.04.00121.-6
8. Frederick W. Fochtman. Capitolo “Forensic Toxicology”, in *Legal Medicine* di Ed. Shafeek S. Sanbar. 2007, 7th Edition, Elsevier Health Sciences, p. 617-620.-7
9. Drummer OH, Gerostamoulos J. Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. *Ther Drug Monit*. 2002;24(2):199-209. doi:10.1097/00007691-200204000-00002.
10. Galera MC, Rossato-Grando LG. Post mortem changes: challenges in drug analysis in the diagnosis of deaths from intoxication. *Drug Anal. Res*. 2021;5(1):14-8. <https://doi.org/10.22456/2527-2616.111711>.
11. Launiainen T, Ojanperä I. Drug concentrations in post-mortem femoral blood compared with therapeutic concentrations in plasma. *Drug Test Anal*. 2014;6(4):308-316. doi:10.1002/dta.1507.
12. Brockbals L, Staeheli SN, Gascho D, Ebert LC, Kraemer T, Steuer AE. Time-Dependent Postmortem Redistribution of Opioids in Blood and Alternative Matrices. *J Anal Toxicol*. 2018;42(6):365–374. <https://doi.org/10.1093/jat/bky017>.
13. Abdelaal GMM, Hegazy NI, Etewa RL et al. Postmortem redistribution of drugs: a literature review. *Forensic Sci Med Pathol*. 2023; 1-8. <https://doi.org/10.1007/s12024-023-00709-z>.

14. Drummer OH, Gerostamoulos D. Post-mortem redistribution of drugs and other factors affecting interpretation: A review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science*. 2023; 5(3), e1480. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1480>.
15. Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int*. 2004;142(2-3):75-100. doi:10.1016/j.forsciint.2004.02.012.
16. Byard RW, Butzbach DM. Issues in the interpretation of postmortem toxicology. *Forensic Sci Med Pathol*. 2012; 8, 205–207. <https://doi.org/10.1007/s12024-011-9278-x>.
17. Robertson MD, Drummer OH. Postmortem drug metabolism by bacteria. *J Forensic Sci*. 1995;40(3):382-386.
18. Vezzoli S, Bernini M, De Ferrari F. Ethyl glucuronide in vitreous humor and blood postmortem specimens: analysis by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and interpreting results of neo-formation of ethanol. *Ann Ist Super Sanita*. 2015;51(1):19-27. doi:10.4415/ANN\_15\_01\_05.
19. Sastre C, Bartoli C, Baillif-Couniou V, Leonetti G, Pelissier-Alicot AL. Post Mortem Redistribution of Drugs: Current State of Knowledge. *Curr Pharm Des*. 2017;23(36):5530-5541. doi:10.2174/1381612823666170622111739.
20. Frederick DL. Toxicology testing in alternative specimen matrices. *Clin Lab Med*. 2012;32(3):467-492. doi:10.1016/j.cll.2012.06.009.
21. Drummer OH. Post-mortem toxicology. *Forensic Sci Int*. 2007;165(2-3):199-203. doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.020.
22. de Campos EG, da Costa BRB, Dos Santos FS, et al. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicol*. 2022;40(1):1-18. doi:10.1007/s11419-021-00596-5.
23. Frolidi R. *Lezioni di tossicologia forense*. 2011. G.Ciappichelli editore, Torino. Edizione V, p.13-14.
24. GTFI. ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA Gruppo Tossicologi Forensi Italiani Linee guida per la determinazione di sostanze stupefacenti e psicotrope su campioni biologici con finalità tossicologico-forensi e medico-legali. 2022.
25. Flanagan RJ, Connally G. Interpretation of analytical toxicology results in life and at postmortem. *Toxicol Rev*. 2005;24(1):51-62. doi:10.2165/00139709-200524010-00004.
26. Usman M, Naseer A, Baig Y et al. Forensic toxicological analysis of hair: a review. *Egypt J Forensic Sci*. 2019;9, 17. <https://doi.org/10.1186/s41935-019-0119-5>.

27. Harkey MR. (1992 vol 63). Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International*.
28. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol*. 2014 Jun;7(2):60-72. doi: 10.2478/intox-2014-0009. Epub 2014 Nov 15. PMID: 26109881; PMCID: PMC4427717.
29. Chung H, Choe S. Overview of Forensic Toxicology, Yesterday, Today and in the Future. *Curr Pharm Des*. 2017;23(36):5429-5436. doi:10.2174/1381612823666170622101633.
30. Peters FT, Wissenbach DK, Busardo FP, Marchei E, Pichini S. Method Development in Forensic Toxicology. *Curr Pharm Des*. 2017;23(36):5455-5467. doi:10.2174/1381612823666170622113331.
31. Savini F, Tartaglia A, Coccia L, et al. Ethanol Determination in Post-Mortem Samples: Correlation between Blood and Vitreous Humor Concentration. *Molecules*. 2020;25(12):2724. Published 2020 Jun 12. doi:10.3390/molecules25122724.
32. Pérez-Martínez C, Fernández-López L, Prieto-Bonete G, Luna A. Toxicological study of an exhumed body using alternative matrices for the detection of psychoactive drugs. *Rom J Leg Med*. 2020;28:398-402. DOI: 10.4323/rjlm.2020.398.
33. Hansen SL, Dalsgaard PW, Linnet K, Rasmussen BS. Comparison of Comprehensive Screening Results in Postmortem Blood and Brain Tissue by UHPLC-QTOF-MS. *J Anal Toxicol*. 2023;46(9):1053-1058. doi:10.1093/jat/bkac011.
34. Wurita A, Suzuki M, Miyoshi N, et al. Investigation on toxicological usefulness of synovial fluids, as an alternative matrix: postmortem distribution/redistribution of triazolam and its predominant metabolite  $\alpha$ -hydroxytriazolam in human body fluids. *Forensic Toxicol*. 2022;40(1):208-214. doi:10.1007/s11419-021-00604-8.
35. Al-Asmari AI, Alharbi H, Zughaihi TA. Post-Mortem Analysis of Heroin Biomarkers, Morphine and Codeine in Stomach Wall Tissue in Heroin-Related Deaths. *Toxics*. 2022; 10(8):473. <https://doi.org/10.3390/toxics10080473>.
36. Cox J, Morris K, Miller AC, et al. Oral Cavity Fluid as an Alternative Postmortem Matrix: Comparison to Simultaneously Collected Blood and Urine Specimens. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. 2023 Jul. DOI: 10.1097/paf.0000000000000854. PMID: 37417473.
37. Dhingra V , Putrified tissue analysis: A challenge for Forensic toxicologists. *IP Int J Forensic Med Toxicol Sci* 2020;5(4):113-116. <https://doi.org/10.18231/j.ijfmts.2020.027>.

38. Øiestad EL, Øiestad ÅML, Middelkoop G, Brochmann GW, Thaulow CH, Vindenes V. Comparative Study of Postmortem Concentrations of Benzodiazepines and Z-Hypnotics in Several Different Matrices. *J Anal Toxicol.* 2023;47(3):287-298. doi:10.1093/jat/bkac106.
39. Vandebosch M, Rooseleers L, Van Den Bogaert W, Wuestenbergs J, Van de Voorde W, Cuypers E. Skeletal tissue, a viable option in forensic toxicology? A view into post mortem cases. *Forensic Sci Int.* 2020;309:110225. doi:10.1016/j.forsciint.2020.110225.
40. Aly SM, Gish A, Hakim F, et al. In the case of extensively putrefied bodies, the analysis of entomological samples may support and complement the toxicological results obtained with other alternative matrices. *Leg Med (Tokyo).* 2023;63:102261. doi:10.1016/j.legalmed.2023.102261.
41. Scendon R, Bury E, Buratti E, et al. Detection of Morphine and Opioids in Fingernails: Immunohistochemical Analysis and Confirmation with Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxics.* 2022;10(8):420. Published 2022 Jul 26. doi:10.3390/toxics10080420.
42. Solimini R, Minutillo A, Kyriakou C, Pichini S, Pacifici R, Busardo FP. Nails in Forensic Toxicology: An Update. *Curr Pharm Des.* 2017;23(36):5468-5479. doi:10.2174/1381612823666170704123126.
43. Buratti E, Cippitelli M, Mietti G, et al. Validation of an HPLC-HR-MS Method for the Determination and Quantification of Six Drugs (Morphine, Codeine, Methadone, Alprazolam, Clonazepam and Quetiapine) in Nails. *J Anal Toxicol.* 2023;47(5):488-493. doi:10.1093/jat/bkad022.
44. Focardi M, Lanzilao L, Bonari A, et al. Improvement in estimation of time since death by albumin and potassium concentrations in vitreous humor. *Forensic Sci Int.* 2020;314:110393. doi:10.1016/j.forsciint.2020.110393.
45. Cieśla J, Tomsia M. Cadaveric Stem Cells: Their Research Potential and Limitations. *Front Genet.* 2021;12:798161. Published 2021 Dec 22. doi:10.3389/fgene.2021.798161.
46. Lendoiro E. Overview on advantages & disadvantages of alternative matrices. *Toxicol Anal et Clin.* 2022;34(3):S16-S17. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2022.06.318>.
47. Farci F, Soni A. Histology, Tooth. [Updated 2023 Jun 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572055/>.
48. Boyde A. Microstructure of enamel. *Ciba Found Symp.* 1997;205:18-31. doi:10.1002/9780470515303.ch3.

49. Wilmers J, Bargmann S. Nature's design solutions in dental enamel: Uniting high strength and extreme damage resistance. *Acta Biomater.* 2020;107:1-24. doi:10.1016/j.actbio.2020.02.019.
50. [https://www.researchgate.net/publication/338278563\\_Dental\\_Histology](https://www.researchgate.net/publication/338278563_Dental_Histology)
51. Akasapu A, Hegde U, Murthy PS. Enamel Surface Morphology: An Ultrastructural Comparative Study of Anterior and Posterior Permanent Teeth. *J Microsc Ultrastruct.* 2018 Jul-Sep;6(3):160-164. doi: 10.4103/JMAU.JMAU\_27\_18. PMID: 30221142; PMCID: PMC6130241.
52. Ten Cate, A. R. (Arnold Richard), *Oral histology : development, structure, and function*, 5th ed, Mosby, 1998, ISBN 0815129521, OCLC 38937486.
53. Zilberman U, Smith P. Sex- and age-related differences in primary and secondary dentin formation. *Adv Dent Res.* 2001;15:42-45. doi:10.1177/08959374010150011101.
54. Solheim T. Amount of secondary dentin as an indicator of age. *Scand J Dent Res.* 1992;100(4):193-199. doi:10.1111/j.1600-0722.1992.tb01740.x.
55. Pinchi V, Pradella F, Buti J, Baldinotti C, Focardi M, Norelli GA. A new age estimation procedure based on the 3D CBCT study of the pulp cavity and hard tissues of the teeth for forensic purposes: A pilot study. *J Forensic Leg Med.* 2015;36:150-157. doi:10.1016/j.jflm.2015.09.015.
56. Sironi E, Taroni F, Baldinotti C, et al. Age estimation by assessment of pulp chamber volume: a Bayesian network for the evaluation of dental evidence. *Int J Legal Med.* 2018;132(4):1125-1138. doi:10.1007/s00414-017-1733-0.
57. Nudel I, Pokhojaev A, Bitterman Y, et al. Secondary Dentin Formation Mechanism: The Effect of Attrition. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(19):9961. Published 2021 Sep 22. doi:10.3390/ijerph18199961.
58. Wennberg A, Mjör IA, Heide S. Rate of formation of regular and irregular secondary dentin in monkey teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;54(2):232-237. doi:10.1016/0030-4220(82)90222-5.
59. Pashley DH. Dynamics of the Pulpo-Dentin Complex. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 1996;7:2, 104-133.
60. Byers MR. Development of sensory innervation in dentin. *J Comp Neurol.* 1980;191(3):413-27.

61. Garcia-Algar O, Vall O, Segura J, et al. Nicotine concentrations in deciduous teeth and cumulative exposure to tobacco smoke during childhood. *JAMA*. 2003;290(2):196-197. doi:10.1001/jama.290.2.196.
62. Zeren C, Keten A, Çelik S, et al. Demonstration of ethyl glucuronide in dental tissue samples by liquid chromatography/electro-spray tandem mass spectrometry. *J Forensic Leg Med*. 2013;20(6):706-710. doi:10.1016/j.jflm.2013.03.033.
63. Schüssl Y, Pelz K, Kempf J, Otten JE. Concentrations of amoxicillin and clindamycin in teeth following a single dose of oral medication. *Clin Oral Investig*. 2014;18(1):35-40. doi:10.1007/s00784-013-0958-7.
64. Pellegrini M, Casá A, Marchei E, et al. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for opiates and cocaine in human teeth. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40(3):662-668. doi:10.1016/j.jpba.2005.07.003.
65. Tassoni G, Cameriere R, Zampi M, Rinaldelli A, Mancinelli F, Cippitelli M, et al. I denti come matrice alternativa per gli accertamenti tossicologici: risultati preliminari relativi all'applicazione di un metodo validato di estrazione e analisi. *Minerva Medicoleg* 2017;137:1-6. DOI: 10.23736/S0026-4849.16.01755-7.
66. Cattaneo C, Gigli F, Lodi F, Grandi M. The detection of morphine and codeine in human teeth: an aid in the identification and study of human skeletal remains. *J Forensic Odontostomatol*. 2003;21(1):1-5.
67. Cippitelli M, Mirtella D, Ottaviani G, Tassoni G, Frolidi R, Cingolani M. Toxicological Analysis of Opiates from Alternative Matrices Collected from an Exhumed Body. *J Forensic Sci*. 2018;63(2):640-643. doi:10.1111/1556-4029.13559.
68. Klima M, Altenburger MJ, Kempf J, Auwärter V, Neukamm MA. Determination of medicinal and illicit drugs in post mortem dental hard tissues and comparison with analytical results for body fluids and hair samples. *Forensic Sci Int*. 2016;265:166-171. doi:10.1016/j.forsciint.2016.02.021.
69. Quintela O, Mon M, Blanco P, de Castro A, Lopez-Rivadulla M, Cruz A. The tooth as an alternative matrix in forensic toxicology. Application to the determination of benzodiazepines. *Acta Med. Leg. Soc*. 2010. DOI: 10.14195/978-989-26-0173-1\_45.
70. Giovanni Ottaviani, Roberto Cameriere, Marta Cippitelli, Rino Frolidi, Giovanna Tassoni, Massimiliano Zampi, Mariano Cingolani, Determination of Drugs of Abuse in a Single Sample of Human Teeth by a Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method, *Journal of*



- Analytical Toxicology, Volume 41, Issue 1, January-February 2017, Pages 32–36, <https://doi.org/10.1093/jat/bkw105>.
71. Reesu GV, Augustine J, Urs AB. Forensic considerations when dealing with incinerated human dental remains. *J Forensic Leg Med.* 2015;29:13-17. doi:10.1016/j.jflm.2014.10.006.
  72. Blakaj F, Bicaj T, Bicaj B. Dental identification of a decomposed body. *Med Arh.* 2010;64(2):125-126.
  73. Bianchi IA, Focardi MB, Grifoni R, et al. Dental identification of unknown bodies through antemortem data taken by non-dental X-rays. Case reports. *J Forensic Odontostomatol.* 2021;39(3):49-57. Published 2021 Dec 30.
  74. Pinchi V, Zei G. Two positive identifications assessed with occasional dental findings on non-dental x-rays. *J Forensic Odontostomatol.* 2008;26(2):34-38. Published 2008 Dec 1.
  75. Cippitelli M, Mirtella D, Ottaviani G, Tassoni G, Frolidi R, Cingolani M. Toxicological Analysis of Opiates from Alternative Matrices Collected from an Exhumed Body. *J Forensic Sci.* 2018;63(2):640-643. doi:10.1111/1556-4029.13559.
  76. Kumar N, Aparna R, Sharma S. Effect of postmortem interval and conditions of teeth on STR based DNA profiling from unidentified dead bodies. *J Forensic Leg Med.* 2021;83:102246. doi:10.1016/j.jflm.2021.102246.
  77. Pinchi V, Torricelli F, Nutini AL, Conti M, Iozzi S, Norelli GA. Techniques of dental DNA extraction: Some operative experiences. *Forensic Sci Int.* 2011;204(1-3):111-114. doi:10.1016/j.forsciint.2010.05.010.
  78. Higgins D, Austin JJ. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. *Sci Justice.* 2013;53(4):433-441. doi:10.1016/j.scijus.2013.06.001.
  79. Bani G, Bani D, Bani Sacchi T. *Istologia Atlante*. VI Edizione. 2004. Casa Editrice IDELSON-GNOCCHI, Napoli.
  80. Kawasaki K, Fearnhead RW. On the relationship between tetracycline and the incremental lines in dentine. *J Anat.* 1975;119(Pt 1):49-59.
  81. Lake FT, O'Dell NL, Walton RE. The effect of internal bleaching on tetracycline in dentin. *J Endod.* 1985;11(10):415-420. doi:10.1016/S0099-2399(85)80078-9.
  82. Simpson, M.S. Effects of demineralizing tetracycline-stained human dentine. *Calcif Tissue Int* 33, 101–104 (1981). <https://doi.org/10.1007/BF02409420>.
  83. Klima M, Auwärter V, Altenburger MJ, Neukamm MA. In vitro studies on the dependence of drug deposition in dentin on drug concentration, contact time, and the physicochemical

properties of the drugs. *Arch Toxicol.* 2023;97(10):2675-2685. doi:10.1007/s00204-023-03573-6.

84. Kushdeep KG, Abraham J.. Morphologic and Radiographic Effects of Acids on the Teeth: An in-Vitro Forensic Study. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology.* 2020;14(1), 28–33. <https://doi.org/10.37506/ijfmt.v14i1.7>.