JAMILLY DE OLIVEIRA MUSSE

**A INFLUÊNCIA DO MEIO AQUÁTICO NOS PROCESSOS DE
IDENTIFICAÇÃO HUMANA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E
LABORATORIAL (RECUPERAÇÃO DO DNA)**

São Paulo

2007

Jamilly de Oliveira Musse

**A Influência do Meio Aquático nos Processos de Identificação
Humana: Estudo Epidemiológico e Laboratorial
(Recuperação do DNA)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

Área de Concentração: Odontologia Social

Orientador: Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira

São Paulo

2007

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Musse, Jamilly de Oliveira

A influência do meio aquático nos processos de identificação humana : estudo epidemiológico e laboratorial (recuperação do DNA / Jamilly de Oliveira Musse; orientador Rogério Nogueira de Oliveira. -- São Paulo, 2007.

128p.: tab., fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Odontologia Social) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Identificação humana – Dentes – DNA 2 Dentes humanos – Meio aquático – DNA – Recuperação 3. Odontologia Social

CDD 614.1
BLACK D873

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail: jamillymusse@usp.br/musse_jo@hotmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Musse JO. A Influência do Meio Aquático nos Processos de Identificação Humana: Estudo Epidemiológico e Laboratorial (recuperação do DNA) [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, / /

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, por ter me auxiliado e amparado, numa das horas mais difíceis da minha vida, e mostrado que se pode vencer, mesmo na adversidade.

Aos meus pais, Raimundo e Mara,

“De vocês recebi o dom mais precioso do universo: a vida.

Já por isso seria infinitamente grata.

Mas vocês não se contentaram em presentear-me apenas com ela;

Revestiram a minha existência de amor, carinho e dedicação.

Cultivaram na criança todos os valores que a transformaram em um adulto responsável e consciente.

Abriram a porta do meu futuro, iluminando o meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo.

Trabalharam dobrado, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus, não foram apenas pais, mas amigos e companheiros, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis e a distância, um fardo pesado demais.

Tantas foram as vezes que meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados por vocês, numa união que me incentivou a prosseguir.

Hoje, neste dia, procuro encontrar entre as palavras àquela que gostaria que seus corações ouvissem.

E só encontro uma simples e sincera palavra: obrigada”. Dividam comigo, os méritos desta conquista, porque lhes pertence: ela também é de vocês.

Aos meus irmãos Jamil e Juliana,

“O amor de nossos pais nos fez irmãos. Nossa opção nos fez amigos. Minha vida tem mais encanto exatamente pela forma com que vocês estão presentes nela”.

Muito obrigada por compartilharem comigo momentos repletos de amor e de
alegrias.

Ao meu noivo Jeidson,

A quem amo tanto, por me acompanhar na vida, dando-me suporte nos momentos mais difíceis, carinho nos momentos de tristeza e um grande sorriso nos momentos de vitória. Amo você.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira,

“Existem várias formas de olhar as pessoas, porém aquela que marca mais é o olhar dos sentimentos, pois neste, os olhos exercem apenas o papel de mensageiros da
verdade”

Pela amizade e confiança depositada em mim, e principalmente por saber transmitir de forma tão brilhante conhecimentos que foram muito além de conhecimentos técnicos, mas verdadeiras lições de vida.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Cavalcante Galvão,

“Há grandes homens que fazem com que todos se sintam pequenos, mas o verdadeiro homem é aquele que faz com que todos se sintam grandes”

Muito obrigada por ter despertado em mim o interesse pela Odontologia Legal e ter aberto tantas portas, apostando sempre em meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, por ter proporcionado mais esta etapa em minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira pela orientação, amizade e transmissão de conhecimentos valiosos que tanto contribuíram para o enriquecimento deste estudo e para minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Moacyr da Silva que desde o princípio acreditou em meus propósitos. Em todos os momentos que estive aqui, recebi seu apoio, distinção e cuidados que apenas verdadeiros amigos poderiam oferecer. Sua dedicação a Odontologia Legal é um exemplo vivo para todos nós.

Aos Professores do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Rodolfo Francisco H. Melani, Maria Ercília de Araújo, Dalton Luis de P. Ramos, Edgar Crosato, Hilda F. Cardozo, Michel Crosato, Antônio Carlos Frias, José Leopoldo F. Antunes pela amizade e convivência científica compartilhada.

Ao laboratório de Análise Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do Prof. Mário Hirata que com a concessão da infra-estrutura, insumos e seus conhecimentos viabilizaram nosso trabalho.

À Prof. Regina Maria Barreto Cicarelli pela concessão dos insumos e da infra-estrutura do seu laboratório.

À Evelyn pela inestimável paciência frente a minha ansiedade e pela disponibilidade para incentivar e ensinar.

Aos colegas de laboratório Ricardo, Carol, Vanessa e Amanda pela amizade e companheirismo. Com vocês compartilhei uma etapa importante da minha vida.

À Joyce pela cooperação no desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas do CRUSP, por compartilharem comigo angústias, esperanças, medos e alegrias; e que, mesmo sem pretensão, se tornaram parte da minha vida e família provisória. Sem a amizade de vocês certamente tudo seria muito mais difícil.

Às Secretárias do Departamento de Odontologia Social pelo carinho e apoio.

Às bibliotecárias pela paciência e dedicação na normatização deste trabalho.

Aos voluntários pelo consentimento e participação no trabalho.

Às Assistentes Sociais do Complexo Residencial da Universidade de São Paulo, pela moradia concedida, em especial à Fátima pelo apoio e agradável convivência.

À CAPES pela bolsa de Mestrado no programa de Demanda Social.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, citados ou não, participaram deste especial momento da minha vida.

"Existe somente uma idade para a gente ser feliz, somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-los a despeito de todas as dificuldades e obstáculos.

Uma só idade para a gente se encantar com a vida e viver apaixonadamente e desfrutar tudo com toda intensidade sem medo nem culpa de sentir prazer.

Fase dourada em que a gente pode criar e recriar a vida à nossa própria imagem e semelhança e vestir-se com todas as cores e experimentar todos os sabores e entregar-se a todos os amores sem preconceito nem pudor.

Tempo de entusiasmo e coragem em que todo desafio é mais um convite à luta que a gente enfrenta com toda disposição de tentar algo novo, de novo e de novo, e quantas vezes for preciso.

Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se presente e tem a duração do instante que passa...."

Mário Quintana

Musse JO. A Influência do Meio Aquático nos Processos de Identificação Humana: Estudo Epidemiológico e Laboratorial (recuperação do DNA) [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

Os recursos empregados para identificação humana variam desde antropologia física até o estudo dos ácidos nucléicos. Exemplos recentes como o Tsunami, na Tailândia e o Katrina, em Nova Orleans reforçam a necessidade de domínio de técnicas de extração do DNA no processo de identificação de corpos esqueletizados ou em estado de decomposição avançado que estiveram sob influência de ambiente aquoso. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi conhecer a casuística de situações que envolvam casos de afogamento, através dos registros do Instituto Médico-Legal Nina Rodrigues na cidade de Salvador - Bahia, além de, verificar o potencial de recuperação do DNA obtido de dentes humanos, imersos na água doce e salgada, por 1 mês. Foram utilizados 40 dentes sendo o DNA extraído pelo método orgânico e amplificado por PCR utilizando a amelogenina como iniciador. A eletroforese ocorreu inicialmente em gel de agarose e posteriormente em gel de poliacrilamida. Em seguida, foram selecionadas 10 amostras para amplificação através do sistema Powerplex® 16 System, sendo a eletroforese realizada em seqüenciador automático. No levantamento, observou-se 346 óbitos por afogamento, a maioria destes na água salgada (51,73%), predominando vítimas do sexo masculino (86,13%), na faixa etária de 18-35 anos (37,94%). Os cirurgiões-dentistas atuaram na identificação de 14,74% das vítimas. A recuperação do DNA foi possível em 37,5% das amostras (45% provenientes de dentes imersos em água

doce e 30% em água salgada). A análise em gel de poliacrilamida de 27 amostras (15 dentes e 12 de células da mucosa oral) provenientes de 12 participantes, que tiveram amplificação positiva no gel de agarose, possibilitou a identificação correta do sexo em 83,3% dos casos (10 indivíduos). Entretanto, foi visualizada a perda de alelos em amostras de dois participantes, prejudicando a determinação do sexo. No Powerplex® foi possível a obtenção de pelo menos uma região do DNA em todas as amostras, mesmo naquelas que tiveram amplificação negativa no gel de agarose. Desta forma, a exposição dos dentes à água interferiu diretamente na recuperação do DNA. A investigação do sexo pela amelogenina mostrou-se efetiva, mas como toda técnica necessita de uma interpretação criteriosa dos resultados. Além disso, o sistema multiplex permitiu a obtenção de resultados mais fidedignos em função do seu alto poder discriminativo. O presente estudo proporcionou a obtenção de conhecimentos técnicos e científicos sobre o emprego da biologia molecular na investigação do sexo, demonstrando que apesar de ser uma técnica extremamente sensível às condições ambientais e outros fatores, trata-se de um método eficiente nos processos de identificação humana. Entretanto, a análise de DNA, mesmo sendo uma poderosa ferramenta, não é condição *sine qua non* em estudos forenses, devendo ser considerada dentro de um conjunto de variadas evidências.

Palavras-Chave: Identificação Humana – Odontologia Legal – DNA – Dentes – Afogamento

Musse JO. The aquatic environment influence in the human identification process: epidemiologic and laboratory study (DNA recuperation) [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

The resources used for human identification vary since physical anthropology until nucleic acid study. Recent examples as the Tsunami, in Thailand and the Katrina, in New Orleans strengthen the necessity of domain of DNA extraction techniques in the skeleton bodies identification process in advanced decomposition state that had been under watery environment influence. In this direction, the objective of this work was to know the casuistry of situations that involve drowning cases, through the registers of Nina Rodrigues Forensic Medicine Institute in Salvador city - Bahia, beyond, to verify the recovery potential of DNA in human teeth immersed in the water for 1 month. 40 teeth had been used, being the DNA extracted for the organic method and amplified by PCR using the amelogenin as initiator. The electrophoresis occurred initially in agarose gel and later in polyacrylamide gel. After that, 10 samples was select for amplification through the Powerplex® 16 System, being the electrophoresis carried in the automated sequence data. In the survey, was observed 346 deaths for drowning, the majority of these in the saline water (51,73%), predominating victims of the masculine sex (86,13%), with age between 18-35 years (37,94%). The surgeon-dentists had acted in the identification of 14,74% of the victims. The DNA recovery was possible in 37,5% of the samples (45% coming teeth immersed in fresh water and 30% in saline water). The analysis in polyacrylamide gel of 27 samples (15 teeth and 12 of oral mucous cells) proceeding from 12 participants,

who had positive amplification in the agarose gel, made possible the correct sex identification in 83,3% of the cases (10 individuals). However, the allelic loss in samples of two participants was visualized, harming the sex determination. In the Powerplex® it was possible obtaining at least one region of the DNA in all the samples, exactly in that they had negative amplification in the agarose gel. Of this form, the exposition of teeth to the water intervened directly with the DNA recuperation. The sex identification by amelogenin revealed effective, but as all technique needs one sensible interpretation of the results. Moreover, the multiplex system allowed the obtaining of trustwotther results in function of your high discriminate power. The present study provided the obtaining of technician and scientific knowledge about use of molecular biology in the sex investigation, demonstrating that although to be one extremely sensible technique to the ambient conditions and other factors, is one efficient method in the human identification processes. However, the DNA analysis, exactly being one powerful tool, is not indispensable condition in forensic studies, having to be considered inside of one set of varied evidences.

Keywords: Human Identification – Forensic Odontology – DNA - Teeth - Drowning

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Escada alélica do Powerplex®16 System.....	69
Figura 5.1 - Fotografia em gel de agarose a 1% corado com brometo de étideo.....	76
Figura 5.2 - Fotografia em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de étideo.....	76
Figura 5.3 - Fotografia em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de étideo...	77
Figura 5.4 - Fotografia em gel de poliacrilamida a 8% corado com prata.....	80
Figura 5.5 - Fotografia em gel de poliacrilamida a 8% corado com prata.....	80
Figura 6.1 – Composição química da água doce e salgada.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Tipos e quantidades de reagentes utilizados na PCR (amelogenina).....	65
Tabela 4.2 - Ciclagem padrão preconizada pelo fabricante do iniciador (amelogenina)	66
Tabela 4.3 - Tipos e quantidades de reagentes utilizados na PCR (Powerplex®) ...	70
Tabela 4.4 - Ciclagem padrão preconizada pelo fabricante do iniciador (Powerplex®).....	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 - Iniciador utilizado para amplificação (amelogenina).....	64
Quadro 4.2 - Localização e composição da sequência repetitiva dos loci que compõem o Powerplex®.....	68
Quadro 5.1 - Classificação das amostras com amplificação positiva segundo o tipo e a condição dentária.....	79
Quadro 5.2 - Quadro comparativo dos dois sistemas de amplificação utilizados (monoplex e multiplex).....	81
Quadro 5.3 - Perfil genético das amostras no powerplex®.....	82

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 – Distribuição percentual de óbitos por afogamento, Salvador, 2003 à 2005	72
Gráfico 5.2 - Distribuição numérica do número de óbitos segundo o ano, Salvador, 2003 à 2005	72
Gráfico 5.3 - Distribuição percentual de óbitos segundo o sexo, Salvador, 2003 à 2005	73
Gráfico 5.4 - Distribuição percentual das vítimas de afogamento segundo o sexo, Salvador, 2003 à 2005	73
Gráfico 5.5 - Distribuição percentual das vítimas de afogamento segundo a faixa etária, Salvador, 2003 à 2005	74
Gráfico 5.6 - Distribuição percentual das vítimas de afogamento segundo o local onde o corpo foi encontrado, Salvador, 2003 à 2005	75
Gráfico 5.7 - Distribuição percentual dos casos de afogamento segundo a atuação odontológico-legal, Salvador, 2003 à 2005	75
Gráfico 5.8 - Percentual de recuperação do DNA, através da tipagem do locus amel, em dentes submetidos à imersão na água	77
Gráfico 5.9 - Percentual de recuperação do DNA, através da tipagem do locus amel, em dentes submetidos à imersão em água doce e salgada.....	78

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AMEL	amelogenina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatos
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FBI	Federal Bureau of Investigation
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ILS600	Internal Lane Standard 600
IML	Instituto Médico-Legal
INTERPOL	Organização Internacional da Polícia Criminal
ISFG	Sociedade Internacional de Genética Forense
LBIGO	largura bigoníaca
LMA	largura mandibular anterior
M	molar
mA	miliampere
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
pb	pares de base
PCR	polimerase chain reaction ou reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico

RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecil sulfato de sódio
STRs	pequenas repetições consecutivas
SNP	polimorfismo de base única
SSP-SP	Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo
VNTR	variable number of tander repeats ou número variável de repetições consecutivas
TEMED	N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamino
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
UV	ultravioleta
V	volts
W	watts
µg	micrograma
µL	microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	porcentagem
®	marca registrada

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Identificação Humana	24
2.1.1 Investigação do sexo no contexto forense	27
2.2 Biologia Molecular aplicada à Identificação Humana	30
2.2.1 Aspectos históricos	30
2.2.2 DNA - Aspectos estruturais e transmissão da informação genética	33
2.2.3 Estabelecimento da Identidade Genética	35
2.2.4 Etapas de análise forense do DNA	38
2.2.5 Incorporação dos Estudos Genéticos à Odontologia Legal	41
2.3 Identificação de Vítimas de Afogamento	52
3 PROPOSIÇÃO	57
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
5 RESULTADOS	72
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96
GLOSSÁRIO	112
APÊNDICES.....	114
ANEXOS.....	120

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo a Odontologia Legal vem contribuindo com os processos de identificação humana. Os cirurgiões-dentistas, devidamente respaldados na Lei nº 5.081/66, podem executar perícias envolvendo materiais biológicos derivados do corpo humano em várias condições (espostejados, dilacerados, carbonizados, macerados, putrefeitos, em esqueletização e esqueletizados), sempre com o objetivo de estabelecer a identidade humana (OLIVEIRA et al., 1998).

Historicamente, impressões digitais têm sido usadas para identificação, porém, em algumas situações, nas quais o corpo encontra-se em estado de putrefação avançado essas são facilmente destruídas. Além disso, freqüentemente os peritos necessitam utilizar elementos comparativos anteriores à morte do indivíduo, como a documentação odontológica, para proceder à identificação, e estas nem sempre estão disponíveis.

Antes do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, situações como essas levavam os peritos a procederem à identificação geral do indivíduo sem contar com o subsídio de elementos comparativos anteriores à morte. E, quando a documentação existia, mas os despojos estavam extremamente degradados, os exames procuravam reconstruir o perfil do indivíduo por meio do estabelecimento da espécie animal, estimativa do sexo, estatura, idade, fenótipo cor da pele, entre outras características. Para tanto, contavam com o auxílio dos estudos antropométricos, que, entretanto, não possibilitavam a individualização do examinado (OLIVEIRA et al, 2002).

Atualmente, a aplicação dos recursos da biologia molecular na identificação humana, tem sido empregada quando esses métodos tradicionais tornam-se inviáveis, pois utilizando seus recursos é possível identificar uma pessoa mesmo sem informações anteriores à morte ou até na presença de material biológico deteriorado em ínfimas quantidades, condições estas relativamente freqüentes nas análises forenses, principalmente em se tratando de acidentes de massa (CORACH, 1997).

Nesse sentido, alguns autores ressaltam a necessidade da atuação conjunta de múltiplos profissionais da área de saúde (médicos, cirurgiões-dentistas, psicólogos, geneticistas, radiologistas) e ciências afins (antropólogos, peritos técnicos, entre outros) no processo de identificação das vítimas (LAU; TAN; TAN, 2005; BUDOWLE; BIEBER; EISENBERG, 2005).

Exemplos recentes e projetados pela mídia como o “Tsunami”, na Tailândia, em 2004 e na Indonésia, em 2006, os furacões “Katrina” em Nova Orleans e o “Rita” no Texas, ambos no ano de 2005 (MCCARTHY, 2006), reforçam a necessidade do domínio de técnicas de extração do DNA no processo de identificação de corpos esqueletizados ou em estado de decomposição avançado que estiveram sob influência de ambiente aquoso (ALONSO et al., 2005).

Nestes casos, como as unidades dentárias são os elementos corpóreos mais resistentes aos fatores exógenos, é fundamental que se domine as técnicas de extração do DNA a partir de dentes sujeitos às diferentes condições do meio ambiente como, por exemplo, a umidade (MALAVER; YUNIS, 2003).

Esta aplicabilidade pôde ser constatada em diversos trabalhos nos quais o DNA foi utilizado no processo de identificação de vítimas, cujos corpos sofreram ação da água (MANNUCCI et al., 1995; GRANDMAISON et al., 2005).

Seguindo esta mesma linha de pesquisa, Mannucci et al. (1995), Nakanishi, Moriya e Hashimoto (2003) ressaltam a influência do meio ambiente na estabilidade do DNA, uma vez que frequentemente são encontrados cadáveres ou parte deles carbonizados, submersos ou enterrados, sofrendo, portanto a ação de fatores ambientais, o que de acordo com Schwartz et al. (1991) pode interferir na quantidade de DNA recuperado ao final, prejudicando assim o processo de identificação. Segundo Bender, Farfán e Schneider (2004), isto acontece porque, a taxa de degradação do DNA varia com a intensidade da luz, umidade e temperatura, podendo levar a contaminação por bactérias e fungos, seguida do crescimento de microrganismos, resultando na degradação física, química e biológica do DNA genômico.

No tocante à realidade brasileira, apesar de no Brasil os acidentes de massa, incluindo nesta categoria os desastres naturais, serem pouco documentados, registros do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) relatam o aumento significativo do número de mortalidade por causas externas, entre eles o afogamento. Nesse sentido, os dados revelam a ocorrência de 57.595 casos de óbitos por afogamento e submersões acidentais entre os anos de 1996 e 2004, o que representa 0,67% do total de mortes ocorridas no país. Essa situação torna-se preocupante a partir do momento que se considera a extensão do litoral brasileiro e sua concentração populacional, principalmente em Estados como a Bahia, onde de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE, 2006) há o predomínio de cidades litorâneas.

Desta forma, os habitantes destas regiões podem estar sendo vítimas de homicídios, suicídio ou acidentes, onde o tempo de submersão/imersão na água e o estado como o corpo foi encontrado pode comprometer o processo de identificação.

Neste contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de protocolos envolvendo biologia molecular aplicada à identificação humana e o emprego de métodos cada vez mais rápidos e precisos durante a identificação das vítimas, buscando a obtenção do DNA nas condições mais adversas, onde geralmente se encontra quantidades ínfimas do material genético.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Identificação Humana

O ato pelo qual se estabelece a identidade de alguma pessoa ou de alguma coisa, pela presença dos atributos que os caracterizam recebe o nome de identificação (RUMJANEK; RINZLER, 2001).

A identificação humana visa o estudo do homem no todo e nas suas partes componentes, analisando-o nos seus aspectos morfológicos, fisiológicos e psíquicos, com a ajuda dos quais se determina a identidade. Estuda também o cadáver inteiro ou espostejado, manchas de várias naturezas, excrementos humanos ou de animais, pêlos, entre outros (VIEIRA et al., 2000). Por isso, o emprego dos métodos de identificação é necessário tanto em indivíduos vivos como em cadáveres, restos cadavéricos, esqueletos, ossada e até mesmo em objetos, armas, vestes, etc. (RISSECH; GARCIA; MALGOSA, 2003).

Arbenz (1988) dividiu tecnicamente a identificação em duas partes: judiciária ou policial e médico/odonto-legal ou antropológica. A primeira independe de conhecimentos médicos e objetiva a caracterização dos indivíduos através de processos rápidos, sendo realizada por técnicos cujo saber médico é desnecessário, tais como a grafologia, a voz, o retrato falado, a fotografia, dactiloscopia, impressões palmares e plantares. Já a médico/odonto-legal ou antropológica demanda de quem a pratique, conhecimentos da Medicina/Odontologia Legal e ciências afins.

De acordo com Migliorini (2000), este tipo de identificação compreende:

- A identificação física que visa à investigação da espécie animal, cor, sexo, estatura, peso, biótipo, sinais individuais, como cicatrizes, tatuagens, sinais profissionais, entre outros;
- A identificação funcional que estuda a atitude, mímica, gestos, andar, funções sensoriais, voz, escrita e;
- A identificação psíquica, voltada para o estudo das manifestações psíquicas normais ou patológicas, incluindo o diagnóstico das oligofrenias, psicoses, neuroses, demências e personalidades psicopáticas.

Entretanto, observa-se na literatura uma analogia entre identificação e reconhecimento (ARBENZ, 1988). De acordo com Galvão (1999) os termos identificação e reconhecimento, apesar de aparentemente serem processos identificatórios, são na essência, bem diferentes. Para o autor, identificar é provar, por meios técnicos e/ou científicos, que aquela pessoa é ela mesma e não outra, sendo fundamentado em metodologia científica. Já reconhecer é lembrança, baseada em procedimento empírico e fundamentada em bases meramente testemunhais.

Atualmente, existem diversos métodos para se chegar ao processo de identificação humana. Nos casos em que o corpo está bem preservado, ela pode ser feita pelo reconhecimento facial ou das características individuais de cada pessoa, como cicatrizes e tatuagens. Pode-se utilizar também como recurso a dactiloscopia ou a própria dentição (YAMAGUCHI et al., 1997), desde que existam registros prévios destas características (PRIMORAC, 2000).

Nesse sentido, em relação à Odontologia Legal, Arbenz (1988) afirma que: “os dentes e os arcos dentários podem fornecer em certas circunstâncias, subsídios de real valor para solução de problemas médico-legais e criminológicos, de sorte a

constituir, às vezes, os únicos elementos com os quais pode contar o perito”. De acordo com Miyajima, Daruge e Daruge Júnior (2001) isto ocorre devido a elevada probabilidade das características dentárias jamais serem as mesmas em duas pessoas quaisquer e em função do alto grau de indestrutibilidade do dente, do osso em que estão fixados e dos materiais restauradores.

Um dos casos mais rumorosos em que a Odontologia Legal esteve envolvida, no Brasil, foi o caso Mengele, em junho de 1985. Tratava-se da descoberta de um corpo, morto por afogamento em 1979, suspeito de pertencer ao médico alemão nazista acusado de fazer experimentos com seres humanos na Segunda Guerra Mundial. Procedeu-se a identificação através do exame odonto-legal do arco dentário por peritos brasileiros, sendo feito exame de DNA por uma instituição inglesa, só para confirmar aquilo que os peritos já haviam tecnicamente comprovado (FERREIRA, 1996).

Entretanto, essa condição básica para executar tecnicamente a identificação individual de uma pessoa (registro prévio) nem sempre se faz presente ou, mostra-se deficiente, o que faz com que durante os exames haja imprecisões, como constatou Clark (1994) analisando a contribuição prestada pela Odontologia Legal em 10 desastres de massa ocorridos na Grã-Bretanha. O mesmo foi observado no Brasil em relação ao acidente da TAM, em 1996, no qual foi constatado, pelos peritos envolvidos no processo de identificação, que muitos cirurgiões-dentistas dão pouca importância ao arquivamento correto dos dados de seus pacientes, restringindo assim a possibilidade de identificação pelos arcos dentários (FERREIRA, 1996).

Na prática pericial é comum os peritos receberem para exame, ossadas ou parte delas, ou até mesmo um osso isolado. Nestes casos, a antropometria, através

de metodologias qualitativas e quantitativas, vem sendo bastante utilizada no processo identificatório, no tocante à investigação e estimativa de dados biotipológicos, como: espécie, sexo, fenótipo cor de pele, idade, estatura e peso (MIGLIORINI, 2000; RISSECH; GARCIA; MALGOSA, 2003).

2.1.1 Investigação do sexo no contexto forense

A investigação do sexo na área forense não apresenta dificuldades para o seu diagnóstico, quando se trata de um cadáver íntegro e recente (GALVÃO, 1999).

Já os casos de corpos em estágio de putrefação avançada com destruição da genitália externa, exigem o emprego de técnicas mais sofisticadas para o estabelecimento do dimorfismo sexual, entre elas, a pesquisa da cromatina sexual ou do corpúsculo de Barr, que é encontrado no sexo feminino. Uma outra opção é a abertura da cavidade abdominal à procura do útero ou da próstata. Estes órgãos são os que mais resistem à ação de fatores ambientais e agentes externos, por estarem anatomicamente protegidos pela caixa pélvica. As radiografias nestes casos são de grande utilidade (FRANÇA, 2004).

Nos esqueletos, os aspectos morfológicos e métricos permitem o diagnóstico do sexo com segurança (CASTRO JÚNIOR, 2005). Nesses casos, de acordo com Castro e Galvão (2002), a cintura pélvica e o crânio são, por ordem, os segmentos do esqueleto humano que mais se prestam a este estudo.

Em relação à Odontologia, diversos estudos sobre determinação sexual a partir do crânio, mandíbula, osso hióide, suturas cranianas, arcos dentários, dentes e

palato vem sendo desenvolvidos no intuito de prestar contribuição à justiça no processo identificatório (GALVÃO, 1998; SAMPAIO, 1999; MACHADO, 2000).

Pashinian (1993) utilizando as ranhuras existentes no palato duro e levando em consideração a posição e variações das mesmas, propôs um modelo matemático, passível de ser utilizado no processo de identificação forense.

Oliveira et al (1999), estudando mandíbulas e relacionando-as com a estimativa do sexo, desenvolveram metodologias específicas a padrões nacionais, onde as características consideradas foram: a altura do ramo mandibular e a distância bigoníaca, sendo os valores analisados estatisticamente. Através de regressão logística e análise da função discriminante, verificou-se uma boa margem de acerto, de respectivamente, 77,7% e 78,33%. Ao final os autores desenvolveram um “software”, para utilização a padrões métricos de indivíduos brasileiros adultos, independente do grupo racial a que pertençam.

Burris e Harris (1998) utilizaram a altura, profundidade do palato e ponta de cúspide dos dentes no processo de identificação do sexo e fenótipo cor de pele.

Galvão (1999) estudou 86 mandíbulas sendo 34 femininas e 52 masculinas, de adultos com mais de 20 anos e verificou que em todas as medidas utilizadas há dimorfismo sexual, porém somente as variáveis: largura bigoníaca (LBIGO) e largura mandibular anterior (LMA) compuseram o modelo matemático. Este obteve concordância em 74,97% dos casos.

Saliba (1999) avaliou medidas cranianas (distâncias entre: as suturas fronto-zigomáticas direita e esquerda; o forame palatino maior direito e esquerdo; a fossa incisiva e espinha nasal posterior e entre os pontos bregma e lambda) em 198 crânios sendo 93 femininos e 105 masculinos, de pessoas adultas com mais de 23 anos de

idade, e elaborou uma fórmula que permitiu um grau de confiabilidade de 69,33% para o sexo feminino e 73,08% para o sexo masculino.

Sampaio (1999) mensurou cinco medidas em 200 crânios humanos (comprimento e largura máxima da abertura piriforme, medida básico-próstio, próstio-násio, násio-espinha nasal posterior) todos com idade superior a 21 anos. Demonstrou-se que o comprimento máximo da abertura piriforme, a distância básico-próstio e próstio-násio foram significativas para determinar o sexo e permitiram a elaboração de uma fórmula com um índice de acerto de 70%.

Machado (2000) pesquisou o índice condílico de Baudoin em 51 crânios e concluiu que houve concordância de 58,1% dos casos analisados e discordância de 39,4%, sendo 2,5% casos duvidosos. Finalizou afirmando que a metodologia empregada por Baudoin, quando aplicada em brasileiros, é factível de erros na demonstração do dimorfismo sexual.

Abe (2000) avaliou 130 crânios sendo 50 femininos e 80 masculinos com idades superiores a 20 anos, realizando as seguintes medidas: espinha nasal anterior-borda anterior do meato acústico externo, glabela-espinha nasal anterior, lambda-glabela, lambda-pólo inferior da apófise mastóide e observou que todas as medidas eram estatisticamente significantes para a discriminação sexual.

Entretanto, apesar do auxílio inestimável dos estudos antropométricos, sua aplicação não possibilita a individualização – ou seja, a nomeação - do examinando. Além disso, na análise antropológica existe a necessidade da realização de constantes revisões de estudos populacionais, pois seus resultados dependem diretamente da origem da amostra estudada (CORACH, 1997; FIGINI et al., 2003).

Neste aspecto, no tocante à estimativa do sexo, a análise da amelogenina constitui uma opção significativa, pois obtido o DNA, sua amplificação e conseqüente

estabelecimento do sexo ocorrem de forma rápida e eficiente (BRETTELL et al., 2001). Sendo assim, é possível obter DNA de praticamente todos os tecidos do corpo humano, variando apenas a quantidade de material capaz de ser extraído de cada um desses tecidos (VU; CHATURVEDI; CANFIELD, 1999).

Neste sentido, a consagrada importância da Odontologia Legal na identificação humana em casos onde pouco se resta para proceder esta identificação, como incêndios, explosões (MELANI, 1999) e acidentes de massa, forçou os profissionais de Odontologia, ligados à investigação forense, a se familiarizarem com as novas tecnologias da biologia molecular (VIEIRA et al., 2000).

Os testes de DNA realizados hoje têm sido aceitos como prova legal em vários casos judiciais, como inclusão e exclusão de paternidade, e na identificação humana (PARDINI et al., 2001).

2.2 Biologia Molecular aplicada à Identificação Humana

2.2.1 Aspectos históricos

O processo de recombinação gênica proporciona um alto grau de variabilidade entre os organismos vivos. Cada indivíduo da espécie humana possui um perfil genético único, com exceção de gêmeos monozigóticos que compartilham do mesmo genótipo (BONACCORSO, 2005).

Há bem pouco tempo a ciência da identificação de casos criminais pautava-se apenas nas análises sorológicas dos polimorfismos de proteínas e grupos sanguíneos e em alguns marcadores genéticos. Hoje, os grupos sanguíneos eritrocitários, como os sistemas ABO, Rh e MNSs, foram substituídos na maioria dos centros, sendo pouco utilizados (MIYAJIMA, DARUGE, DARUGE-JÚNIOR, 2001).

As provas de identificação individual, utilizando os testes de grupos sanguíneos, ganharam valor legal nas cortes alemãs a partir de 1920, mas somente em 1935 foram aceitas legalmente nos Estados Unidos. Logo em seguida, no Brasil, tais exames passaram a ter valor legal, sendo a primeira ação de investigação de paternidade datada de 1948 (MOURA-NETO, 1998).

Marcando uma outra etapa da evolução desta ciência, em 1954, foi demonstrada a ocorrência de um sistema de histocompatibilidade mediado por antígenos na superfície dos leucócitos, conhecido por complexo HLA (histocompatibility leucocyte antigen), determinado por genes alélicos muito próximos localizados no braço curto do cromossomo 6, com acentuado poder de discriminação individual ou determinação da individualidade genética (REMUALDO et al., 2005).

Outra fase importante no desenvolvimento das ciências forenses voltada à identificação humana veio com a publicação de Jeffreys, Brookfield e Semeor (1985), onde se testou sondas moleculares radioativas com a propriedade de reconhecer certas regiões altamente sensíveis do DNA (minissátelites do genoma humano) que produziam uma espécie de “impressão digital”.

A tipagem molecular de material genético foi utilizada oficialmente pela primeira vez na Inglaterra, por Jeffreys, Brookfield e Semeor (1985), para a resolução de um problema de imigração. Um ano após, os mesmos autores empregaram esta técnica para identificar o verdadeiro estuprador e assassino de duas vítimas, a partir

do qual a Criminalística e a Medicina Legal ganharam novo fôlego e têm empregado a técnica da tipagem molecular de DNA como potente arma no esclarecimento de diversos delitos e na identificação humana (PINHEIRO, 2004).

No Brasil, os testes envolvendo DNA passaram a ser levados em conta pela Justiça somente na década de noventa, sendo ainda bastante questionados por alguns. Acrescido a este fato, existe o alto custo do exame, em virtude da escassez de institutos públicos preparados para execução rotineira desse tipo de serviço. Obviamente, o DNA não pode por si só provar a culpabilidade criminal de uma pessoa ou inocentá-la, mas pode estabelecer uma conexão entre essa pessoa e a cena do crime (CALABREZ; SALDANHA, 1997).

Atualmente, já aparecem sinais de reconhecimento, por parte do país, da eficiência das informações oferecidas nos exames de DNA e a conseqüente necessidade de torná-los acessíveis à população em geral (RUMJANEK; RINZLER, 2001).

Como exemplo, no Brasil, a Capital Federal já conta com a aprovação da Lei nº 1.097/96, que assegura a realização gratuita de exames de DNA nos processos de investigação de paternidade/maternidade, as pessoas de reconhecida necessidade (BRASIL, 2006) e no Estado de São Paulo pode-se citar o Projeto Caminho de Volta que trabalha com a tecnologia da biologia molecular na busca de crianças desaparecidas (GATTAS et al., 2005).

Além destes, há Projetos de Lei sobre o assunto, tais como: Projeto de Lei nº 6.610/02, do Deputado Ricardo Izar, que dispõe sobre a criação do Banco Estadual do DNA, com a finalidade exclusiva de realizar o registro inicial de identificação do recém-nascido; o Projeto de Lei n.º 3.377/00, do Deputado Aloízio Mercadante, que trata sobre a utilização e pesquisa do código genético; o Projeto de Lei n.º 3.078/00,

do Deputado Jorge Costa que dispõe sobre a coleta de amostras de materiais orgânicos para identificação individual pelo isolamento do DNA. Projeto de Lei n.º 4900/99, do Deputado Eduardo Jorge sobre a proteção contra a discriminação da pessoa em razão da informação genética e o Projeto de Lei n.º 188/99, do Deputado Alberto Fraga, que estabelece a identificação criminal genética para os indivíduos que cometerem crimes hediondos (BRASIL, 2006).

2.2.2 DNA - Aspectos estruturais e transmissão da informação genética

As informações genéticas estão armazenadas sob a forma de ácidos nucléicos. Estes, por sua vez, são polinucleotídeos, ou seja, macromoléculas formadas pelo encadeamento de unidades menores chamadas de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é constituído por três unidades básicas: uma base nitrogenada, uma molécula de açúcar (desoxirribose) e um grupamento fosfato (PO_4^-). Os nucleotídeos diferenciam-se pela sua base nitrogenada. A adenina e a guanina contêm dois anéis carbônicos, sendo chamadas de purinas; a citosina e a timina são conhecidas como pirimidinas (FARAH, 1997; WEEDEN; SWARNER, 1999; BUDOWLE; BROWN, 2001).

Toda a informação genética é armazenada na forma de seqüências de nucleotídeos que compõem o DNA, enquanto as funções celulares são desempenhadas pelas proteínas. O elo entre essas duas moléculas é o RNA mensageiro (mRNA), que é transcrito a partir do DNA e traduzido em seqüências de aminoácidos, que formam as proteínas (JOBLING; GILL, 2004).

Sendo assim, o DNA é responsável pelo armazenamento de toda a informação genética, estando localizado nos cromossomos do núcleo (DNA genômico) e nas mitocôndrias (DNA mitocondrial), podendo ser extraído de amostras de sangue, esfregaços bucais, saliva, osso, dente, tecidos, órgãos, fios de cabelo, sêmen, urina, entre outros materiais biológicos (STRACHAN; READ, 2002).

O DNA genômico é constantemente empregado nas aplicações forenses, sendo os dentes uma excelente fonte deste material, pois utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) é possível comparar a amostra obtida com conhecidas amostras *ante-mortem* ou com o DNA paterno/materno (PRETTY; SWEET, 2001; SWEET; HILDEBRAND; PHILLIPS, 1999).

É neste tipo de DNA onde estão localizados os genes, depositários das informações genéticas responsáveis pelas atividades da célula. Cada gene, por sua vez, faz parte de uma estrutura denominada cromossomo e encontra-se em locais específicos conhecidos como loci genético (ALBERTS et al., 1997). Formas alternativas de um gene são denominadas de alelo. Se um mesmo alelo estiver presente em ambos os cromossomos de um par, o indivíduo é homozigoto, se forem diferentes, heterozigoto (BYARD; JAMES; HEALH, 2006; SULLIVAN et al., 1993).

Os genes constituem apenas uma pequena fração de todo o DNA do genoma. Mesmo genes funcionais contêm regiões não codificantes (íntrons). Na verdade, boa parte do DNA não tem função conhecida. Os seguimentos cromossômicos mais usados na análise forense geralmente estão em regiões não funcionais (DUARTE et al., 2001).

Já o DNA mitocondrial é outro tipo de material que pode ser utilizado para identificar um corpo, sendo sua principal vantagem a existência de um alto número de cópias por célula (de centenas a milhares de organelas). Em casos onde a

amostra de DNA extraído é muito pequena ou degradada, tal como em tecidos esqueletizados, a probabilidade de obtenção de um perfil genético a partir do DNA mitocondrial é maior que em qualquer marcador encontrado no DNA genômico (SWEET; DIZZINO, 1996).

Silva e Passos (2002), afirmam que a análise do DNA mitocondrial para fins forenses fica reservada para tecidos antigos como ossos, cabelos e dentes nos quais o DNA nuclear já não oferece mais condições de análise.

Porém, por seu exame se dar pelo seqüenciamento direto de suas bases nitrogenadas, técnica mais complexa e dispendiosa, exigindo o emprego de tecnologia especializada e também pelo fato do DNA mitocondrial ser unicamente matrilineo, por isso, menos informativo, a análise deste não é usual a todos os laboratórios forenses, voltados à elucidação de crimes e à identificação de pessoas (VOGEL; MOTULSKY; MOTTA, 2000).

2.2.3 Estabelecimento da Identidade Genética

A identidade genética pelo DNA pode ser usada para demonstrar a culpabilidade de criminosos, exonerar inocentes, identificar corpos e restos humanos em desastres de massa, determinar paternidade, elucidar trocas de bebês, detectar substituições e erros de rotulação em laboratórios de patologia clínica, entre outros (BRETTELL et al., 2001).

Nos testes de determinação de identidade genética são estudadas regiões genômicas em que há variação entre pessoas normais. Essas regiões são chamadas de polimorfismos de DNA (PENA, 1993).

Um loco polimórfico existe quando duas ou mais seqüências variantes ocorrem em determinado sítio de um cromossomo (OTTO; OTTO; FROTA-PESSOA, 1998). Atualmente o método mais utilizado é o estudo de regiões repetitivas de DNA chamadas de minissatélites e microssatélites. A chave da diversidade nessas regiões é o número de repetições, que varia entre indivíduos e pode ser estudado com o emprego de sondas de DNA ou com a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (KUMAR; HEGDE, 2005).

Os minissatélites são formados por seqüências de vários nucleotídeos, por exemplo, (ATGCGAGCTACTGAGCC) n , repetidas em números diferentes em cada indivíduo, dando-lhe uma característica única. Um locus de minissatélite (VNTR) ou número variável de repetições consecutivas pode ter muitos alelos em função do número de vezes (n) em que esta estrutura é repetida ao longo do DNA, deixando a população polimórfica em relação ao locus (JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999). Suas repetições geralmente possuem de 10 a 64 pares de bases (STRACHAN; READ, 2002).

Já os loci de microssatélites (STRs) ou repetições curtas consecutivas se assemelham aos minissatélites, porém com estrutura repetida menor, como, por exemplo, na seqüência (GATA) n , onde as repetições são constituídas por 2 a 9 pares de bases (STRACHAN; READ, 2002).

De acordo com Jobim, Jobim e Brenner (1999) os melhores STRs utilizados na identificação humana são aqueles com maior polimorfismo (maior número de

alelos), menor tamanho (100 a 200 pares de bases), elevado índice de discriminação e heterozigose, e baixa frequência de mutações.

Além dos minissatélites e microssatélites existem dois grandes grupos de polimorfismos com base na substituição de nucleotídeos únicos (SNPs) e na inserção/deleção de um ou mais nucleotídeos (polimorfismos de inserção/deleção). Ambos apresentam a vantagem de poderem ser estudados em produtos de amplificação muito curtos (50 pb ou menos), apresentando distintas vantagens sobre os microssatélites no estudo do DNA extremamente degradado (como é o caso de cadáveres em estado muito avançado de decomposição ou carbonizados) (WEBER, 2002; OPEL et al., 2006).

Outras regiões que também podem ser utilizadas no contexto da análise forense, são as do DNA mitocondrial. Dentre os vários motivos que justificam o seu emprego têm-se: primeiro, esse DNA também contém regiões polimórficas que permitem sua individualização; segundo, os descendentes recebem esse DNA apenas da mãe, o que permite traçar a linhagem materna de uma pessoa; e terceiro, esse DNA é mais resistente à degradação que o DNA nuclear. Assim, em grandes desastres (incêndios, explosões, queda de aviões) quando é mais difícil identificar os corpos, analisa-se o DNA mitocondrial. Este é extraído dos restos mortais e a sequência de interesse é comparada com as obtidas de irmãos, ascendentes ou descendentes maternos (RUMKANER, RINZLER, 2001).

2.2.4 Etapas de análise forense do DNA.

A obtenção do perfil genético pelo DNA compreende as seguintes etapas: coleta dos materiais, extração, quantificação, amplificação e análise da região estudada (ALONSO; GENOFRE, 1999).

O sucesso na análise do DNA depende do tipo de amostra colhida e de como elas foram preservadas. Assim, a técnica empregada na coleta e documentação do vestígio, bem como sua quantidade e o modo como foi manuseado, embalado e preservado são alguns pontos críticos para este tipo de exame (BONACCORSO, 2005).

No tocante à extração, a escolha do método está relacionada ao tipo de material envolvido e influencia diretamente o sucesso da análise dos STRs (BUTLER, 2005). Tal fator também se aplica ao DNA extraído de materiais biológicos obtidos post-mortem (SWEET, 2001). Trata-se de um processo composto por três etapas distintas: ruptura ou lise celular (onde se pode utilizar diversas técnicas para rompimento das membranas celulares), desnaturação e inativação de proteínas (através do emprego de agentes quelantes e proteinases) e, finalmente, a própria extração do DNA (WALKER; RAPLEY, 1999).

Dentre as técnicas de extração mais utilizadas em Odontologia Legal estão: Método orgânico (composto de fenol-clorofórmio e utilizado para DNA de alto peso molecular); Chelex 100 (mais rápido e com menor risco de contaminação, porém o custo é mais elevado); FTA Paper (composto de papel absorvente de celulose com substâncias químicas, propiciando rapidez na utilização) (BUTLER, 2005); Álcool

isopropílico (a base de acetato de amônio e isopropanol, mais barato e alternativa para o método orgânico) (RIVERO et al., 2002).

A quantificação é um passo aplicado ao DNA extraído antes da reação de PCR, com o objetivo de assegurar uma diluição adequada para os extratos concentrados de DNA e eliminar aqueles que contenham apenas traços que falhariam na etapa de amplificação, salvando-se assim tempo e recursos. Obviamente, dos ensaios de quantificação também se obtém informações relevantes para escolha do tipo de marcador a ser utilizado na amplificação frente à concentração de DNA obtida (BONACCORSO, 2005).

Em relação à amplificação, para o estudo das seqüências de STRs ou VNTRs, a reação em cadeia pela polimerase (PCR), proposta por Saiki e cols., em 1985, têm sido a técnica de escolha (ANZAI et al., 2001).

O procedimento consiste na amplificação seletiva in vitro, de seqüências específicas do DNA que se pretende estudar, utilizando primers ou iniciadores, para que se inicie o processo de amplificação, sendo os mesmos específicos para cada locus analisado. Os demais reagentes são: o DNA alvo, magnésio, água, nucleotídeos sintéticos e a enzima Taq polimerase. Esses componentes são colocados em pequenos tubos de ensaio e submetidos a ciclos de temperatura no termociclador (FIGINI et al., 2003).

A partir daí, essa metodologia ocorre em três etapas: desnaturação ou “melting”, que consiste na separação da dupla fita de DNA, hibridização ou “annealing” que representa a ligação do iniciador ou “primer” ao DNA a ser amplificado e “extension” ou extensão, que é a amplificação propriamente dita (OZAKI, 1999).

A desnaturação ocorre quando a molécula de DNA é aquecida acima da temperatura de 90° C, na qual as pontes de hidrogênio da dupla hélice se rompem, ocorrendo a separação das cadeias complementares. Os iniciadores se ligam especificamente às seqüências de DNA complementares no processo de hibridização. A enzima termoestável denominada Taq DNA polimerase e os desoxirribonucleotídeos (dNTPs) iniciam a síntese de novas fitas de DNA. Com um novo aumento da temperatura, a enzima Taq DNA polimerase catalisa a reação, incorporando o nucleotídeo na posição terminal do iniciador, complementando as bases do DNA molde, promovendo assim o alongamento da fita (SANTOS et al., 2004).

Os seguimentos de DNA formados servem como molde para os ciclos subseqüentes, sendo por isso a PCR considerada como uma reação em cadeia. Todo o processo de amplificação é repetido por 25-40 ciclos, amplificando o segmento de DNA até o ponto necessário em que se tenha um número de cópias suficientes para análise (LIBÓRIO et al., 2005).

As vantagens da utilização da PCR na ciência forense são: a sua sensibilidade, pois é capaz de amplificar regiões a partir de quantidades ínfimas da seqüência-alvo de DNA e até mesmo do DNA de uma única célula; e sua robustez, permitindo a amplificação de seqüências específicas a partir de material biológico degradado (WALKER; RAPLEY, 1999).

Entretanto, devido a sua alta sensibilidade, a PCR é suscetível à contaminação, o que exige cuidados especiais no laboratório (WALSH, 2004).

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR são identificados após a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, sendo este último procedimento seguido da coloração com prata, ou detecção de sinal fluorescente. Neste caso, os

iniciadores da PCR são marcados com fluorocromos, possibilitando a análise por seqüenciador automático (KRENKE et al., 2002).

A eletroforese em gel de agarose, apesar de muito utilizada, não fornece resolução adequada para fragmentos muito pequenos (OZAKI, 1999). Ou seja, ao analisar regiões com pequena diferença de pares de bases, o gel de agarose não promove uma separação satisfatória dos alelos (MUKHERJEE; BIWAS, 2004).

2.2.5 Incorporação dos Estudos Genéticos à Odontologia Legal

Na prática forense, as estruturas dentárias têm sido priorizadas para análises genéticas porque a cavidade pulpar – arcabouço formado pelas paredes entre esmalte, dentina e cimento – pode propiciar um meio estável para o DNA. Frequentemente, esse uso se dá em concomitância aos métodos comparativos convencionais - médicos, odontológicos e antropológicos -, com o intuito de dar maior respaldo e confiabilidade aos processos de identificação (OLIVEIRA et al., 2002).

O ponto de partida para toda análise forense é uma boa extração e o manejo dos dentes, que apresenta algumas particularidades, como descrevem Smith et al. (1997). Entre as recomendações, os autores sugerem que se preserve a coroa para eventual confronto documental, propondo um corte horizontal na junção amelodentinária com remoção da polpa ou mesmo o aproveitamento de todo o remanescente dentário. Em estudo comparativo, Sweet e Hildebrand (1998)

constatarem haver ganho significativo na extração do DNA quando há pulverização dos dentes, com a utilização do nitrogênio líquido.

Dentre os casos registrados na literatura em que os dentes foram utilizados, destaca-se o relatado por Sweet e Sweet (1995). Trata-se de um caso de identificação em que uma vítima de homicídio foi incinerada, tendo o seu corpo reduzido a aproximadamente 25% do tamanho original, inviabilizando a realização do exame de DNA pelos métodos convencionais. No entanto, um dente não erupcionado (terceiro molar) fora preservado e possibilitou a extração do DNA da polpa dentária (1,35µg).

Na literatura, alguns trabalhos (MANNUCCI et al., 1995; NAKANISHI, MORIYA; HASHIMOTO, 2003) analisam a forma pela qual os fatores ambientais, como umidade e temperatura, afetam a qualidade e quantidade de DNA obtido a partir de amostras diversas.

Tsuchimochi et al. (2002), testaram a resina Chelex® 100 na extração de DNA da polpa dentária para posterior aplicação da PCR. Para isso, os dentes extraídos foram incinerados por 2 minutos nas temperaturas de 100°C, 200°C, 300°C, 400°C e 500°C. Todas as amostras até 300°C puderam ser amplificadas e classificadas, enquanto que acima de 400°C não foi produzido nenhum produto de PCR. Os autores concluíram que a extração de DNA utilizando esta resina, a partir da polpa dentária, é apropriada para a obtenção de uma amostra de DNA de qualidade superior, para amplificação por PCR.

Remualdo et al. (2005) avaliaram a amplificação por PCR do DNA obtido de dentes submetidos ao calor (200°C, 400°C, 500°C e 600°C) durante 60 minutos, testando três diferentes métodos de extração (orgânico, acetato de amônia/isopropanol e sílica). Utilizando o método orgânico para extração do DNA

genômico, 50% das amostras submetidas à queima foram amplificadas, porém apenas em temperaturas mais baixas (200°C e 400°C). Nas temperaturas mais elevadas (500°C e 600°C), o método de extração isopropanol/acetato de amônia conferiu melhores resultados, principalmente para extração de DNA mitocondrial.

Lund e Dissing (2004) avaliando a estabilidade do DNA extraído do sangue e de células bucais em diferentes condições de umidade (0, 50, 80 e 100%) e temperatura (35°, 45°, 55° e 65°) verificaram a presença de crescimento de microrganismos após incubação da amostra em temperatura de 35°C e com 100% de umidade, afirmando haver uma relação crescente entre degradação do DNA e umidade.

A influência do meio ambiente na concentração, integridade e recuperação do DNA, extraído de polpas dentárias, foi anteriormente mensurada por Schwartz et al. (1991). Os autores variaram o pH (3,7 e 10,0), a temperatura (4°C, 25°C, 37°C e incinerando o dente), a umidade (20, 66 e 98%), as condições do solo em que foi feita a inumação dos dentes (areia, terra de vaso, terra de jardim, submersão em água e enterrados ao relento), e os tempos de inumação (de uma semana a seis meses). Constataram que esses fatores não são determinantes para obtenção de DNA de alto peso molecular a partir de polpas dentárias.

Pfeiffer et al. (1999) armazenaram 44 dentes humanos no solo, 24 deles por 18 semanas e 20 por um ano. A extração do DNA foi realizada pelo método orgânico, a amplificação por PCR e os loci avaliados foram: TH01, vWA, FGA, HV1 e HV2. Os resultados evidenciaram a redução de 90% da concentração do DNA extraído após seis semanas de armazenamento.

Seguindo esta mesma linha de pesquisa, De Leo, Turrina e Marigo (2002) avaliaram o potencial de identificação humana através dos dentes submetidos a

condições ambientais comuns em casos forenses. Neste trabalho os autores buscaram estabelecer um protocolo que preservasse as características morfológicas dos dentes para investigação antropométrica e ao mesmo tempo, disponibilizasse o máximo de material para análise do DNA.

Cerri et al. (2004) expuseram dentes a condições úmidas, secas, substâncias químicas e carbonização para avaliar dois sistemas de amplificação do DNA, confirmando que, em condições extremas, é necessária uma análise mais sensível dos dados para obtenção de informações genéticas.

A fim de avaliar diferentes tecidos dentários como fontes de DNA em análises forenses, Malaver e Yunis (2003) realizaram um estudo, onde utilizaram 20 dentes obtidos de corpos não identificados, enterrados em 1995 e exumados em 2000, obtendo 45 amostras (5 de polpa, 20 de dentina e 20 de cemento). A polpa produziu os sinais mais fortes de amplificação por PCR, enquanto que os sinais da dentina e do cemento foram muito similares entre si.

Hanaoka et al. (1995) avaliaram a extração de DNA de 50 dentes (polpas e tecidos duros). O DNA obtido das polpas dentárias variou de 3 a 40µg, e não foi encontrado correlação entre o período de estocagem dos dentes e a quantidade de DNA. Os autores investigaram a eficiência da extração de DNA a partir de tecidos duros dentários em diferentes concentrações de solução descalcificante. O DNA obtido das polpas dentárias foi de alto peso molecular, sendo possível à análise por sondas multilocus ou por PCR; já o material obtido de tecidos duros só apresentou análise satisfatória pela PCR.

A identificação do sexo é um procedimento de grande importância nas análises forenses (SHADRACH et al., 2004; IKAWA et al., 2005; AKANE, 1998). Neste sentido, pesquisas mostraram que uma proteína encontrada no esmalte dental

e denominada amelogenina ou AMEL apresenta distinções entre os sexos quanto ao tamanho e ao padrão da sequência de nucleotídeos (LATTANZI et al., 2005; MOHAMMED; TAYEL, 2005). De fato, o gene que codifica a amelogenina feminina está localizado no cromossomo X, enquanto a amelogenina masculina é encontrada no cromossomo Y; as mulheres apresentam alelos homozigotos e genes idênticos, e os homens apresentam dois genes diferentes, alelos heterozigotos (AKANE, 1998).

Em análises forenses, a técnica da PCR permite a identificação do sexo do indivíduo que deixou vestígio biológico. Isto porque, o locus da amelogenina apresenta um alelo de 106 pares de bases nas mulheres e um de 106 e outro de 112 pares de bases nos homens, permitindo assim a distinção dos gêneros (FIGINI et al., 2003).

Sivagami, Rao e Varshev (2000), reportando a dificuldade de extrair DNA e tendo como substrato somente tecidos duros dentários, obtiveram sucesso no diagnóstico do sexo com o gene AMEL, utilizando nitrogênio líquido para pulverizar as estruturas dentárias.

Urbani, Lastrucci e Kramer (1999) investigaram a eficácia de utilização do DNA de polpas dentárias expostas a diferentes condições de temperatura, em variados períodos de tempo, para determinação do sexo. Os autores obtiveram 100% de amplificação do locus (amelogenina) através da PCR, confirmando a aplicabilidade do método no processo de identificação humana.

Alvarez et al. (1996) pesquisaram o efeito dos fatores ambientais na análise do DNA de polpas dentárias, por PCR, utilizando cinco locus, entre eles a amelogenina. Concluíram que, em geral, dentes imersos em água apresentaram pobres resultados, em comparação com aqueles enterrados no solo, na areia ou submetidos a altas temperaturas.

Chen, Sun e Wu (1994) testaram a influência dos fatores ambientais na determinação do sexo, obtendo o DNA de dentes humanos e amplificando por PCR. Os autores variaram o pH (2, 7, 10), a temperatura (-20, 4, 27, 37° C), a umidade (20, 66% e imersão) e também submeteram os dentes a soluções contendo 10% de formol, 75% de etanol e ao ar livre. Os resultados obtidos, através da visualização em gel de agarose, confirmaram o potencial de análise do sexo através dos dentes, exceto naqueles deixados ao ar livre, imersos em água, embebidos em solução de pH igual a 2 e incinerados por 10 minutos, nos quais as bandas de DNA não foram verificadas.

Yoshida et al. (2005) avaliaram o potencial de investigação do sexo, de amostras frescas e antigas (dentes e ossos) através do DNA, utilizando como locus a amelogenina e os marcadores DYZ-1, DYZ-3 e DXZ-1. Neste trabalho verificaram que a determinação do sexo em dentes frescos pode ser feita com sucesso utilizando qualquer marcador dos cromossomos sexuais. Entretanto, em amostras submetidas a condições ambientais por muito tempo ou em estágio avançado de decomposição é necessária a associação de dois ou mais marcadores moleculares para obter um resultado mais preciso.

Na tentativa de facilitar o processo de identificação humana, através da diminuição dos passos operatórios, Collins et al. (2004) desenvolveram um kit multiplex AmpFISTR para PCR contendo quinze locus de STRs e a amelogenina para determinação do gênero, tornando a análise do DNA mais simples e rápida, diminuindo assim a probabilidade de ocorrência de erros na técnica e contaminação.

Góes et al. (2004) empregaram o kit Powerplex® 16 System, para estudar os polimorfismos genéticos presentes na população da cidade do Rio de Janeiro, através da análise das seguintes regiões: Penta E, D18S51, D21S11, TH01,

D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Amelogenina, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 and D5S818. Os resultados demonstraram que o Penta E e o D18S51 são os melhores loci de polimorfismos. O mesmo foi feito por Opel et al. (2006) e Wei, Zhao e Shengbin (2006) para avaliação de DNA degradado proveniente de restos de esqueletos humanos.

Ainda sobre a identificação do sexo pela amelogenina, observa-se a utilização freqüente desta região nos relatos de casos sobre acidente de massa. Este, segundo a Organização Panamericana de Saúde (2006) é definido como um evento que resulta em um elevado número de vítimas, causando alteração no curso normal dos serviços de emergência e de atenção à saúde.

De acordo com Pueyo, Roldangarrido e Sanchez (1994) as características mais comuns decorrentes do desastre de massa são:

1. Grande repercussão social: isto significa um grande número de voluntários, intenso trabalho dos meios de comunicação, comoção e envolvimento emocional da coletividade.
2. Grande destruição com traumatismos em pessoas e residências ou apartamentos.
3. Dificuldades ou até impossibilidade de identificação, principalmente quando as vítimas são de diferentes nacionalidades.
4. Ações de saques e furtos de pertences e objetos pessoais das vítimas por indivíduos próximos ao desastre.
5. Intervenção de múltiplas instituições governamentais e sociais: Polícia, Forças Armadas, Defesa Civil, Cruz Vermelha, Peritos do IML, Aviação Civil, Corpo de Bombeiros.

Pretty, Webb e Sweet (2001) afirmaram que os desastres de massa representam um desafio para a equipe de identificação odonto-legal que frequentemente é chamada para trabalhar na identificação de vítimas, através do estudo dos arcos dentários. Segundo os autores, o sucesso deste difícil trabalho está alicerçado na preparação prévia e nos treinamentos da equipe de odontologistas. Atenção especial deve ser dispensada também aos aspectos emocionais e psicológicos que envolvem toda equipe.

Clayton, Whitaker e Maguire (1995) descreveram o trabalho realizado na identificação de vítimas de uma explosão ocorrida em 19 de abril de 1993, no Texas. Dos 61 corpos, 21 foram identificados através das características dentárias, dactiloscopia e do uso de radiografias. Para as demais vítimas, utilizou-se um programa de DNA que analisava quatro STRs e a amelogenina para investigação do sexo.

Brkic et al. (2000) relataram os resultados e métodos de identificação empregados em 1000 vítimas de uma guerra ocorrida na Croácia, em julho de 1998. Cerca de 824 vítimas foram identificadas positivamente. Dentre as metodologias empregadas, o exame dos arcos dentários em combinação com parâmetros antropológicos (idade, sexo e altura), características individuais (tatuagens, roupas, jóias) e perfil de DNA foram responsáveis pela identificação de 64% dos corpos.

Hsu et al. (1999) trabalharam no processo de identificação de indivíduos soterrados em função de um acidente aéreo, em fevereiro de 1998, em Taiwan. Das 202 vítimas, 19 foram identificadas utilizando informações contidas nas fichas médicas e odontológicas, impressão digital ou fotografias; enquanto nos 183 restantes a identificação ocorreu pelo DNA.

O ataque às torres gêmeas em 11 de setembro de 2001 tem sido bastante descrito na literatura (HOLLAND et al., 2003; BRENNER; WEIR, 2003). Em geral, os trabalhos estimam a ocorrência de cerca de 2.782 vítimas no desastre, das quais 1.524 foram identificadas, 785 delas pelo DNA e 219 pelos arcos dentários ou dactiloscopia (BUDIMLIJA et al., 2003).

No atentado de 11 de março de 2004 em Madri o processo de identificação das vítimas (192 mortos e 2.050 feridos) se deu através da dactiloscopia (146 / 76%), odontologia (4 / 2%), antropologia (10 / 5%) e do DNA (32 / 17%). Entretanto, isto não significa que exista sobreposição de um método em relação ao outro, pois a escolha da técnica a ser utilizada no processo de identificação está diretamente associada ao tipo de agente lesivo empregado (BOADAS, 2005).

Alonso et al. (2005) descreveram os esforços da equipe forense na identificação de vítimas do Tsunami, acidente este ocorrido em dezembro de 2004 e responsável pelo óbito de mais de 200.000 vítimas. Os autores reforçam ainda a importância da atuação de uma equipe multidisciplinar nestes casos, composta por antropologistas, médicos, cirurgiões-dentistas, radiologistas e especialistas em dactiloscopia e genética forense.

Recentemente, no Brasil, a queda do voo 1907 da Gol resultou na morte de 154 pessoas. Estima-se que a papiloscopia tenha atuado na identificação de 107 passageiros, seguida da Odontologia Legal (11) e do DNA (11). As demais vítimas foram identificadas através da associação de técnicas (25) (WANDERLEY, 2006).

Além da identificação humana, outro objeto de estudo da Odontologia Legal relacionado à biologia molecular, é a análise da marca de mordida (MARQUES et al., 2005). Em casos de violência física, como abuso sexual, assassinatos, abuso infantil, freqüentemente são encontradas marcas de mordida na pele.

A saliva do agressor comumente é depositada na pele da vítima durante a mordida, o beijo ou a sucção. Segundo Sweet (2000) é possível, por meio das células presentes na saliva, identificar o grupo sanguíneo do agressor pelo sistema ABO em 80 a 85% dos casos. Dessas células, pode-se também isolar o DNA para proceder à identificação do criminoso.

Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas no sentido de otimizar metodologias de extração de DNA da saliva depositada na pele, para que este material possa ser utilizado como fonte de prova em casos forenses. Entre elas tem-se o duplo esfregaço, onde no trabalho de Anzai et al. (2005) foi possível estabelecer o perfil do DNA em quatro de cinco amostras testadas, compostas por 250µL de saliva depositada na pele.

Sweet et al. (1996) compararam os resultados de extração de DNA de amostras de saliva depositadas na pele humana na simulação de marcas de mordidas a partir dos métodos: orgânico, chelex clássico e chelex modificado, sendo este último mais eficaz que os outros, mas todos com possibilidade de aplicação.

Além da coleta de células no próprio corpo humano, é possível a obtenção das mesmas em objetos que tiveram contato com o corpo, os chamados artefatos (PARDINI et al., 2001). O DNA pode ser obtido em quantidade suficiente para se realizar exames de identificação humana em gomas de mascar, cigarros, marcas de mordida em alimentos, escovas de dente, entre outros (FRÉGEUA; GERMAIN; FOURNEY, 2000; SWEET; HILDEBRAND, 1998).

Koh et al. (2004) descreveram que a saliva é uma ótima fonte de DNA, pois por ser coletada de maneira indolor e não-invasiva e utilizada mesmo quando armazenada em condições referidas como não ideais (-70°C, por tempo superior à 1 mês), conforme avaliado em seu estudo.

Quando comparados os métodos de coleta da saliva, Sweet et al. (1997) demonstraram que há diferença significativa entre a capacidade de recuperação do DNA por três diferentes técnicas: filtro de papel (17,4%), técnica do swab único (35,3%) e técnica do duplo swab (44,6%). Esses autores simularam situações de marcas de mordida em duas séries experimentais: três amostras de 40µL de saliva foram depositadas sobre a pele de 27 cadáveres (em 33 locais diferentes) e três amostras de 100µL de saliva foram depositados sobre a pele de cinco cadáveres (em 12 locais diferentes). A saliva foi coletada pela técnica do duplo swab em tempos de 5 minutos, 24 e 48 horas, sendo comprovado um decréscimo na concentração nas primeiras 24 horas e estabilidade entre 24 e 48 horas, mostrando sucesso na amplificação, independente do tempo após o depósito da saliva. Também não foi encontrado nenhum caso de contaminação.

Smith et al. (1997) afirmaram em seu trabalho que a saliva, em contato com a pele intacta, se mantém em condições estáveis e pode ser recuperada, por pelo menos 60 horas, após a sua deposição.

Em outro estudo, Sweet e Shutler (1999) utilizaram a análise de DNA por PCR em uma marca de mordida localizada em um corpo que esteve submerso em um rio por quase 6 horas, até a sua descoberta. Verificou-se que independente da condição em que o corpo foi conservado, foi recuperado DNA suficiente da área da mordida, o que possibilitou a obtenção do genótipo do agressor.

Porém, nem sempre será possível recuperar DNA a partir de uma marca de mordida, uma vez que a mesma estará sujeita a uma série de modificações, tais como contaminação, degradação e putrefação, dependendo das circunstâncias (SWEET et al., 1997).

2.3 Identificação de Vítimas de Afogamento

Os acidentes e a violência, definidos por Blank (2002) como causas externas de lesões e envenenamentos, têm sido relatados frequentemente como responsáveis pelo aumento constante de atendimentos e internações no Brasil. Segundo Martins e Andrade (2005), os mesmos resultam em alta demanda aos serviços de saúde e em sofrimento para as vítimas e seus familiares, além de elevados custos diretos e indiretos e de seqüelas, que comprometem a qualidade de vida dos que sofreram esses eventos.

No Brasil, a partir da década de 70, diversos estudos têm descrito a magnitude das mortes violentas nos centros urbanos, com destaque para homicídios e acidentes de veículos (MELLO; GAERYSZEWski; LATORRE, 1997). As causas externas ocupam o segundo lugar nas estatísticas brasileiras de mortalidade, sendo ultrapassadas apenas pelas doenças do aparelho circulatório (SOUZA, 1994).

Mello (1979) estudou a mortalidade por causas violentas no município de São Paulo, verificando que, em crianças de 0 a 4 anos, a principal causa de óbito foi a queda, seguida pelo atropelamento. Já em faixas etárias maiores, até 14 anos prevaleceram o atropelamento e o afogamento.

No Estado da Bahia, particularmente na capital, Salvador, também se observou um crescimento da mortalidade proporcional por causas externas a partir da segunda metade da década de 80, quando a taxa de mortalidade passou de 62,1 por 100.000 habitantes para 64,9 em apenas 10 anos, níveis considerados muito elevados em relação ao país como um todo (PAIM et al., 1999). No tocante aos tipos específicos de mortes violentas ocorridas em 1985, em indivíduos de 0 a 19 anos,

destacam-se: envenenamento acidental e outros acidentes de efeitos tardios (45%), afogamento/submersão (19%), acidentes de veículos (17%), aspiração de alimentos, objetos e outros (8%), acidentes com fogo e chamas (5%) e homicídios (4%) (POSSAS, 1989).

Em se tratando de casos de afogamento, em particular, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 450.000 pessoas morram anualmente em todo o mundo, constituindo em frequência a terceira causa de todas as mortes acidentais (60% dos indivíduos com idade inferior a 20 anos) e a quarta causa de morte na faixa etária entre os 5 e 14 anos de idade (BIERENS; KNAPE; GELISSEN, 2002).

Em 1998, constatou-se que no Brasil aconteceram quase 1,3 milhões de casos de afogamento e aproximadamente oito mil vítimas chegaram ao óbito, sendo 35% destes provenientes de imersão na água salgada (SZPILMAN; ORLOWSKI, 2001).

De acordo com registros do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) ocorreram cerca de 57.595 casos de óbitos por afogamento e submersões acidentais entre os anos de 1996 e 2004, o que equivale a 0,67% do total de mortes ocorridas no país durante esses 8 anos.

Desta forma, estudos epidemiológicos revelam que o afogamento configura situação de perigo para a vida humana, principalmente para crianças e jovens em torno de 0 a 14 anos, fato que confirma a necessidade de se pensar em mecanismos que possibilitem minimizar seus efeitos (STEINMAN et al., 2000).

Este tipo de óbito foi definido por Baptista et al. (2003) como sendo um tipo de asfixia mecânica produzida pela penetração de um meio líquido ou semi-líquido nas vias respiratórias, impedindo a passagem de ar até os pulmões.

Segundo França (2004), a etiologia do afogamento pode ser acidental (decorrente de morte por causas fortuitas e não previsíveis), homicida (morte de um indivíduo em mãos de outro, de forma dolosa, culposa ou intencional) ou suicida (morte de um indivíduo pelas lesões que se auto-inflige com o objetivo de por fim a própria vida), sendo esses dois últimos menos freqüentes.

No Brasil um acidente importante que resultou na morte de 55 pessoas foi o naufrágio do barco Bateau Mouche IV no réveillon de 1988. O fato ocorreu próximo à praia de Copacabana no Rio de Janeiro, em função do excesso de passageiros a bordo (DURÃO, 2006). Outro exemplo de naufrágio bastante relatado na literatura mundial foi o do Titanic, ocorrido em 15 de abril de 1912, provocando a morte de 1502 passageiros (SARNOFF, 2006).

Ainda sobre essa casuística, trabalhos (MANNUCCI et al., 1995; LAU; TAN; TAN, 2005) relatam o uso do DNA na identificação de vítimas cujo corpo foi encontrado na água, ressaltando a importância da técnica no processo de identificação.

Rabl, Ambach e Tributsch (1991), após investigações forenses e criminais, relataram um caso de identificação humana, pelo DNA, de um casal encontrado em um lago, dentro de um carro, em 1989, após 50 anos de imersão na água.

Doyle e Bolster (1992) relataram em junho de 1985, a queda de uma aeronave (Air Índia AI-182) que voava de Toronto para Bombay e caiu no mar. Havia 329 passageiros a bordo. Destes, apenas 132 foram recuperados, o que equivale a 39,8% das vítimas. Só não foi possível a identificação de uma das vítimas. Trabalharam no processo de identificação 4 médicos legistas, 7 patologistas forenses e 4 odonto-legistas.

Em setembro de 1993 ocorreu uma forte tempestade em Gênova e 4 pessoas desapareceram, incluindo um casal de idosos. Quatro dias depois, parte de um corpo foi encontrado junto à costa. Após dois meses o outro corpo foi localizado, sendo o processo de identificação de ambos feito através do DNA (MANNUCCI et al., 1995).

Missliwetz e Stellwag (1995) relataram seis casos de crime premeditado resultantes de morte por afogamento.

Da mesma forma, Lunetta (2002) avaliou a *causa mortis* de 1590 indivíduos cujos corpos foram encontrados na água e encaminhados para necropsia no Departamento de Medicina Forense da Universidade de Helsinki, entre os anos de 1976 a 1998. A identificação se deu através do exame das características individuais das vítimas e avaliação das circunstâncias e alterações patológicas nas quais o corpo foi encontrado, reforçando a importância do desenvolvimento de métodos auxiliares ao diagnóstico no processo de identificação de vítimas de afogamento.

Lucas, Goldfeder e Gill (2002) analisaram a *causa mortis* dos sobreviventes de enchentes na cidade de Nova York entre os anos de 1997-2000, através de um levantamento epidemiológico. Os autores observaram que neste período ocorreram 123 mortes: 52 por suicídios, 50 por causas indeterminadas, 16 por acidentes e 5 por homicídios. Entretanto, 97 delas se deram por afogamento.

Davis (1989) ressalta que a determinação da *causa mortis* de vítimas de afogamento requer um cuidadoso trabalho de investigação por parte de policiais e patologistas através da correlação entre a data, circunstâncias em que os corpos foram encontrados e achados durante a necropsia e exames laboratoriais.

Tal fato pôde ser comprovado após o Tsunami no Oceano Índico em 26 de dezembro de 2004, onde foram aplicadas as mais variadas técnicas a fim de se

obter a identificação de milhares de vítimas, tais como patologia forense, odontologia legal, perfil de DNA e impressões digitais (LAU; TAN; TAN, 2005).

O mesmo foi aplicado na identificação das vítimas, do “Katrina”, em Nova Orleans e do “Rita”, no Texas reforçando a necessidade de domínio de técnicas de extração do DNA no processo de identificação de corpos esqueletizados ou em estado de decomposição avançado que estiveram sob influência de ambiente aquoso (SHAFER, 2005).

3 PROPOSIÇÃO

- Conhecer a casuística de situações que envolvam casos de afogamento, através dos registros existentes no Instituto Médico Legal Nina Rodrigues na cidade de Salvador-BA;
- Verificar o potencial de recuperação do DNA a partir de dentes imersos em diferentes condições aquosas (água doce e salgada), por um mês.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Material descartável

- Sacos e potes plásticos para coleta, acondicionamento e imersão dos dentes;
- Parafilm (Sigma-Aldrich®);
- Tubos de polipropileno com tampa de 0,2; 0,5; 1,5mL (Biologix Research Company®);
- Ponteiros de 0,5 a 10, 10 a 200 e 100 a 1000µL (Uniscience®);
- Cartões MGM®;
- Swab (Sterile Foam Tips-FTA®);
- Disco de carborundum e mandril para baixa rotação.

4.1.2 Equipamentos

- Freezer -20°C vertical (Eletrolux®);

- Pipetador de 0,5 a 10, 10 a 200 (Labmate®) e 100 a 1000µL (Tomos®);
- Centrífuga (Celm®);
- Termociclador - modelo GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems®);
- Aparelho para banho-maria (Quimis®);
- Fonte de eletroforese-EPS200 (GE Healthcare®);
- Cuba de eletroforese vertical V16-2 (Life Technologies®) e horizontal Horizon 58 (Whatman Biometra®);
- Balança eletrônica de precisão BA-AL500 (Marte®) e estufa de secagem (Soc Fabbe Ltda®);
- Vórtex (Quimis®);
- Fluxo;
- Micro Punch de 1.2mm (Whatman®);
- Grau e pistilo de porcelana (RCLAB®);
- Agitador orbital TE420 (Tecnal®);
- pHmetro (Oakton®);
- Sistema de foto-documentação digital Multimage Light Cabinet e software Chemilmager 4400 ver. 5.5 (Alpha Innotech Corporation®);
- Impressora digital CP700D (Mitsubishi®);
- Seqüenciador automático ABI PRISM 377 e software GeneScan ver. 2.1 (Applied Biosystems®).

4.1.3 Reagentes

- Nitrogênio líquido;
- Tris ultra puro, EDTA (ácido etileno diamino tetracético), NaCL (cloreto de sódio), SDS (dodecil sulfato de sódio) (SIGMA®);
- Proteinase K 20mg/mL, padrão de 100 e 1000 pares de bases (Invitrogen®);
- Cloreto de cálcio, acetato de sódio, etanol 70% e 100%, acrilamida, ágar, ácido clorídrico, bis-acrilamida, ácido acético, nitrato de prata, hidróxido de sódio (Merck®);
- Fenol, persulfato de amônio (USB Corporation®);
- Clorofórmio P.A. (Dinâmica®);
- Álcool isoamílico, agarose, TEMED (N, N, N', N'-teramethylethylenediamine (Gibco BRL®);
- Iniciador AMEL, tampão para PCR, dNTPs, Taq DNA polimerase, DNA extraído presente no Kit geneprint® STR multiplex CSF1PO-TPOX-TH01, kit Powerplex 16 system, uréia (Promega®);
- Ácido bórico (LGCBio®);
- Formaldeído (Chemetrics®);
- Glicerol (Synth®);
- Brometo de etídio (DynaL Biotech®);
- Loading (Amersham Pharmacia Biotech®);
- Kit FTA (Whatman®);

- Long ranger gel solution (Cambrex®).

4.2 Métodos

Inicialmente este trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sendo aprovado por meio do protocolo de nº.180/05 (Anexo A).

Em seguida, realizou-se um levantamento epidemiológico nos registros do Instituto Médico-legal Nina Rodrigues na cidade de Salvador-Bahia, do número de óbitos por afogamento entre os anos de 2003 e 2005. Nesse momento, informações como sexo, idade, tipo de água ao qual o corpo foi submetido (doce ou salgada) e a existência ou não de contribuição da Odontologia Legal na identificação dessas vítimas também foram coletados.

Posteriormente, procedeu-se a fase laboratorial da pesquisa. Esta, por sua vez, foi dividida em duas etapas.

4.2.1 Etapa I

4.2.1.1 coleta das amostras

A amostra foi composta por quarenta unidades dentárias obtidas de 20 indivíduos, mediante consentimento livre e esclarecido dos mesmos (Apêndice A), sendo a indicação da exodontia feita por motivos ortodônticos ou problemas periodontais e realizada por outros profissionais, não envolvidos com a presente pesquisa.

De cada participante coletou-se células da mucosa oral, em cartões MGM®, com um swab (Sterile Foam Tips-FTA®) e dois dentes, independente do grupo a que pertenciam (molares, pré-molares, incisivos e caninos) ou do estado encontrado (presença de cáries, restaurações – Apêndice B). As células da mucosa oral foram empregadas para controle da amostra, enquanto os dentes foram utilizados para fins de identificação humana.

4.2.1.2 preparo das amostras

Os cartões MGM® foram mantidos à temperatura ambiente até o momento da extração do DNA.

Em relação aos dentes, após cirurgia dos mesmos, eles foram imediatamente submetidos a um processo de limpeza físico-química, através da realização de raspagens com curetas periodontais e lavagem com álcool 70%. Passada esta etapa, os mesmos foram acondicionados em sacos plásticos, identificados e armazenados à -20°C.

Dos dois elementos dentários obtidos de cada indivíduo um foi submetido à imersão em água doce e o outro em água salgada por um mês, utilizando para isto

recipientes plásticos, devidamente esterilizados. A escolha do período de tempo de imersão foi feita pautando-se no trabalho de Schwartz et al. (1991).

Em seguida, seccionou-se a porção coronária do elemento dentário com o uso de um disco de carborundum esterilizado e trocado para cada unidade. Apenas a porção radicular foi utilizada para pulverização devido à dificuldade técnica da realização manual deste procedimento, utilizando como referência Gaytemeen e Sweet (2003).

A pulverização foi realizada segundo o método de Sweet e Hildebrand (1998), adaptado com o uso de um grau e pistilo de porcelana e estocagens manuais. Para pulverização dos dentes foram necessárias de 3 a 4 imersões em nitrogênio líquido mantendo as batidas do pistilo constantes. O rendimento médio de pó de dente alcançado variou de acordo com o tipo de dente pulverizado (Apêndice C).

4.2.1.3 extração do DNA

A extração do DNA das células armazenadas nos cartões foi realizada a partir de fragmentos destes. Para isso foram retirados três discos de 1,2mm dos cartões MGM®, com auxílio de um Micro Punch de 1.2mm (Whatman®), os quais foram colocados em microtubos de 0,2mL. Esse material foi submetido a lavagens sucessivas no FTA Reagent e em TE, como mostra o protocolo do fabricante do kit FTA (Whatman®) (Anexo B).

Nos dentes, adotou-se o método orgânico (Anexo C) descrito por Hochmeister, Rudim e Ambach (1998). Após a extração, realizou-se corrida

eletroforética em gel de agarose 1% (Anexo D), juntamente com um marcador de tamanho molecular de 100 pares de base. A separação eletroforética foi realizada a 100V e 60mA durante 40 minutos. Após a corrida, os géis foram corados com uma solução de brometo de etídio por 20 minutos e, em seguida, digitalizados utilizando o sistema de visualização de imagens Multimage Light Cabinet e o software Chemilmager 4.400, versão 5.5. Este procedimento foi realizado com o objetivo de verificar a presença ou não do material genético (gel de integridade).

4.2.1.4 amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

A região escolhida para amplificação pela técnica da PCR foi a amelogenina (Quadro 4.1), pelo fato da mesma ter sido relatada frequentemente na literatura para distinção do sexo entre os indivíduos, procedimento este importante na prática forense (MOHAMMED; TAYEL, 2005; IKAWA et al., 2005).

Lócus	Sequência do iniciador
Amelogenina	Sense: ACCTCATCCTgggCACCTgg (21BP) Anti-sense: AggCTTgAggCCAACCATCAg (21BP)

Quadro 4.1 - Iniciador utilizado para amplificação (amelogenina)

Vale ressaltar que apesar da amelogenina representar uma região funcional do DNA (gene), ela foi utilizada exclusivamente com fins de identificação humana

para estimativa do sexo, não sendo observado, durante o desenvolvimento da pesquisa, nenhum outro tipo de característica dos indivíduos envolvidos.

Para controle positivo da PCR empregou-se amostra de DNA extraído presente no kit geneprint® STR multiplex CSF1PO-TPOX-TH01, após ter sido comprovada a sua efetividade.

Os tipos, quantidades dos reagentes e a ciclagem utilizada encontram-se descritos nas tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1 – Tipos e quantidades de reagentes utilizados na PCR (amelogenina)

Reagentes	FTA¹	Dente	Controle positivo da PCR
Água	17,875µL	7,875µL	16,875µL
Tampão	5,0µL	5,0µL	5,0µL
dNTPs	0,5µL	0,5µL	0,5µL
Primer	1,5µL	1,5µL	1,5µL
DNA polimerase	0,125µL	0,125µL	0,125µL
DNA molde	----x----	10, 0µL	1,0µL
Volume total	25,0µL	25,0µL	25,0µL

¹ A quantidade de reagentes empregada para controle negativo da PCR foi a mesma utilizada nas amostras de saliva

Tabela 4.2 – Ciclagem padrão preconizada pelo fabricante do iniciador (amelogenina)

Programa	Temperatura	Tempo (min)	Ciclos
Desnaturação inicial	96°	2	
Desnaturação	94°	1	} 10
Hibridização	64°	1	
Extensão	72°	1,5	
Desnaturação	90°	1,0	} 20
Hibridização	64°	1,0	
Extensão	72°	1,5	
Extensão final	72°	10	
Resfriamento	4°	∞	

Os produtos da amplificação foram mantidos a -20°C até o momento da corrida eletroforética.

4.2.1.5 eletroforese

Os produtos de PCR foram analisados inicialmente em gel de agarose na concentração de 1,5% (Anexo E) em tampão TBE, utilizando um marcador de tamanho molecular de 100 pares de base. A separação eletroforética foi realizada a 100V e 60mA durante 40 minutos. Após a corrida, os géis foram corados com uma solução de brometo de etídio por 20 minutos e, em seguida, digitalizados utilizando o

sistema de visualização de imagens Multimage Light Cabinet e o software Chemilmager 4.400, versão 5.5.

Posteriormente, as amostras que amplificaram no gel de agarose foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corados com prata (Anexo F e G). Este procedimento foi adotado pela impossibilidade de distinção do sexo no gel de agarose, em função da pequena diferença de pares de bases existentes entre homens e mulheres, quando se utiliza como região a amelogenina.

4.2.2 Etapa II

Neste momento, amostras de DNA extraídas de dentes de 10 participantes foram escolhidas de acordo com a intensidade das bandas no gel de agarose (ausência de banda, banda forte, intermediária e fraca) para realização de PCR utilizando o kit PowerPlex® 16 System. Este kit permite a amplificação de 15 STRs (Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 e D5S818) e da amelogenina, sendo essas regiões do DNA comumente utilizadas para identificação humana.

Juntamente com o processamento dessas amostras, optou-se por fazer também a tipagem genética da pesquisadora, com o objetivo de tentar verificar, posteriormente, a ausência ou presença de contaminação, o que pode resultar numa incorreta interpretação dos resultados. Trata-se de um procedimento recomendado pela INTERPOL (2001) a todas as pessoas que participam da custódia de amostras para exames de DNA, o que envolve desde a coleta, acondicionamento, transporte e conservação das amostras até a realização do exame.

No quadro 4.2 são apresentadas informações a respeito da localização e da sequência repetitiva de todas as regiões presentes no kit. Na figura 4.1 estão representados todos os alelos das regiões disponíveis no kit.

Lócus	Localização	Sequência Repetitiva (5'-3')
Penta E	15q	AAAGA
D18S51	18q21.3	AGAA
D21S11	21q11-21q21	TCTA
TH01	11p15.5	AATG
D3S1358	3p	TCTA
FGA	4q28	TTTC
TPOX	2p21	AATG
D8S1179	8q	TCTA
vWA	12p12	TCTA
Amelogenin	Xp22.1-22.3 e Y	NA
Penta D	21q	AAAGA
CSF1PO	5q33.3-34	AGAT
D16S539	16q24	GATA
D7S820	7q11.21-22	GATA
D13S317	13q22-q31	TATC
D5S818	5q23.3-32	AGAT

q: braço longo do cromossomo; p: braço curto do cromossomo

Quadro 4.2 - Localização e composição da sequência repetitiva dos lócus que compõem o Powerplex® 16 System

Figura 4.1 - Escada alélica do Powerplex®16 System. A. alelos marcados com fluoresceína. B. alelos marcados com JOE. C. alelos marcados com TMR

Os tipos, quantidades de reagentes e a ciclagem utilizada encontram-se nas tabelas 4.3 e 4.4.

Tabela 4.3 – Tipos e quantidades de reagentes utilizados na PCR (Powerplex®)

Reagentes	Volume por amostra (µL)
Água	16,7
Tampão	2,5
Primer	2,5
DNA polimerase	0,8
DNA molde	2,5
Volume total	25,0

Tabela 4.4 – Ciclagem padrão preconizada pelo fabricante do iniciador (Powerplex®)

Programa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°	11 min	
	96°	1 min	
Desnaturação	94°	30 s	} 10
Hibridização	60°	68 s	
Extensão	70°	50	
Desnaturação	90°	1,0	} 20
Hibridização	58°	1,0	
Extensão	70°	1,5	
Extensão final	60°	30	
Resfriamento	4°	∞	

4.2.2.1 eletroforese ABI 377

Os produtos da amplificação foram mantidos a -20°C até o momento da corrida eletroforética.

Antes da aplicação das amostras amplificadas no gel foi feito o preparo dos reagentes de pós-amplificação do kit PowerPlex® 16 System. Para isso, foram adicionados ao produto da PCR o Internal Lane Standard (ILS) 600 (um padrão de peso molecular até 600pb) e o Blue Dextran Loading Solution (um tampão contendo formamida, um desnaturante de DNA) na seguinte proporção: 1.0µL do produto da PCR, com 1.0µL do PowerPlex X Allelic Ladder Mix, 0.5µL de ILS 600 e 1.5µL de Blue Dextran Loading Solution.

O produto da amplificação foi submetido à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida desnaturante a 6%, no seqüenciador ABI377 para obtenção dos perfis de cada locus.

Para a preparação do gel foram misturados em um agitador magnético por 10 minutos os seguintes reagentes: 26mL de água destilada; 18g de uréia a qual apresenta ação desnaturante; 5mL de Long Ranger Gel Solution, que determina as dimensões dos orifícios do gel por onde os fragmentos de DNA irão migrar.

Em seguida, foi adicionado 5mL de TBE (10X), um tampão de corrida que proporciona a passagem da corrente pelo gel e foi feita a deaeração da mistura por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 250µL de persulfato de amônio 10%, o promotor da polimerização do gel e 35µL de TEMED, que age como catalisador da reação de polimerização.

A análise dos alelos amplificados foi realizada com a utilização do software GeneScan ver. 2.1.

5 RESULTADOS

No levantamento, verificou-se nos registros referentes ao total de óbitos ocorridos entre os anos de 2003 e 2005 uma prevalência de 2,7% de mortes resultantes de afogamento (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 - Distribuição percentual de óbitos por afogamento, Salvador, 2003 à 2005

Ao comparar numericamente todos os óbitos registrados no IML e aqueles provenientes de casos de afogamento, observou-se uma baixa prevalência desse último, com declínio gradativo no decorrer dos anos (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 - Distribuição numérica do número de óbitos segundo o ano, Salvador, 2003 à 2005

Os dados revelaram ainda uma ocorrência maior de óbitos em indivíduos do sexo masculino, sendo essa distribuição mantida, não só ao longo dos três anos, mas também nos casos de afogamento (Gráficos 5.3 e 5.4).

Gráfico 5.3 - Distribuição percentual de óbitos segundo o sexo, Salvador, 2003 à 2005

Gráfico 5.4 - Distribuição percentual das vítimas de afogamento segundo o sexo, Salvador, 2003 à 2005

Em relação à idade, a maioria dos óbitos por afogamento ocorreu em adultos jovens (37,94%) e de meia idade (21,77%), seguido de adolescentes (17,64%), crianças (15%) e idosos (1,76%). Vale ressaltar que 5,89% dos laudos não mencionavam a idade da vítima (Gráfico 5.5).

Gráfico 5.5 - Distribuição percentual das vítimas de afogamento segundo a faixa etária, Salvador, 2003 à 2005

Ainda sobre a faixa etária, a classificação adotada neste trabalho baseou-se no preconizado pelo estatuto da criança e do adolescente (BRASIL, 1990) e na pesquisa feita por Reis e Fradique (2003).

Em relação ao tipo de água ao qual o corpo foi submetido, prevaleceu a água salgada, seguida da água doce e de piscina, exceto em 2003, quando as duas primeiras categorias foram invertidas. Semelhante ao que aconteceu com a idade, alguns laudos não informava o local (Gráfico 5.6).

Gráfico 5.6 - Distribuição percentual das vítimas de afogamento segundo o local onde o corpo foi encontrado, Salvador, 2003 à 2005

Ao avaliar a contribuição da Odontologia Legal na identificação das vítimas, percebeu-se uma baixa atuação dos cirurgiões-dentistas nesses casos (Gráfico 5.7).

Gráfico 5.7 - Distribuição percentual dos casos de afogamento segundo a atuação odonto-legal, Salvador, 2003 à 2005

Na primeira etapa da fase laboratorial, após a extração do DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 5.1).

Posteriormente realizou-se a PCR, sendo a visualização inicial do DNA feita em gel semelhante ao anterior, só que em maior concentração (1,5%) (Figuras 5.2 e 5.3).

Figura 5.1 - Fotografia em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo. Amostras: 1= marcador de 100pb; 2= saliva; 3= dente água salgada; 4= dente água doce; 5= controle negativo da extração

Figura 5.2 - Fotografia em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo, depois da amplificação do locus AMEL. Amostras: 1= marcador de 100pb; 2= saliva; 3= dente água salgada; 4= dente água doce; 5= controle negativo da PCR e 6= controle positivo da PCR

Figura 5.3 - Fotografia em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo, depois da amplificação do locus AMEL. Amostras: 1= marcador de 100pb; 2= controle positivo; 3, 6= dente água salgada; 4, 7= dente água doce; 5, 8= saliva

Observou-se nesta etapa, a recuperação do DNA em 37,5% das amostras dentárias (Gráfico 5.8), sendo obtido maior êxito nas provenientes de dentes imersos na água doce (45%), em comparação com a água salgada (30%), resultado este presente no gráfico 5.9.

Gráfico 5.8 - Percentual de recuperação do DNA, através da tipagem do locus amel, em dentes submetidos à imersão na água

Gráfico 5.9 - Percentual de recuperação do DNA, através da tipagem do locus amel, em dentes submetidos à imersão em água doce e salgada

Todas as amostras utilizadas como controle apresentaram amplificação positiva. O tipo de dente (molar, pré-molar, canino, incisivo) e a condição do mesmo (presença de cáries, restaurações, etc) não interferiu na recuperação do DNA (Quadro 5.1).

Amostras	Tipo dentário	Condição dentária
AS1	Molar superior	Hígido
AS2	Incisivo inferior	Cárie mésio-distal
AD2	Incisivo inferior	Cárie mésio-distal e cervical
AS3	Canino inferior	Hígido
AD3	Incisivo inferior	Hígido
AD4	Pré-molar superior	Cárie ocluso-mesial
AS6	Molar inferior	Cárie mésio-distal
AS7	Pré-molar superior	Hígido
AD8	Incisivo inferior	Hígido
AS9	Pré-molar superior	Cárie cervical
AD10	Molar inferior	Hígido
AD12	Incisivo inferior	Hígido
AD17	Molar inferior	Cárie ocluso-mesial
AD19	Canino superior	Cárie mesial
AD20	Pré-molar inferior	Hígido

Quadro 5.1 – Classificação das amostras com amplificação positiva, segundo o tipo e a condição dentária. AS = dente submetido à imersão em água salgada; AD = dente imerso na água doce

A análise em gel de poliacrilamida de 27 amostras (15 dentes e 12 de células da mucosa oral) provenientes de 12 participantes, que tiveram amplificação positiva no gel de agarose, permitiu a visualização dos diferentes alelos da amelogenina, possibilitando a identificação correta do sexo em 83,3% dos casos, o que numericamente equivale a 10 indivíduos. Além disso, verificou-se uma correlação adequada entre a intensidade das bandas e o tipo de material utilizado para exame (Figuras 5.4 e 5.5).

Entretanto, foi visualizado, ainda no gel de poliacrilamida, a perda de alelos em amostras de dois indivíduos, prejudicando o processo de identificação do sexo.

Figura 5.4 - Fotografia em gel de poliacrilamida a 8% corado com prata. Amostras: 1, 5 e 8= dente água salgada; 2 e 6= dente água doce; 3, 7 9=saliva; 4 e 9=padrão 10pb. A. Sexo masculino, B. Sexo feminino, C. Identificação prejudicada

Figura 5.5 - Fotografia em gel de poliacrilamida a 8% corado com prata. Amostras: 1=padrão 10pb; 2 e 11= padrão de 100pb; 3 e 4= controles negativo e positivo da PCR; 5, 7. e 10=saliva; 6, 9 e 11= dente água doce; 8 e 12= dente água salgada. A. Sexo feminino, B. Identificação prejudicada, C. Sexo masculino

Na segunda etapa da fase laboratorial, os resultados da amplificação das 16 regiões do kit PowerPlex® 16 System encontram-se nos quadros 5.2 e 5.3. Pode-se observar que não houve correlação na recuperação do DNA entre os dois tipos de sistema de amplificação utilizados (monoplex e multiplex), pois com a utilização do kit, foi possível a recuperação do DNA, de pelo menos uma região, mesmo nas amostras que não amplificaram com o monoplex (Quadro 5.2). Além disso, recuperou-se uma maior quantidade de loci nos dentes imersos na água doce (37) em comparação com a água salgada (24), apesar da amostra com maior número de loci amplificados pertencer a esta última condição.

Amostras	Amplificação – gel de agarose	Amplificação Powerplex	Número de lócus amplificados
AS2	-	+	16
AD7	-	+	8
AS8	-	+	3
AD8	+	+	10
AD10	+	+	8
AS15	-	+	1
AS17	-	+	2
AD19	+	+	3
AS20	-	+	2
AD20	+	+	8

Quadro 5.2 - Quadro comparativo dos dois sistemas de amplificação utilizados (monoplex e powerplex). AS = dente submetido a imersão em água salgada; AD = dente imerso na água doce; + = amplificação positiva; - = ausência de amplificação

Locus	AS2	AD7	AS8	AD8	AD10	AS15	AS17	AD19	AS20	AD20	Pesquisadora
D3S1358	14/18	14/15	-	15/17	13/14	-	-	-	-	15/15	15/16
TH01	6/8	6/6	-	7/9,3	6/9	-	7/7	-	-	7/9	6/9,3
D21S11	32,2/33, 2	-	-	31/34,2	29/29	-	-	28/28	-	34,2/35,2	30/32,2
D18S51	17/18	-	-	-	-	-	-	-	-	18/18	14/16
PENTA E	7/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5/12
D5S818	12/12	12/13	8/8	8/8	12/15	-	-	-	12/13	12/13	11/12
D13S317	8/12	-	-	11/14	12/13	-	-	-	-	9/11	11/11
D7S820	12/12	13/14	-	9/10	11/11	-	-	-	-	-	7/10
D16S539	8/12	11/11	-	10/13	10/10	-	-	-	-	-	11/12
CSF1PO	11/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10/10
PENTA D	12/13	-	-	-	-	-	-	10/10	-	-	12/12
vWA	15/17	17/20	-	14/15	-	-	-	-	-	-	14/17
D8S1179	13/13	12/12	13/14	13/14	-	-	-	-	-	-	12/12
TPOX	8/11	-	-	-	-	-	-	-	-	9/9	8/9
FGA	22/22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22/24
AMEL	XX	XX	XY	XY	XY	XX	XX	XX	XY	XY	XX

Quadro 5.3 - Perfil genético das amostras no powerplex®

6 DISCUSSÃO

As taxas de mortalidade por causas externas no Brasil, entre elas as de afogamento têm crescido de forma significativa nos últimos anos, chegando a ocupar o segundo lugar nas estatísticas brasileiras de mortalidade (MARTINS; ANDRADE, 2005). Sendo assim, faz-se necessário conhecer o perfil da população que mais contribui para esta estatística, para que os planejadores e executores de políticas públicas possam definir, em bases concretas, as ações que deveriam ser prioritárias, a fim de contemplar a prevenção e a atenção às vítimas dessas causas.

Neste sentido, os achados do levantamento epidemiológico do presente estudo evidenciam uma prevalência de 346 óbitos por afogamento na cidade Salvador, o que equivale a 2,7% do total de mortes registradas no IML. Já Baptista et al. (2003) e Martins e Andrade (2005) encontraram um percentual de 26%, em Portugal e 19,5%, no Paraná, respectivamente. Essa discrepância de valores provavelmente ocorreu em função das diferentes realidades de cada local e do período de tempo avaliado pelos autores nesses trabalhos.

Quanto à distribuição dos óbitos por afogamento, a maioria dos trabalhos avaliados (BIERENS, KNAPE, GELISSEN, 2002; SZPILMAN, 2006; MELLO; GAWRYSZEWSKI; LATORRE, 1997) concordam com os resultados desta pesquisa, quanto ao sexo (masculino) e a idade de maior acometimento (adultos). Considerando esta última categoria, observou-se ainda uma alta prevalência de óbitos em indivíduos com idade inferior a 20 anos (42,76%), resultado este um pouco menor que o observado pela Organização Mundial de Saúde (60%), em 1995.

No entanto, é importante ressaltar o expressivo percentual encontrado de óbitos envolvendo crianças (15%), na maioria das vezes associados à queda e acidentes domésticos. Resultado semelhante foi observado por Martins e Andrade (2005), Baracat, Paraschin e Nogueira (2000) e Ballesteros et al., (2003). Este último, desenvolvido nos Estados Unidos, onde o afogamento foi identificado como a terceira causa de morte em crianças abaixo de 15 anos.

No tocante ao tipo de água ao qual o corpo foi submetido, 63% dos casos analisados por Baptista et al. (2003), durante 12 anos, aconteceram na água doce, ao contrário do observado pelos autores deste trabalho e por Suomionem e Korpela (2002) que encontraram um maior predomínio de óbitos na água salgada. A principal justificativa para esta ocorrência reside no fato de 95% do total da água existente no território brasileiro ser constituído por este tipo de água (BERNARDO; DANTAS, 2005).

Quanto à contribuição da Odontologia Legal na identificação das vítimas por afogamento observou-se uma baixa prevalência desta. Os cirurgiões-dentistas atuaram em apenas 14,74% dos casos, nos 3 anos. Esta casuística aconteceu provavelmente em função da ausência do cargo de perito odonto-legal na Bahia durante este período, já que o primeiro concurso público para a carreira citada ocorreu apenas em 2006 (BAHIA, 2006). Ainda em relação a este assunto, a maior contribuição observada no ano de 2003 se deu em virtude da atuação de cirurgiões-dentistas, especialistas em Odontologia Legal, no IML de Salvador.

Observou-se também, nos laudos avaliados, a subnotificação dos exames odontológicos nos arquivos. Ou seja, muitas vezes constava no laudo à solicitação do exame, mas o resultado do mesmo não estava anexado aos demais documentos. Neste sentido, seria recomendável uma revisão dos registros do IML, bem como um

treinamento dos seus recursos humanos no sentido de facilitar o preenchimento adequado dos laudos técnicos, estruturando melhor seu banco de dados.

Os resultados deste levantamento serviram de base para etapa posterior do presente estudo: a fase laboratorial. Considerando a recente casuística mundial de acidentes de massa envolvendo o ambiente aquático e a conseqüente necessidade do domínio de técnicas de extração do DNA no processo de identificação de corpos esqueletizados ou em estado de decomposição avançado que estiveram sob influência da água, optou-se por fazer a imersão dos dentes na água doce e salgada, com o objetivo de simular casos de identificação forense. A escolha do tipo de água utilizado na pesquisa deu-se a partir dos resultados do levantamento.

Neste sentido, um dos primeiros passos na identificação de vítimas de acidente de massa é a investigação do sexo (HUFFINE; CREWS; KENNEDY, 2001; BRENNER; WEIR, 2003), geralmente promovida com base nas características anatômicas dos órgãos genitais masculinos e femininos. Entretanto, quando se trata de corpos esqueletizados ou em estado de putrefação avançada, os ossos e dentes são muitas vezes os únicos materiais disponíveis para identificação, podendo esta ser promovida empregando os recursos da biologia molecular, através da análise da amelogenina (MURAKAMI et al., 2000).

Na Odontologia Legal, o dente é o material eletivo para estudo do DNA devido à dureza das suas estruturas (esmalte, cemento, dentina e osso alveolar) o que fornece condições para a preservação e integridade do material genético, mesmo em circunstâncias adversas do meio, como as altas temperaturas e a umidade (CERRI et al., 2004). Pinheiro (2004) afirma ainda que se os restos cadavéricos forem encontrados submersos a possibilidade de se conseguir bons

resultados é remota, uma vez que o estado de degradação do material genético é muito maior.

Bender, Farfán e Schneider (2004) confirmam a possibilidade de degradação do DNA quando submetido à ação da luz, calor e umidade. O mesmo foi observado por Nakanish, Moriya e Hashimoto (2003).

Neste trabalho, ao avaliar, no gel de agarose, uma única região do DNA para investigação do sexo (amelogenina) foi possível a recuperação do material genético em apenas 37,5% dos dentes, evidenciando que a água interferiu diretamente neste processo. Ao contrário do que aconteceu com os dentes, todas as amostras de células da mucosa oral utilizadas como controle amplificaram.

Notou-se também uma maior degradação do DNA na água salgada (70%) em comparação com a água doce (55%), provavelmente em função da própria composição química dessas duas condições aquosas. Nelas, estão presentes íons como: cálcio, magnésio, sódio, potássio, bicarbonatos, cloretos, sulfatos, nitratos, entre outros. Aparecem ainda traços de chumbo, cobre, arsênio, manganês e um largo espectro de compostos orgânicos, provenientes da decomposição da matéria orgânica de origem animal e vegetal. Além disso, em alguns casos, inclui-se também resíduos de áreas agrícolas e despejos de efluentes de origem doméstica e industrial, variando desde ácidos húmicos até compostos orgânicos sintéticos como detergentes, pesticidas e solventes (MACEDO, 2001). A diferença na concentração de algumas das referidas substâncias na água doce e salgada encontra-se na figura 6.1.

H 4.5 H ₂ O -1.74 -1.74								He	
Li 6.3 Li ⁺ 4.6		Be BeOH ⁺ (?) 9.2	B 7.0 H ₃ BO ₃ , B(OH) ₄ ⁻ 3.39	C 4.9 HCO ₃ ⁻ 2.64 3.0	N 6.3 N ₂ , NO ₃ ⁻ 1.97	O 4.5 H ₂ O, O ₂ -1.74	F 5.7 F ⁻ , Mg F ⁺ 4.17 5.3	Ne	
Na 7.7 Na ⁺ 0.33 3.57		Mg 7 Mg ²⁺ , (MgSO ₄) 1.27 3.77	Al 2 Al(OH) ₄ ⁻ 7.1	Si 3.8 H ₄ SiO ₄ 4.15 3.8	P 4 HPO ₄ ²⁻ , (MgPO ₄) 5.3	S 6.9 SO ₄ ²⁻ (NaSO ₄) 1.55 3.92	Cl 7.9 Cl ⁻ 0.26 3.66	Ar	
K 6.7 K ⁺ 1.99 4.23		Ca 5.9 Ca ²⁺ , (CaSO ₄) 1.99 3.42				As H AsO ₄ ²⁻ 7.3	Se 4 Se O ₃ ²⁻ 8.6	Br 8 Br ⁻ 3.08	Kr
		Sr 6.6 Sr ²⁺ 4.05					I 6 I ⁻ , IO ₃ ⁻ 6.3		
		Ba 4.5 Ba ²⁺ 6.8							

Key:	Ca 5.9 Ca ²⁺ (CaSO ₄) 1.99 3.42	←	Oceanic residence time, log τ yr
		←	Predominant species
		←	Conc. seawater, -log <i>M</i>
		←	Conc. riverwater, -log <i>M</i>

Figura 6.1 - Composição química da água doce e salgada, segundo Kroshwitz e Grant (1998)

Vale ressaltar que a concentração desses elementos varia com a profundidade e é influenciada diretamente pelo crescimento, distribuição e redução dos fitoplanctons e outros organismos (KROSHWITZ; GRANT, 1998).

Não foi possível descobrir o mecanismo pelo qual a água afeta a recuperação do DNA. Haglund e Sorg (1997), já afirmavam que na área forense algumas lacunas em torno do conhecimento ainda limitam a capacidade humana para tirar inferência sobre os fenômenos naturais e culturais. Porém, alguns componentes presentes no ecossistema aquático já foram relatados na literatura como sendo capazes de degradar o DNA (crescimento de microrganismos, em função da umidade) (BENDEN; FARFAN; SCHNEIDER, 2004) ou inibir a enzima Taq DNA polimerase (ácido húmico) e consequentemente a PCR (BURGER et al., 1999).

A análise no gel de agarose não permitiu a identificação do gênero em função da pequena diferença de pares de bases (6) existentes entre homens e mulheres, quando se utiliza como região a amelogenina. Neste sentido, Mukherjee e Biwas (2004) sugerem, nesses casos, o emprego do gel de poliacrilamida, por este promover uma melhor separação das bandas e conseqüentemente visualização dos alelos.

Assim, a corrida em gel de poliacrilamida foi efetuada nas amostras que amplificaram no gel de agarose, o que permitiu uma correta visualização dos alelos da amelogenina, identificando precisamente o sexo de 10 participantes. Esta diferença ocorre porque a mulher é homozigota (XX) em relação ao gene que codifica a amelogenina e o homem heterozigoto (XY) (LATTANZI et al., 2005).

Entretanto, apesar da determinação do sexo pela amelogenina ser uma metodologia já sedimentada e com credibilidade no meio científico, observou-se no gel de poliacrilamida perda de alelos em amostras de dois indivíduos do sexo masculino. Trata-se de um fato preocupante principalmente quando se considera o contexto forense, onde um erro de interpretação ou deficiências na documentação da cadeia de custódia pode comprometer de forma significativa os resultados da investigação (SCHWARK; BOSINSKI; TIMME, 2006).

Neste sentido, Pinheiro (2004), Shadrach et al. (2004) e Brinkmann (2002) comentam esta possibilidade ao afirmarem que algumas vezes a degradação do DNA em vez de impedir a obtenção dos resultados pode ocasionar a visualização de um único alelo em vez de dois, sendo mais freqüente o desaparecimento do alelo de maior dimensão. Por isso, quando se analisa vestígios antigos e se obtém um perfil homozigótico para alguns sistemas, deve-se ter cuidado na utilização desses resultados, pois pode se tratar de um perfil heterozigótico.

Uma alternativa para solucionar este problema foi proposta por Steinlechner et al. (2002). Os autores estudando o perfil genético de 29.432 homens armazenados em um banco de dados australiano, verificaram a ausência de produto de PCR específico da amelogenina, correspondente ao cromossomo Y, em 6 indivíduos. Ao mudar a metodologia e analisar também 8 STRs do mesmo cromossomo, obteve-se o perfil genético completo de 5 participantes, confirmando o genótipo masculino dos mesmos. A taxa de erro da investigação do sexo pelo teste da amelogenina neste trabalho foi de 0,018%.

Verificou-se também no gel de poliacrilamida uma correlação adequada entre a intensidade das bandas e o tipo de material utilizado para exame. Ou seja, as amostras resultantes do esfregaço da mucosa oral que teoricamente apresentam uma maior quantidade de células (DE LEO; TURRINA; MARIGO, 2000) e consequentemente de DNA, mostraram bandas mais intensas que as amostras dentárias.

Alguns autores relatam ainda outros tipos de variações diferentes das ambientais que poderiam afetar a quantidade e qualidade do DNA. São elas: tipo de dente; condição dentária antes da extração (presença de cárie ou outra patologia) e após a extração (trauma anatômico); tipo de tecido dentário utilizado na extração (dentina, cimento, polpa); período de tempo entre a extração e o isolamento do DNA; idade do indivíduo e quantidade de tecido pulpar presente nos dentes (VERBOVAYA, IVANOV, 1991; DE LEO; TURRINA; MARIGO, 2000).

Pfeiffer et al. (1999) comprovaram que a condição dentária não influencia na recuperação do DNA, o que também foi verificado neste trabalho, uma vez que as amplificações ocorreram em dentes de grupos diferentes (5 incisivos, 4 molares, 4

pré-molares e 2 caninos) e nas mais variadas condições (inclusive com comprometimento radicular).

Quanto ao tipo de tecido dentário empregado para extração, Malaver e Yunis (2003) evidenciaram forte amplificação das amostras provenientes da polpa em comparação com as outras regiões dentárias. Segundo os autores, os cementoblastos e odontoblastos presentes, respectivamente, no cemento e na dentina, acabam funcionando como fator de proteção contra a degradação ambiental. Este tipo de avaliação não foi realizada neste estudo, pois a polpa de todos os dentes estavam mumificadas.

Outro fator que pode ter interferido na não amplificação do DNA é a qualidade da amostra biológica forense. A ínfima quantidade de material biológico para extração de DNA pode resultar em ausência da seqüência – alvo na fração utilizada para a reação ou a mesma pode encontrar-se danificada, impossibilitando a amplificação por PCR (MOHAMMED; TAYEL, 2005).

Assim, atenção especial deve ser dispensada por parte dos pesquisadores na preservação do DNA para amplificação pela PCR, o que também envolve o controle da temperatura, umidade, pH (BENDER, FARFAN; SCHNEIDER, 2004), presença de ácido húmico e fúlvico e microrganismos. A temperatura baixa, o ambiente seco, com o mínimo crescimento de microrganismos e o pH neutro ou levemente alcalino preservam o DNA. A presença de ácido fúlvico e húmico inibe a enzima Taq DNA polimerase. Os microrganismos, se em grande quantidade, podem degradar o DNA por completo (BURGER et al., 1999).

Por isso, em casos que envolvem amostras de DNA muito degradado, a utilização do sistema multiplex pode aumentar a chance de amplificação (WEI; ZHAO; SHENGBIN, 2006; OPEL et al., 2006). Neste sistema, várias seqüências–

alvo são analisadas simultaneamente numa única reação (LEVEDAKOU et al., 2002). Tal fato proporciona o aumento do poder discriminatório e a diminuição do tempo de análise, bem como das quantidades de DNA e de reagentes (ROCCAZELLO et al., 2004).

No presente trabalho a recuperação do DNA através do sistema PowerPlex® foi possível em todas as amostras testadas, em pelo menos uma região, independentemente da intensidade da banda apresentada no gel de agarose. Mesmo as amostras que não amplificaram através do monoplex apresentaram resultado positivo com o emprego desta metodologia. Além disso, recuperou-se uma maior quantidade de loci nos dentes imersos na água doce (37) em comparação com a água salgada (24), semelhante ao que foi observado no gel de agarose.

Vale ressaltar que como o objetivo da parte laboratorial do presente estudo foi testar a condição ambiental, através da análise da amelogenina, estabelecendo assim o sexo dos participantes, o sistema multiplex foi empregado em um número limitado de amostras, como forma complementar à pesquisa, já que o foco do trabalho não era a identificação.

Após a PCR utilizando o multiplex, realizou-se a corrida eletroforética em um seqüenciador automático. Gill et al. (1995) relatam que a automação dos procedimentos laboratoriais pode reduzir a quantidade de manipulações manuais, propiciando qualidade e diminuição do risco laboratorial. Esse sequenciador controla automaticamente variáveis de corrida como temperatura, tempo e voltagem, além de transferir os dados da eletroforese automaticamente para um software de análise. Sua limitação é a necessidade de um investimento inicial relativamente alto.

Na tentativa de minimizar os efeitos da degradação do DNA e até mesmo como respaldo jurídico para que o resultado do exame não seja questionado, é

necessário que os laboratórios forenses mantenham a cadeia de custódia de suas amostras, através de registros que possam acompanhá-las desde a coleta até sua disposição final, de forma a comprovar que tomou todas as precauções para prevenir a falsificação, quebra, perda ou contaminação das amostras (BONACCORSO, 2005).

Nesse sentido, a Resolução SSP-SP 194 de 2 de junho de 1999 (São Paulo, 1999), o manual da INTERPOL (2001) e do FBI (1999, 2001) demonstram a preocupação de garantir a preservação da amostra biológica para extração e análise do DNA. Apesar de serem normativas internas, servem de parâmetro para laboratórios de análises clínicas e de pesquisas científicas.

No Brasil ainda não há normas de coleta e análise de material biológico para fins de identificação humana pelo DNA (ANZAI et al., 2005). Entretanto, a Sociedade Internacional de Genética Forense tem realizado testes de proficiência para laboratórios brasileiros inscritos (ISFG, 2000).

Assim, uma das preocupações dos autores deste trabalho foi quanto à manutenção e documentação de toda a cadeia de custódia. Por isso, inicialmente todo material foi congelado a -20 graus até a sua utilização. Tal procedimento preserva o DNA e evita o descongelamento e recongelamento das amostras, o que pode degradar o material genético (INTERPOL, 2001).

A extração de DNA dos dentes foi previamente otimizada utilizando o método orgânico (HOCHMEISTER; RUDIM; AMBACH, 1998). Walker e Rapley (1999) relatam que a metodologia de extração do DNA pelo método orgânico é mais usual, além de obter bons resultados principalmente pela realização prévia da digestão enzimática (MESQUITA et al., 2001).

Entretanto, a literatura mostra a adoção cada vez maior do emprego de kits comerciais na extração do DNA, por estes diminuírem os passos operatórios, uniformizando melhor os resultados (COTTON et al., 2000), o que também é recomendado por sociedades de creditação internacional como a Interpol (2001) e a Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG, 2000).

Segundo Butler (2005), a qualidade e quantidade de DNA devem ser examinadas após a extração. Assim, quando se refere às amostras utilizadas em investigação criminal, ou passíveis de degradação e contaminação, recomenda-se a quantificação do DNA humano (ISFG, 2000).

Apesar de ser possível quantificar o DNA extraído (OZAKI, 1999), tal procedimento não é imprescindível para análises forenses, devido à ínfima quantidade de material disponível para o exame.

Desta forma, o DNA obtido nas extrações torna-se precioso demais para ser utilizado numa etapa de checagem intermediária. Somado a isso, pode existir a necessidade de repetir procedimentos como PCRs e corridas eletroforéticas, necessitando assim do material proveniente das extrações.

Anzai et al. (2005) reforçam ainda mais esta idéia ao afirmarem em seu trabalho que o resultado positivo da quantificação do DNA previamente a PCR não foi fator determinante para o sucesso de sua amplificação. Por isso, optou-se por não fazer este procedimento.

Concomitantemente ao aprendizado das técnicas de extração, implementou-se os testes de otimização das PCRs e de eletroforese. O emprego dessas metodologias teve como objetivo o treinamento com os equipamentos e seus protocolos.

Isto porque uma padronização deficiente ou mesmo sua ausência implica na amplificação de regiões inespecíficas do DNA ou na sua não amplificação. Em vista disto, tal procedimento deve ser feito preliminarmente, utilizando amostras de DNA como teste, a fim de não desperdiçar DNA obtido de casos forenses reais (FINDLAY et al., 1997).

Além disso, procedimentos inadequados que possam levar à contaminação de amostras pelos investigadores e profissionais do laboratório podem resultar em uma incorreta interpretação do perfil genético (BONACCORSO, 2005). Dessa maneira, o desenvolvimento e cumprimento de normas e boas práticas de laboratório são imprescindíveis, assim como treinamentos específicos para o exame de DNA tornam-se obrigatórios (INTERPOL, 2001).

Neste trabalho, foram utilizados controles positivos e negativos tanto na extração do DNA, quanto na PCR. Optou-se também pela coleta das células da mucosa oral dos participantes no controle das amostras para provar que os dois tipos de materiais biológicos pertenciam ao mesmo indivíduo e que não houve troca de material.

O presente estudo proporcionou a obtenção de conhecimentos técnicos e científicos sobre o emprego da biologia molecular na investigação do sexo, demonstrando que apesar de ser uma técnica extremamente sensível às condições ambientais e outros fatores, trata-se de um método eficiente nos processos de identificação humana. Entretanto, a análise de DNA, mesmo sendo uma poderosa ferramenta, não é condição *sine qua non* em estudos forenses, devendo ser considerada dentro de um conjunto de variadas evidências.

7 CONCLUSÕES

- O levantamento epidemiológico permitiu conhecer o perfil da população que mais contribui para estatística encontrada durante os três anos pesquisados no IML de Salvador. Foram encontrados diversos casos de afogamento, predominando vítimas do sexo masculino, a maioria deles ocorrendo em água salgada, sugerindo a importância da implementação de programas de prevenção, na tentativa de minimizar a prevalência de óbitos por afogamento em cidades do litoral brasileiro, ao mesmo tempo em que oferece subsídios ao setor público para melhoria da coleta e crítica dos dados do sistema de informação de mortalidade;
- A exposição dos dentes à água interferiu diretamente na recuperação do DNA;
- Apesar da sua comprovada eficácia, reconhecimento e credibilidade a investigação do sexo pela amelogenina, como todos os procedimentos que empreguem os recursos da biologia molecular, exige uma interpretação criteriosa dos resultados, por parte do pesquisador, e a observação de todos os critérios referentes à manutenção da cadeia de custódia;
- Resultado negativo no monoplex não significa impossibilidade de recuperação do DNA, principalmente em amostras degradadas, daí a importância da utilização do sistema multiplex para identificação humana;
- A análise de DNA, mesmo sendo uma importante ferramenta nos processos de identificação humana, deve ser utilizada com critério e considerada dentro de um conjunto de variadas evidências.

REFERÊNCIAS¹

Abe DM. Avaliação do sexo por análise da função discriminante a partir de dimensões lineares do crânio [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP; 2000.

Akane A. Sex Determination by PCR Analysis of the X-Y Amelogenin Gene. In: Lincoln PJ, Thomson J. Methods in Molecular Biology 1998;98(1):245-249.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biologia Molecular da célula. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.

Alonso A, Albarran C, Martin P, Garcia P, Simón LF, Iturralde MJ et al. Challenges of DNA profiling in mass disaster investigations. Croat Med J 2005;46(4):540-8.

Alonso GL, Genofre GC. Genética Molecular e Odontologia Forense. Rev Odontol Univ Santo Amaro 1999;4(1):30-3.

Alvarez GA, Munoz I, Pestoni C, Lareu MV, Rodriguez-Calvo MS, Carracedo A. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. Int J Legal Med 1996;109(3):125-9.

Anzai EK, Hirata MH, Hirata RDC, Nunes FD, Melani RFA, Oliveira RN. DNA extraction from human saliva deposited on skin and its use in forensic identification procedures. Braz Oral Res 2005;19(3):216-22.

Anzai EK, Ozaki A, Nunes FD, Hirata M, Oliveira RN. Extração de DNA de saliva humana depositada sobre a pele e sua aplicabilidade aos processos de identificação individual. Odontol Soc 2001;3(1-2):5-7.

Arbenz GO. Medicina Legal e antropologia forense. São Paulo: Atheneu; 1988.

Bahia. Diário Oficial da Bahia. Disponível em: URL:[http:// www.diariooficial.ba.gov.br](http://www.diariooficial.ba.gov.br) [2006 jan. 12].

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Ballesteros MF, Schieber RA, Gilchrist J, Holmgreen P, Annest JL. Differential ranking of causes of fatal versus non-fatal injuries among US children. *Inj Prev* 2003; 9:173-6.

Baptista JP, Casanova PC, Sousa JP, Martins PJ, Simões A, Fernandes V et al. Afogamento: revisão temática a propósito de análise casuística do Serviço de Medicina intensiva dos Hospitais da Universidade de Coimbra (1989-2002). *Rev Port Pneumol* 2003;9(4):311-25.

Baracat ECE, Paraschin K, Nogueira RJN. Acidentes com crianças e sua evolução na região de Campinas, SP. *J Pediatr* 2000;76(5):368-74.

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

Bernardo DL, Dantas ADB. Métodos e técnicas de Tratamento de água. 2ª ed. São Carlos: Rima; 2005.

Bierens JLM, Knape JTA, Gelissen HMM. Drowning. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:578-86.

Blank D. Prevenção e controle de injúrias físicas: saímos ou não do século 20?. *J Pediatr* 2002;78:84-6.

Boadas J. Atentado em Madrid. Disponível em: URL:[http:// www.anabad.org/noticias](http://www.anabad.org/noticias) [2005 jun. 8].

Bonaccorso N. Aplicação do exame de DNA na elucidação de crimes. São Paulo: Faculdade de Direito da USP; 2005.

Brasil. Câmara Federal. Projetos de Lei e outras proposições. Disponível em: URL:<http://www.2camara.gov.br> [2006 jun. 30].

Brasil. Lei 8069. Estatuto da Criança e do Adolescente. Brasília: Diário oficial da União 1990.

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Informação e Informática do SUS (DATASUS). Tabela CID BR – 10: óbitos por ocorrência por faixa etária segundo

região - afogamento e submersões acidentais de 1996 a 2004. Brasília: MS/DATASUS. Disponível em: URL:<http://www.datasus.gov.br.html> [2006 fev. 24].

Brenner CH, Weir BS. Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims. *Theoretical Population Biology* 2003;63:173-178.

Brettell TA, Inman K, Rudin N, Saferstein R. *Forensic Science. Anal Chem.* 2001;73: 3735-44.

Brinkmann B. Is the amelogenin sex test valid? *Int J Legal Med* 2002;116:63.

Brkic H, Strinovic D, Kubat, Petrovecki V. Odontological identification of human remains from mass graves in Croatia. *Int J Legal Med* 2000;114:19-22.

Budmlija ZM, Mechthild K P, Mundorff AZ, Wieraema J, Bartelink E, Mackinnon G et al. World Trade Center Human Identification Project: Experiences with Individual Body Identification Cases. *Croat Med J* 2003;44(3):259-63.

Budowle B, Bieber FR, Eisenberg AJ. Forensic aspects of mass disasters: Strategic considerations for DNA-based human identification. *Leg Med* 2005;7:230-43.

Budowle B, Brown BL. El uso del análisis de ADN en la identificación forense. *Forénsica* 2001;1(2):9-22.

Burger L, Hummel S, Herman B, Henke W. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 1999;20(8):1722-8.

Burris BG, Harris EF. Identification of race and sex from palate dimensions. *J Forensic Sci* 1998;43(5):959-63.

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

Byard RW, James RA, Healh KJ. Recovery of human remain after shark attack. *J Forensic Sci* 2006;51(4):888-92.

Calabrez MCT, Saldanha PH. A pesquisa de DNA em odontologia forense. In: Silva M. Compêndio de Odontologia Legal. Rio de Janeiro: Editora Medsi; 1997. p.167-221.

Castro CMP, Galvão, LCC. Diagnóstico do sexo pelo estudo quantitativo da ulna. Arquivos da Sociedade Brasileira de Medicina Legal 2002;1(6):35-51.

Castro Júnior OV. Seleção da largura dos dentes artificiais anteriores através de medidas antropométricas da face e da extensão do arco dentário. RPG 2005;12(1): 60-5.

Cerri N, Ricci U, Verzeletti A, Falconi B, De Ferrari F. Typing of teeth two different amplification systems. International Congress Series 2004;1261:622-4.

Chen L, Sun G, Wu M. Influence by environmental and physicochemical factors on the results of sex identification of human dental pulp by polymerase chain reaction. Hua Xi Yi Ke Da Xue Bao 1994;25(3):253-8.

Clark DH. An analysis of the value of forensic odontology in ten mass disasters. Int Dent J 1994;44(3):241-50.

Clayton TM, Whitaker JP, Maguire CN. Identification of bodies from scene of mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. Forensic Sci Int 1995;76:7-15.

Collins PJ, Hennessy LK, Leibelt CS, Roby RK, Reeder DJ, Foxall PA. Developmental validation of single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433 and amelogenin: the AmpFISTR Identifiler Amplification Kit. J Forensic Sci 2004;49(6):1265-77.

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

Cotton EA, Allsop RF, Guest JL, Frazier RRE, Koumi P, Callow FP et al. Validation of the AMPFISTR@SGMPlus system for use in forensic casework. Forensic Sci Int 2000;112:51-161.

Davis JH. Bodies found in water. An investigative approach. Am J Forensic Med Pathol 1989;7(4):291-7.

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

Doyle CT, Bolster MA. The medical-legal organization of mass disaster-the Air India crash 1985. *Med Sci Law* 1992;32(1):5-8.

Duarte FAM, Perez AM, Pena SD, Barros MPM, Rossi EO. A avaliação do DNA como prova forense. Ribeirão Preto: Fundec-RP, 2001.

Durão A. Bateau Mouche IV afunda no réveillon. Disponível em: URL:<http://jbonline.terra.com.br> [2006 jul. 8].

Farah SB. DNA Segredos e Mistérios. São Paulo: Sarvier; 1997.

Federal Bureau of Investigation (FBI). Handbook of forensic services: evidence examinations – DNA general [manual online]. 1999. Disponível em: URL:<http://www.fbi.gov/hq/lab/handbook/examsdna.htm> [2005 jun. 8].

Federal Bureau of Investigation (FBI). Quality assurance audit for forensic DNA and convicted offender DNA databasing laboratories. *Forensic Sci Commun* [periódico online]. 2001. Disponível em: URL:<http://www.fbi.gov/hq/lab/fac/backissu/jan2001/dnaaudit.htm> [2004 jun. 8].

Ferreira RA. Reconhecendo pela boca. *Revista da APCD* 1996;50(6):464-73.

Figini ARL, Silva JRL, Jobim LF, Silva M. Identificação Humana. São Paulo: Millennium; 2003.

Findlay I, Taylor A, Quirke P, Frazier R, Urquhart A. DNA fingerprint from single cells. *Nature* 1997;389:555-6.

França GV. Medicina Legal. 7^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Frégeua CJ, Germain O, Fourney RM. Fingerprint enhancement revisited and the effects of blood enhancement chemicals on subsequent Profiler Plus fluorescent short tandem repeat DNA analysis of fresh and aged bloody Fingerprints. *J Forensic Sci* 2000;45(2):354-80.

Galvão LCC. Determinação do sexo através da curva frontal e apófise mastóidea [Tese de Doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 1998.

Galvão LCC. Determinação do sexo por análise quantitativa da mandíbula. *Rev Cons Reg Odont Pernambuco* 1999;2(1):16-9.

Gattas GJF, Figaro-Garcia C, Fridman C, Battistella LR, Massad E, Neumann MM et al. Projeto Caminho de Volta: busca de crianças desaparecidas no Estado de São Paulo. *Rev Extensão USP* 2005. Disponível em URL: <http://www.usp.br/prc/revista/> [Jan 10 2006].

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

Gill P, Kimpton CP, Urquhart A, Oldroyd N, Millican ES, Watson SK et al. Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework – a strategy for the future. *Electrophoresis* 1995;16:1543-52.

Góes ACS, Silva DA, Gil EHF, Silva MTD, Pereira RW, Carvalho EF. Allele frequencies data and statistic parameters for 16 STRs loci- D19S433, D2S1338, CSF1PO, D16S539, D7S820, D21S11, D18S51, D13S317, D5S818, FGA, Penta E, TH01, vWA, D8S1179, TPOX, D3S1358 in the Rio de Janeiro population, Brasil. *Forensic Sci Int* 2004;140:131-2.

Grandmaison GLL, Leterreux M, Lasseuguette K, Alvarez JC, Mazancourt P, Durigon M. Study of the diagnostic value of iron in fresh water drowning. *Forensic Science International* 2005. Disponível em URL: <http://www.sciencedirect.com> [Jan 10 2006].

Haglund WD, Song MH. The postmortem fate of woman remains. United States: CRC Press; 1997.

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

Hochmeister MN, Rudin O, Ambach E. PCR analysis from cigarette butts, postage stamps, envelope sealing flaps, and other saliva-stained material. In: Lincoln PJ, Thompson J. *Methods in molecular biology*, v.48: Forensic DNA profiling protocols. Totowa: Humana press; 1998. p. 27-32.

Holland MM, Cave CA, Holland CA, Bille TW. Development of quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. *Croat Med J*. 2003; 44(3):264-72.

Huffini E, Crews J, Kennedy B. Mass identification of persons missing from the break-up of the former Yugoslávia structure, function and role of the International Commission on missing persons. *Croat Med J* 2001;42(3):271-5.

Hsu CM, Huang NE, Tsai LC, Kao LG, Chao CH, Linacre A et al. Identification of victims of the 1998 Taoyuan Airbus crash accident using DNA analysis. *Int J Legal Med* 1999;113(1):43-6.

Ikawa T, Kakegawa A, Nagano T, Ando H, Yamakoshi Y, Tanabe T et al. Porcine amelogenin is expressed from the X and Y chromosomes. *J Dent Res* 2005; 84(2):144-8.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Distribuição territorial da população brasileira. Disponível em: URL:<http://www.ibge.gov.br.html> [2006 fev. 26].

International Criminal Police Organization (INTERPOL). Interpol handbook on DNA data exchange and practice: recommendations from the Interpol DNA monitoring expert group. 1^a ed. Lyon: OIPC - Interpol; 2001.

International Society for Forensic Genetics (ISFG). The 1998-1999 collaborative exercises and proficiency testing program on DNA typing of the Spanish and Portuguese working group of the International Society for Forensic Genetics (GEP-INSFG). *Forensic Sci Int* 2000;114(1):21-30.

Jeffreys AJ, Brookfield JFY, Semeor FR. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 1985;317:818-9.

Jobim LF, Jobim MR, Brenner C. Identificação humana pelo DNA. In: Galante Filho H, Figini AL, Reis AB, Jobim LF, Silva M. Identificação Humana. Porto Alegre: Sagra Luzatto; 1999. p. 239-303.

Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics* 2004;5:739-51.

Koh D, Ng DPK, Choo SGL, Ng V, Fu Q. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clinica Chimica Acta* 2004;343:191-4.

Krenke BE, Tereba A, Anderson SJ, Buel E, Culhane S, Finis CI, et al. Validation of 16 locus fluorescent multiplex system. *J Forensic Sci* 2002;47(4):773-85.

Kroschwitz II, Grant MH. Kirk – Othmer: Encyclopedia of chemical technology. New York: Interscience publication; 1998.

Kumar MG, Hegde AM. Sex identification from exfoliated primary teeth--a PCR study. *J Clin Pediatr Dent* 2005;30(1):19-21.

Lattanzi W, Giacomo MCD, Lenato GM, Chimienti G, Voglino G, Resta N et al. A large interstitial deletion encompassin the amelogenin gene on the short arm of the y chromosome. *Human Genetics* 2005;116(5):395-401.

Lau G, Tan WF, Tan PH. After the Indian Ocean Tsunami: Singapore's contribution to the international disaster victim identification effort in Thailand. *Ann. Acad. Med. Singapore* 2005;34(5):341-51.

Levedakou EN, Freeman DA, Budzynski MJ, Early BE, Damaso RC, Pollard AM et al. Characterization and validation studies of powerplex 2.1, a nine locus short tandem repeat (STR) multiplex system and penta D monoplex. *J Forensic Sci* 2002; 47(4):757-72.

Libório TN, Etges A, Neves AC, Mesquita RA, Nunes FD. Avaliação do DNA genômico obtido de biópsias de boca embebidas em parafina e arquivadas por até 40 anos. *Jornal Brasileiro de Medicina laboratorial* 2005;41(6):405- 10.

Lucas J, Goldfeder LB, Gill JR. Bodies found in the waterways of New York City. *J Forensic Sci* 2002;47(1):137-41.

Lund S, Dissing J. Surprising stability of DNA in stains at extreme humidity and temperature. *International Congress Series* 2004;1261:616-8.

Lunetta P. Circumstances and macropathologic findings in 1590 consecutive cases of bodies found in water. *Am J Forensic Med Pathol* 2002;23(4):371-6.

Macedo JAB. Águas e Águas. São Paulo: Livraria Varela; 2001.

Machado SR. Verificação da aplicabilidade do índice de Baudoin para a determinação do sexo. Disponível em: URL: <http://www.ibep-ba.com.br/publica9.htm> [2000 out. 02].

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

Mannucci A, Casarino L, Bruni G, Lomi A, De Stefano F. Individual identification of flood victims by DNA polymorphisms and autopsy findings. *Int J Legal Med* 1995; 107(4):213-5.

Marques JAM, Barros GB, Musse JO, Cardoso PEC, Silva M. Estudo da Distância Inter-canina no Processo de Identificação de Marcas de Mordidas Humanas. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2005;59(5):363-6.

Martins CBG, Andrade SM. Causas Externas entre menores de 15 anos em cidade do Sul do Brasil: atendimentos em pronto-socorro, internações e óbitos. *Rev Bras Epidemiol* 2005;8(2):94-204.

Mccarthy M. Desastres naturais crescem com aquecimento global, diz especialista britânico. *Folha de São Paulo* 2006 set. 25; cad. 8:13.

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

Mello JMPH, Gawryszewski V, Latorre MRO. Análise dos dados de mortalidade. *Rev. Saúde Pública* 1997;4:5-25.

Mello JMHP. Mortalidade por causas violentas no Município de São Paulo. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1979.

Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesqui Odontol Bras* 2001;15(4):314-9.

Migliorini LM. Contribuição ao estudo do processo de identificação através da rugoscopia palatina [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2000.

Missliwetz J, Stellwag CC. 6 cases of premeditated murder of adults by drowning. Arch Kriminol 1995;195(3-4):75-84.

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

Mohammed F, Tayel SM. Sex identification of normal persons and sex reverse cases from bloodstains using FISH and PCR. J Clin Forensic Med 2005; 12:122-7.

Moura Neto RS. Análise forense. Rev Panorama Justiça 1998;9:38.

Mukherjee KK, Biswas R. Short tandem repeat (STRs) and sex specific amelogenin analysis of blood samples from neurosurgical female transfused patients. Journal of Clinical Forensic Medicine. Disponível em: URL:[http:// www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) [2004 jul. 8].

Murakami H, Yamamoto Y, Yashitome K, Ono T, Okamoto O, Shigeta Y et al. Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples. Acta Med Okayama 2000;54(1):21-32.

Nakanishi A, Moriya F, Hashimoto Y. Effects of environmental conditions to which nails are exposed on DNA. Leg Med 2003;5(1):194-7.

Oliveira RN, Daruge E, Galvão LCC, Tumang AJ. Contribuição da Odontologia legal à Identificação Humana Post-Mortem. Rev Bras Odontol 1998; 55(2):117-22.

Oliveira RN, Galvão LCC, Machado SR, Cardoso LM, Souza SB. Determinação do sexo por análise quantitativa da mandíbula. Revista do Conselho Regional de Pernambuco 1999;2(1):117-22.

Oliveira RN, Nunes FD, Anzai EK, Daruge E, Mesquita RA, Ozaki NA et al. Population studies on the Y-chromosome of loci DYS390, DYS391 and DYS393 in Brazilian subjects and its use in human identification. J Forensic Odontostomatol 2002;20(1):6-9.

Opel KL, Chung DT, Drabek J, Tatarek NE, Jantz LM, McCord BR. The Application of Miniplex Primer Sets in the Analysis of Degraded DNA from Human Skeletal Remains. *J Forensic Sci* 2006;51(2):124-31.

Organização Mundial de Saúde. Sociedade, violência e saúde: uma reflexão. São Paulo: Santos; 1995.

Organización Panamericana de La Salud. Establecimiento de um sistema de atención de victimas em massa. Disponível em: URL:<http://www.paho.org/spanish> [2006 fev. 24].

Otto PG, Otto PA, Frota-Pessoa A. Genética Humana e clínica. São Paulo: Roca; 1998.

Ozaki NA. Determinação da frequência de genes de algumas regiões hipervariáveis do genoma humano para estudo do vínculo genético familiar em caucasiano brasileiros [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 1999.

Paim JS, Costa MCN, Mascarenhas JCS, Silva LMV. Distribuição espacial da violência:mortalidade por causas externas em Salvador (Bahia), Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 1999;6(5):321-32.

Pardini VC, Ferreira ACS, Gomes KB, Rodríguez SLB. Uso do DNA proveniente de polpa dentária para identificação humana – Relato de caso e técnica. *Rev CROMG* 2001;7(1):33-5.

Pashinian GA. A mathematical model of the relief of the hard palate and the possibility of its use in personal identification. *Sud Med Ekspert* 1993;36(3):17-21.

Pena SDJ. Breve introdução às impressões digitais de DNA. *Rev Brás Genet* 1993; 16(3):856-7.

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

Pinheiro MFP. Genética e Biologia Forense e Criminalística. In: Noções Gerais sobre outras ciências forenses. Portugal: Faculdade de Medicina da Univ. do Porto, 2004.

Possas C. Epidemiologia e sociedade: heterogeneidade estrutural e saúde no Brasil. São Paulo: Hucitec; 1989.

Pretty IA, Sweet D. A look at forensic dentistry – part 1: the role of teeth in the determination of human identity. *Brit Dent J* 2001;190(7):359-66.

Pretty IA, Webb DA, Sweet D. The design and assessment of mock mass disasters for dental personnel. *J Forensic Sci* 2001;46(1):74-9.

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

Pueyo M, Roldangarrido V, Sanchez JAS. *Odontologia legal y forense*, Barcelona: Masson; 1994.

Rabl W, Ambach E, Tributsch W. Postmortem changes after 50 years immersion (1939 reconstructed suicide). *Beitr Gerichtl Med* 1991;49:85-9.

Reis JC, Fradique FS. Significações sobre causas e prevenção das doenças em jovens adultos, adultos de meia idade e idosos. *Psicologia* 2003;19(1):47-57.

Remualdo VR, Nunes MH, Melani RH, Hirata MH, Oliveira RN. Análise do STR-F13A01 e MPSs do mtDNA para fins de identificação humana: comparação de três métodos de extração de DNA de dentes submetidos ao calor. *Rev Pós Grad* 2005;12(4):437-43.

Rissech C, García M, Malgosa A. Sex and age diagnosis by ischium morphometric analysis. *Forensic Sci Int* 2003;135(3):188-96.

Rivero ERC, Valenzuela MGS, Sousa SCOM, Nunes FD. Método de extração de DNA de material arqueológico pelo acetato de amônio e pelo isopropanol. *Pesq Odont Bras* 2002;16:210.

Roccazzelo AM, Tringali G, Barbaro A, Comaci P, Insirello E. Simultaneous estimation of a Y-specific fragment and X-specific fragment and sex determination of forensic studies in real time PCR. *Forensic Sci Int* 2004;146:5165-6.

Rumjanek FD, Rinzler CMC. Os exames de DNA nos tribunais. *Ciência Hoje* 2001; 169(29):24-30.

Saliba CA. Contribuição ao estudo do dimorfismo sexual, através de medidas do crânio [Tese de Doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas; 1999.

Sampaio CMA. Investigação do sexo através de medidas crânio-faciais [Tese de Doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 1999.

Santos CF, Sakai VT, Machado MAAM, Shippers DN, Greene AS. Reverse Transcription and Polimerase Chain Reaction: Principles and Applications in Dentistry. J Appl Oral Sci 2004;12(1):1-11.

São Paulo. Resolução SSP 194 de 2 de junho de 1994. estabelece normas para coleta e exame de materiais biológicos para identificação humana. Diário Oficial do Estado, São Paulo, 2 jun. 1999. Poder Exec., Seção I, p.3.

Sarnoff DSS. Titanic ran into iceberg, sinking fast. Disponível em: URL:<http://www.naufragios.com.br> [2006 jul. 8].

Schwark NVW, Bosinski H, Timme SR. What do the X and Y chromosomes tell us about sex and gender in forensic case analysis? J of Clin Forensic Med. Disponível em: URL:<http://www.sciencedirect.com> [2006 dez. 8].

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

Shadrach B, Commane M, Hren C, Warshawsky I. A Rare Mutation in the Primer Binding Region of the Amelogenin Gene Can Interfere with Gender Identification. J Mol Diagn 2004;6(4):763-70.

Shafer J. Sobre o erro de reconstruir Nova Orleans. Folha de São Paulo 2005 set. 18;36.

Silva LAF, Passos NS. DNA forense: Coleta de Amostras Biológicas em Locais de Crime para Estudo do DNA. Maceió: Ed UFAL; 2002.

Sivagami AV, Rao AR, Varshey U. A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian population. Forensic Sci Int 2000;110:107-15.

Smith BC, Holland MM, Swett DL, Dizinno JA. DNA and the Forensic Odontologist. In: Bowers CM, Bell GL. Manual of forensic odontology. 3 ed. Ontario: Manticore Publisher; 1997. cap 10, p. 283-298.

Souza ER. Homicídios no Brasil: o grande vilão da saúde pública na década de 80. Cadernos Saúde Publica 1994;10(1):45–60.

Steinlechner M, Berguer M, Niederstatter H, Parson W. Rare failures in the amelogenin sex test. Int J Legal Med 2002;116:117-20.

Steinman EH, Vasconcellos EM, Ramos JL, Nahas MV. Epidemiologia dos acidentes no surf no Brasil. Rev Bras Med Esporte 2000;6(1):9-15.

Strachan T, Read A. Genética molecular humana. 2º ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.

Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. BioTechniques 1993;15: 637-641.

Suomionem PB, Korpela R. Impact of age, submersion time and water temperature on outcome in near-drowning. Resuscitation 2002;52:247-54.

Szpilman D. Definitions of drowning and other water-related injuries. The epidemiology of drowning (including definitions). Task force on the epidemiology of drowning. Disponível em: URL: <http://www.drowning.nl> [2006 out. 02].

Szpilman D, Orlowski PJ. Afogamento. Rev Soc Cardiol 2001;2:390-405.

Sweet D, Dizzino JA. Personal identification through dental evidence – tooth fragments to DNA. J Calif Dent Assoc 1996;24(5):35-42.

Sweet D, Hildebrand D. Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding. J Forensic Sci 1998;43(6):1199-202.

Sweet D, Hildebrand D, Phillips DRT. Identification of skeleton using DNA from teeth and PAP smear. J Forensic Sci 1999;44(3):630-3.

Sweet D. Human bite mark evidence. In: Willems G. Forensic Odontology: proceedings of the european IOFOS millenium meeting. Belgium: Leuven University Press; 2000. p.75-9.

Sweet, D; Lorente, M; Lorente, JA; Valenzuela, A; Villanueva, E. An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. J Forensic Sci 1997;42:320-2.

Sweet D, Lorente M, Valenzuela A, Alvarez JC. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. Forensic Sci Int 1996;83(3):167-77.

Sweet, D; Shutler, GG. Analysis of salivary DNA evidence from a bite mark on a body submerged in water. J Forensic Sci 1999;44(5):1069-72.

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

Sweet DJ. Why a dentist for identification? Dent Clin North Am 2001;45(2):237-51.

Tsuchimochi T, Iwasa M, Maeno Y, Koyama H, Inoue H, Isobe I, et al. Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chomosomal alphoid repeat and short tandem repeats. Am J Forensic Med Pathol 2002;23(3):268-71.

Urbani C, Lastrucci RD, Kramer B. The effect of temperature on sex determination using DNA-PCR analysis of dental pulp. J Forensic Odontostomatol 1999;17(2):35-9.

Verbovaya LV, Ianov PL. Sexing deoxyribonucleic acid (DNA) on DNA Fingerprint gel: an internal control for DNA fingerprint evidence. J Forensic Sci 1991;36(4):256-63.

Vieira SJA, Billerbeck AEC, Iwamura ESM, Cardoso LA, Munoz DR. Post-mortem forensic identity testing: application of pCR to the identification of fire victim. São Paulo Med J 2000;118(3):75-77.

Vogel F, Motulsky AG, Motta PA. Genética humana: problemas e abordagens. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Vu NT, Chaturvedi AK, Canfield DV. Genotyping for DQA1 and PM loci in urine using PCR-based amplification: Effects of sample volume, storage temperature, preservatives, and aging on DNA extraction and typing. *Forensic Sci Int* 1999;102:23-34.

Walker MR, Rapley R. Guia de rotas na tecnologia do gene. São Paulo: Atheneu; 1999.

Walsh SJ. Recent advances in forensic genetics. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4:31-40.

Wanderley RF. O acidente do vôo gol 1907 [diapositivo]. Maceió: Brasil Forense; 2006. 87 diapositivos, col.

Weber JL. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2002;71:854-862.

Weeden VW, Swarnerv SL. Exames forenses de identidade por análises de DNA. In: Hery JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. São Paulo: Manola; 1999.

Wei H, Zhao Q, Shengbin L. Genetic Polymorphism for the PowerPlex 16 System from the Chinese Tujia Ethnic Minority Group. *J Forensic Sci* 2006;51(3):125-32.

Yamaguchi T, Yamada Y, Ohtani S, Nagao M, Takatori T, Ohira H. et al. Two cases of personal identification from dental information. *Japanese J Legal Med* 1997;51(4):324-330.

Yoshida M, Suno M, Asari M, Ogawa K, Awaya T, Shimizu K, et al. Sex identification from DNA in old teeth. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2005;80(2):191-9.

GLOSSÁRIO

Ácido desoxirribonucléico (DNA) – Molécula que codifica a informação genética em todas as espécies, com exceção dos vírus de RNA, controla o funcionamento e a divisão celular e tem a capacidade de se auto-duplicar passando de uma geração para a seguinte.

Alelo – Formas alternativas de um gene ou STR em um dado locus.

Amplificação – Aumento do número de cópias de fragmentos específicos do DNA.

Base nitrogenada – Uma molécula pequena que compõe o nucleotídeo e pode ser de quatro tipos no DNA: adenina, guanina, citosina e timina.

Cromossomo – Estrutura composta de uma molécula muito longa de DNA e proteínas associadas que carregam parte – ou toda – informação hereditária de um indivíduo.

Degradação – Quebra ou destruição do DNA por meios físicos ou químicos.

Desoxirribose – Molécula de açúcar que compõe os nucleotídeos do DNA.

Eletroforese – Migração das partículas de uma solução coloidal sob influência de um campo elétrico.

Enzima – Proteína que catalisa uma reação química específica.

Fenótipo – Caráter observável de uma célula ou organismo.

Gel – Matriz (usualmente agarose ou poliacrilamida) usada na eletroforese para separar moléculas.

Gene – Uma porção do DNA que contém em sua sequência de bases a informação específica para síntese de uma cadeia polipeptídica.

Genoma – Informação genética total carregada por uma célula ou organismo.

Genótipo – Constituição genética de uma célula ou organismo.

Heterozigoto – Indivíduo (ou genótipo) com dois alelos diferentes em um dado locus de cromossomos homólogos.

Hibridização – Processo pelo qual duas fitas complementares de ácidos nucleicos formam uma dupla hélice, através do pareamento de bases complementares.

Homozigoto – Indivíduo (ou genótipo) com dois alelos idênticos em um dado locus de cromossomos homólogos.

Lise celular – Ruptura das membranas celulares para liberar os componentes citoplasmáticos ou nucleares intracelulares.

Locus – Posição de um gene em um cromossomo.

Nucleotídeo – Constituído por uma molécula de açúcar, uma base nitrogenada e um grupo fosfato ligado ao seu átomo de carbono 5' ou 3'.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) – Técnica para amplificação de regiões específicas do DNA, através da variação de temperatura.

Polimorfismo – Regiões de variação genética que servem de base para variação entre os indivíduos.

Primer – Pequena sequência de DNA conhecida e sintetizada, utilizada como iniciador da PCR.

Taq DNA polimerase – Enzima termoestável catalisadora da reação de síntese de novas fitas de DNA. É obtida do microrganismo *Thermus aquaticus*.

Testes de proficiência – Testes para avaliar a competência de técnicos e a qualidade do desempenho do laboratório.

A INFLUÊNCIA DO MEIO AQUÁTICO NOS PROCESSOS DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL (RECUPERAÇÃO DO DNA)

Você está sendo convidado (a) para participar de um estudo de pesquisa. Antes de decidir se vai ou não participar, é importante que você entenda o motivo desta pesquisa estar sendo realizada e o que ela envolve, por isso, leia cuidadosamente as informações seguintes.

A Odontologia Legal ou Forense tem como finalidade aplicar os conhecimentos da ciência odontológica a serviço da justiça, principalmente com referência à identificação. Em casos de corpos esqueletizados ou em estado de decomposição avançado, o estudo do DNA pode fornecer valiosa contribuição no processo de identificação humana.

A realização deste trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de recuperação do DNA de dentes humanos submetidos à imersão em água doce e água salgada. Para isto, precisamos da doação de dois dentes e de uma amostra de saliva de cada participante da pesquisa, para obtenção e posterior análise do DNA.

Vale ressaltar que para coleta da saliva o pesquisador utilizará para cada participante, materiais descartáveis ou estéreis e paramentação como luvas, máscaras, gorros e jaleco, evitando assim contaminação.

O principal benefício desta pesquisa é a possibilidade de identificação de corpos encontrados na água pelo DNA obtido do dente. Informamos ainda que a

coleta de dados será feita por numeração, a fim de que seja assegurada a privacidade dos participantes, quanto aos dados confidenciais envolvidos.

Não está prevista qualquer forma de indenização referente a possíveis danos, visto que a pesquisa será somente laboratorial (trabalharão apenas fora da minha boca), sendo a avaliação da necessidade de extração feita por outros profissionais, não envolvidos no presente trabalho.

É importante informar que os resultados deste trabalho farão parte de pesquisa integrante de Dissertação de Mestrado, serão publicados em forma de artigo científico em periódico nacional ou internacional e apresentados em congressos.

Você não é obrigado(a) à participar da pesquisa. Só participará se você quiser. Se desejar participar, deverá assinar este formulário em duas vias e manter uma cópia com você. Se decidir participar, mas durante a pesquisa mudar de idéia, poderá desistir a qualquer momento, sem que isto lhe cause algum tipo de punição.

Em caso de dúvidas ou caso deseje obter mais alguma informação, você pode entrar em contato com os pesquisadores Rogério Nogueira de Oliveira ou Jamilly de Oliveira Musse no telefone: (11) 30917891 (Departamento de Odontologia Social da FOUSP).

Após ter lido, os esclarecimentos prestados anteriormente no presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estou plenamente de acordo em participar do presente estudo, concordando que os meus dentes e a minha saliva sejam utilizados na pesquisa: A Influência do Meio Aquático nos Processos de Identificação Humana: Estudo Epidemiológico e Laboratorial (Recuperação do DNA), estando ciente de que os resultados serão publicados para difusão e progresso do conhecimento científico e que a minha identidade será preservada.

Por ser verdade, firmo o presente.

Data:____/____/____

Nome por Extenso:_____

Assinatura:_____

Assinatura do Pesquisador:_____

APÊNDICE B – Avaliação Clínica das Unidades Dentárias

PARTICIPANTE	DENTE – ÁGUA SALGADA	DENTE – ÁGUA DOCE
1	Molar superior (hígido)	Pré-molar inferior (hígido)
2	Incisivo inferior (cárie mésio-distal)	Incisivo inferior (cárie mésio-distal e cervical)
3	Canino inferior (hígido)	Incisivo inferior (hígido)
4	Molar superior (cárie ocluso-mesial)	Pré-molar superior (cárie ocluso-mesial)
5	Canino inferior (cárie mésio-distal)	Incisivo superior (cárie mésio-distal)
6	Molar inferior (cárie mésio-distal)	Pré-molar inferior (cárie extensa na mesial)
7	Pré-molar superior (hígido)	Pré-molar superior (hígido)
8	Canino superior (fratura lingual)	Incisivo inferior (hígido)
9	Pré-molar superior (cárie cervical)	Pré-molar superior (cárie cervical e distal)
10	Molar inferior (hígido)	Molar inferior (hígido)
11	Pré-molar superior (hígido)	Pré-molar superior (hígido)
12	Incisivo inferior (hígido)	Incisivo inferior (hígido)
13	Pré-molar superior (hígido)	Pré-molar superior (hígido)
14	Incisivo inferior (hígido)	Incisivo inferior (hígido)
15	Molar inferior (restauração de amálgama mésio-ocluso distal)	Molar inferior (restauração de amálgama mésio-ocluso-distal)
16	Molar superior (hígido)	Molar superior (cárie ocluso-mesial)

17	Molar inferior (hígido)	Molar inferior (cárie ocluso-mesial)
18	Incisivo inferior (hígido)	Incisivo inferior (desgastado)
19	Pré-molar inferior (hígido)	Canino superior (cárie mesial)
20	Pré-molar inferior (hígido)	Pré-molar inferior (hígido)

APÊNDICE C – Rendimento Médio, em Gramas, de Pó de Dente após Pulverização

PARTICIPANTE	DENTE – ÁGUA SALGADA	DENTE – ÁGUA DOCE
1	0,25	0,25
2	0,156	0,115
3	0,25	0,115
4	0,25	0,24
5	0,25	0,25
6	0,248	0,26
7	0,248	0,241
8	0,25	0,25
9	0,19	0,25
10	0,175	0,26
11	0,26	0,15
12	0,19	0,26
13	0,24	0,25
14	0,25	0,17
15	0,26	0,25
16	0,25	0,25
17	0,25	0,25
18	0,12	0,13
19	0,16	0,25
20	0,25	0,25

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 180/05**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*A influência do meio aquático nos processos de identificação humana: estudo epidemiológico e laboratorial (recuperação do DNA)*", de responsabilidade da Pesquisadora **Jamilly de Oliveira Musse**, sob orientação do Professor Doutor **Rogério Nogueira de Oliveira**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 07 de dezembro de 2005

Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Protocolo de Extração para Amostras de Células Bucais (FTA)

1. Coleta das células bucais, com swab estéril;
2. Aplicação no cartão FTA;
3. Corte de três pedaços do cartão de 1,2 mm;
4. Colocar o papel em um eppendorf com capacidade para 250ul, juntamente com 200ul de reagente FTA no tubo. Lava 3X com o reagente do FTA por 5 minutos, em temperatura ambiente, misturando eventualmente;
5. Remover o máximo possível o reagente através de pipeta;
6. Adicionar 200ul de TE. Lava 2X, por 5 minutos;
7. Remover o máximo possível o TE através de pipeta;
8. Secar na estufa com temperatura baixa (50°C), por uma hora. A estufa e os tubos devem estar abertos;
9. Põe no freezer (máximo 1 semana);
10. Realização do PCR.

ANEXO C – Protocolo de Extração para Amostras de Dente (Hochmeister, Rudim e Ambach, 1998)

1. Coleta e extração inicial (1º dia)

- Colocar até 0,25g de dente em tubo eppendorf;
- Adicionar 700µL do tampão de lise;

Reagente	Para 50 mL	Para 100 mL
10mM Tris pH 8,0	0,5mL Tris pH 8,0 1M	1mL Tris pH 8,0 1M
10mM EDTA	0,5mL EDTA 1M	1mL EDTA 1M
0,1M NaCl	5mL NaCl 1M	10mL NaCl 1M
2% SDS	1g	2g

- Adicionar 35µL de Proteinase K (20 mG/ml);
- Incubar “overnight” à 56° C;

2. Extração propriamente dita (2º dia)

- Inativar proteinase K por 10 min a 95° C;
- Acrescentar 700µL de fenol tamponado pH 8,0;
- Deixar homogeneizando por 5 min;
- Centrifugar 3000 rpm por 30 min;
- Transferir o sobrenadante para outro tubo;
- Acrescentar 700µL de fenol/clorofórmio/alcool isoamílico (25:24:1) na mesma quantidade do sobrenadante;
- Centrifugar 3000 rpm por 30 min;
- Remover sobrenadante para outro tubo;

- Acrescentar álcool 100% e acetato de sódio;

Obs: Álcool 100%: 2-3X mais que o sobrenadante (+/- 800µL)

Acetato de sódio 3M: 1/10 do sobrenadante (+/- 60µL)

- Incubar “overnight” a -20° C

3. Ressuspender (3° dia)

- Centrifugar 12000 rpm por 10 min;
- Remover o álcool cuidadosamente:usar ponteira de 200mL de depois de 10mL, para retirar o excesso de álcool;
- Colocar 1mL de álcool 70%;
- Centrifugar 12000 rpm por 10 min;
- Remover o álcool cuidadosamente:usar ponteira de 200mL de depois de 10mL, para retirar o excesso de álcool;
- Secar o “pellet” deixando-o em forno aquecido previamente a 65° C por 30 min até secar bem;
- Ressuspender com 20µL de TE;
- Deixar 10 min em banho maria a 65° C;
- Colocar no freezer até a realização da PCR.

ANEXO D – Protocolo do Gel de Agarose 1,0%

1. Preparação da cuba;
2. Pesar 300mg de agarose;
3. Acrescentar 30ml TBE à 0,5 %;
4. Aquecer a mistura no aparelho de microondas por cerca de 2 minutos, até que a solução fique transparente;
5. Verter o preparado na cuba eletroforética;
6. Posicionar os pentes;
7. Aguardar cerca de 30 minutos até a polimerização do gel;
8. Remover os pentes e o gel está pronto para uso.

ANEXO E – Protocolo do gel de agarose 1,5%

1. Preparação da cuba;
2. Pesar 450mg de agarose;
3. Acrescentar 30ml TBE à 0,5 %;
4. Aquecer a mistura no aparelho de microondas por cerca de 2 minutos, até que a solução fique transparente;
5. Verter o preparado na cuba eletroforética;
6. Posicionar os pentes;
7. Aguardar cerca de 30 minutos até a polimerização do gel;
8. Remover os pentes e o gel está pronto para uso.

ANEXO F – Protocolo do Gel de Poliacrilamida 8%

1. Lavagem e montagem das placas;
2. Preparo do protogel: Dissolver em 100 ml de água 29g de acrilamida e 1g de bisacrilamida; aquecer a solução a 37°C para dissolver os componentes quimicamente;
3. Misturar 8mL do protogel; 23,7mL de água destilada; 8mL de TBE 5X; 280µL de persulfato de amônia e 14µL de TEMED;
4. Verter imediata e delicadamente a solução entre as placas. Não permitir a formação de bolhas;
5. Inserir o pente;
6. Verificar se está vazando gel pelas laterais;
7. Permitir a polimerização do gel por 30-60 minutos, acrescentando a solução em caso de ocorrência de retração.

ANEXO G – Protocolo de Revelação com Prata

SOLUÇÃO DE FIXAÇÃO

Etanol 96%	105mL
Acido acético glacial	5mL
Água destilada	890mL

SOLUÇÃO DE IMPREGNAÇÃO

Ag NO ₃	1,7g
Água destilada	1000mL

SOLUÇÃO DE REVELAÇÃO

NaOH	4,5g	9g
Água destilada	150mL	300mL
Formaldeido	410μL	820μL

Procedimento:

1. Transferir o gel de poliacrilamida para uma cuba contendo 200mL da solução de fixação;
2. Manter a cuba sob agitação por 20 minutos;
3. Descarte da solução de fixação;
4. Fazer uma rápida lavagem do gel com água;
5. Adicionar 200mL da solução de impregnação;
6. Manter a cuba sob agitação por 20 minutos;

7. Descarte da solução de impregnação;
8. Fazer uma rápida lavagem do gel com água;
9. Acrescentar 200mL da solução de revelação por 20 min sob agitação;
10. Descarte da solução de revelação;
11. Lavagem com água (solução de glicerol 30%) por 10 min com agitação;
12. Descarte da água;
13. Secagem do gel.