UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

SUZANA PAPILE MACIEL CARVALHO

**Avaliação da qualidade do DNA obtido de saliva humana
armazenada e sua aplicabilidade na identificação forense em
Odontologia Legal**

BAURU
2009

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

SUZANA PAPILE MACIEL CARVALHO

Avaliação da qualidade do DNA obtido de saliva humana armazenada e sua aplicabilidade na identificação forense em Odontologia Legal

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ortodontia e Odontologia em Saúde Coletiva.

Área de concentração: Odontologia em Saúde Coletiva
Orientador: Prof. Dr. Arsenio Sales Peres

BAURU

2009

C253a Carvalho, Suzana Papile Maciel
Avaliação da qualidade do DNA obtido de saliva humana armazenada e sua aplicabilidade na identificação forense em Odontologia Legal / Suzana Papile Maciel Carvalho. -- Bauru, 2009.
189 p.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Arsenio Sales Peres

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 04 de fevereiro de 2009.

E-mail: sumaciel@uol.com.br

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 14/2007
Data: 31/10/ 2007

Epígrafe

Ser livre

“Sou livre quando amo o que faço;
Sou livre quando amo as coisas e os homens;
Porque o amor os faz mais livres e eu, menos escravo;
Sou livre quando aceito e defendo a liberdade dos outros;
Sou livre quando a minha liberdade vale mais que o dinheiro;
Sou livre quando consigo em tudo descobrir bondade;
Sou livre quando aceito que o mais importante é minha consciência;
Sou livre quando me sei dar sem exigir possuir;
Sou livre quando creio que Deus é maior que meu pecado;
Sou livre quando sei que, na hora do fracasso,
é sempre tempo de recomeçar;
Sou livre quando creio firmemente num homem como eu que,
depois de ter morrido, continua a viver para sempre;
Sou livre quando sou capaz de amar o instante da vida que tenho nas mãos;
Sou livre quando estou consciente de que nem tudo me convém;
Sou livre quando, acorrentado, continuo a gritar o direito à minha liberdade;
Sou livre quando sou capaz de aceitar o que os outros me oferecem;
Sou livre quando reconheço as minhas limitações;
Sou livre se tenho a capacidade de me transformar;
Sou livre quando tento fazer do meu trabalho um ato de criação!”

Dedicatória

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente à Deus

Minha eterna gratidão à *Deus*, minha fonte de vida, paz e alegria!!!

Deus de minha confiança, que tem me fortalecido e me sustentado!

Sem o *Senhor* nada seria possível, nada seria alcançado, nada seria concretizado! Como é bom sentir tua presença, teu cuidado, principalmente nas situações difíceis!

Obrigada, *Senhor*, por sempre me acompanhar, em todos os momentos, ajudando-me a superar os desafios que a vida me proporciona.

Obrigada, meu Deus, por ter me dado uma linda família e amigos maravilhosos.

Por que Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas! A Ele seja a Glória!

(Bíblia Sagrada, Romanos 12: 36)

“SENHOR...é tão bom sonhar teus sonhos;

É tão bom viver teus planos;

E conhecer a graça de pertencer a Ti, Deus Fiel!!

***É tão bom fechar meus olhos e contemplar com minha fé todas as Tuas palavras
e Tuas promessas para mim;***

É maravilhoso ver seu cuidado de Pai para comigo”.

Dedico este trabalho aos meus pais, Sérgio (in memorian) e Dirce

Obrigada por tudo o que fizeram por mim, por terem me apoiado, sempre com muito amor, nos bons e nos maus momentos!

Obrigada por nunca medirem esforços em me ajudar!

Sou grata por terem me ensinado a enfrentar as dificuldades e a batalhar pelos meus ideais!

Agradeço por toda a segurança e pela proteção que me proporcionaram!

Devo todas as minhas conquistas a vocês!! Amo vocês!!!

Mãe, muito obrigada por dedicar sua vida a nós, suas filhas, e por todos os cuidados que nos dispensou. Você investiu e torceu por nós sempre!!!

Você é um exemplo de força, de dedicação e de superação!

Não concluiria este trabalho sem a sua ajuda,

Sou eternamente grata pelo amor que tem pela *Manuela* e por todo o carinho dispensado a ela desde seu nascimento e, principalmente, pelos momentos que cuidou dela para que eu pudesse concluir este trabalho!

Pai, sou grata a Deus por tudo o que você foi e continuará sendo em minha vida,

Homem que eu admiro muito, exemplo de honra, sabedoria, sensibilidade, generosidade, integridade, amor, alegria e inteligência,

Não sai de minha mente seu olhar calmo e amoroso, sempre pronto a me ouvir e a me aconselhar;

Você me mostrou o caminho da vida; foi muito bom ter convivido com você,

Obrigada por ter me transmitido tudo o que uma pessoa precisa para viver e ser feliz!!!

Pai e Mãe,

Quero dizer-lhes que valeu e continuará a valer muito!!

A presença de vocês estará para sempre na minha vida, aonde quer que eu vá, aonde quer que eu esteja.

Vocês estarão para sempre no meu coração e na minha mente.

(Legrand)

Dedico este trabalho a meu esposo, Roberto Fernandes Carvalho Júnior

Obrigada por compartilhar comigo todos os momentos de vida pessoal e profissional!! Obrigada pelo apoio a mim oferecido quando conversamos sobre a possibilidade do meu ingresso nesse curso de mestrado. Agradeço a Deus por tê-lo colocado em minha vida e por permitir-nos viver nossa história!!

Quando paro para pensar em tudo o que temos vivido juntos durante esses anos, tudo o que compartilhamos, nosso lar, nossa família, nossa filha, nossa vida profissional, os momentos felizes e, principalmente os momentos difíceis, em que choramos juntos, e que não foram poucos, não posso deixar de sentir orgulho de nós...

Pela coragem que tivemos para enfrentar os desafios que nos chegaram, pela convicção de atravessá-los juntos, e pelo amor, o mais belo e forte amor, para fazer tudo isso valer.

Muito obrigada por tudo!!!

***Amo-te tanto, meu amor... não cante
O humano coração com mais verdade ...
Amo-te como amigo e como amante
Numa sempre diversa realidade.***

***Amo-te afim, de um calmo amor prestante
E te amo além, presente na saudade.
Amo-te, enfim, com grande liberdade
Dentro da eternidade e a cada instante...***
(Soneto do amor total- Vinícius de Moraes)

Dedico este trabalho à minha filha, Manuela Maciel Carvalho

“Os filhos são herança do Senhor, uma recompensa que Ele dá”

(Bíblia Sagrada - Salmo 127: 3)

Agradeço imensamente a Deus por ter me dado a oportunidade de ser mamãe de uma criança tão linda e tão doce como você!!

Você veio no momento certo, para preencher minha vida e a de nossa família com muita alegria!! Seu sorriso, seu rostinho, seu abraço, seu beijo... é tão bom ouvir você me chamando de mamãe e pedindo meu colo... Como é maravilhoso cuidar de você, trocar sua fralda, alimentar-lhe, dar-lhe banho, contar-lhe historinhas, cantar com você... Obrigada por me ensinar a ser criança outra vez, a entender a beleza das coisas simples, a aprender a falar com os brinquedos, com os animais e com os amigos imaginários, a amar as pessoas como elas são, a aprender a sorrir até com os olhos... Obrigada por me mostrar a imensidão do amor, vivido com essa intensa emoção!!!

Você é um milagre de Deus!! Amo muito você!!!

***Primeiro senti que outra vida em mim havia
Fiquei em verdadeiro estado de Graça
E muita saúde e força a Deus eu pedia
Mesmo me sentindo muito, muito assustada...***

***Já não era tão menina
E aquela vida dentro de mim
Era muito preciosa
E haveria de vir, eu queria...***

***Seu nome e sexo eu sabia
Disso ninguém duvidava
Pois a convicção com que informava
A todos de sua chegada
Realmente Impressionava...***

***Quando escutei seu coração
Batendo forte que nem um encantado tambor
Pensei: eis aqui, na minha barriga,
O meu grande eterno e insubstituível amor...***

***Ah! Minha filha,
Muita amada e querida, que emoção
A alegria me invadiu sem pedir licença
Envolveu-me num momento sublime, perfeito e só meu
Momento, aquele que, agora, em forma de poesia,
Passa a ser também seu...***

(Presente Divino- Ysolda Cabral)

Dedico este trabalho às minhas irmãs

Ana Silvia Maciel Chaves e Denise Papile Maciel Dal Col

Obrigada pelas grandes amigas que são! Sou grata a Deus por vocês e pelo laço de amizade de nos une!!! Obrigada por me ajudarem e me apoiarem em todos os momentos da minha vida!! Agradeço todo o amor de vocês pela Manuela e por todas as vezes que cuidaram dela por mim!!

Dizer que admiro e amo vocês é muito pouco, porque uma amizade como a nossa merece mais, merece ser descrita no infinito para que todos pudessem entender o que realmente ela representa na minha vida. Quero agradecer a Deus pela amizade de vocês, dizer a Ele que vocês são um grande presente que recebi em minha vida! Amo vocês!!

Dedico este trabalho aos meus sobrinhos,

*Paulo Bruno Maciel Chaves, Dayane Maciel Chaves, Vítor Carvalho de
Assis e Lucas Carvalho de Assis*

Obrigada por vocês existirem e trazerem tantas alegrias à minha vida!!!

Com vocês comecei a ser mãe, alegrando-me com suas alegrias e chorando com os erros, cuidando de vocês... enfim, amando-os!!!

Paulo e Day, obrigada pela confiança que sempre depositaram em mim, vocês não imaginam o quanto são importantes para mim e quanto os amo com amor de mãe...

Vítor e Lucas, obrigada pelo carinho que demonstram por mim...

Paulo, Day, Vítor e Lucas, que Deus lhes acompanhem e contem sempre comigo!!! Amo vocês!!!

***Saibam quantos estes meus versos virem
que te amo
do amor maior
que possível for".
(Oswald Andrade)***

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

Àqueles que, quando deveriam ser professores, foram mestres, transmitindo-me seus conhecimentos e experiências e que, quando deveriam ser mestres, foram amigos e, em sua amizade me compreenderam e me incentivaram a seguir meu caminho, meus profundos agradecimentos!!

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Arsênio Sales Peres

Agradeço-lhe por ter me recebido como sua orientada neste curso de mestrado. Obrigada pela confiança depositada em mim! Sou grata pela compreensão, amizade e pelo carinho que demonstrou diante das dificuldades que vivi nesse período. Obrigada por me apresentar à Odontologia Legal e pelas oportunidades que me proporcionou!! Muito obrigada pelos ensinamentos transmitidos e por me incentivar na busca de meus ideais!! Meu profundo respeito e meus maiores agradecimentos serão pouco diante do que me ofereceu!! Deus lhe abençoe!

Agradecimento especial à Co-orientadora deste trabalho,

Prof.^a Dr.^a Lucilene Airlho Ribeiro Bicudo

Obrigada pelo carinho com qual me acolheu quando pouco me conhecia e pela dedicação com que me conduziu! Obrigada pela paciência em ensinar algo novo para mim, e pela competência e dedicação demonstradas na conclusão desse trabalho!! Nessa nossa convivência, com certeza, nasceu uma bonita amizade!! Deus lhe abençoe muito e retribua em dobro tudo o que fez por mim!!! Muito obrigada!!

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva

Nossa parceria começou com um objetivo profissional, elaboração de projetos, artigos, etc, e acabou se transformando numa grande amizade! Além de amigo, tenho-lhe como mestre, pois me ajudaste em muitos trabalhos, inclusive nesse, cuja idéia originou-se de sua tese de doutorado. Agradeço a paciência e o carinho desmonstrado desde o início de nossas atividades profissionais, bem como a prontidão em me ajudar! Obrigada pelas oportunidades que me proporcionou e pelas palavras de incentivo diante das dificuldades. Agradeço por sempre torcer por mim! Obrigada pela confiança que sempre depositou em mim!! Conte sempre comigo!! Deus lhe abençoe!!

Agradecimentos

Agradecimentos

“Durante todos esses anos várias pessoas colaboraram e me ensinaram muitas coisas... E confesso que não aprendi tudo que queria, mas aprendi tudo que pude. Andei muito tentando alcançar este momento. E agora quero revelar meus sinceros agradecimentos às pessoas que me fizeram sorrir, chorar, sentir, viver... crescer...”

À Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, que me acolheu e me propiciou uma formação na graduação e na pós-graduação.

Ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Crânio- Faciais de Bauru, Centrinho, e ao departamento de Odontopediatria, pela excelente formação que me deram na pós-graduação.

Aos participantes da minha pesquisa, pela colaboração e receptividade, sem a qual este trabalho não teria sido concretizado.

Ao Prof. Dr. José Roberto de Magalhães Bastos pela cordialidade em atender minhas solicitações e, principalmente por ter liberado a vaga no berçário para que a Manuela recebesse cuidados especiais enquanto eu desenvolvia esse trabalho.

À Prefeitura do Campus da Faculdade de Odontologia de Bauru, por ter permitido que a Manuela ocupasse uma vaga no Berçário Leite e Amor.

A todos os funcionários do Berçário, especialmente às tias que cuidaram com muito carinho da Manuela enquanto eu desenvolvia este trabalho e às outras mães com as quais convivi nos horários das mamadas, Cris (Luíza), Camila (Helena), Paulinha (Ana Luíza), Ná (Thales) e Lucilene (Beatriz).

A todos os professores do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva da FOB-USP, em especial àqueles com os quais me envolvi profissionalmente, Prof. Dr. José Roberto de Magalhães Bastos, Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris, Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Helena de Carvalho Sales Peres e Prof^ª. Dr^ª. Magali de Lourdes Caldana, pelos ensinamentos ministrados e pela atenção dedicada a mim.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Social da FOB-USP, pela contribuição em todos os momentos. Especialmente à Silvia Cristina Tonin Costa, sempre pronta a me ajudar, além da amizade a mim demonstrada, a torcida e as orações para que tudo desse certo para minha família, obrigada! Também à Marta Regina Laporacci, pelo carinho e pela colaboração na convocação dos participantes desta pesquisa, à Helena Maria Mancoso Negrão Mantovani, pelo carinho e atenção sempre dispensada à mim e à Rosa Maria Fernandes, pela cordialidade.

Aos colegas do mestrado, bem como aos demais colegas ingressantes nos outros programas em 2007, especialmente àqueles com quem mais convivi e que, de alguma maneira, colaboraram para a execução deste trabalho: César (Césão), que se tornou um grande amigo, Cris, Fábio, Adelson, Maurício, Juliane, Fernanda.

Ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos pela colaboração na elaboração dessa pesquisa, à Vera, à Débora e, todos os integrantes do Departamento pela curta, mas ótima convivência.

Ao Thiago, funcionário do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela enorme ajuda e dedicação na execução do projeto e da primeira etapa desse trabalho, sempre sem medir esforços e com muita paciência para me ensinar.

Ao Laboratório de Genética do Centrinho pela recepção maravilhosa, na pessoa da minha co-orientadora, Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo, a todos os funcionários e alunos a ele ligados, especialmente, à aluna de iniciação científica Leniza Pola, que me ajudou no laboratório, e à funcionária Roseli Zedi Ceide, excelente pesquisadora, pelas opiniões e sugestões que melhoraram muito o trabalho.

À Biblioteca da FOB e aos seus funcionários, pela dedicação e, principalmente, ao Ademir pela colaboração nos comuts e à Rita, pela amizade e pela força transmitida pelas orações e palavras de conforto.

Aos funcionários do xérox da Biblioteca da FOB, Adriana e Salvador, por sempre me atenderem com carinho e pela amizade por mim demonstrada.

À Maristela, sempre pronta a me atender, mesmo fora de horário, pelas orientações com a documentação e pela amizade.

Ao Departamento de Informática, pelo pronto atendimento e pela atenção sempre que precisei.

Às alunas da graduação que participaram de pesquisas comigo, Ana Cláudia, Bianca, Letícia e, principalmente, à Kátia, pela dedicação, sinceridade e amizade que demonstrou por minha pessoa.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Unicamp) por me receber como aluna especial, bem como à Prof^ª. Gláucia Ambrosano, por me aceitar em sua disciplina de Bioestatística.

Aos colegas do curso de mestrado e doutorado em Saúde Coletiva da Unicamp, Piracicaba, pela excelente recepção e pela ótima convivência, especialmente à Camila, ao Théo, à Luciana e à Cláudia, pela amizade demonstrada nas aulas e nos trabalhos que fizemos juntos.

Ao Prof. Antônio Carlos Pereira, da Unicamp (FOP) por me receber de braços abertos como aluna especial em sua disciplina de Metodologia da pesquisa, bem como a enorme colaboração na elaboração de artigos e projetos.

Às amigas de trabalho, Karina, nossa secretária insubstituível e amiga, à Fernanda e à Ana, bem como seus maridos e filhos, minha gratidão pelos bons momentos que passamos juntas e pela compreensão com a divisão de horários e a força no atendimento de meus pacientes.

Ao Pr. Gilson, Shirlei e filhos, pelas orações, mensagens e pelo apoio espiritual a mim, ao Roberto, e à nossa filha Manuela, em todos os momentos.

À Ilma e à Fátima pelos cuidados de mãe e pelo carinho enorme dispensado à Manuela, bem como pela inúmeras vezes que cuidaram dela para que eu pudesse executar esse trabalho! Sem vocês, teria sido muito difícil!

Aos pais do Roberto, Sr. Roberto e D.Marlene, muito obrigada pelo apreço e pelo carinho com que me tratam, bem como por tudo o que fizeram por nós e pela Manuela. Deus lhes abençoe!!

Aos cunhados Sílvio, Renato, Joel e Fabiana, obrigada pela convivência muito agradável, pela ajuda e pela amizade!! Agradeço por fazermos parte da mesma família e sou grata por tudo o que fizeram por mim, pelo Roberto e pela Manuela!

Aos meus tios Inadir, Izabel e Julinho, Orlando, Bela, João, Rose, Paulo, Rubens e aos meus primos, agradeço todo o carinho, amor e atenção dispensados à nós.

Aos primos e grandes amigos Neto, Janice, Lu e Fábio (e ao nenezinho, ainda na barriga) agradeço a intensa amizade, aos momentos que passamos juntos, às baladas, aos passeios, às viagens, enfim, vocês são muito importantes para nós!!

Aos primos e amigos Marcos, Solange, Maurício e Murilo, que nos receberam e nos ajudaram muito quando moramos em Piracicaba. Foi um período corrido, mas muito bom, tenho saudade de nossos churrascos, de nossas saídas e de nossas longas conversas... Muito obrigada pela ajuda e pelo carinho, espero poder, um dia, retribuir tudo o que fizeram por nós!

Aos grandes e verdadeiros amigos, presentes em todos os momentos, através de atos ou, ao menos, em palavras de conforto ou longas conversas, dividindo angústias e sonhos, alegrias e desesperos. Companheiros de baladas, jantares, churrascos, viagens... MUITO OBRIGADO: Dolírio (Bozó), Karen, Carol, André, Letícia, Renato e Anne.

Aos sobrinhos "postiços", do coração, Ísis, Pietra, Luíza, Marina e, ainda na barriga, Rafaela e Diego, agradeço por serem parte de nossas vidas e por nos trazerem tanta alegria!! Amamos vocês!!

A todos os demais que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho e com a minha formação, meus mais sinceros agradecimentos.

Resumo

RESUMO

A saliva pode ser utilizada como fonte eficiente de DNA para técnicas de identificação humana, as quais são aceitas como prova legal, sendo o parecer do profissional superlativo para a formulação da sentença. Esse material pode ser coletado de maneira indolor e não-invasiva e utilizado mesmo quando armazenado em diferentes condições. Este trabalho objetiva avaliar a qualidade do DNA obtido de saliva humana armazenada e sua aplicabilidade da identificação de pessoas. Foram analisadas amostras salivares de n=100 sujeitos da pesquisa, coletadas nas formas de saliva *in natura* e saliva coletada de swab. A saliva foi armazenada à -20°C. Após 7 dias, realizou-se a primeira etapa, quando o DNA foi extraído das 200 amostras de saliva utilizando-se a resina InstaGene (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) e, posteriormente, submetido à PCR e à eletroforese. Após 180 dias de armazenamento da saliva, repetiu-se a mesma técnica da primeira fase, porém em apenas 20 amostras, selecionadas aleatoriamente do total de 100 amostras de saliva coletadas por swab bucal. Os resultados da primeira etapa indicaram que o DNA foi extraído com sucesso em 96% das reações realizadas para as 200 amostras de saliva, fato observado também quando se analisou as amostras em separado, de saliva *in natura* (94%) e saliva advinda do swab (98%). Além disso, não houve diferenças estatisticamente significantes na extração do DNA entre as duas formas de coleta de saliva utilizadas. Na segunda fase, foi possível a detecção do gene alvo nas 20 amostras analisadas (100%). Posteriormente, objetivando-se aprofundar a análise do DNA salivar de maneira mais próxima ao padrão exigido em um processo de identificação, o gene SIX3-2 foi testado nas amostras e também foi feita a digestão do produto da PCR com a enzima de restrição MbO1 para avaliar polimorfismo do gene ADRA-2. Os resultados mostraram que a quantidade e a qualidade do DNA advindo de saliva do swab bucal, bem como as técnicas empregadas estão adequadas à análise forense do DNA. Portanto, a saliva humana é bastante útil como fonte de DNA e pode ser armazenada, em temperatura e condições ideais, para análise posterior.

Palavras-chave: Identificação Humana. Odontologia Legal. Medicina Legal. Criminologia. DNA. Biologia Molecular. Saliva.

Abstract

ABSTRACT

Evaluation of DNA quality obtained from stored human saliva and its applicability in forensic identification in Forensic Dentistry

The saliva can be used as efficient DNA source for human identification techniques in which they are accepted as forensic proof, being the superlative professional's opinion for the sentence formulation. This material can be collected in a painless and noninvasive way and it is used even when stored in different conditions. This paper aims at evaluating DNA quality obtained from stored human saliva and its applicability in people identification. Saliva samples from n=100 research subjects were analyzed. They were collected in two ways: *in natura* and swab. The saliva was stored at the temperature of -20°C. After 7 days, the first phase was performed, when the DNA was extracted from the 200 saliva samples using the InstaGene resin (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and, subsequently, submitted to PCR and electrophoresis. After 180 days of the saliva storage, the same technique used in the first phase was repeated; however, in only 20 samples, selected at random from the total of 100 ones collected from mouth swab. The results of the first phase indicated that the DNA was successfully extracted in 96% of the reactions performed for the 200 saliva samples. This fact was also observed when the separate saliva samples *in natura* (94%) and swab (98%) were analyzed. In addition, there were no statistically significant differences in the extraction of the DNA between the two ways used for collecting saliva. In the second phase, the target gene detection was possible in the 20 samples analyzed (100%). Subsequently, the SIX3-2 gene was tested in the samples with the objective of deepening the salivary DNA analysis as close as the standard required in an identification process. Also, the digestion of the PCR product with the enzyme of MbO1 restriction was performed to evaluate the polymorphism of the ADRA-2 gene. The results showed that the DNA quantity and quality from the mouth swab saliva, as well as the techniques applied are suitable for the forensic analysis of DNA. Therefore, the human saliva is very useful as DNA source and can be stored in ideal temperature and conditions for further analysis.

Keywords: Human Identification. Forensic Dentistry. Forensic Medicine. Criminology. DNA. Molecular Biology. Saliva.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- QUADROS

Quadro 2.1 - Relação entre quantidade mínima da amostra, de DNA e células/organelas que compõem a amostra	103
Quadro 4.1 Concentração de reagentes utilizados na PCR.....	122
Quadro 4.2 - Ciclagem padrão utilizada nas PCRs	123
Quadro 4.3 - Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR.....	125
Quadro 4.4 - Ciclagem padrão utilizada nas PCRs	126
Quadro 4.5 - Reagentes utilizados na digestão com enzima de restrição	127
Quadro 5.1 - Reagentes utilizados na digestão com enzima de restrição	151

- FIGURAS

Figura 5.1 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva in natura. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; colunas 2 - 30, amostras 01 a 29 de DNA de saliva in natura	133
Figura 5.2 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva in natura. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb, colunas 2-8, amostras de 30 a 36 de DNA de saliva in natura e colunas 9-11, controles negativos-água	135
Figura 5.3 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva in natura. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb, colunas 2 e 3, controles positivos (sangue) e colunas 4-30, amostras 37 a 63 de DNA de saliva in natura	135
Figura 5.4 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva in natura. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb, colunas 2-30, amostras 64 a 92 de DNA de saliva in natura	137
Figura 5.5 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva in natura e saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb, colunas 2-10, amostras 92 a 100 de DNA de saliva in natura e colunas 11-31, amostras 01 a 21 de DNA de saliva do swab bucal	137
Figura 5.6 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb e colunas de 2-29, amostras 22 a 50 de DNA de saliva do swab bucal	139
Figura 5.7 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo dos produtos da PCR. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb e colunas de 2-21, amostras 51 a 70 de DNA de saliva de swab bucal	139
Figura 5.8 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb, colunas 2-30, amostras 71 a 99 de DNA de saliva do swab bucal.	141

Figura 5.9 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2, amostras de DNA de saliva do swab bucal	141
Figura 5.10 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-11, amostras de DNA de saliva do swab bucal (amostras: 1, 2, 5, 14,17, 26, 27, 35).....	145
Figura 5.11 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-11, amostras de DNA de saliva do swab bucal (amostras: 53, 55, 58, 60, 61, 63, 65, 67, 77).....	145
Figura 5.12 - Padrão obtido da PCR para amplificação do gene SIX3-2. Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-6, amostras dos produtos da PCR da saliva do swab bucal (amostras: 1, 2, 14, 17 e 26).....	147
Figura 5.13 - Padrão obtido da PCR para amplificação do gene SIX3-2. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-10, amostras dos produtos da PCR da saliva do swab bucal (amostras: 5, 27, 35, 48, 51, 53, 55, 60).....	149
Figura 5.14 - Padrão obtido da PCR para amplificação do gene SIX3-2. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-10, amostras dos produtos da PCR da saliva do swab bucal (61).....	149
Figura 5.15 - Padrão obtido após digestão das amostras de saliva do swab bucal com enzima Mb01 para polimorfismo do gene ADRA-2. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-9, amostras: 1, 2, 17, 26, 35, 51, 55, 58	153

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Sequência dos primers utilizados na amplificação do gene humano que codifica a proteína β -actina	123
Tabela 4.2 -	Sequência dos primers utilizados para a amplificação do gene SIX3-2	126
Tabela 5.1 -	Distribuição de frequências de reações positivas e negativas para a extração de DNA e PCR para as amostras de saliva humana	133
Tabela 5.2 -	Distribuição de frequências de reações positivas e negativas para a extração de DNA e PCR por comparação dos tipos de saliva utilizadas.	133
Tabela 5.3 -	Distribuição de frequências de reações positivas e negativas para a extração de DNA e amplificação por PCR para as amostras de saliva humana coletadas por swab bucal.	143

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1291>CG	Tipo de Polimorfismo
15R	Código da Centrifuga
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
°C	Grau Celsius
A	Adenina
AABB	Associação Americana de Bancos de Sangue
ABO	Sistema sangüíneo ABO
ADRA-2A	Gene
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
Amp-FLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP56	Código do Vórtex Phoenix
B-actina	Beta-actina
C	Citosina
CA	Certificaton Authority
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFO	Conselho Federal de Odontologia
CODIS	Combined DNA Index System
CTLE	Comitê Técnico Especializado de Biologia Molecular
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAase	DNA polimerase
DNAmt	DNA mitocondrial
dNTP	Didesoxinucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
FBI	Federal Bureau of Investigation
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
g	Grama

G	Guanina
GE	General Eletric
GITAD	Grupo Ibero-Americano de Trabalho em DNA
GOL	Gol Transportes Aéreos
H ₂ O	Água
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Crânio-faciais
ICMP	International Commission od Missing Persons
Inc.	Incorporation
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INTERPOL	International Criminal Police Organization
ISFH	Sociedade Internacional de Hemogenética Forense
Ltda	Limitada
Mb01	Enzima de restrição
MD	Maryland
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
Min	Minuto
mL	Mililitro
MLP	Multilocus probes
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MO	Missouri
n	Amostragem
NDNAD	National DNA Database
ng	Nanograma
pb	Pares de base
pg	Picogramas
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico (indicador ácido- base)
pmol	Picomoles
POST	Gabinete de Ciência e Tecnologia do Parlamento Britânico
PTC	Programmable Thermal Controller

PTC	Teste de Feniltiouréia
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
Rh	Sistema sangüíneo Rh
RNAase	RNA polimerase
SBML	Sociedade Brasileira de Medicina Legal
SIX3-2	Gene
SLP	single locus probes
SSP-SP	Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo
SAS	Software Statistical Analysis System
SP	São Paulo
STR	Short Tandem Repeat
SWGDM	Grupo Técnico de Trabalho em Métodos de Análise de DNA
T	Timina
T 2202	Código do Transiluminador ultravioleta
TAM	Táxi Aéreo Marília- Linhas Aéreas
TBE	Tampão Tris/borato/EDTA
U	Unidade de medida
UK	United Kingdom
USP	Universidade de São Paulo
UNESCO	Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e Cultura
USA	United States of American
V	Volts
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	69
2	REVISÃO DE LITERATURA	75
2.1	A IDENTIFICAÇÃO HUMANA E A ODONTOLOGIA LEGAL	77
2.2	BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À IDENTIFICAÇÃO HUMANA: ATUAÇÃO EM ODONTOLOGIA LEGAL	80
2.2.1	DNA: Aspectos Históricos	85
2.2.2	Estrutura do DNA	86
2.2.3	A utilização do DNA em processos de identificação: procedimentos técnicos e cuidados ...	89
2.2.4	Cálculos estatísticos e estudos de frequência	92
2.2.5	Bancos de dados de DNA	94
2.2.6	Técnicas de Biologia Molecular aplicadas à Odontologia Legal	99
2.2.6.1	Amplificação de minissatélites por PCR	99
2.3	UTILIZAÇÃO DA SALIVA NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA.....	101
3	PROPOSIÇÃO	113
4	MATERIAIS E MÉTODOS	117
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	119
4.2	AMOSTRA	119
4.3	PRIMEIRA ETAPA - 7 DIAS	120
4.3.1	Extração do DNA.....	121
4.3.2	Reações da PCR para o gene B-actina	122
4.3.3	Eletroforese e detecção dos produtos de PCR.....	123
4.4	Segunda Etapa – 180 dias	124
4.4.1	Reação da PCR para o gene SIX3-2	124
4.4.2	Digestão com enzima de restrição Mb01 para análise de polimorfismo do gene ADRA-2A	126
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	127
5	RESULTADOS.....	129
5.1	PRIMEIRA ETAPA - 7 DIAS	131
5.2	SEGUNDA ETAPA- 180 DIAS	143
5.2.1	Amplificação do gene B-actina.....	143
5.2.2	Amplificação do gene SIX3-2	147
6	DISCUSSÃO	155
7	CONCLUSÃO	167
	REFERÊNCIAS	171
	ANEXOS.....	185

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A identificação consta dos processos para estabelecer-se a identidade, sendo, portanto, a qualidade que distingue um indivíduo de outro (ALVES, 1956). Nenhuma sociedade poderá existir na qual cada indivíduo não tenha sua identidade assegurada, que o distinga, pessoalmente, nas suas relações comuns. A identidade é a soma dos caracteres físicos permanentes que individualizam uma pessoa, distinguindo-a das demais; raça, gênero, idade, tipo sanguíneo, arco dentário, datiloscopia, prosopografia, etc. Já a identificação caracteriza-se pelo emprego de meios adequados para determinar a identidade ou não identidade. É a descrição de uma pessoa que se quer fazer reconhecer (comunicação verbal¹).

Assim, a identificação dos indivíduos tornou-se imprescindível em todas as esferas das relações humanas, seja ao nível social como jurídico. Através dela, as pessoas podem preservar seus direitos, bem como ter os seus deveres cobrados, quer cíveis, quer penais. A identidade de uma pessoa se faz necessária mesmo após sua morte, para salvaguardar os direitos familiares quanto à herança, quanto à certeza de seu falecimento e ao destino de seu corpo (RIBEIRO, 1993).

Um aspecto importante a ser aclarado trata da distinção entre reconhecimento e identificação. O reconhecimento pode ser entendido como uma identificação empírica, subjetiva, sem o rigor científico, e, normalmente é visual, realizado por parentes e conhecidos da vítima, prática muito suscetível a enganos e falhas. Estas imprecisões ocorrem pelas próprias limitações do método, bem como pelo estado emocional dos responsáveis pelo reconhecimento, causado pela provável perda do ente querido ou mesmo pelo ambiente lúgubre dos institutos médico-legais (OLIVEIRA et al., 1998). Já a identificação estabelece-se pelo uso de técnicas e métodos cientificamente comprovados (OLIVEIRA et al., 1998; SILVA; SALES-PERES, 2004).

A idéia de identidade e identificação é tão antiga quanto o homem. No homem primitivo, já se encontrava marcas e caracteres em suas armas e utensílios, os quais, acreditam-se, tenham servido para identificá-los (ALVES, 1956). No Código

¹ Aula expositiva proferida por Arsenio Sales Peres na Faculdade de Odontologia de Bauru em maio de 2000.

de Hamurabi já havia menção a amputações de partes do corpo como forma de individualização. Nessa época, o processo de identificação confundia-se com a própria punição, e os meios empregados visavam mais identificar aqueles que haviam sido condenados do que propriamente conferir alguma segurança social, como por exemplo, as marcas no corpo usadas em criminosos na Índia, na Grécia, em Roma, na Espanha, na Rússia e na França, nesta conhecidas como a “flor de lis”(DEL-CAMPO, 2006).

Com a evolução científica, por muito tempo foi usado um assinalamento dos caracteres físicos do indivíduo, como: altura, peso etc, mas tudo era relativo, porque as expressões usadas não eram universais e havia variação de termos de pessoa para pessoa. Passou a se usar também a fotografia, que muito auxílio prestou à identificação, pois os caracteres do indivíduo ficavam gravados numa chapa fotográfica. Aqui, porém apareceu um inconveniente, pois uma simples modificação no penteado modificava a fisionomia. Surgiu, então, a necessidade de se desenvolver métodos mais confiáveis e precisos, chegando-se aos processos mais aperfeiçoados (ALVES, 1956).

Atualmente, a identificação é caracterizada pelo uso de técnicas e meios propícios para se chegar à identidade, e pode ser realizada por técnicos treinados (judiciária ou policial) ou por profissionais com conhecimentos diferenciados e específicos na área biológica (médico-legal ou odonto-legal), tendo uma sucessão praticamente ilimitada de técnicas e meios adequados para se chegar à identidade humana (OLIVEIRA et al., 1998).

A revolução causada com a descoberta, por Watson e Crick, em 1953, da estrutura em dupla hélice do Ácido Desoxirribonucléico (DNA), componente responsável pelo patrimônio genético dos seres vivos, ocasionou mudanças importantes em praticamente todas as áreas da ciência, surgindo, a partir de então, técnicas capazes de caracterizar, no DNA, as particularidades de cada pessoa (SANTOS et al., 2004).

Estas técnicas de identificação com a utilização de regiões polimórficas do DNA já estão bem estabelecidas como um processo seguro, com alto poder de discriminação e alta confiabilidade, sendo aceitos como prova legal, em casos judiciais, como inclusão e exclusão de paternidade, e na identificação humana (PARDINI et al., 2001; SILVA; OLIVEIRA, 2006).

Entre as técnicas mais utilizadas atualmente para identificação forense, fazendo uso da biologia molecular, encontra-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para amplificar regiões polimórficas como *short tandem repeats* (STRs) do DNA genômico. Esta técnica permite a amplificação de regiões restritas do genoma, tornando possível a obtenção de valiosas informações de quantidades extremamente pequenas de DNA (WALSH et al., 1992; AKANE; SIEKE; SHIONO et al., 1992).

Há um número variado de materiais biológicos para obtenção do DNA e realização de testes laboratoriais de identificação humana, como tecido ósseo, bulbo capilar, material de biópsia, saliva, sangue, urina, fezes, entre outros. É possível obter DNA de praticamente todos os tecidos do corpo humano, variando apenas a quantidade que é possível extrair de cada um desses tecidos (HOPKINS et. al., 1989; WALSH et. al., 1992; RUDIN; INMAN, 2002; BUTLER, 2005).

Uma fonte de DNA genômico notadamente simples e prontamente acessível para análise genética por PCR é a saliva. Estudos forenses têm demonstrado que a análise de DNA por PCR de saliva depositada em impressões, marcas de mordida, pontas de cigarros, marcas e impressões deixadas em postagens, envelopes e outros objetos pode auxiliar na identificação individual (WALSH et al., 1992; BAECHEL; PRESLEY; SMERICK, 1995; YAMAMOTO; ISHIZU, 1995; SWEET; DIZZINO, 1996; SCHIE; WILSON, 1997; HOCHMEISTER; RUDIN; AMBACH, 1998; SWEET; HILDEBRAND, 1999).

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse no uso da saliva como um fluido para o diagnóstico de doenças e na identificação forense (STRACKFUS; BILGER, 2002). Produtos metabólicos, enzimas, hormônios, imunoglobulinas e outras moléculas têm sido quantificadas na saliva com muito sucesso. Kits comerciais são utilizados para a extração do DNA salivar. Unindo-se a facilidade de se coletar a saliva e a habilidade para se isolar DNA suficiente para a análise genética, a saliva pode ser uma fonte potencialmente eficiente de material genético (Ng DANIEL et al., 2004).

Como exemplos da utilização da saliva como fonte de DNA para identificação, em 13 de fevereiro de 2003, a imprensa nacional divulgou o resultado do exame de DNA realizado com a ponta de um cigarro, sendo a saliva o material biológico analisado. Era a comprovação de que uma menina seqüestrada com 48

horas de vida, em março de 1979, em Goiânia estava viva e fora registrada como filha de Vilma Martins Costa, a mulher que também seqüestrou Pedrinho, em Brasília, no dia 20 de janeiro de 1986 (GOULART, 2003). Também no final de 2003, a imprensa mundial divulgou imagens da coleta de esfregaço bucal para se proceder à identificação de Saddam Hussein pela análise de DNA (FREITAS, 2003; REMUALDO; OLIVEIRA, 2005).

O presente estudo propõe-se a demonstrar a utilização da saliva humana armazenada em condições ideais como um método seguro para a obtenção e extração do DNA e sua aplicabilidade no processo de identificação humana.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A IDENTIFICAÇÃO HUMANA E A ODONTOLOGIA LEGAL

O aparecimento da disciplina de Odontologia Legal no Brasil ocorreu somente na edição da grade curricular estabelecida pelo Decreto 19.852 (CORRÊA, 1976), editado em 1931:

1º Ano – anatomia, fisiologia, histologia e microbiologia, metalurgia e química aplicadas.

2º Ano – clínica odontológica (1ª cadeira), higiene e odontologia legal, prótese dentária, técnica odontológica.

3º Ano - clínica odontológica (2ª cadeira), patologia e terapêutica aplicadas, prótese buco-facial, ortodontia e odontopediatria.

Desde então, esta especialidade não parou mais de se desenvolver, demonstrando, nos últimos tempos, uma notável maturidade científica e profissional, sendo a Antropologia Forense uma das áreas que melhor exemplifica esta evolução, passando das etapas de simples observações e chegando, atualmente, a sofisticados testes laboratoriais, com a inclusão de exames genéticos (SILVA, RHA, 2007). A Antropologia Forense é a aplicação prática ao Direito de um conjunto de conhecimentos da Antropologia Geral visando, principalmente, a questões relativas à identidade médico-legal e à identidade judiciária ou policial (CROCE; CROCE-JUNIOR, 2004). Fato posto, a Antropologia interessa ao Direito, pois é a história natural do homem, e seu estudo é imperioso nas questões de identidade.

Assim, a identificação humana é uma das grandes áreas de estudo e pesquisa da Odontologia Legal e da Medicina Legal. E as duas ciências trabalham com o mesmo material, o corpo humano, em vida e em vários estágios do *pós-mortem* (esposteçados, dilacerados, carbonizados, macerados, putrefeitos, em esqueletização e esqueletizados), sempre com o mesmo objetivo, ou seja, estabelecer a identidade humana (OLIVEIRA et al., 1998).

A atuação do cirurgião-dentista no âmbito forense é assegurada pela legislação federal competente, a Lei nº 5.081, de 24 de Agosto de 1966, que

regulamenta o exercício da odontologia no Brasil. Além disso, a Resolução CFO 63/2005 regulamenta, através de seu artigo 64, as áreas de atuação do profissional especialista em Odontologia Legal (BRASIL, 2005):

- Art. 28. As áreas de competência para atuação do especialista em Odontologia Legal incluem:
- a) Identificação humana;
 - b) Perícia em foro civil, criminal e trabalhista;
 - c) Perícia em área administrativa;
 - d) Perícia, avaliação e planejamento em infortunistica;
 - e) Tanatologia forense;
 - f) Elaboração de: 1) autos, laudos e pareceres; 2) relatórios e atestados;
 - g) Traumatologia odonto-legal;
 - h) Balística forense;
 - i) Perícia logística no vivo, no morto, íntegro ou em suas partes em fragmentos;
 - j) Perícia em vestígios correlatos, inclusive de manchas ou líquidos oriundos da cavidade bucal ou nela presentes;
 - l) Exames por imagem para fins periciais;
 - m) Deontologia odontológica;
 - n) Orientação odonto-legal para o exercício profissional;
 - o) Exames por imagens para fins odonto- legais.

Existem dois tipos de processos de identificação humana: o comparativo e o reconstitutivo, sendo o primeiro baseado em registros anteriores ao óbito, permitindo a identificação personalista ou individual, possível de ser realizada através da utilização de registros médicos e prontuários odontológicos. Já no processo reconstitutivo, não se têm dados anteriores à morte do indivíduo e procura-se realizar a identificação geral definindo-se, por exemplo, o gênero, a idade e a etnia (SASSOUNI, 1963). Na identificação geral incluem-se o diagnóstico de manchas ou líquidos provenientes da cavidade bucal, ou nela contidos e a definição da causa e do tempo de morte (OLIVEIRA et al., 1998).

A colaboração da Odontologia Legal na Antropologia Forense pode ser verificada através da identificação humana em restos corporais, tais como crânio, trabalhando através de comparações com registros dentários, fotos e prontuários (KEISER-NIELSEN; STROM, 1983; MIYAJIMA; DARUGE; DARUGE JUNIOR, 2001), assim como em acidentes de massa, a fim de diferenciar as pessoas presentes no evento, exemplificados pelas seguintes situações: desastres naturais, tais como os tsunâmis ocorridos em 2004 (LAU; TAN; TAN, 2005; MORGAN et al., 2006), acidentes de ônibus seguidos de carbonização das vítimas (VALENZUELA et al., 2000; VALENZUELA et al., 2002), acidentes aéreos (FERREIRA, 1996; LUDS et al., 1994; NAMBIAR; JALIL; SINGH, 1997), incêndios (CAMPOBASSO;

FALAMINGO; VINCI, 2003), acidentes ferroviários (DUMANCIC et al., 2001), acidentes militares e guerras (BRANNON; MORLANG, 2004).

Desse modo, os resultados dos trabalhos da Odontologia Legal podem ser mensurados em inúmeros relatos científicos (AMOEDO, 1903; ANDERSEN; WENZEL, 1995; ARBENZ, 1988; AUSTIN; MAPLES, 1994; BERNSTEIN, 1983; CLARK, 1994; ENDRIS, 1985; GALVÃO, 1996; GRIFITHS, 1988; JACOB; SHALLA, 1987; KESSLER; PEMBLE, 1993; KULLMAN; CIPI, 1992; MANN, 1987; OLIVEIRA, 1995; PETERSEN, 1975; POTSCHE et al., 1992; ROTHWELL, 1989; SOGNAES, 1975; SOLHEIM, 1992; STEAGALL; SILVA, 1996) e quantificados, inclusive, por aquelas pessoas não afeitas às ciências forenses, como ocorreu quando a mídia pôs em evidência a importância dos procedimentos de identificação no caso das vítimas do desastre sofrido pelo jato da TAM, em São Paulo, no final de 1996 (OLIVEIRA et al., 1998).

Além disso, após os dois maiores acidentes aéreos brasileiros, ocorridos com as empresas GOL, em 2006 e TAM, em 2007, a população pôde perceber de maneira mais próxima e evidente, através dos meios de comunicação, a importância do trabalho da Odontologia Legal no processo de identificação das vítimas. Nesses casos de catástrofes, em que a comoção coletiva está em pauta de destaque, a demora na identificação dos corpos acarreta ainda mais sofrimento e pesar em familiares e na população como um todo.

Com grande demonstração de vigor intelectual e permanente produção científica, a Odontologia Legal, pelos seus próprios méritos, segue seu caminho de ocupar lugar de destaque junto às demais áreas da Odontologia. E, embora haja a necessidade de trabalho em equipe com profissionais de outras áreas das ciências forenses, como medicina, direito, farmácia, antropologia, computação, fotografia, biologia e bioquímica, em muitos casos de identificação humana *post mortem* somente o odontologista será capaz de, por meio de seus conhecimentos específicos, respaldar adequadamente à justiça (OLIVEIRA et al., 1998).

Sweet (2001) ressalta que existem três tipos de identificação onde se utilizam caracteres bucais, maxilares e características orofaciais, sendo que, dois deles têm sido usados por muitas décadas e configuram-se como responsabilidade primária do odontologista. O primeiro é denominado de identificação dentária comparativa e envolve a comparação dos registros ante-mortem e post-mortem; o

segundo, composto pela reconstrução do perfil dentário post-mortem, é usado em casos onde não há suspeita de quem pode ser a pessoa ou seus descendentes; e, o terceiro trabalha na aplicação das modernas técnicas de perfil de DNA a fim de se estabelecer a identidade.

A já consagrada importância da Odontologia Legal para a identificação humana, principalmente em casos onde pouco se resta para se proceder a esta identificação (incêndios, explosões, corpos em decomposição ou esqueletizados), forçou os cirurgiões-dentistas ligados à investigação forense, a se familiarizarem com as novas tecnologias da biologia molecular, haja vista que o principal objetivo da análise forense de DNA é obter a identificação correta de um indivíduo com a menor probabilidade de erro, sendo recomendado o emprego de equipes multiprofissionais, somando-se conhecimentos e experiências diversificadas (REMUALDO; OLIVEIRA, 2005; SILVA et al., 2006; SYRJÄEN; SAINIO, 1990).

2.2 BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À IDENTIFICAÇÃO HUMANA: ATUAÇÃO EM ODONTOLOGIA LEGAL

Desde a descoberta da importância dos genes na determinação das características individuais, conceitos e métodos genéticos passaram a ser utilizados na solução de questões relacionadas com a identificação humana. O que há de novo é que com a introdução dos métodos de análise do DNA podem-se resolver casos mais complexos de identidade. Assim, tornou-se possível realizar a identificação positiva por métodos genéticos, afirmando, por exemplo, que este indivíduo é pai desta criança (inclusão de paternidade), ao invés de somente poder-se concluir que ele não é o pai verdadeiro (exclusão de paternidade) (FARAH, 1997). As provas obtidas por DNA têm tido um papel importante nos processos de identificação por carregarem um significativo peso de convencimento numa corte de justiça (SCHNEIDER, 2006).

Apesar do auxílio inestimável dos estudos antropométricos, sua aplicação não possibilita a individualização, ou seja, a nomeação exata do examinando. Através da aplicação de recursos da biologia molecular é possível identificar uma

pessoa mesmo na presença de material biológico deteriorado em ínfimas quantidades, condições estas relativamente freqüentes nas análises forenses (PRETTY; SWEET, 2001).

Cada indivíduo possui uma configuração genotípica única, responsável por um perfil fenotípico praticamente impossível de repetir-se casualmente, o que ocorre unicamente em gêmeos monozigóticos, por partilharem do mesmo genótipo herdado de uma simples divisão mitótica do zigoto (CALABREZ; SALDANHA, 1997). Além disso, o DNA de um indivíduo é idêntico em qualquer célula do corpo, quer tenha sido extraído da raiz do cabelo, do sangue ou do espermatozoide. Esses princípios permitem identificar um “perfil molecular” para cada indivíduo a partir de uma amostra de qualquer tecido (FARAH, 1997).

Segundo Silva e Passos (2002), o estudo de DNA forense pode ser aplicado nas seguintes situações:

- 1) Identificação e vinculação de suspeitos ao crime, como, por exemplo, em casos de estupro. As impressões digitais vinculam circunstancialmente uma pessoa ao local do crime, enquanto que o DNA pode vincular o suspeito diretamente ao crime. Também, pode-se estabelecer a relação entre instrumentos lesivos e vítimas por produção de perfis de DNA recuperado e produzido a partir de material biológico presente em anteparo ou objeto encontrado em local de crime ou a ele relacionado (BONACCORSO, 2000).
- 2) Distinção de crimes isolados de crimes em série. Pela comparação do DNA obtido de diferentes locais de crime, pode-se determinar se mais de uma pessoa está envolvida ou se a mesma pessoa cometeu os crimes.
- 3) Absolvção de pessoas falsamente acusadas. O número de pessoas inocentadas pelo DNA é maior do que as incriminadas.
- 4) Identificação de restos mortais de uma vítima pela comparação com amostras anteriores da mesma pessoa ou com amostras de parentes biológicos (pais, irmãos, avós, etc.). Nesse caso, a Biologia molecular pode ser aplicada para a atividade pericial de identificação de cadáveres mutilados, carbonizados e em decomposição (restos mortais e ossadas), identificação de partes e órgãos de cadáveres.

- 5) Determinação de paternidade em casos de gravidez resultante de estupro e de vínculo genético como investigação de paternidade, anulações de registros civis de nascimento, raptos e sequestros de crianças e tráfico de menores.

Há vários métodos aceitáveis de identificação humana, cada um com as suas limitações. Historicamente, as impressões digitais têm sido usadas para identificação, porém, em algumas situações tais como fogo e esqueletização, são facilmente destruídas; já a identificação através de exames genéticos é uma importante e confiável ferramenta, mas, assim como a datiloscopia, também tem a necessidade de um registro anterior ou algum descendente. É importante comentar que existem algumas limitações na utilização de perfis de DNA para identificação, por exemplo, a impossibilidade de se distinguir entre gêmeos monozigóticos, o que as impressões digitais permitem fazer, a facilidade de contaminação de amostras forenses com DNA estranho, e a não aplicabilidade deste método em muitos casos de carbonização e putrefação de corpos (BONACCORSO, 2000).

Para que um processo de identificação seja aplicável, é necessário que preencha os seguintes requisitos técnicos (DEL-CAMPO, 2006).

- ✓ Unicidade ou individualidade: é a condição de não se ver repetido em outro indivíduo o conjunto de caracteres pessoais, isto é, apenas um único indivíduo pode tê-los;
- ✓ Imutabilidade: condição de inalterabilidade dos caracteres por toda a existência, ou seja, são caracteres que não mudam com o passar do tempo;
- ✓ Perenidade: é a capacidade de resistir à ação do tempo;
- ✓ Praticabilidade: é a condição que torna o processo aplicável na rotina pericial. É, enfim, a qualidade que permite que certos caracteres sejam utilizados, como custo, facilidade de obtenção e facilidade de registro.
- ✓ Classificabilidade: é a condição que torna possível guardar e achar, quando preciso, os conjuntos de caracteres que são próprios e

identificadores das pessoas. Isto é, a possibilidade de classificação para facilitar o arquivamento e a rapidez de localização em arquivos.

- ✓ Reprodutibilidade: corresponde à constância na reprodução de certos dados, reprodução fiel e contínua dos resultados obtidos desde o seu primeiro teste.

O DNA obedece aos postulados necessários para um método de identificação. No que se refere à unicidade, pode-se afirmar que não existem duas pessoas com a mesma sequência de bases no seu DNA, exceto gêmeos idênticos. A perenidade corresponde à propriedade do DNA estar presente nos seres vivos do início ao fim da vida, e mesmo em restos mortais. Desse modo, o DNA de todas as células de um indivíduo é idêntico ao encontrado no zigoto (exceto no caso de mutações somáticas). Já a imutabilidade é a propriedade do DNA não sofrer alterações no conteúdo informacional ao longo da vida. Assim, eventuais mutações somáticas que ocorram não comprometem os estudos de identificação. Portanto, o perfil genético de um indivíduo feito aos dois anos de idade será idêntico àquele obtido aos 60 anos e a partir de seus restos mortais (SILVA; PASSOS, 2002).

Quanto à classificabilidade, os perfis genéticos dos indivíduos podem ser armazenados em banco de dados de DNA, como arquivos, prontos para o uso quando preciso. No que se refere à praticabilidade, a utilização do DNA ainda apresenta algumas dificuldades, devido ao alto custo dos laboratórios e à necessidade de pessoal altamente especializado para as etapas de coleta, transporte, armazenamento e estudo das amostras biológicas (SILVA; PASSOS, 2002). Porém, são limitações que podem ser superadas à medida que se amplie a utilização deste método de identificação. Finalmente, a reprodutibilidade corresponde à constância na reprodução dos resultados obtidos desde o primeiro teste de DNA, ou seja, todos os testes aplicados num mesmo indivíduo fornecerão o mesmo perfil genético.

Inúmeros são os casos que demonstraram a aplicabilidade dos exames de DNA. Como exemplo da utilização do DNA na identificação de restos mortais, pode-se citar um acidente em massa, ocorrido em fevereiro de 1998, quando um avião caiu em Taiwan, resultando na morte de 202 pessoas. Com exceção de 19 vítimas,

identificadas por evidências não-genéticas, através de registros dentários e médicos, digitais, evidências fotográficas e pessoais, um total de 183 foram identificadas por tipificação de DNA com grande sucesso. Esse grande número de corpos identificados através da análise de DNA levou os autores a afirmarem que em casos de corpos severamente destruídos em decorrência de um acidente com avião, a análise de DNA provou ser o melhor método de escolha para identificação das vítimas (HSU et al., 1999).

Também na identificação das vítimas do ataque terrorista ao World Trade Center em Nova York (11 de setembro de 2001) houve efetiva participação de cirurgiões-dentistas na equipe forense, a qual se utilizou da análise de materiais biológicos encontrados nos destroços (REMUALDO; OLIVEIRA, 2005).

Morgan e colaboradores relataram alguns casos de identificação das vítimas do tsunami ocorrido em Dezembro de 2004 no sul da Ásia, atingido Tailândia, Indonésia e Sri Lanka. Amostras de DNA foram coletadas de grande parte dos corpos e, mesmo que a identificação por material genético não tenha sido o primeiro método de escolha, devido ao maior custo e exigência técnica, boa parte destas amostras foi utilizada com sucesso na identificação destes indivíduos quando dados físicos, impressões digitais e dentárias não puderam ser aplicadas (MORGAN et al., 2006).

Em outubro de 2005, um teste de DNA inocentou Larry Fuller. Ele estava preso há vinte cinco anos, quando a vítima de uma agressão seguida de estupro, em 1981, o identificou. Apesar de jurar a sua inocência, Fuller foi julgado e condenado a cinquenta anos de prisão apenas com base no testemunho da vítima. Em Outubro de 2005, sua inocência foi finalmente reconhecida por um Tribunal de Dallas (EUA), graças a um teste de DNA o qual provou, sem margem para dúvidas, que não fora ele o estuprador (CHEMELLO, 2007).

2.2.1 DNA: Aspectos Históricos

O exame forense de amostras biológicas teve seu início no começo do século XX com a aplicação dos grupos sanguíneos ABO em evidências relacionadas a crimes ou à identificação de pessoas. Em 1954 foi demonstrada a ocorrência do sistema de histocompatibilidade mediada 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 (CALABREZ; SALDANHA, 1997).

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 (CALABREZ; SALDANHA, 1997). Posteriormente, estes sistemas foram substituídos na maioria dos centros, sendo pouco utilizados (MYIAJIMA; DARUGE; DARUGE-JUNIOR, 2001).

Outra fase importante no desenvolvimento das ciências forenses voltadas à identificação humana foi iniciada por Jeffreys, Wilson e Thein (1985), criadores da técnica do DNA fingerprinting. Através desse método, os autores testaram sondas moleculares radioativas com a propriedade de reconhecer certas regiões altamente sensíveis do DNA (minissátelites do genoma humano), as quais produziam uma espécie de “impressão digital” (CALABREZ; SALDANHA, 1997; MARTIN; SCHMITTER; SCHNEIDER, 2000).

Em outubro de 1986, Jeffreys empregou o exame de DNA para identificar o criminoso no caso de dois crimes com características semelhantes, das duas jovens inglesas, Lynda Mann e Dawn Ashworth que foram assaltadas, violentadas sexualmente e assassinadas na década de 1980 (CHEMELLO, 2007). A partir de então, 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 (LOMBARDI, 2007; MOURA-NETO, 1998).

Em 1987, testes de DNA já estavam sendo apresentados nos tribunais do Reino Unido e dos Estados Unidos. Porém, em 1989, ocorreu, nos Estados Unidos, o primeiro ataque aos procedimentos técnicos e à validade científica dos testes de DNA para casos de criminalística (LANDER, 1989). Essas críticas provocaram a realização de trabalhos enfatizando a validade dos testes de identificação baseados no estudo de DNA e determinando também diretrizes para a realização destes testes (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992). Atualmente, pode-se afirmar que a análise de polimorfismos do DNA está consolidada cientificamente, e não restam dúvidas de sua importância perante os tribunais (GÓES, 2008).

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 custo do exame, ainda elevado para boa parte da população e também a escassez de institutos públicos preparados para execução rotineira dos exames com base no DNA (CALABREZ; SALDANHA, 1997).

No entanto, já aparecem os primeiros sinais, por parte do Estado, de pleno reconhecimento da eficiência das informações oferecidas nos exames de DNA e a consequente necessidade de torná-lo acessível à população em geral (CALABREZ; SALDANHA, 1997). No Estado de São Paulo, já está em vigor o Decreto 44.336, desde 15 de Outubro de 1999, assegurando a gratuidade para realização, por determinação judicial, de exames de DNA, aos comprovadamente pobres, nas ações de investigação de paternidade (SÃO PAULO, 1999). Além disso, outras iniciativas podem ser observadas, como o Projeto Caminho de Volta que trabalha com a tecnologia da biologia molecular na busca de crianças desaparecidas (GATTAS et al., 2005; SILVA, RHA, 2007).

2.2.2 Estrutura do DNA

A análise da variabilidade genética em bactérias revelou que a informação genética é armazenada no DNA. As moléculas deste ácido nucléico consistem de resíduos de açúcar e de grupamentos fosfatos alternados e de bases nitrogenadas. Os grupos fosfatos ligam os átomos de carbono 3' de um açúcar ao átomo de

carbono 5' do açúcar vizinho. As bases nitrogenadas pirimidínicas são representadas pela citosina (C), timina (T). As purínicas pela adenina (A) e guanina (G). A guanina pareia-se somente com a citosina, através da ligação de três pontes de hidrogênio e a adenina com a timina por duas ligações de ponte de hidrogênio (ALBERTS et al., 1997). A estrutura do DNA é uma dupla hélice, e suas duas moléculas são mantidas por pontes de hidrogênio. (FARAH, 1997).

Os genes constituem apenas uma pequena fração de todo o DNA do genoma (DUARTE, 2001). Estima-se que 30% do DNA humano seja composto por repetições, não tendo estas, na grande maioria, significado funcional. Embora já seja conhecido que algumas regiões não codificantes têm funções de regulação genética, na atualidade observa-se que sua contribuição é muito mais significativa especialmente para a evolução, sendo responsáveis por tantas diferenças adaptativas entre espécies quanto às alterações nas proteínas, consideradas a principal força por trás desse fenômeno (FURTADO, 2005). Estas zonas têm um alto grau de variações de seqüências entre várias pessoas, o que diminui a chance de duas pessoas terem a mesma seqüência nessa área (LIJNEN; WILLEMS, 2001), portanto, sendo muito utilizadas na análise forense (DUARTE, 2001).

Para comparar o DNA de duas pessoas é necessário que a variação genética seja detectada e de alguma forma visualizada. Como é inviável tecnicamente analisar todo o DNA de um indivíduo para estudar a variação, somente algumas regiões são analisadas, sendo escolhidas aquelas que apresentam maior variação individual e facilidade de estudo. Essas regiões são chamadas de marcadores genéticos, sendo que na identificação humana, utiliza-se quase que exclusivamente as regiões microssatélites, os STRs (SILVA; PASSOS, 2002).

Essas regiões STRs apresentam, em média, uma seqüência de repetição de dois a nove pares de base, perfazendo loci menores que 300 pares de base, sendo abundantemente encontrados no genoma humano, o que permite uma variabilidade de escolha nos testes de identificação forense (FARAH, 1997; WALKER; RAPLEY, 1999). Para aplicações forenses, os STRs de maior valor são aqueles que apresentam maior polimorfismo (maior número de alelos), menor tamanho, maior freqüência de heterozigotos (maior que 90%) e baixa freqüência de mutações (GALANTE-FILHO et al., 1999).

A informação genética nas células humanas (DNA) está organizada em dois tipos de genoma: genoma nuclear e genoma mitocondrial. O DNA genômico é encontrado no núcleo de cada célula do corpo humano, formando os cromossomos, e corresponde à maior parte do DNA (FARAH, 1997). Representa uma fonte de DNA para a maioria das aplicações forenses, haja vista que por meio da análise baseada na técnica da PCR é possível comparar a amostra obtida com conhecidas amostras *ante-mortem* ou com o DNA paterno/materno (PRETTY; SWEET, 2001).

No contexto da análise forense, o interesse pelo DNA mitocondrial surge pelas seguintes justificativas: contém regiões polimórficas que permitem sua individualização; descendentes recebem esse DNA apenas da mãe, por isso chamado DNA haplótipo, permitindo traçar a linhagem materna de uma pessoa; é mais resistente à degradação que o DNA nuclear e pode durar por muitos anos mesmo em condições ambientais adversas e centenas a milhares dessas organelas estão presentes em cada célula (SMITH, 2001; PANETO, 2006; SCHNEIDER, 2006). Porém, por seu exame se dar pelo seqüenciamento direto de suas bases nitrogenadas, técnica esta dispendiosa, por exigir o emprego de tecnologia altamente especializada, e também pelo fato de ser unicamente matrilineo, e, por isso, menos informativo, sua análise não é usual a todos os laboratórios forenses. Complementarmente, Silva e Passos (2002), afirmaram 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.

A amplificação de DNAm foi a ferramenta utilizada na identificação de ossadas de soldados americanos que lutaram na Guerra do Vietnã (HOLLAND; FISHER; MITCHELL, 1993). Também, na tragédia de 11 de setembro de 2001 no World Trade Center (EUA), restos das vítimas foram analisados por esta técnica (HOLLAND, 2003). Porém, uma das mais expressivas aplicações deste tipo de abordagem ocorreu na Argentina, onde filhos de pessoas “desaparecidas” durante o regime militar foram identificados com suas avós maternas através da análise do DNA mitocondrial (FARAH, 1997).

2.2.3 A utilização do DNA em processos de identificação: procedimentos técnicos e cuidados

O conhecimento dos procedimentos adequados de coleta e preservação dos materiais fonte de DNA é imprescindível para o perito, uma vez que o sucesso na identificação pelo uso desta técnica depende da integridade da amostra biológica enviada ao laboratório para análise (SILVA; PASSOS, 2002).

Existem entidades internacionais e nacionais responsáveis indiretas pelo controle de qualidade das análises forenses de DNA. Estas entidades formulam recomendações não só para a correta execução de todos os procedimentos necessários para a análise de DNA, como também para a confecção de laudos e relatórios. Na busca deste controle de qualidade, praticam a aferição externa dos laboratórios a elas filiados através de testes de proficiência ou acreditação. Também estimulam a padronização de metodologias de análise e dos *loci* utilizados e praticam testes de validação para empresas fabricantes de reagentes usados na análise forense de DNA. Dentre as entidades internacionais pode-se citar a européia Sociedade Internacional de Hemogenética Forense (ISFH), o Grupo Técnico de Trabalho em Métodos de Análise de DNA, SWGDAM, coordenado pelo FBI, a Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB), o Grupo Ibero-Americano de Trabalho em DNA (GITAD) e a International Criminal Police Organization (INTERPOL). Como exemplos de entidade nacionais têm-se a Sociedade Brasileira de Medicina Legal (SBML), a Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo (SSP-SP), o Comitê Técnico Especializado de Biologia Molecular (CTLE) do INMETRO e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BONACCORSO, 2000).

Segundo BUDOWLE (1996), a qualidade, exatidão e confiabilidade dos resultados obtidos na análise de DNA em vestígios coletados ou relacionados a ocorrências criminais dependem de procedimentos próprios que devem ser rigorosamente adotados nas etapas do isolamento do local do delito e do levantamento das amostras biológicas a serem encaminhadas para a unidade orgânica responsável pela genotipagem forense. Logo, o tipo, a integridade e a preservação dessas amostras constituem-se em fatores essenciais à consecução de

perfis genéticos bem caracterizados e definidos, pré-requisito para a produção de laudos periciais de excelente nível técnico-científico (BONACCORSO, 2000).

É importante mencionar que evidências físicas sofrem normalmente insultos ambientais (luz, mudanças de temperaturas, reativos químicos, substâncias corrosivas, ataque enzimático, contaminação/degradação por microorganismos, com conseqüentes quebras e outras alterações da cadeia de polinucleotídeos) que modificam a composição e a estrutura normal do DNA. Essas evidências estão ainda sujeitas às mais diversas formas de contaminação por material genético exógeno, derivado de outros seres humanos que não necessariamente estão ligados à cadeia de eventos do ato delituoso em questão (BONACCORSO, 2000).

Assim, o odontologista deve estar atento para a necessidade de coletar amostras que permitam a comparação dos perfis genéticos de alguns indivíduos. Assim, três tipos de amostras devem ser obtidas sempre que possível: amostra questionada, amostra padrão e amostras de exclusão. A amostra questionada é a que se quer identificar o autor. A amostra padrão é uma amostra de origem conhecida. Então, comparando-se o perfil genético das duas amostras, é possível proceder-se à identificação da amostra questionada. Já as amostras de exclusão são também de origem conhecida, de indivíduos que tiveram acesso ao local do crime, ao suspeito ou à vítima, mas que não estão implicadas com o crime (SILVA; PASSOS, 2002).

Ainda, o FBI (1999), a International Criminal Police Organization (INTERPOL, 2001) e a Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo (São Paulo, 1999) publicaram normas de procedimentos para a coleta, armazenamento e análise de materiais biológicos para a extração de DNA. Sucintamente, essas normas orientam que a coleta do material deve ser realizada usando-se luvas e máscaras descartáveis e utilizando-se recipientes sempre estéreis, como *swabs* tubos, potes e sacos plásticos ou de papel. A coleta e o acondicionamento dependem do tipo de amostra biológica. Assim, para as amostras umedecidas, é aconselhado que permita a secagem em ambiente estéril, porém, se isso não for possível, transporta-se imediatamente para o laboratório ou congela-se em freezer. Não se deve descongelar e congelar as amostras repetidamente, pois causaria a degradação do DNA. Ainda, deve ser feita a documentação completa do

vestígio eleito para a coleta, incluindo-se fotografias da região, tipo de armazenamento, e descrição de todo o processo (ANZAI, 2002).

A Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo (SSP-SP) baixou a Resolução SSP-194 em 2 de junho de 1999 (São Paulo, 1999):

Considerando:

- a) A necessidade de normatizar os serviços periciais relativos à coleta de materiais biológicos para exames de identificação humana, tanto nos locais de crime quanto na pessoa humana, viva ou morta;
- b) que os procedimentos a serem seguidos pelos órgãos policiais e periciais oficiais devem estar em consonância com os ditames da legislação em vigor, e
- c) que é imprescindível a correta preservação das amostras para não haver contaminações ou outros prejuízos (p.104).

Devido ao usual exercício do contraditório por parte da defesa com argumentos contra a admissão da validade dos resultados dos testes de DNA no processo, é imperativo que os centros forenses mantenham a cadeia de custódia de amostras, através de registros que possam acompanhar as amostras a partir da coleta e através da interpretação dos resultados. O laboratório deve ser hábil para demonstrar que tomou todas as precauções para prevenir falsificação, perda ou contaminação da amostra (CASKEY; EDWARDS, HAMMOMD; 1989; MACHADO, 1996; ANVISA, 2005)

Todas as etapas empreendidas para a tipagem do DNA, desde a coleta até a interpretação do significado estatístico dos dados obtidos serão consubstanciadas em uma peça pericial escrita que servirá aos interesses de seus leitores. Em instância final, o laudo poderá ainda servir como elemento de convicção para juízes, promotores e advogados nas ações judiciais (BONACCORSO, 2000).

São recomendações básicas de quesitos para a elaboração do laudo pericial de análise de DNA: identificação do número do inquérito policial ou processo judicial; identificação das partes envolvidas e amostras; informação da etnia (raça) dos envolvidos, quando possível e relevante; citação da metodologia empregada na coleta e armazenamento de materiais e, se necessário, esclarecimento dos cuidados empreendidos para manutenção da cadeia de custódia destes materiais. Em adição, o laudo deve conter informações bibliográficas a cerca das metodologias utilizadas para a extração, quantificação e amplificação do DNA; forma de identificação dos alelos obtidos nos testes e fundamentos empregados para os cálculos estatísticos. As frequências estatísticas utilizadas como base para os cálculos também devem

ser mencionadas (COMMISSION OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR FORENSIC HAEMOGENETICS, 1992; SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA LEGAL, 1999).

2.2.4 Cálculos estatísticos e estudos de frequência

A vinculação de um suspeito ao crime, utilizando DNA, é feita da mesma forma que as impressões digitais, ou seja, se o perfil de DNA obtido da amostra biológica coletada no local do crime for coincidente com o perfil genético do suspeito, pode-se afirmar, após os cálculos estatísticos pertinentes, que o suspeito é o doador da amostra encontrada. A probabilidade de um suspeito ser o doador da amostra pode variar muito; no entanto, nos casos em que são analisados números suficientes de marcadores genéticos, pode-se atingir uma porcentagem elevada, conferindo uma certeza estatística aceitável pelos tribunais (SILVA; PASSOS, 2002).

De acordo com Tracey (2001), a Lógica da identificação utilizada em DNA é idêntica à lógica usada em uma ampla variedade de estratégias em antropologia forense. A qual consiste em se estabelecer o perfil de um indivíduo através da inclusão e exclusão de características até se chegar à identificação do mesmo. O sucesso desta lógica está no número de características analisadas e na frequência de classes ou condições dentro de cada uma delas. O poder da análise de DNA forense está nos polimorfismos dos loci STRs e do número de loci utilizados.

No homem, é conhecido um grande número de marcadores STR, mas, em identificação humana são utilizados relativamente poucos, normalmente entre treze e vinte marcadores, embora, em algumas situações esse número poderá ser menor, devido à baixa qualidade dos materiais biológicos que são analisados (PENA, 1997). Nos estudos de paternidade, por exemplo, para cada locus deverá haver coincidência entre um dos alelos da criança com um dos presentes em sua mãe e o outro alelo deverá estar presente no pai e recebe o nome de alelo paterno-obrigatório. A exclusão de paternidade é declarada quando o suposto pai não apresenta três ou mais dos alelos paterno-obrigatórios, definidos para o investigador (SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA LEGAL, 1999).

No processo de identificação, o fato de que duas amostras possuem o mesmo perfil para um grupo de marcadores genéticos em especial não significa obrigatoriamente que elas possuam a mesma origem. A interpretação dos testes depende das frequências populacionais para cada marcador genético utilizado. Quando a tipagem genética de duas amostras é igual, torna-se necessário expressar numericamente a significância deste evento (PARADELA; FIGUEIREDO, 2007).

Nesses casos, são realizados testes para mensuração da razão de verossimilhança entre as amostras analisadas. Este grau de verossimilhança é medido pela frequência de incidência que representa o número de vezes em que determinado perfil genético ocorre na população, como, por exemplo, 1 em 5 bilhões ou 1 em 20 bilhões de pessoas (EVETT; WEIR, 1998). Caso esse perfil seja extremamente raro em uma dada população, pode-se dizer que a evidência é extremamente forte, caso contrário, pode consistir em uma mera causalidade (Committee on DNA Forensic Science, 1996; EVETT; WEIR, 1998; JOBIM; JOBIM, BRENNER, 1999).

Sabe-se que diferentes populações apresentam alelos em frequências diferentes e algumas vezes únicos, por isso a necessidade do estudo de diferentes marcadores naquela população para saber quais são os alelos presentes e em que frequência, a fim de se definir quais são os melhores marcadores a serem utilizados nestes casos (SILVA, RHA, 2007).

Assim, para que a identificação através de STRs possa ser rapidamente incorporada com efetiva confiabilidade à população brasileira, é de extrema importância a realização de estudos populacionais (OZAKI, 1999; TRACEY, 2001; OLIVEIRA et al., 1998; SILVA, RHA, 2007) e, nestes estudos, a investigação deve ser realizada em indivíduos sem nenhum grau de parentesco, a fim de possibilitar a determinação de frequências alélicas da população (LINCOLN; THOMSON, 1998). Estas frequências poderão ser divulgadas pela literatura científica e, principalmente, pela criação de bancos de dados representativos destes indivíduos, o que irá contribuir para o aprimoramento das estimativas de probabilidade (BONACCORSO, 2000) e para identificação de indivíduos.

2.2.5 Bancos de dados de DNA

Bancos de DNA são sistemas nos quais se armazenam perfis de DNA referentes a um conjunto de marcadores moleculares selecionados previamente (SILVA, RHA, 2007). Pode-se diferenciar quatro tipos de bancos de material genético: de pesquisa, de diagnóstico, de potenciais e de dados. Os bancos de pesquisa são formados por DNA obtido de indivíduos, de famílias extensas ou de populações inteiras, afetados por uma determinada doença genética. Já os bancos de diagnóstico são obtidos a partir do DNA de pessoas com suspeita de determinada doença e de seus familiares, para fins diagnósticos ou de aconselhamento (GOLDIM; MATTE, 2007). O terceiro tipo de banco de material genético é formado por qualquer coleção de tecido (blocos de parafina para análise anátomo-patológica, células ou tecidos em cultura, cartões para screening neonatal (teste do pezinho) e bancos de sangue, que são fontes de DNA, e, portanto, bancos em potencial (REILLY; McEWEN, 1994).

E, finalmente, os bancos de dados de DNA são casos particulares em que as informações genéticas são armazenadas para fins de identificação de um indivíduo por comparação com o padrão armazenado (GOLDIM; MATTE, 2007). As bases podem existir só por si, sendo as amostras descartadas uma vez obtidos os perfis de DNA, ou estarem associadas a biobancos, onde as amostras biológicas originais serão armazenadas. O tempo de conservação das amostras e dos perfis é também, nesse caso, muito variável (HENRIQUES; SEQUEIROS, 2007).

Assim, como o teste de DNA é apenas comparativo, em investigações de crimes, uma ferramenta útil pode ser um banco de DNA criminal (um conjunto de tipos diferentes de DNA que permite comparar os seus dados com os coletados na cena do crime). Desse modo, esses delitos ainda impunes podem ser esclarecidos de forma rápida e objetiva, conforme ocorre em outros países que já dispõem deste recurso (CHEMELLO, 2007).

Além da área criminal, em casos de grandes catástrofes e acidentes em massa, pessoas desaparecidas e na identificação de cadáveres e de restos humanos nos quais os métodos forenses tradicionais não podem ser utilizados, o banco de DNA populacional é uma alternativa eficiente para se chegar à identidade

individual. A localização e a identificação de pessoas desaparecidas é outra das utilidades principais de uma base de dados forense de suporte populacional. O desaparecimento de pessoas é um fenómeno mundial. Segundo a organização “Latino-Americanos Desaparecidos” (citada por Paradela; Figueiredo; 2006), cerca de 3000 crianças desaparecem todos os dias no continente americano. Então, esses bancos podem ser úteis na busca por esses indivíduos e também para a identificação de pessoas que sofrem sequestro, homicídio violento, vítimas da guerra, desaparecidos vítimas de ditaduras latino-americanas ou durante guerrilhas nestes países. Além disso, podem ser úteis noutras situações, como no caso de disputa de heranças ou na emissão de certificados de óbito no caso de cadáveres sem identificação prévia (FIGUEIREDO; PARADELA, 2006).

Países como EUA, Inglaterra, Canadá, Alemanha, França, Austrália e Nova Zelândia já desenvolveram bancos de dados de DNA criminais (CHEMELLO, 2007). Consoante os casos, estas bases de dados forenses podem conter a informação genética de condenados apenas, ou de condenados e argüídos, ou incluir até simples suspeitos. Em alguns casos, define-se na legislação o tipo de crime passível de ser incluído na base, sendo que em algumas legislações, só a repetição de certos crimes é critério elegível. Os perfis e dados respeitantes a pessoas julgadas inocentes podem ser posteriormente destruídos ou manterem-se definitivamente, uma vez entradas na base de dados. Em alguns países europeus, os dados de condenados são também destruídos após o cumprimento da sentença (ENFSI, 2006).

A National DNA Database (NDNAD) é a maior base de dados genéticos em todo o mundo e uma das mais controversas. O Gabinete de Ciência e Tecnologia do Parlamento britânico (POST) refere que, em 2006, o número de perfis de DNA era já de mais de 3 milhões e continuava a aumentar (POST, 2006). Segundo a Wikipedia (2007b), a UK NDNAD tem hoje bem mais de 7 milhões de registos. Os critérios de qualidade exigidos pela legislação da NDNAD são muito rigorosos, e apenas seis organizações no Reino Unido estão aprovadas para produzir perfis de DNA a partir de amostras de justiça criminal ou de cenas de crime. Porém, o fato de conter dados de muitos menores, de o consentimento dos voluntários ser irrevogável, os grandes poderes atribuídos à polícia para a colheita de amostras e a conservação de perfis mesmo após a inocentação dos suspeitos, acrescidos ao fato de o número de

negros e de outras minorias étnicas estarem sobre-representados são fonte de grande discussão e preocupação por parte de organizações de ética e grupos de direitos civis no Reino Unido (POST, 2006).

Nos EUA, o FBI implantou o Combined DNA Index System (CODIS) que tornou-se operacional em 1998, e combina a ciência forense com a tecnologia eletrônica, formando um banco de dados de perfis genéticos de DNA extraídos de evidências biológicas coletadas nas cenas dos crimes e DNA de criminosos condenados. Todos os estados americanos podem ter acesso a esse banco de DNA e dessa maneira, há a possibilidade de comparar os perfis genéticos de um suspeito de um crime com os perfis contidos no CODIS, averiguando se o mesmo cometeu anteriormente outra infração (FBI, 2002).

Na Europa, devido à grande mobilidade de delinqüentes, facilitada pela abolição de fronteiras entre os vários países europeus que aderiram ao tratado de Shengen, é cada vez mais frequente que a mesma pessoa pratique crimes e delitos em diferentes países. Por isso, a INTERPOL tem vindo a estabelecer protocolos com os vários países para a troca de dados de DNA, assim como mudanças na legislação dos países europeus estão sendo realizadas para possibilitar a formação de um banco europeu de dados de DNA (POST, 2006).

Com relação ao banco de dados de pessoas desaparecidas, em 1999, a Espanha demonstrou pioneirismo ao implantar oficialmente o “Programa Phoenix”, através do qual são gerados dois bancos de dados de DNAm independentes, que podem automaticamente comparar e cruzar seqüências similares ou idênticas. Um deles é o Banco de Dados Referência, com seqüências de DNAm de parentes maternos das pessoas desaparecidas, que fornecem amostras de células de esfregaço bucal, voluntariamente; o outro é o Banco de Dados Questionado, obtido de DNAm de restos e cadáveres de indivíduos desconhecidos (LORENTE et al., 2001).

Na Iugoslávia, cerca de 30.000 pessoas estão desaparecidas como resultado dos conflitos da última década. Em 2000, foi estabelecido formalmente um programa da Comissão Internacional de Pessoas Desaparecidas (International Commission of Missing Persons- ICMP), graças à colaboração de várias corporações governamentais e privadas, numa tentativa de realizar a identificação humana através de uma rede com a aliança política, centros de acesso às famílias e

laboratórios de DNA em toda a antiga Iugoslávia (HUFFINE et al., 2001). Os exemplos de criação de bancos de dados de DNA de pessoas desaparecidas se multiplicam em países como Argentina, Chile e Colômbia (SILVA; MAJELLA, 2002).

Porém, no Brasil, foram desenvolvidos alguns poucos bancos de dados representativos da população, pois, ainda há barreiras ao crescimento desse tipo de tecnologia. A primeira dificuldade está no alto custo do investimento para a criação de bancos de dados de DNA. Por exemplo, segundo a Wikipedia, a UK NDNAD custou, apenas entre Abril de 1995 e Março de 2004, 182 milhões de libras e o gabinete de ciência e tecnologia do parlamento britânico (POST) refere um programa de expansão de 240 milhões de libras (April 2000–March 2005) para coligir perfis de DNA de todos os “prevaricadores ativos” conhecidos (POST, 2006).

As outras barreiras relacionam-se à escassez de profissionais treinados para tal trabalho, que, mesmo aparentemente simples, depende de conhecimentos científicos bastante complexos e à forte miscigenação de raças encontrada no país, embora tenha sido verificado, nesses poucos bancos criados, que a distribuição de frequências alélicas não parece variar significativamente entre os diferentes grupos étnicos (GÓES, 2008).

No entanto, essas dificuldades podem ser superadas gradativamente com o desenvolvimento de medidas que venham facilitar a implantação da tecnologia do DNA na identificação humana e, como consequência, na criação de bancos de dados de DNA. Para isso, há necessidade do envolvimento de instituições governamentais e privadas na implementação destas medidas e no investimento financeiro e profissional, bem como a participação da sociedade como agente colaborador.

Além disso, a exemplo do CODIS e de outros bancos de dados citados, o material fonte de DNA de escolha é a saliva, devido à facilidade de coleta, não invasiva e indolor, o desenvolvimento de um banco de saliva pelos cirurgiões-dentistas e pesquisadores da área e mesmo por laboratórios especializados seria viável e de fácil execução, já que os pacientes estão constantemente eliminando razoáveis quantidades de sua saliva na cuspidora durante o atendimento odontológico, quando na realização de testes de fluxo salivar e também na realização de exames em laboratórios que fazem a coleta de saliva. Esses profissionais poderiam coletar facilmente a saliva desses pacientes e esta poderia

ser armazenada em um banco de dados. Essa saliva seria utilizada gradativamente para se obter os perfis genéticos dos indivíduos, os quais seriam armazenados em um banco de dados de DNA com a finalidade de identificação forense.

Por outro lado, simultaneamente aos avanços tecnológicos na ciência forense, iniciou-se também uma discussão, tanto ética quanto legal, acerca dos bancos de dados de DNA que foram implantados há alguns anos, principalmente, nos Estados Unidos e na Europa. As posições contra elencam uma série de direitos individuais que tais bases de dados violam: o direito à privacidade, a dignidade da pessoa, o direito à integridade física e moral, o direito a não declarar, a presunção de inocência, o direito à saúde e o direito à liberdade. Mesmo reconhecendo-se que altos padrões de qualidade e de competência na formação e manutenção das bases de dados possam superar o perigo de violação de alguns dos direitos citados, como por exemplo, os que se referem à integridade física e moral e à saúde, a autonomia e a privacidade dos indivíduos podem ficar comprometidas na coleta e armazenamento de material genético, gerando discussões.

Fato posto, a idéia da formação de bancos de dados contendo o perfil genético de pessoas ainda encontra-se em sua fase inicial, necessitando eliminar dificuldades técnicas, éticas e legais, as quais somente irão diminuir à medida que esta tecnologia ganhe espaço merecido na Ciência Forense quando permeado por ensinamentos bioéticos. Portanto, torna-se imprescindível que discussões sobre a criação de bancos de dados de DNA se iniciem no Brasil, a fim de que avanços possam ocorrer, não somente na área da Biologia Molecular como ciência, mas também nas Ciências Forense e nos métodos de identificação de pessoas. E a Medicina e a Odontologia Forense necessitam desse investimento tecnológico e científico para que aumentem seu leque de contribuição em casos nos quais a utilização da tecnologia do DNA seria a solução definitiva.

2.2.6 Técnicas de Biologia Molecular aplicadas à Odontologia Legal

Os testes mais utilizados na identificação forense empregando a pesquisa em DNA são: análise por hibridização, usando sondas de *multilocus* (*multilocus probes-MLPs*) ou sondas de locus simples (*single locus probes- SLPs*), detectando os RFLPs e os VNTRs ou STRs (BOTSTEIN et al., 1980) e PCR para reconhecer sequências polimórficas normalmente presentes em miní ou microssatélites (SILVA, M., 1997).

Em aplicações forenses, a técnica da PCR é a mais utilizada, pois aumenta dramaticamente as possibilidades de análise do DNA, permitindo-se determinar o perfil molecular de um indivíduo (FARAH, 1997).

2.2.6.1 Amplificação de minissatélites por PCR

Até 1985, a análise genética com finalidade médico-legal, em razão da pequena quantidade de material disponível, era limitada. A quantidade das amostras, normalmente inferior a 1µg, era inadequada para a obtenção de resultado confiável em alguns casos, como em crimes sexuais, ou apresentava-se contaminada por outro material (SILVA, M., 1997).

Porém, o advento da PCR, que permite a amplificação de regiões restritas do genoma, associada à sua hibridização e aos recentes desenvolvimentos da tecnologia da Amplificação de Comprimento de Fragmentos Polimórficos (AmpFLP), aumentou o potencial de análise das amostras forenses. A principal vantagem da PCR é a amplificação exponencial de sequências de ácidos nucleicos *in vitro*, possibilitando a obtenção de valiosas informações de quantidades extremamente pequenas de DNA (BUGAWAN; SAIKI; LEVENSON, 1988; HIGUCHI et.al.,1988; SAJANTILA; STROM; BUDWOL, 1991; WALSH et al., 1992; AKANE; SIEKE; SHIONO, 1992) ou até mesmo, de uma única célula (Li; GYLLENSTEN; CUI, 1988), bem como de DNA degradado, uma vez que uma sequência nucleotídica de

interesse não seja muito grande (IMPRAIM et al., 1987). A diversidade do material potencialmente fonte de DNA, a rapidez, a especificidade e a possibilidade de ser incorporado à tecnologia automatizada também são vantagens da análise com base na PCR (SILVA, M., 1997).

Na técnica da PCR, uma fita simples de DNA é utilizada como molde para a síntese de cadeias complementares sob a ação da enzima polimerase do DNA, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde (DNA template). O tubo de ensaio é submetido a uma alta temperatura (94°C por 5 min.), causando a desnaturação da molécula. Em seguida, a temperatura é rebaixada (30 a 65°C por 30 segundos), quando os primers se anelam às suas sequências complementares no DNA. Finalmente, a temperatura é colocada em torno de 71°C (por 2 a 5 min.), temperatura ideal para que a polimerase do DNA utilizada na reação atue, dirigindo a síntese de novas cadeias. Esse ciclo se repete por cerca de 30 vezes, produzindo-se mais que 250 milhões de cópias de uma determinada sequência de DNA em fita dupla, já que o número de cópias cresce de modo exponencial a cada ciclo. Os tamanhos dos fragmentos correspondentes a cada alelo presente no indivíduo são determinados analisando-se a PCR em eletroforese após, por exemplo, a coloração do gel com brometo de etídio (FARAH, 1997).

Sweet (2001) descreveu que o método utilizando PCR possibilita a discriminação de um indivíduo dos demais, com um alto nível de confiança, começando apenas com cerca de 1ng (nanograma), equivalente a uma parte em um bilhão de um grama, do DNA alvo. Posteriormente, verificou-se que menores quantidades de amostra podem ser utilizadas. Conforme relataram Asamura et al. (2006), ao realizarem a tipagem de alelos em oito loci do cromossomo X, com DNA altamente degradado, obtiveram sucesso a partir de 20 picogramas (pg). Valores numéricos da ordem de picogramas já vêm sendo estudados e comprovando sua efetividade na aplicação em amostras degradadas (DIXON et al., 2006; GILL; WERRETT, 1987).

Se por um lado, a técnica da PCR pode ser aplicada tendo-se como fita molde até uma única molécula de DNA, por outro lado, tal sensibilidade causa enormes problemas gerados pela possível contaminação indesejada da amostra com DNA estranho. Assim, para se evitar resultados falso-positivos devido ao DNA

de outra origem, a análise da PCR deve ser acompanhada de uma reação controle na qual não se acrescenta DNA (FARAH, 1997).

Kwok e Higuchi (1989) citaram vários cuidados pertinentes à preparação do material para a PCR, objetivando evitar a contaminação das amostras: o isolamento físico da área de preparação da PCR e de seus produtos utilizados; autoclavar a água deionizada e outras soluções, com exceção dos iniciadores, dos desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), do tampão comercial e da Taq DNA Polimerase; aliquotar reagentes; utilização de luvas descartáveis, as quais devem ser constantemente trocadas; cuidado ao abrir os tubos, pois parte do produto da PCR pode estar na tampa, levando ao desperdício de material; misturar os reagentes da PCR em um único tubo, aliquotá-los em tubos individuais e, por último, adicionar o DNA individualmente em cada tubo. Além disso, é de extrema importância a escolha correta dos controles negativos e positivos, que podem auxiliar na detecção de contaminantes (ANZAI, 2002).

A preservação do DNA forense para a amplificação pela PCR também envolve o controle da temperatura, da umidade, o valor do pH, e da presença de ácido húmico e fúlvico e de microorganismos. A temperatura baixa pode preservar o DNA, seja ele datado de milhares de anos, ou de amostras forenses, assim como o DNA pode ser mais bem preservado em ambientes secos e com o mínimo crescimento de microorganismos. A presença dos ácidos húmico e fúlvico pode comprometer a amplificação pela PCR pelo fato de inibir os efeitos da enzima polimerase utilizada na reação. O pH neutro ou levemente alcalino na amostra também ajuda na preservação do DNA. Os microorganismos podem metabolizar o DNA por completo, se em grande quantidade (BURGER et al., 1999).

2.3 UTILIZAÇÃO DA SALIVA NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

A grande vantagem da utilização do DNA na ciência Forense é o fato de que o mesmo pode ser extraído de diferentes fontes como: amostras de sangue, saliva, células da mucosa bucal (presas a cigarros, envelopes), osso, dente, tecidos, órgãos, fios de cabelo, sêmen, urina, fezes, suor, impressões papilares e outros

materiais biológicos. Porém, os tipos celulares, as reações necessárias, a quantidade mínima de material para se proceder ao exame de DNA para fins periciais e o local de onde são colhidas essas amostras podem ser diferentes e específicos para cada material fonte de DNA (REMUALDO; OLIVEIRA, 2005).

AMOSTRA	FORMA DE APRESENTAÇÃO DA AMOSTRA	QUANTIDADE MÍNIMA DA AMOSTRA	QUANTIDADE DE DNA	CÉLULAS/ORGANELAS QUE COMPÕEM A AMOSTRA
Sangue	Total	1 mL	20 a 50 µL	4×10^6 a 9×10^6
Sangue	Mancha 1 a 2 mm	1µL	1µg	6.000 a 8.000 leucócitos
Saliva	“swab”	40µL	3ng	6 a 600×10^3 células epiteliais descamadas e 25 a 650×10^3 leucócitos
Sêmen	Mancha de 2,5 mm	5µL	1ng	25 a 50×10^3 espermatozóides
Sêmen	Azoospermia	1 mL	3µ	500 leucócitos
Cabelo	Total	1 fio	33 a 330 ng	Mitocôndrias (10 a 100 cópias do DNA mt)
Urina	Total	1 mL	M-4 a 60 ng/mL F- 14 a 200 ng/ml	Células epiteliais vaginais, uretrais, vesicais, renais, leucócitos (80.000 a 100.000) hemácias, espermatozóides
Dente	Polpa	1 dente	3 a 40 µg	Odontoblastos, fibroblastos, células endoteliais, nervosas periféricas, mesenquimais indiferenciadas, componentes nucleados do sangue
Dente	Total (seco)	1 dente	18,4 µg/g	Células da polpa, odontoblastos, cementoblastos

Fonte: (REMUALDO e OLIVEIRA, 2005).

Quadro 2.1 - Relação entre quantidade mínima da amostra, de DNA e células/organelas que compõem a amostra

A análise da saliva humana e de esfregaços bucais, que podem ser obtidos em casos de violência física, como abuso sexual, assassinatos, abuso infantil, onde freqüentemente são encontradas marcas de mordida na pele tem ganhado importância na Antropologia Forense. Também, em casos de identificação de cadáveres por DNA e determinação de relação de parentesco, a saliva surge como fonte confiável para análise genética. Assim, estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver métodos para se isolar saliva da cavidade bucal, de objetos e da pele e utilizá-la na identificação através da extração e da tipificação do DNA.

Embora muito mais conhecida como saliva, o termo correto seria fluido bucal, pois é composta pelo fluido crevicular, que contém leucócitos, os quais se infiltram através da junção dentogengival e células epiteliais (epitélio estratificado pavimentoso não-queratinizado) descamadas (CATE, 1988).

Ng Daniel et al. (2004) descreveram que a saliva é uma fonte de DNA muito útil pelo fato de ser coletada de maneira simples e rápida, podendo ser utilizada mesmo quando armazenada nas mais diferentes condições. E a possibilidade de sua utilização em biologia molecular deve-se ao fato de ser composta em 99% de sua totalidade por água, possuindo leucócitos (25 a 650.000) e células epiteliais descamadas (6 a 600.000) (CATE, 1988).

Como exemplo prático da utilização da saliva como fonte de DNA para identificação, pode-se citar o caso descrito por Yamamoto et al. (1998). Um esqueleto de criança foi encontrado no apartamento da possível mãe após ter sido guardado por 16 anos. Para a identificação, foram utilizados esses remanescentes ósseos do esqueleto e a saliva da suposta mãe, coletada de uma mancha de papel. Para a amplificação, utilizou-se 0,2 ng do DNA extraído do osso e 20 ng do DNA extraído da saliva. A tipagem do DNA foi realizada em treze loci e analisou-se a região D-loop (283pb) do DNAmT para identificação materna. Os resultados mostraram que somente dois haplótipos não foram compatíveis. Estes valores foram suficientes para concluir-se a relação de parentesco entre os indivíduos analisados. Os autores concluíram que a saliva pode ser considerada uma poderosa e confiável fonte de extração de DNA.

Na maioria dos casos de estudos genéticos de famílias e populações, o DNA ainda é obtido do sangue. Porém, conforme afirmam vários autores, o uso da saliva e de esfregaços bucais como fonte de DNA apresenta algumas vantagens técnicas em

relação ao sangue, pois, a coleta é feita mais facilmente e de maneira indolor, principalmente quando se considera a coleta feita em bebês, crianças e idosos, além de não oferecer implicações religiosas e culturais, como o sangue. Também, na coleta de sangue, há maiores riscos potenciais de contaminação, principalmente com hepatite e AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana), devido à utilização de material perfuro-cortante como agulhas, (SCHIE; WILSON, 1997; TREVILATTO; LINE, 2000).

Schie et al (1997) realizaram estudo para determinar se a saliva humana pode ser uma fonte confiável e alternativa para extração do DNA em relação ao sangue, para análise de alguns alelos polimórficos. DNA genômico foi extraído da saliva de 69 indivíduos saudáveis. Volumes tão pequenos como de 100µL de saliva, armazenados a -70°C por períodos prolongados (acima de 6 anos) foram suficientes para prover DNA em quantidade satisfatória para a análise genética por PCR. Duas amostras foram executadas para comparar o DNA extraído do sangue e da saliva de um número de indivíduos. Completa concordância foi encontrada entre a tipagem do DNA dessas amostras. Então, o autor afirmou que a saliva pode ser utilizada como uma excelente fonte de DNA para estudos de polimorfismos em substituição ao sangue.

Nesse mesmo sentido e com o objetivo de mostrar que as células epiteliais bucais são uma fonte segura de DNA para a amplificação por PCR, Trevillatto e Line (2000) coletaram amostras de células epiteliais bucais de 83 indivíduos e obtiveram sucesso na PCR. Eles comprovaram a seguridade deste tipo de fonte para extração do DNA, principalmente por ser mais facilmente coletável de pessoas relutantes em coletar o sangue, além da facilidade de sua obtenção, sem necessidade de supervisão médica e sem risco de contaminação.

Um caso de inclusão de paternidade utilizando-se a saliva, após a tentativa de substituição da amostra pelo pai, foi documentado. Assim, coletou-se a saliva do suposto pai e do filho e, na comparação das amostras, observou-se contaminação da amostra pelo pai. Após interrogatório, o pai admitiu a tentativa de burlar os resultados, através da introdução de saliva de outra pessoa. Foi realizado novo exame, permitindo a inclusão de paternidade (MARTINEZ-GONZALEZ et al., 2007).

O DNA também pode ser extraído de manchas de saliva. Estas são invisíveis, o que aumenta a dificuldade de reconhecê-las e coletá-las. Porém, desde

que alternativas de elevado padrão como a análise da amilase salivar, o uso de fontes de luz e lasers são amplamente empregados pela polícia para localizar manchas de fluidos corporais na cena do crime, a saliva depositada sobre qualquer substrato, como a pele, pode ser encontrada e reconhecida, até mesmo na ausência de marcas de dentes. Depois da análise do DNA salivar e da obtenção do perfil deste DNA encontrado nessa mancha de saliva, o resultado pode ser comparado com o perfil molecular dos suspeitos, obtidos através do swab bucal ou da coleta de sangue, por exemplo (PRETTY; SWEET, 2001).

O DNA presente na saliva encontrada na pele é mais difícil para coletar e extrair quando comparado ao DNA extraído da saliva encontrada em manchas em roupas, papéis ou outros objetos inanimados, pois a pele não pode ser submetida diretamente aos mesmos procedimentos para extração do DNA. Além disso, a quantidade de saliva depositada sobre a pele é geralmente muito pequena em casos de marcas de mordida (SWEET et al., 1996). Harvey (1976), citado por Wright e Dailey (2001), estima que cerca de 0,3 mL de saliva é depositada na pele durante a mordida, sendo, então, necessário usar métodos de coleta cujo resultado na recuperação seja o máximo de quantidade de saliva possível e que minimize qualquer potencial de contaminação pelas células da pele da vítima.

Pretty e Sweet (2001) enfatizaram a aplicação da PCR como método de amplificação deste DNA, afirmando que a saliva está presente em quantidade e qualidade suficiente para tipificação do DNA por PCR. Ainda, de acordo com estes autores, a técnica do duplo swab tem provado ser um efetivo método para obtenção de evidência salivar de pele humana e objetos inanimados, podendo-se conseguir a diferenciação entre os perfis de DNA da vítima e da saliva.

O swab ou suabe é um tipo de cotonete de haste longa, de madeira ou de plástico, sendo uma das pontas revestida com algodão ou outro material absorvente neutro. Estando a amostra seca, para que a transferência de material ocorra de forma eficiente, o swab deve ser previamente umedecido com água destilada estéril. No estado líquido, a amostra pode ser coletada através do leve umedecimento do swab na mesma, porém sem molhá-lo em demasia (SILVA; PASSOS, 2002).

Nesse mesmo íterim, Lijnen e Willems (2001) descreveram as técnicas para a coleta de saliva fresca e da saliva obtida da pele e de objetos. Assim, para a coleta da saliva diretamente na boca pode ser utilizado um swab bucal, realizando-

se a fricção do swab seco levemente pela bochecha. Já a saliva da pele pode ser obtida pelo duplo swab ou por um único swab contendo um papel de seda estéril molhado, sendo este papel colocado na pele para redução de possível contaminação. Para o duplo swab, a pele deve ser primeiramente friccionada, suavemente, com o swab estéril e molhado, para que ocorra a rehidratação e a liberação das células. Em seguida, estas células devem ser coletadas com o segundo swab seco. Todas as amostras obtidas pelas três técnicas devem secar à temperatura ambiente e armazenadas a 4°C. No caso dos objetos, após secagem deste em temperatura ambiente, eles devem ser cortados em pedaços e colocados em solução tampão. Em seguida, as amostras devem ser armazenadas em recipiente refrigerado, fechado e lacrado. O recipiente deve ser encaminhado ao laboratório o mais rápido possível.

Um trabalho realizado por Sweet et al (1997) comparou três técnicas de coleta da saliva em casos de marcas de mordida, com o filtro de papel, com o único swab e com o duplo swab e observou que a técnica do duplo swab foi mais eficiente na quantidade de material coletado (44,6%) em relação a do único swab (35,3%) e do filtro de papel, que mostrou ser a menos eficiente (17,4%).

Na literatura, encontram-se várias técnicas utilizadas na extração de DNA de saliva. As mais citadas são o método orgânico, o método Chelex clássico e o Chelex Modificado. O método orgânico utiliza fenol-clorofórmio para a extração do DNA. Os outros dois usam a resina Chelex, que tem alta afinidade por íons de metais, sendo que no método Chelex modificado, os swabs foram molhados em água destilada e incubados em diferentes temperaturas para aumentar a liberação das células dos mesmos. Estudo comparando a extração de DNA de saliva depositada sobre a pele simulando marcas de mordidas e utilizando essas três diferentes técnicas (Orgânica, Chelex Clássica e Chelex Modificada) mostrou que no último método, a quantidade de DNA obtida foi maior (aumento de 6,9%), porém os três métodos apresentaram possibilidades de aplicação em casos forenses (SWEET et al., 1996).

Em trabalho similar, porém apenas com a alteração do material do qual foi coletado a saliva, Fridez e Coquoz (1996) já apresentaram resultados diferentes quando compararam o método orgânico com o Chelex. Então, após a deposição de 10 a 20µl de saliva em selos usando uma pipeta, estes foram colados em envelopes. Em seguida, cada selo foi cortado em pedaços (2 x 2 mm) e o DNA foi extraído,

sendo que em parte foi usado o fenol-clorofórmio e na outra parte, a resina Chelex. Os resultados mostraram que a quantidade de DNA extraída foi maior no método orgânico (de 1 a 100 ng) comparado ao Chelex (2 a 10 ng), sendo que esta vantagem do primeiro método foi observada também na PCR.

Outro método de extração de DNA utiliza a resina InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Este método foi utilizado por Umeda et al, em 1998 para extração de DNA de saliva e comparação da detecção, por meio da PCR, de seis bactérias periodontopatogênicas. Sakai (2005) também realizou trabalho, no qual extraiu DNA de saliva utilizando-se a resina InstaGene. Como principal vantagem do uso desta resina, pode-se citar a facilidade de manuseio em comparação à resina Chelex, além da formação de bandas mais nítidas nas reações de PCR (UMEDA, 1998).

Com relação às condições de armazenamento da saliva e formas de obtenção desta, Walsh e colaboradores (1992) realizaram um estudo no qual a saliva foi examinada como potencial fonte para análise de DNA e testes de identificação. A saliva foi coletada de maneiras e substratos diferentes, como swabs bucais, filtros de cigarros, selos e invólucros de envelopes e, para simular uma situação forense, dois voluntários foram amordaçados por 15 minutos. O resultado obtido da saliva ou do swab bucal foi igual ao do obtido do cabelo e sangue desses indivíduos, evidenciando um padrão de bandas indistinguível para todas as amostras dos mesmos indivíduos. Também, o padrão de bandas obtido da saliva fresca foi idêntico aos de manchas de saliva nas mordanças, envelopes e no swab para o mesmo indivíduo. Segundo os autores, os resultados demonstraram que a saliva é uma boa fonte de DNA e este pode gerar padrões de bandas adequados para testes de identificação, sendo que a quantidade de 1 mL de saliva foi claramente suficiente para análise, mas uma quantidade igual ou menor que 100µL pode ser adequada em algumas situações. E, finalmente, os autores enfatizaram a facilidade da coleta da saliva como método não-invasivo e indolor, pois conseguiram coletar o esfregaço bucal e a saliva de um bebê de apenas seis meses de idade.

Ng Daniel et al. (2004) publicaram estudo em que analisaram o efeito de diferentes condições de armazenamento na extração de DNA genômico da saliva pela técnica de PCR. Assim, saliva coletada de quatro indivíduos saudáveis foi submetida a cinco diferentes condições de armazenamento em volumes de 2 ml. Os

resultados indicaram que a PCR resultou em um produto específico e único para todas as amostras, evidenciando que a saliva pode ser utilizada como fonte de DNA, mesmo quando armazenada em condições inferiores às consideradas ótimas.

No estudo de Allen, Saldeen e Gyllensten (1994), a saliva de dez indivíduos foi aplicada em selos e envelopes. O DNA foi extraído destes materiais, seguido da amplificação por PCR. Os resultados dos experimentos mostraram que uma pequena quantidade de DNA extraído dos selos e envelopes foi suficiente para a tipificação genética, quando a PCR foi aplicada. Nas dez amostras testadas, os genótipos obtidos dos envelopes e selos foram idênticos aos genótipos do DNA dos fios de cabelo dos mesmos indivíduos. A manipulação dessas amostras por pessoas diferentes e as diferentes cores e a cola usadas nos envelopes não afetaram a tipificação genética. O sucesso dos experimentos feitos no laboratório foi maior quando comparado ao de três casos forenses. Isso ocorreu porque o DNA das amostras foi extraído logo após o fechamento dos envelopes, enquanto que, nas amostras forenses, houve uma demora de mais de um ano para extração do DNA, sugerindo que produtos químicos, temperatura, umidade e luz-ultravioleta possam ter causado a degradação do DNA.

Enfatizando o sucesso na obtenção de saliva para extração de DNA de objetos como envelopes e selos, Hopkins et al. (1994) identificaram um indivíduo utilizando a PCR para detectar regiões hipervariáveis em DNA extraído de saliva puncionada de discos de 3mm de selos colados em um envelope. O perfil genético desse indivíduo foi realizado com sucesso e comparado com os perfis de um banco de dados com 500 códigos, os quais haviam sido produzidos por um laboratório, sendo facilmente identificado. Assim, os autores também mostraram que esses perfis de DNA individuais podem ser facilmente armazenados em um computador em forma de banco de dados para posterior utilização em processos de identificação desses indivíduos e de seus familiares.

Em casos de crimes sexuais, rapto e abuso sexual de crianças, assaltos e homicídios, nos quais frequentemente o agressor deixa marcas de mordidas e de sucção da pele como expressão de sua dominância, raiva e comportamento alterado, e a análise das impressões deixadas pelos dentes não pode ser conclusiva, devido às distorções causadas pela elasticidade e curvatura da pele, a

saliva pode ser coletada dessas marcas para se proceder à análise de DNA e identificação do agressor (PRETTY; SWEET; 2001; SILVA et al, 2006).

Nesse sentido, em estudo de Sweet et al. (1997), usando situações simuladas 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 cinco minutos, 24 horas e 48 horas. O DNA foi extraído e submetido à PCR para tipificação de dois loci STRs. Resultados indicaram que a concentração de DNA recuperado variou de acordo com o tempo, sendo comprovado um decréscimo na concentração nas primeiras 24 horas e estabilidade a partir deste tempo até 48 horas. Porém, houve sucesso na amplificação independente do tempo após o depósito da saliva e da concentração de DNA na amostra, além de nenhum caso de contaminação.

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 lago pelo período de 5,5 horas antes de ser descoberto e, independentemente da condição em que o corpo foi conservado, recuperou-se DNA suficiente da área da mordida, o que forneceu uma contribuição genotípica para a identificação do agressor. Essa eficiência comprova-se pelo fato da saliva, em contato com a pele intacta, e mantida em ambiente com condições estáveis, poder ser recuperada por pelo menos 60 horas após a sua deposição.

Portanto, Sweet e Hildebrand (1999) destacaram a importância de sempre se considerar a marca de mordida como uma evidência física e biológica e atentar-se para a recuperação de DNA em qualquer caso em que minúsculos traços de saliva estão presentes, até mesmo em situações envolvendo alimentos ricos em bactérias. Como exemplo, os autores descreveram um caso em que coletaram a saliva obtida em um pedaço de queijo mordido, encontrado na cena do crime. O queijo havia sido congelado pela polícia por dez dias antes de ser enviado ao laboratório. Para a coleta da saliva, foi utilizada a técnica do duplo swab, e também foi coletado sangue do suspeito. Através da tipagem de 10 loci STR por PCR, identificou-se o suspeito como o autor da mordida e, por conseguinte, do crime.

O trabalho de Anzai et al. (2005) também demonstrou a utilização da saliva coletada de marcas de mordidas para extração do DNA e sua contribuição na Odontologia Legal. Assim, vinte amostras de saliva foram coletadas de diferentes doadores e simulou-se casos envolvendo marcas de mordida. Os resultados indicaram que procedimentos padronizados para coleta e extração de DNA de saliva podem ser utilizados em casos forenses e a análise de saliva depositada sobre a pele pode ser incorporada ao conjunto de provas de um inquérito criminal já que possui um grande poder discriminatório.

A cavidade oral tem uma ampla variedade de bactérias, muitas das quais são únicas neste habitat. Há evidências de que bactérias orais são transferidas pelas mordidas e, em muitos casos, sobrevivem e se multiplicam, causando infecções. Entretanto, há evidências de que indivíduos abrigam colônias de espécies bacterianas singulares, as quais podem ser identificadas por técnicas como tipagem bacteriana e perfil protéico (ELLIOT et al., 1984). Assim, *streptococcus* recuperados da pele humana ou de objetos mostram que houve o contato desses com a superfície oral ou o depósito de saliva, evidenciando um envolvimento bucal na lesão (BORGULA et al., 2003).

Em trabalho no qual 10µl de amostra de saliva fresca foi coletado sem estimulação e aplicado na área do quadrante superior do tórax, Brown et al. (1984) mostraram, logo no início, uma perda na velocidade de crescimento das unidades que compunham a colônia e em seguida, uma recuperação dessa extensão de 45 a 50% por hora. Também se observou que, depois de 6,25 horas da deposição da saliva, *streptococcus* orais podiam ser recuperados.

Já em outro estudo, marcas de mordidas foram analisadas em intervalos de tempos para verificar a viabilidade de se isolar os *streptococcus* e posteriormente, proceder-se à comparação genotípica com as bactérias da cavidade oral. Concluiu-se que é possível recuperar a bactéria 24 horas após a ocorrência da mordida, mas a identificação afirmativa pode ser realizada somente com a comparação com a amostra adquirida dos dentes do responsável pela mordida. Desse modo, *streptococcus* isolados de recentes marcas de mordidas podem ser analisados por PCR e comparados com os dos dentes dos possíveis suspeitos. Porém, é preferível recorrer à análise do DNA dos suspeitos e reservar a análise das bactérias para

situações em que a tipagem do DNA do agressor não for possível de ser realizada (RAHIMI et al., 2005).

Considerando a importância da saliva humana como fonte de DNA nos processos de identificação, enfatizada por alguns trabalhos científicos, a realização de mais pesquisas para a ampliação do conhecimento e da aplicação deste material na Odontologia Forense torna-se extremamente importante.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como proposição:

Avaliar a qualidade do DNA obtido de saliva humana armazenada em dois diferentes períodos (7 e 180 dias) e sua aplicabilidade na identificação de pessoas em Odontologia Legal.

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Preliminarmente o projeto de pesquisa “A implantação de banco de saliva humana como ferramenta de apoio para a identificação através da Biologia Molecular” foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) sob Processo de número 140/2007 em 10 de Outubro de 2007 e aprovado em 31 de outubro de 2007, de acordo com o estabelecido pela Resolução nº 196/96 (BRASIL, 1996). (Anexo A). Após o andamento do trabalho e, mediante consenso dos pesquisadores envolvidos, o título foi alterado para “Avaliação da qualidade do DNA obtido de saliva humana armazenada e sua aplicabilidade na identificação forense em Odontologia Legal” (Anexo B).

4.2 AMOSTRA

Nesse estudo, 200 amostras salivares foram analisadas no total, coletadas de 100 sujeitos da pesquisa, sendo que cada participante contribuiu fornecendo duas amostras de sua saliva, uma de saliva *in natura* e outra pelo swab bucal único. Os sujeitos da pesquisa foram voluntários do município de Bauru, Estado de São Paulo que, por livre arbítrio, concordaram em participar da pesquisa após entendimento e acordo ao proposto, culminando com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a Resolução nº. 196/96 (BRASIL, 1996). (Anexo C).

A amostra, representativa de um subconjunto da população, foi selecionada de modo aleatório, sendo que gênero, idade e classe social não foram considerados fatores de exclusão. Nenhum dos voluntários desistiu de participar da pesquisa durante o andamento da mesma.

As amostras salivares foram coletadas em Bauru, nas dependências da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), com swab estéril aplicado na mucosa interna, secagem em ambiente ventilado e à sombra e armazenagem em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL apropriados. Estes tubos foram guardados em isopor contendo gelo picado para serem transportados até o laboratório das Disciplinas de Farmacologia e Fisiologia, Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru. Em seguida, estes foram armazenados em congelador à temperatura de -20°C. Também foi coletada saliva *in natura*, sem estimulação salivar prévia, porém com o descarte inicial, sendo armazenada uma quantidade de 2 mL da saliva coletada. Todos os tubos contendo saliva foram numerados de 1 a 100 a fim de resguardar a identidade dos voluntários. Tais amostras, acondicionadas em tubos de microcentrífuga de plástico, foram mantidas em refrigeração negativa de 20 °C.

A segunda etapa da pesquisa foi realizada no Laboratório de Genética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Crânio-Faciais de Bauru (HRAC-USP), Centrinho, sob a supervisão da Prof^a Dr^a Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo. Nessa fase, foram utilizadas apenas as amostras de saliva coletadas pelo swab bucal, sendo que do total de cem, foram selecionadas apenas vinte amostras, de maneira aleatória.

4.3 PRIMEIRA ETAPA - 7 DIAS

4.3.1 Extração do DNA

A extração de DNA de saliva foi realizada tomando-se como base a técnica documentada por Umeda, em 1998, modificada por Sakai et al. (2007), utilizando-se a resina Instagene.

Os tubos contendo as amostras de saliva foram descongelados em gelo picado e homogeneizados em agitador Vortex Phoenix AP56 por 30 segundos. Preliminarmente ao processo de extração, 1 mL de água foi adicionado a cada tubo, contendo 1mL de saliva (proporção de 1:1), e, em seguida estes foram homogeneizados. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 5 minutos numa Centrífuga refrigerada a 4°C (Heraeus Biofuge 15R, Heraeus Equipament Ltda, Brentwood, UK), para a separação das células de sua parte aquosa.

O pellet resultante de cada amostra foi lavado em água destilada estéril da seguinte forma: descartou-se o sobrenadante e acrescentaram-se 1mL de água; os tubos foram homogeneizados no agitador e centrifugados a 10.000 X g por 5 minutos. Este processo de lavagem do “pellet” foi realizado 4 vezes para cada amostra. O sobrenadante foi novamente descartado e pellet suspenso em 100 µL de água livre de DNAase e RNAase (Qiagen gmbH, Hilden, Alemanha) e 100 µL de InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA).

Em seguida, o conteúdo destes tubos foi transferido para um tubo de microcentrífuga estéril de 0,5 mL e incubado a 56°C por 30 minutos em termociclador (Progene, Tecnhne, Cambridge, UK). As amostras foram novamente homogeneizadas e fervidas durante 10 minutos para a obtenção do DNA. Após nova centrifugação (10.000 g por 3 minutos), para remover células não lisadas e restos celulares de tamanho grande, 170µL do sobrenadante foram pipetados para um novo tubo de microcentrífuga estéril para posterior análise por PCR.

4.3.2 Reações da PCR para o gene B-actina

Para a reação de PCR, foi utilizado o termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). Foi obtida uma mistura contendo 5µL de amostra de DNA advindo da saliva ou do swab, 5µL de solução-tampão para PCR (Gibco/BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA), 1,25 unidades de Taq DNA Polimerase (Taq Promega®), 0,2 mM de desoxinucleotídeos (Invitrogen), 0,4 µM do primer e 1,5 mM de Cloreto de magnésio (Gibco/BRL). O Quadro 4.1 apresenta a concentração dos reagentes utilizada na reação de PCR. A sequência de primers utilizada para a amplificação do gene humano que codifica a proteína B-actina está apresentada na Tabela 4.1. Como controle positivo foi utilizado DNA humano advindo do sangue. Já o controle negativo consistiu na substituição do DNA por água, assim sendo possível detectar possíveis contaminações de alguns dos reagentes requisitados para a reação de PCR.

A ciclagem térmica utilizada para este par de primers sucedeu-se da seguinte forma: 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 30 s, 72°C por 1,5 min, seguido de uma extensão final foi de 72°C por 10 minutos (Quadro 4.2).

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO
DNA	5µL
Solução tampão	5µL
Taq DNA	1,25 unidades
Desoxinucleotídeos	0,2 mM
Primer	0,4 µM do primer
MgCl ₂	1,5 mM

Quadro 4.1 Concentração de reagentes utilizados na PCR

Tabela 4.1 - Sequência dos primers utilizados na amplificação do gene humano que codifica a proteína β -actina

	ORIENTAÇÃO	SEQÜÊNCIA
Gene (B-actina)	Forward	Aaccgcgagaagatgaccagatcatgt
	Reverse	Agcagccgtggccatctcttgctcgaagtc

PROGRAMA	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
Hot-start	94°C	2'	
Desnaturação	94°C	45"	} 40 ciclos
Hibridização	58°C	30"	
Polimerização	72°C	1,5'	
Final	72°C	10'	
Resfriamento	4°C	∞	

Quadro 4.2 - Ciclagem padrão utilizada nas PCRs

4.3.3 Eletroforese e detecção dos produtos de PCR

Os produtos da PCR (10 μ L de cada amostra amplificada) foram analisados por meio de uma eletroforese horizontal em gel de agarose a 2%.

Para o preparo do gel, utilizou-se 50 mL de solução tamponada composta por Trisma base, ácido bórico e EDTA (TBE), 1 g de agarose e brometo de etídio na proporção de 0,5 μ g/mL. Montou-se, então, o sistema de eletroforese horizontal (Loccus biotecnologia, São Paulo, SP, Brazil), no qual despejou-se a mistura e adicionou-se o pente. Após a polimerização do gel (aproximadamente 30 minutos), o pente foi retirado, e o gel coberto com tampão para eletroforese (TBE).

Em seguida, iniciou-se o carregamento do gel com uma alíquota de 10 μ L de cada amostra submetida à PCR. Em uma das extremidades do gel, também foi utilizada uma alíquota de 1 μ L de padrão de peso molecular, acrescida de 1,8 μ L de

tampão de carregamento e 8 µL de água destilada estéril. A eletroforese foi realizada com a aplicação de corrente de 100 V durante 1 hora.

Após a eletroforese, o gel de agarose foi colocado sobre um transiluminador ultravioleta (T 2202, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), realizando-se, imediatamente, a fotodocumentação para registro da presença de produtos amplificados de tamanhos antecipados. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb (Amersham). O produto amplificado era constituído de 351 pares de bases (pb).

4.4 SEGUNDA ETAPA – 180 DIAS

Nesta etapa, foram analisadas apenas as amostras de saliva coletadas por swab bucal único. Assim, foram selecionadas, aleatoriamente, 20 amostras (n=20) do total de cem amostras de saliva coletadas por swab bucal. O método de extração do DNA foi o mesmo utilizado na 1ª etapa, bem como os reagentes e as condições da PCR para o gene B-actina.

4.4.1 Reação da PCR para o gene SIX3-2

Como a genotipagem forense tem como núcleo principal de sua atividade chegar-se à exata identificação do indivíduo, e, para isso, há necessidade da busca por maior controle de qualidade na manipulação e na análise das amostras, um outro gene humano, o SIX3-2 foi testado nas amostras. Além disso, com o objetivo de se aprofundar a análise do DNA salivar, de maneira mais próxima ao padrão exigido em um processo de identificação, realizou-se a digestão do produto da PCR com a enzima de restrição MbO1 para avaliar o polimorfismo 1291C>G no gene ADRA-2A. Esses genes humanos foram escolhidos devido aos inúmeros trabalhos já realizados com os mesmos pela co-orientadora desta pesquisa, assegurando-lhe um

grande conhecimento sobre o comportamento destes genes e as precisas concentrações necessárias de reagentes para se obter um perfil de bandas adequado, o qual pode ser utilizado para se obter o perfil genético do indivíduo estudado. Nesta fase foi utilizado o DNA extraído das amostras de saliva, o qual estava armazenado a -20°C . As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro GE[®] e diluídas a uma concentração final de 20ng/ml. A amplificação do SIX3-2 foi realizada com volume de 20ul contendo DNA genômico (60ng), dNTPs (100uM), primers (25pmol cada) e Taq polimerase (5U). O “PCR Enhancer Kit” (Invitrogen[®], CA) composto de tampão 10X, MgSO₄ e solução enhancer também foi utilizado nas reações (Quadro 4.3). A sequência dos primers utilizados na amplificação do gene SIX3-2 encontra-se na Tabela 4.3. O protocolo utilizado para a amplificação da sequência do SIX3-2 encontra-se descrito no quadro 5.1. A PCR foi realizada nas condições apresentadas no Quadro 4.4. A eletroforese foi realizada segundo o mesmo padrão das etapas 1 e 2, sendo que o produto amplificado era constituído de 374 pares de bases (pb).

REAGENTES	VOLUME
Tampão (10x)	2,0uL
Enhancer	1,0uL
MgSO ₄ (50mM)	0,6uL
dNTP (100mM)	0,3uL
Primer F (25uM)	0,4uL
Primer R (25uM)	0,4uL
Taq DNA polimerase (5U)	0,3uL
H ₂ O	13,5uL
DNA	2,0uL

Quadro 4.3 - Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR

PROGRAMA	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
Hot-start	94°C	4'	
Desnaturação	94°C	30"	} 40 ciclos
Hibridização	56°C	30"	
Polimerização	72°C	1'	
Final	72°C	7'	
Resfriamento	4°C	∞	

Quadro 4.4 - Ciclagem padrão utilizada nas PCRs

Tabela 4.2 - Seqüência dos primers utilizados para a amplificação do gene SIX3-2

	ORIENTAÇÃO	SEQÜÊNCIA
SIX3-2	Foward	Tggcgggcctctgtgtcagg
	Reverse	Gttgggtatcctgatttcg

4.4.2 Digestão com enzima de restrição Mb01 para análise de polimorfismo do gene ADRA-2A

As amostras 1, 2, 17, 26, 35, 51, 55 e 58 foram submetidas à digestão por 2 horas com enzima de restrição MbO1. As enzimas de restrição são enzimas bacterianas que atuam como "tesouras moleculares", reconhecendo seqüências de pares de bases específicas em moléculas de DNA e cortando-as nesses pontos. Elas são altamente específicas: cada tipo de enzima reconhece e corta apenas uma determinada seqüência de nucleotídeo, em geral constituída por 4 ou 6 pares de bases nitrogenadas. A digestão com a enzima MbO1 resulta em quatro fragmentos constantes (5, 62, 116 e 165 pb), Os reagentes estão especificados no Quadro 4.5.

REAGENTES	VOLUME
PCR	15,0 uL
H ₂ O	5,5uL
Tampão da enzima	2,5uL
Enzima de restrição	2,0uL
Óleo	1 gota
Temperatura	37°C
	25uL

Quadro 4.5 - Reagentes utilizados na digestão com enzima de restrição

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para a análise estatística, foi utilizado o teste de McNemar, com nível de significância de 5%. A análise foi realizada no programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, Release 9.1, 2003).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 PRIMEIRA ETAPA - 7 DIAS

Inicialmente, extraiu-se o DNA das 100 amostras de saliva *in natura* e das 100 amostras de saliva coletadas pelo swab único, no tempo considerado zero, uma semana após a coleta e armazenamento em temperatura negativa de 20°C. Foram obtidos os seguintes resultados: quando se utilizou a saliva *in natura* como fonte de DNA, em um total de 100 amostras, 94% (n= 94) responderam positivamente à extração de DNA e à reação de PCR, enquanto que, para a saliva advinda do swab bucal, das 100 amostras analisadas, 98% (n= 98) responderam de maneira positiva às mesmas reações (Tabela 5.1). Não foi possível a detecção do gene alvo nas amostras de números 4, 59, 65, 75, 97 e 100 para *saliva in natura*. E das amostras de saliva coletadas pelo swab bucal, não foi possível a detecção do mesmo gene alvo nas amostras de número 20 e 21. Os padrões de bandas obtidos nas reações de PCR para as amostras de saliva *in natura* e saliva do swab bucal estão representados nas figuras de 5.1 a 5.9.

Comparando-se os resultados positivos e negativos obtidos com as amostras de saliva *in natura* e saliva do swab bucal, não houve diferenças estatisticamente significativas entre ambas. E, quando não foi possível a detecção do gene alvo, não houve coincidência entre as amostras do mesmo indivíduo, ou seja, quando a resposta foi negativa para um tipo de amostra (saliva *in natura* ou advinda do swab bucal), apresentou-se positiva para a outra de mesmo número.

Analisando-se a saliva total, através da soma das amostras de saliva *in natura* com as amostras de saliva de esfregaço bucal, totalizando 200 amostras, a extração de DNA e reações de PCR positivas foram possíveis em 96% (192) delas (Tabela 5.2).

	POSITIVA	NEGATIVA
	N (%)	N (%)
Saliva <i>in natura</i>	94 (94%)	6 (6%)
Saliva do swab	98 (98%)	2 (2%)
TOTAL	192 (96%)	8 (4%)

SALIVA IN NATURA	SALIVA DO SWAB	
	POSITIVA N (%)	NEGATIVA N (%)
Positiva	92 (97,9%)	2 (2,91%)
Negativa	6 (100,0%)	0 (0,0%)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Figura 5.1 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva in natura. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; colunas 2 - 30, amostras 01 a 29 de DNA de saliva in natura

Figura 5.2 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva in natura. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb, colunas 2-8, amostras de 30 a 36 de DNA de saliva in natura e colunas 9-11, controles negativos-água

Figura 5.3 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva in natura. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb, colunas 2 e 3, controles positivos (sangue) e colunas 4-30, amostras 37 a 63 de DNA de saliva in natura

Figura 5.4 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva in natura. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb, colunas 2-30, amostras 64 a 92 de DNA de saliva in natura

Figura 5.5 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva in natura e saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb, colunas 2-10, amostras 92 a 100 de DNA de saliva in natura e colunas 11-31, amostras 01 a 21 de DNA de saliva do swab bucal

Figura 5.6 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb e colunas de 2-29, amostras 22 a 50 de DNA de saliva do swab bucal

Figura 5.7 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo dos produtos da PCR. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb e colunas de 2-21, amostras 51 a 70 de DNA de saliva de swab bucal

Figura 5.8 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb, colunas 2-30, amostras 71 a 99 de DNA de saliva do swab bucal.

Figura 5.9 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2, amostras de DNA de saliva do swab bucal

5.2 SEGUNDA ETAPA- 180 DIAS

5.2.1 Amplificação do gene B-actina

Nesta etapa, foram analisadas apenas as amostras de saliva coletadas por swab bucal único, já que os resultados para ambas mostraram-se coincidentes na primeira etapa. Assim, foram selecionadas, aleatoriamente, 20 amostras (n=20) do total de cem amostras de saliva coletadas por swab bucal.

Extraíu-se o DNA e realizou-se a PCR destas 20 (n=20) amostras de saliva após o armazenamento das mesmas por 180 dias em temperatura negativa de 20°C. O método de extração do DNA foi o mesmo utilizado na 1ª etapa, bem como os reagentes e as condições da PCR. Os resultados indicaram que foi possível a amplificação do gene B-actina nas 20 amostras de saliva selecionadas aleatoriamente, após 180 dias de armazenagem, perfazendo uma resposta de 100% (Tabela 5.3). Os padrões obtidos nas reações de PCR estão representados nas figuras 5.10 e 5.11).

Tabela 5.3 - Distribuição de frequências de reações positivas e negativas para a extração de DNA e amplificação por PCR para as amostras de saliva humana coletadas por swab bucal.

	POSITIVA	NEGATIVA
	N (%)	N (%)
SALIVA DO SWAB	20 (100%)	0 (0,0%)

Figura 5.10 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-11, amostras de DNA de saliva do swab bucal (amostras: 1, 2, 5, 14,17, 26, 27, 35)

Figura 5.11 - Padrão obtido da PCR nas amostras de saliva do swab bucal. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-11, amostras de DNA de saliva do swab bucal (amostras: 53, 55, 58, 60, 61, 63, 65, 67, 77)

5.2.2 Amplificação do gene SIX3-2

A amplificação do gene SIX3-2 foi realizada, inicialmente, nas amostras de número 1, 2, 14, 17, 26. Os resultados indicaram a amplificação positiva para todas as amostras. (Figura 5.12).

Figura 5.12 - Padrão obtido da PCR para amplificação do gene SIX3-2. Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-6, amostras dos produtos da PCR da saliva do swab bucal (amostras: 1, 2, 14, 17 e 26).

Repetiu-se a mesma PCR, agora para as amostras: 5, 27, 35, 48, 51, 53, 55, 58, 60, 61. Os resultados indicaram uma amplificação positiva para amostras: 35, 48, 51, 53, 55, 58, 60, 61 (Figuras 5.13 e 5.14).

Figura 5.13 - Padrão obtido da PCR para amplificação do gene SIX3-2. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-10, amostras dos produtos da PCR da saliva do swab bucal (amostras: 5, 27, 35, 48, 51, 53, 55, 60).

Figura 5.14 - Padrão obtido da PCR para amplificação do gene SIX3-2. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-10, amostras dos produtos da PCR da saliva do swab bucal (61)

5.2.3 Digestão com enzima de restrição Mb01 e para análise de polimorfismo do gene ADRA-2A

As amostras 1, 2, 17, 26, 35, 51, 55 e 58 foram submetidas à digestão por 2 horas com enzima de restrição MbO1. Os reagentes utilizados na reação estão especificados no quadro 5.1. Os resultados mostraram que todas as amostras foram digeridas com a enzima de restrição (Figura 5.15).

REAGENTES	VOLUME
PCR	15,0 UI
H ₂ O	5,5uL
Tampão da enzima	2,5uL
Enzima de restrição	2,0uL
Óleo	1 gota
Temperatura	37 ⁰ C
	25uL

Quadro 5.1 - Reagentes utilizados na digestão com enzima de restrição

Figura 5.15 - Padrão obtido após digestão das amostras de saliva do swab bucal com enzima Mb01 para polimorfismo do gene ADRA-2. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pb; coluna 2-9, amostras: 1, 2, 17, 26, 35, 51, 55, 58

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Preliminarmente, é importante discutir acerca da mística muitas vezes formada em torno do DNA, trazendo a idéia errônea de infabilidade da prova do material genético, ou seja, fazendo grassar a falsa expectativa de alcance quase infinito desta prova, que se mal elaborada pode levar a erros judiciais, em algumas situações até irreparáveis.

E, como todo método de identificação humana, o DNA também apresenta limitações para sua aplicação. Por exemplo, no caso de gêmeos idênticos serem suspeitos de um crime em que o autor deixou vestígios, o DNA em nada poderia colaborar para a elucidação do delito, uma vez que não se consegue distinguí-los por serem geneticamente iguais, ao passo que a papiloscopia sim, se dentre os vestígios existirem impressões digitais. Nesse mesmo íterim, as condições de preservação do material biológico de um cadáver carbonizado ou de um cadáver que tenha ficado por muito tempo submerso no mar, muitas vezes não permitem, através da análise de DNA, que se alcancem dados com significância estatística para afirmar sobre sua identidade, porém, o exame do arco dentário pode ser mais significativo nesta situação. Outro ponto importante a ser abordado nas limitações da análise de DNA, principalmente na área criminal, diz respeito às peculiaridades da análise. Características intrínsecas a cada vestígio biológico podem se tornar barreiras intransponíveis como, por exemplo, a inibição da reação da PCR para materiais oriundos de algumas vestimentas coloridas com índigo ou raspados de um cinto de couro e impregnados de taninos (BONACCORSO, 2000).

Entretanto, apesar de todas as limitações envolvendo a análise de DNA, principalmente para uso forense, sua importância como prova extremamente esclarecedora permanece (*ad perpetuam rei memoriam*), se realizada segundo as recomendações técnicas preconizadas. E, quando bem aplicada, a prova pautada na análise de DNA será contundente e robusta, só restando à defesa a tentativa da desarticulação da conexão verossímil. Assim, as alegações da defesa provavelmente voltarão o foco das atenções para a busca de um erro na interpretação estatística, erros de taxas, o controle de qualidade das análises e, no

caso da PCR, questões de contaminação. Portanto, para se garantir a credibilidade de tão importante ferramenta, deve-se implementar no Brasil, conforme já ocorre em outros países, rigorosos padrões de qualidade para coleta, armazenagem e análise de material genético, estudos de frequência de diferentes marcadores genéticos presentes na população e bancos de dados de DNA ou biobancos de material potencialmente fonte de DNA para análise forense.

Também, torna-se imprescindível ressaltar que as provas periciais que buscam a identidade ou não identidade de um ser humano são tratadas para que se perpetue no bojo processual na verificação de uma coisa ou fato. *Ad perpetum rei memoriam* é uma locução latina que designa um meio de prova destinado a preservar, para efeitos jurídicos, o estado atual de determinado fato ou coisa, prevenindo sua inutilização para efeitos probatórios. Assim sendo, a identificação através da secreção de saliva requer conhecimentos genéticos e médico/odontológicos, porque é de natureza própria da competência profissional específica, determinando-se essencialmente a identificar ou não o ser humano suspeito.

Pode-se afirmar que a contribuição na identidade ou não identidade é competência do odontologista, e vem a ser determinada quando o vestígio foi configurado *in vitam*, mediante processos biológicos, clínicos e laboratoriais, aplicáveis por peritos judiciais. Na investigação criminal, a circunstância que se observa é determinada como um vestígio e a busca da verdade passa pela conexão com o fato incerto de que se pretende a prova através do sinal encontrado. Cabe ao perito trilhar de modo que através do vestígio fique provado o indício, próximo ou remoto. O DNA extraído da saliva, muitas vezes, é falível, a não ser que exista um rol de suspeitos que toca aos acidentes do crime, e tem com ele relação íntima e necessária. Pressupõe-se que um banco de saliva humana para extração e tipificação de DNA possa, de maneira mediata e de longo prazo, criar uma cultura que facilitaria a investigação criminal nos casos de verosimilhança com suspeitos conhecidos e previamente catalogados neste banco.

Galdino Siqueira (2003) adverte:

Indício é fato, circunstância acessória que se liga ao crime, e por onde se conclui, quer que o crime foi consumado, quer que um determinado indivíduo nele tomou parte, quer que há crime e que foi consumado de tal ou qual maneira. Assim, os indícios versam ou sobre o fato, ou sobre o agente ou sobre o modo do fato. Não se deve, porém, confundir os indícios, que forma a prova chamada circunstancial.

A veemência técnica das provas originárias de DNA mostra-se irrefutável, classificando-as como indícios graves, precisos e concordantes. A operacionalização do banco ora proposto tem segmento simplório em relação à população que possui acesso aos mais diversos meios de tratamento odontológico. E, de acordo com a revista de literatura apresentada neste estudo, o uso da saliva para extração de DNA em processos de identificação pode ser considerada em várias situações. Assim, a saliva pode ser utilizada em Odontologia e Medicina Legal em casos de identificação de restos mortais de uma vítima pela comparação com amostras anteriores da mesma pessoa ou com amostras de parentes biológicos, determinação de paternidade e vinculação de suspeitos a crimes, como, por exemplo, em crimes envolvendo marcas de mordidas e sucção.

A saliva humana pode ser considerada como uma fonte cientificamente comprovada e eficaz para extração de DNA, para análise de polimorfismos e para a determinação do perfil genético individual. Além disso, a criação de bancos de dados de perfis genéticos individuais a partir da saliva seria totalmente viável à medida que pesquisadores da área, centros de estudos, centros de investigações criminais e laboratórios firmassem parcerias com esse propósito. Por isso, discussões acerca da padronização da coleta e do armazenamento, do tipo de análise e do cálculo da frequência genética utilizando-se softwares específicos somente serão melhores discutidas no Brasil na medida em que se desenvolverem grupos que estabeleçam normas deste tipo. Neste trabalho, defende-se a criação de grupos deste tipo e de biobancos de saliva e bancos de dados de DNA humanos em laboratórios e centros de estudos.

As discussões acerca dos princípios éticos e legais envolvendo a criação desses bancos, principalmente no que se referem à obrigatoriedade dos exames de DNA, existem à semelhança das tensões sentidas com a evolução da medicina decorrente do desenvolvimento da genética humana. A necessidade de proteger a dignidade humana, a privacidade e a autonomia, remete para o legislador uma

necessária ponderação dos vários interesses que compete proteger. No caso em questão, com as características mais específicas relativas à criação e conservação de bancos de dados de saliva humana para obtenção de perfis de DNA para fins de investigação criminal ou para fins de identificação civil, pode-se afirmar que pondera quanto ao reforço dos poderes do Estado, dada a necessidade de segurança do próprio Estado e dos seus cidadãos, e que tal necessidade pode condicionar ou comprimir direitos, liberdades e garantias destes.

Daí que a legislação sobre esta matéria procure estabelecer um equilíbrio aceitável entre a necessidade de tratamento dos dados genéticos e a proteção do indivíduo. A proibição de qualquer tipo de discriminação baseada no conhecimento dos dados genéticos é um princípio, tanto ético como jurídico, que pode ser encontrado nos diversos textos internacionais: Carta dos Direitos Fundamentais da UE (artº 21º, nº 1)², Convenção sobre os Direitos do Homem e a Biomedicina do Conselho da Europa (artº 11º)³, Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos, da Unesco (artº 9º)⁴, ou a Declaração Universal sobre Genoma Humano e os Direitos do Homem (artº 6º) e a Declaração Internacional sobre os Dados Genéticos Humanos (artº 7º) ambas da Unesco (HENRIQUES; SIQUEIROS, 2007).

A Resolução nº 194 de 1999, da Secretaria de Segurança Pública (São Paulo, 1999), prevê, em seu artigo 6º, a existência de um Termo de Coleta de material biológico de pessoa viva que deverá ser lavrado perante testemunhas. Neste, o doador declara estar fornecendo o material de livre e espontânea vontade, descaracterizando, por exemplo, a obrigatoriedade de coleta de material para a criação de um banco de dados de DNA criminal. Esta previsão leva em conta o princípio *nemur tenetur se detergere*, um dos princípios do Processo Penal ligado ao Devido Processo Legal, previsto no inciso LXIII do artigo 5º da Constituição da República (TORNAGHI, 1988; DAMÁSIO, 1989). Entende-se que o acusado deve evitar se auto-acusar, não estando obrigado a fazer prova contra si mesmo. Essa inferência gerou o surgimento de posições divergentes. A primeira delas defende que a justiça não pode obrigar réu algum a se submeter a exame de DNA, citando o referido artigo da Constituição, inclusive o seu inciso X que consigna serem invioláveis a intimidade, a vida privada, a honra e imagem das pessoas e defendendo que a obrigatoriedade significa uma ofensa à integridade física e à dignidade pessoal do acusado. A segunda posição, por sua vez, defende que, acima

dos interesses individuais do acusado, está o interesse da vítima ou da família desta e os interesses do Estado. Ainda, deverá constar no Termo citado a declaração do órgão coletor de que o material biológico colhido será utilizado única e exclusivamente para exames relacionados com a ocorrência criminal que se está apurando e não em outras passadas ou futuras. Esse fato não impede a criação de biobancos de dados para exames de DNA, porém remonta à necessidade de definição da propriedade, do controle e do acesso a esses dados.

A dificuldade na coleta de material genético encontra-se, primeiramente, na resistência à novidade, reação comum do ser humano e no desconhecimento sobre a real aplicação deste DNA, fruto de mistificações geradas pela ficção exagerada em torno do assunto, pois, se ninguém considera um constrangimento a colheita das impressões digitais, porque dificultar tanto a colheita de um fio de cabelo ou de um pedaço de unha para exame de DNA? Ainda, não se deve levar a um rigor extremo a idéia de incolumidade física, pois a coleta de um fio de cabelo, de um pedaço de unha, de um pouco de sangue ou de saliva não causam nenhum constrangimento, e, no caso da última, nenhuma dor. Com relação ao princípio do *nemo tenetur se detergere*, quando qualquer pessoa é identificada ou precisa ser identificada, o princípio do silêncio não é aplicado, ou seja, não se pergunta ao acusado se ele aceita que as digitais deixadas no local do crime sejam examinadas, do mesmo modo, não é aceitável que se admita a recusa do réu de se submeter ao exame de DNA e ainda que haja a recusa do réu a entregar seu material biológico, poderia se realizar uma busca desse material nos registros do mesmo ou nos ambientes nos quais vive. Além disso, esse princípio não é prevalente ao direito de identidade, já que ambos são igualmente constitucionais e o princípio da não auto-acusação não pode impedir que o Estado tenha e utilize os registros de seus cidadãos (DOUGLAS; KRYMCHANTOWSKI, DUQUE, 2003).

Portanto, não é linear o direito a proibir a organização de bancos de dados genéticos com fins de investigação criminal, em nome dos direitos estritamente individuais, se isso permitir que, no seu conjunto, a humanidade possa ter uma vida mais segura e que familiares de desaparecidos possam tê-los identificados em vida ou depois da morte.

Entretanto, todas as disposições internacionais, bem como os pareceres já emitidos por Conselhos Nacionais de Ética, no âmbito dos biobancos, salientam

quatro aspectos fundamentais: extremo cuidado com o consentimento informado (excetuando-se os casos em que o suspeito não queira fornecer material biológico, devendo-se coletá-lo por outros meios) que aqui se torna particularmente melindroso, dado que está sempre em aberto a emergência de novos campos de investigação não previstos à partida, grande rigor na dimensão sigilosa da informação recolhida e recurso ao anonimato sempre que isso seja compatível com o tipo de investigação, qualidade de procedimentos, equipamentos e competências dos recursos humanos envolvidos e procurar a adesão da sociedade ao sentido e à utilidade da recolha e armazenamento dos dados.

Frequentemente, o material biológico encontrado na cena do crime ou coletado de cadáveres e restos mortais, presentes tanto no corpo da vítima ou em objetos, é escasso ou apresenta-se degradado (BURGER et al., 1999; FBI, 2001; INTERPOL, 2001). Dessa maneira, há uma preocupação de se garantir a preservação da amostra biológica para a extração e análise de DNA, e estes cuidados são especificados pelas poucas normativas existentes, como a Resolução SSP-SP 194 de 2 de junho de 1999 (SÃO PAULO, 1999), o manual da INTERPOL (2001) e do FBI (1999, 2001). Na tentativa de nos aproximar de casos de identificação reais, atendeu-se às normativas referentes à coleta e armazenamento preconizados por essas autoridades.

Assim, evitou-se ao máximo a contaminação por DNA externo, que poderia dificultar ou até mesmo impossibilitar a extração do DNA procurado, principalmente porque a utilização das técnicas de PCR possibilita, inclusive, a amplificação do DNA de uma única célula, mesmo degradada (WALKER; RAPLEY, 1999; INTERPOL, 2001; STRACHAN; READ, 2002). Essa única célula, ao contaminar as amostras biológicas, poderia ter seu DNA amplificado juntamente com o DNA procurado, comprometendo a análise do perfil genético, e, conseqüentemente, impossibilitando a identificação do indivíduo.

E, quando a saliva é utilizada como fonte de DNA, esse risco de contaminação por DNA externo deve ser considerado, devido à facilidade do contato com outros materiais pela boca e até, por exemplo, a presença de saliva de outra pessoa pelo contato do beijo íntimo. E, embora não tenha sido o objetivo deste trabalho, é importante enfatizar-se que, quando na realização da identificação individual, encontrar-se DNA humano contaminado por DNA de outra ou de outras

peessoas, a análise do perfil genético de cada indivíduo através de comparação com um perfil pré-existente dos mesmos indivíduos ou com amostras de parentes biológicos destes será determinante para o sucesso da identificação.

As normas da INTERPOL (2001) citam que o descongelamento e o recongelamento constantes das amostras podem degradar o DNA. Portanto, houve o cuidado de armazenar os swabs bucais contendo a saliva em dois tubos de microcentrifuga, possibilitando que fossem congeladas a -20°C até a sua utilização, cada tubo para uma fase da pesquisa. E, no caso da criação de biobancos de dados de saliva humana, o manejo dessas amostras ocorreria no momento em que fosse necessária a tipificação de determinado indivíduo, sendo que, posteriormente, seria armazenado o DNA deste indivíduo.

Além disso, outros cuidados foram devidamente seguidos na realização das reações da PCR, objetivando evitar a contaminação das amostras, tais como o isolamento físico da área de preparação da PCR e de seus produtos utilizados, e também o controle da temperatura, da umidade e do valor do pH e a escolha correta de controles negativos e positivos, os quais podem auxiliar na detecção de contaminantes (KWOK; HIGUCHI, 1989; BURGER et al., 1999; FBI, 1999; INTERPOL, 2001; ANZAI, 2002; SILVA; PASSOS, 2002). As amostras sempre foram manejadas com a utilização de luvas e máscaras, em ambiente estéril, e em tempos muito curtos. A água deionizada utilizada nas reações da PCR foi autoclavada, bem como as outras soluções, com exceção dos iniciadores, dos dNTPs, o tampão e a Taq DNA polimerase. Além disso, os reagentes da PCR foram misturados em um único tubo e posteriormente, adicionados aos tubos de microcentrifuga contendo as amostras de DNA individuais.

Para auxiliar na detecção de contaminantes, utilizou-se controles negativos e positivos. Como controle negativo, usou-se a água, e, como controle positivo, utilizou-se sangue humano nas reações da PCR. No caso dos controles negativos (água), não houve a amplificação desejada e, para os controles positivos (sangue), a amplificação foi idêntica à obtida com a saliva humana, indicando a ausência de contaminação e comprovando tratar-se de DNA humano. Assim, pode-se afirmar que a saliva humana pode ser uma fonte confiável e alternativa para extração do DNA quando comparada ao sangue, fato comprovado por trabalhos científicos como

os realizados por Schie et al (1997), Trevillatto e Line (2000) e Ng Daniel et al. (2004) e já descritos anteriormente.

Ainda, conforme a descrição de Umeda et al. (1998), para a PCR utilizando-se como amostra a saliva, este processo se baseia em lavagens e centrifugações repetidas, cujos objetivos principais são remover possíveis inibidores da PCR e permitir uma diminuição no limite de detecção das células-alvo. Então, esse protocolo foi devidamente seguido, sendo que a lavagem e as centrifugações foram repetidas 4 vezes, seguindo orientação deste autor.

Além disso, considerando-se que a saliva, um material biológico, pode conter moléculas que podem inibir a PCR, fez-se necessário, nesse trabalho, mesmo após as sucessivas lavagens e centrifugações, a utilização de uma matriz comercial de purificação de DNA. Isso porque a inibição não pode ser superada pelo aumento na quantidade de primers nem pelo aumento na quantidade de DNA na reação da PCR, já que desta forma também são introduzidos mais inibidores desta reação. Essa matriz tem a capacidade de quelar íons bivalentes, favorecendo a eficiência da extração do DNA e protegendo o DNA em altas temperaturas (MÄTTÖ, 1998; CONRADS, 1999).

Assim, poderia-se utilizar a resina Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) ou a Instagene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Porém, estudos realizados com o uso de Chelex 100 para a extração do DNA, resultaram em bandas referentes aos alvos procurados, no entanto, fracas e de difícil visualização (SAKAI, 2005). Desta forma, InstaGene Matrix foi utilizado, de acordo com as instruções do fabricante, obtendo-se resultados positivos.

O período de 7 e 180 dias de armazenamento das amostras congeladas antes da extração do DNA teve como objetivo avaliar a durabilidade da saliva quando armazenada, já que na literatura, há trabalhos mostrando que a saliva pode ser armazenada sem sofrer alterações, contribuindo para a criação de biobancos de saliva humana. Como exemplos destes trabalhos, pode-se citar o de Walsh et al. (1992), que extraiu o DNA da saliva no dia zero e depois de 10 a 14 dias, Schie et al. (1997), o qual testou o armazenamento desta fonte de DNA por 6 anos e Ng et al. (2004), que fez as extrações de DNA em tempos diferentes, 7 dias e 1 mês.

Todos estes trabalhos obtiveram resultados muito promissores para o uso da saliva em biologia molecular, pois, mesmo nas diferentes condições de armazenagem, muitas vezes condições inferiores às consideradas ótimas para a extração de DNA, os resultados indicaram a obtenção de produtos específicos e de tamanho correto para todas as amostras. Em trabalho realizado por Schie et al (1997), no qual a saliva foi armazenada em diferentes condições, por períodos maiores de 6 anos, volumes pequenos deste material, como de 100µL de saliva, foram suficientes para prover DNA em quantidades satisfatórias para a análise genética pela PCR.

Nesta nossa pesquisa, na primeira fase, foi possível a extração de DNA humano em 96% das amostras e, na segunda etapa, em 100% delas, evidenciando a possibilidade de armazenagem da saliva humana sem o risco de que esta ou o DNA sofram alguma alteração por, pelo menos, 180 dias antes de sua utilização para extração de material genético. Isso ratifica a possibilidade de formação de bancos de dados de DNA a partir da saliva, sugerindo, inclusive, o uso desta ao invés do sangue para extração de DNA.

Alguns autores obtiveram os mesmos padrões de bandas para os mesmos indivíduos partindo de manchas de saliva em mordanças, envelopes e swab, saliva fresca, e sangue, de saliva de marcas de mordida e da pele (SWEET et al, 1996; SWEET et al., 1997; SWEET; SHUTLER, 1999; BORGULA et al., 2003; RAHIMI et al, 2005; ANZAI, 2002), de manchas de saliva (YAMAMOTO et al., 1998), saliva fresca ou *in natura* (BROWN et al, 1984; SCHIE et al, 1997; Ng et al, 2004; MARTINEZ-GONZALEZ et al., 2007), de selos e cartas (ALLEN et al., 1994, HOPKINS et al., 1994, FRIDEZ; COQUOZ, 1996), e de alimentos, como queijo (SWEET; HILDEBRAND, 1999). Os resultados da primeira etapa deste estudo mostraram que não houve diferenças estatisticamente significantes entre as duas formas de coleta de saliva utilizadas. E, quando não foi possível a detecção do gene alvo em alguma amostra, este resultado nunca foi coincidente para a mesma amostra, ou seja, quando não se conseguiu o padrão de bandas esperado para uma amostra de saliva *in natura*, este padrão era observado na amostra de swab bucal de mesmo número, sendo o contrário também verdadeiro. Por isso, na segunda fase, optou-se apenas pela repetição das reações para análise de DNA na saliva.

Na primeira fase deste trabalho, quando da amplificação do gene humano B-actina, a banda observada no gel de agarose era evidente, porém havia um rastro no gel mostrando que a amplificação não era de boa qualidade. Para avaliar se o problema era a qualidade do DNA extraído ou a amplificação do gene, utilizou-se um outro gene humano, o SIX3-2. Os resultados apresentados no gel de agarose, após a amplificação, mostraram bandas evidentes e sem rastros, comprovando, portanto, a boa qualidade do DNA extraído. Além disso, para testar esse DNA em análises procedentes à PCR, utilizou-se a enzima de restrição MbO1 para análise de um polimorfismo no gene ADRA2A. Em todas as amostras testadas, a enzima reconheceu o sítio de restrição e o cortou em fragmentos. Esses resultados mostraram que a quantidade e a qualidade do DNA advindo de saliva do swab bucal, mesmo após um período de armazenamento, bem como as técnicas empregadas estão adequadas à análise forense do DNA.

Por fim fica patente a facilidade do cirurgião-dentista frente ao paciente, enquanto a coleta de saliva e o devido acondicionamento em bancos de saliva. A criação do biobanco de saliva, como base para análise de DNA, em centros regionais seria uma ferramenta superlativa à segurança pública e ao bem estar da comunidade em detrimento das muitas dúvidas forenses que poderiam ser resolvidas com um investimento modesto em se tratando do poder de resolutividade criminal, cível, trabalhista, além de outras como dúvidas de cunho pessoal/familiar.

Sem profetizar, mas idealizando com base em nosso estudo, em poucas décadas a criminalística, a ciência forense e a população colheriam resultados dignos de notas com este banco de dados por nós defendido.

Frente a esse fato, sugere-se a crescente discussão e a realização de trabalhos sobre as perspectivas da aplicação da saliva humana como ferramenta na identificação humana através da Biologia Molecular.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com base no que foi exposto e discutido nos capítulos anteriores deste trabalho, pode-se concluir que:

- O DNA obtido da saliva humana, armazenada em períodos de 7 e 180 dias, pode ser considerado como ferramenta de conexão verossímil entre vestígio e indício, devido a sua qualidade para fins de identificação forense.

Referências

REFERÊNCIAS

- Akane A, Sieke S, Shiono H. Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of dna X-Y homologous gene. *Forensic Science International*. 1992; 52: 143-8.
- Alberts B, Bray D, Leiws J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.
- Allen M, Saldeen T, Gyllensten U. PCR- Based DNA typing of saliva on Stamps and Envelopes. *Biotechniques*.1994; 17(3):546-52.
- Alves IC. Processos de identificação. *Revista Brasileira de Odontologia*.1956; 82:191-203.
- Amoedo O. Study of the teeth after death from a medicolegal standpoint. *Dental Digest*. 1903; 9: 604-8.
- Andersen L, Wenzel A. Individual identification by means of conventional bitewing film and subtraction radiography. *Forensic Sci. Int*. 1995; 72(1):55-64.
- Anvisa. Norma ISSO/ IEC 17.025. Norma para laboratório de ensaio e calibração. 2005. [acesso em 2008 jan 12]. Disponível em www.anvisa.gov.br.
- Anzai EK. Extração de DNA de saliva humana depositada sobre a pele e sua aplicabilidade aos processos de identificação individual. [Dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2002.
- Anzai EK, Hirata MH, Hirata RDC, Nunes FD, Melani RFH, Oliveira RN. DNA extraction from human saliva deposite on skin and its use in forensic identification procedures. *Braz Oral Res*. 2005; 19 (3): 216-22.
- Arbenz GO. Identidade e identificação –conceitos gerais. In: _____-Medicina Legal e Antropologia Forense. 1ªed. Rio de Janeiro: Atheneu;1988.
- Austin SD, Maples WR. The realiability of skull/photograph superimposition in individual identification. *J Forensic Sci*.1994; 39(2): 446-55.
- Baechtel FS, Presley KW, Smerick JB. D1S80 typing of DNA from simulated forensic specimens. *J Forensic Sci*. 1995; 40: 536.
- Bernstein ML. The aplication of photography in Forensic Dentistry. *Dent Clin. North Am*.1983; 27(2): 51-170.
- Bonaccorso N. Análise Forense de DNA [monografia].São Paulo (SP): Academia de Polícia de São Paulo; 2000.

Borgula LM, Robinson FG, Rahimi M, Chew KEK, Birchmeier KR, Owens SG. Isolation and genotypic comparison of oral streptococci from experimental bitemarks. *J Forensic Odontostomatol.* 2003; 21: 23-9.

Botstein D, White R, Skolnick M, Davis R. Construction of genetic linkage maps using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics.* 1980; 32: 314-31.

Brannon RB, Morlang WM. The USS Iowa disaster: success of the forensic dental team. *J Forensic Sci.* 2004; 49 (5):1067-8.

Brasil. Conselho Federal de Odontologia. Resolução nº. 63, de 30 de Junho de 2005. Consolidação das normas para procedimentos nos conselhos de Odontologia. [acesso em 2007 mar 20]. Disponível em: URL: <http://www.cfo.org.br>.

Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de Outubro de 1996. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres Humanos. [acesso em 2007 fev 10]. Disponível em: URL: <http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Res.196>.

Brown KA, Elliot TR, Rogers AH, Thonar JC. The survival of oral streptococci on human skin and its implication in bite mark investigation. *Forensi Sci Int.* 1984; 26: 193-7.

Budowle B. Curso prático de DNA forense. Academia de Polícia Civil do Distrito Federal- APC/DF. Brasília, Associação Brasileira de Criminalística-ABC, 26-29/06 de 1996.

Bugawan T, Saiki RK, Levenson CH. The use of non-radioactive oligonucleotide probes to analyse enzymatically amplified DNA for prenatal diagnosis and forensic HLA typing. *Bio/Technology.* 1988; 6: 943-47.

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

Butler JM. *Forensic DNA typing.* 2ª ed. San Diego: Academic Press; 2005.

Calabrez MCT, Saldanha PH. A pesquisa de DNA em odontologia forense. In: Silva M. *Compêndio de odontologia legal.* Rio de Janeiro: Editora Medsi; 1997; cap.14, p. 167-221.

Campobasso CP, Falamingo R, Vinci F. Investigation of Italy's deadliest building collapse: forensic aspects of a mass disaster. *J Forensic Sci* 2003; 48(3):635-9.

Caskey CT, Edwards A, Hammomd HA. DNA: the history and the future use in forensis analysis. In: *Proceedings of the international symposium on the forensic aspects of DNA analysis.* Quantico, VA, FBI Forensic Science Research and Training Center, 1989.

Cate T. *Oral histology: development, structure and function.* Saint Louis: Mosby; 1988.

Chemello E. *Química Virtual* (Março, 2007). [acesso em 2008 maio 10]. Disponível em www.quimica.net/emiliano.

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

Committee on DNA Forensic Science. The evaluation of forensic DNA evidence. Washington: National Academy Press; 1996.

Commission of the international society for forensic haemogenetics report. Report: concerning recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of the DNA polymorphisms. [Editorial] *Forensic Sci. Int.*, v.42, p.125-30, 1992.

Conrads G. Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA gene-directed multiplex PCR. *J Clin. Microbiol.* 1999; 37 (5):1621-4.

Côrrea R. Regulamentação da odontologia. Curitiba: Instituto Paranaense de Estudos Superiores; 1976.

Croce D, Croce-Júnior D. Manual de medicina legal. 5ª ed. São Paulo: Saraiva; 2004.

Damásio EJ. Código de processo penal anotado. 8ª ed. São Paulo: Saraiva, 1989.

Del-Campo ERA. Medicina legal. 2ª ed. São Paulo: Saraiva; 2006. cap.3, p. 57-99.

Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD et al. Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs - results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Sci Int* 2006; 164 (1): 33-44.

Douglas W, Krymchantowski VA, Duque FG. Medicina Legal à luz do Direito Penal e Processual Penal. 2ªed. Rio de Janeiro: Ed. Impetus; 2003.

Duarte FAM. A avaliação do DNA como prova forense. 1ª ed. Ribeirão Preto: Fundec; 2001.

Dumancic J, Kaic Z, Njemirovskij V, Brkic H, Zecevic D. Dental identification after two mass disasters in Croatia. *Croat Med J.* 2001; 42: 657-62.

Elliot TR, Rogers AH, Haverkamp JR, Groothuis D. Analytical pyrolysis of streptococcus salivaris as an aid to identification in bite-mark investigation. *Forensic Sci Int.* 1984; 26:131-7.

Endris R. Odontological contribution to the of identification camp physician Josef Mengele. *Arch. Kriminol.* 1985; 176(5-6).

ENFSI - European Network of Forensic Science Institutes, Report on DNA Legislation in Europe. [acesso em 2009 jan 12]. Disponível em: www.enfsi.org.

Evetts IW, Weir BS. Interpreting DNA evidence statistical genetics for forensic scientists. Inc, MA, USA: Sinauer Associates; 1998.

Farah SB. DNA: segredos & mistérios. São Paulo: Saraiva; 1997.

Federal Bureau of Investigation (FBI). Handbook of forensic services: Evidence examinations- DNA general [manual online].1999. [acesso em 2008 maio 10]. Disponível em <http://www.fbi.gov/hq/lab/handbook/exasdna.htm>.

Federal Bureau of Investigation (FBI). Quality assurance audit for forensis DNA and convicted offender DNA databasing laboratories. Forensic Sci Commun[periódico online]. 2001. [acesso em 2001 set 28]. Disponível em <http://www.fbi.gov/hq/lab/backissu/jan2001/dnaaudit.htm>.

Federal Bureau of Investigation (FBI). The FBI's Combined DNA Index System Program. [manual online] (2002 Nov) [acesso em 2002 nov 03]. Disponível em <http://www.fbi.gov/hq/lab/codis/brochure.pdf>.

Ferreira RA. Reconhecendo pela boca. Rev. Assoc Paul. Cir. Dent. 1996; 50 (6): 464-73.

Freitas Jr. A semana. Rev. Isto é. 2003; 1786:25.

Fridez F, Coquoz R. PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction. Forensic Sci Int. 1996; 78:103-10.

Furtado F. Do lixo ao luxo: DNA tido como irrelevante pode ser mais importante para a evolução do que se pensava. Ciênc Hoje On-Line. (2005 Out 31). [acesso em 2007 maio 3]. Disponível em: URL: <http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3564>.

Galante-Filho H, Figini AL, Reis AB, Jobim LF, Silva M. Identificação humana. 1ªed. Porto Alegre: Sagra Luzzatto; 1999.

Galvão LCC. Estudos médico-legais. Porto Alegre: Sagra Luzzatto; 1996.

Gill P, Werrett DJ. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. Forensic Sci Int. 1987; 35:145-8.

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 Cult Extensão USP 2005. [acesso em 2007 fev 10]. Disponível em: URL:

<http://www.usp.br/prc/revista/>.

Góes ACS. Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias. Revista do Biomédico, n.65. [acesso em 2008 mar 29]. Disponível em: www.crbm1.com.br/bio65/artigocien-65.asp.

Goldim JR, Matte U. Bancos de DNA. Considerações éticas sobre o armazenamento de material genético [acesso em 2008 jan 12]. Disponível em: www.ufrgs.br/bioetica/bancodn.htm.

Goulart G. Caso Roberta. Correio Brasiliense 2003; 2: 30.

Griffiths CJ. Forensic dental training in Austrália. *Forensic Science Int.* 1988; 36 (3-4): 279-82.

Henriques F, Sequeiros J. Relatório do regime jurídico da base de dados de perfis de ADN. Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida. Presidência do Conselho de Ministros. Junho de 2007.

Higuchi R, Von Beroldingen CH, Sensabaugh CG, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature.* 1988; 332 (7):543-6.

Hochmeister MN, Rudin O, Ambach E. PCR analysis from cigarette butts, postage stamps, envelope sealing flaps and others saliva-stained material. In: Lincoln PJ, Thomson J, editors. *Forensic DNA profiling protocols*. Totowa: Humana Press; p.27-32. *Methods in molecular biology*, 98, 1998.

Holland M M. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World trade Center attacks. *Croatian Medical Journal.* 2003; 44: 264-72.

Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam war. *J. Forensic Sci.* 1993; 38 (3):542-53.

Hopkins B, Morten JEN, Smith JC, Markham AF. The development of methods for the analysis of DNA extracted from forensic samples. *Technique.* 1989; 2: 96.

Hopkins B, Williams NJ, Webb MBT, Debenham PG, Jeffreys AJ. The use of minisatellite Variant Repeat- Polymerase Chain Reaction (MRV-PCR) to determine the source of saliva on a Used Postage Stamp. *J of Forensic Sci.* 1994; 39 (2):526-31.

Hsu CM, Huang NE, Tasi 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: 43-46.

Huffine E, Crews J, Kennedy B, Bomverger K, Zinbo A. Mass identification of persons missing from the break-up of the former Yugoslavia: structure, function and role of the international commission on missing persons. *Croat Med J.* 2001; 42: 271-5.

Impraim CC, Saiki RK, Erlich HA, Teplitz RL. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochemistry Biophys Res Commun.* 1987; 142: 710-6.

Internacional Criminal Police Organization (INTERPOL). *INTERPOL handbook on DNA data exchange and practice*. [manual online] 1ª edição. (2001 June). [acesso em 2002 mar 01]. Disponível em

<<http://www.interpol.int/Public/Forensic/dna/HandbookPublic.pdf>.

Jacob RF, Shalla CL. Post-mortem identification of the edentulous deceased: denture tissue surface anatomy. *J Forensic Sci.* 1987, 32 (3): 698-702.

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 Luzzatto; 1999; cap.11, p. 239-303.

Keiser-Nielsen S, Strom F. The odontological identification of Eva Braun Hitler. *Forensic Sci Int.* 1983; 21: 59-64.

Kessler, HP, Pemble CW. Forensic dental identification of casualites during Operation Desert Storm. *Mil. Med.* 1993;158 (6):359-62.

Kullman L, CIPI B. International co-operation in a dental identification. *J Forensic Odontostomatol.* 1992; 10 (1):25-31.

Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature.* 1989; 339:237-8.

Lander ES. DNA fingerprinting on trial. *Nature*, 1989; 339: 501-5.

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

Li H, Gyllensten UB, Cui X. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature.* 1988; 335: 414-17.

Lincoln PJ, Thomson J. *Methods in molecular biology: forensic DNA profiling protocols.* Totowa: Humana Press; 1998.

Lijnen I, Willems G. DNA in Forensic Dentistry. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2001, 23 (9): 511-17.

Lombardi R. O DNA a serviço da investigação policial. *Rev Ciênc Criminal* 2007; 1(8):12-4.

Lorente JA, Entrada C, Alvarez C, Arce B, Heinrichs B, Lorente M et. al. Identification of missing persons: the Spanish "Phoenix" Program. *Croat Med J.* 2001; 42: 267-70;

Ludes B, Tracqui A, Pfitzinger H, Kintz P, Levy F, Disteldorf M. Medico-legal investigations of the airbus A320 crash upon Mount Ste-Odile, France. *J Forensic Sci.* 1994; 39: 1147-52.

Machado CM. Biossegurança em laboratórios. *Laes e Haes*, v.23, p.60-72, 1996.

Mann RW. Maxillary suture obliteration: aging the human skeleton based on intact or fragmentary maxilla. *J Forensic Sci.* 1987; 32 (1):148-57.

Martin PD, Schmitter H, Schneider PM. A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. *Forensic Sci Int.* 2000; 119: 225-231.

- Martinez-Gonzalez LJM, Lorente JA, Martinez-Espin E, Alvarez JC, Lorente M, Villnueva E, Budowle B. Intencional Mixed Buccal Cell Reference Sample in a Paternity Case. *J Forensic Sci.* 2007; 52 (2): 397-99.
- Mätto J et al. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (1): 157-60.
- 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.
- Morgan OW, Sribanditmongkol P, Perera C, Sulasmi Y, Alphen DV, Sondorp E. Mass fatality management following the South Asian tsunami disaster: case studies in Thailand, Indonsesia, and Sri Lanka. *PLoS Med.* 2006; 3 (6):809-15.
- Moura-Neto RS. Análise forense. *Rev Panorama Justiça* 1998; 9: 38.
- Nambiar P, Jalil N, Singh B. The dental identification of victims of an aircraft accident in Malaysia. *Int Dent J* 1997; 47(1):9-15.
- National Research Council. DNA technology and forensic science. Washington, National Academy Press, 1992.
- Ng DPK, Koh D, Choo SGL, Ng V, Fu Q. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clinica Chimica Acta.* 2004; 343:191-94.
- Oliveira RN, Daruge E, Galvão LCC, Tumang AJ. Contribuição da odontologia legal. para a identificação “post-mortem”. *Rev Bras Odontol* 1998; 55 (2):117-22.
- Oliveira RN. Determinação do sexo através de mensurações mandibulares. *Rev. ABO Nac.* 1995; 3 (4): 241-244, ago./set.
- Ozaki AN. Determinação da frequência de genes de algumas regiões hipervariáveis do genoma humano para estudo do vínculo genético familiar em caucasianos brasileiros [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 1999.
- Paneto GG. Utilização do DNA mitocondrial no contexto forense brasileiro [dissertação]. Araraquara (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP; 2006.
- Paradela ER, Figueiredo AL dos S. O DNA vai ao tribunal: o impacto das tipagens genéticas. 2007. [acesso em 13 jan 2008]. Disponível em: www.artigonal.com/direito-artigos/o-dna-vai-ao-tribunal-o-impacto-das-tipagens-geneticas-380007htm.
- Paradela ER, Figueiredo ALS. Genética Forense: coleta, documentação e transferência de evidências biológicas destinadas a testes forenses de DNA. Trinolex, São Paulo, 2006. [acesso em 2007 jan 11]. Disponível em www.Trinolex.com/artigos_view.asp?artigos&id=3177.

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.

Penna SDJ. O DNA como (única) testemunha em determinação de paternidade. *Bioética*. 1997;5: 231-41.

Petersen KB. A hotel fire. *Int. Dent. J.* 1975; 25 (3): 172-208.

POST (The Parliamentary Office of Science and Technology, UK): The National DNA Database, Postnote nº 258. (Fev 2006). [acesso em 2009 jan 15]. (Disponível em www.parliament.uk/parliamentary_offices/post/pubs2006.cfm).

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

Pretty IA, Sweet D. A look at forensic dentistry- Part 2: Teeth as weapons of violence identification of bitemark perpetrators. *British Dental Journal*. 2001; 190 (8):415-18.

Rahimi M, Heng NCK, Kieser JA, Tompkins GR. Genotypic comparison of bacteria recovered from human bitemarks and teeth using arbitrarily primed PCR. *Soc Appl Microbiol*. 2005; 99:1265-70.

Reilly PR, McEwen JE. Stored Guthrie Cards as DNA Banks. *Am J Hum Genet*. 55: 196-200, 1989.

Remualdo VR, Oliveira RN. Potencial de análise forense do DNA de diferentes amostras biológicas. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2005; 59 (6):421-4.

Ribeiro, F de A.Q. Um método de padronização de medidas feitas em radiografias dos seios frontais para ser utilizado na identificação pessoal. [tese]. São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo;1993.

Rothwell, BR et.al. Dental identification in serial homicides: the Green River murders. *J. Am. Dent. Assoc.*, 1989;119 (3):373-379, sep.

Rudin N, Inman K. An introduction to forensic DNA analysis. 2ª ed. Florida: CRC Press; 2002.

Sajantila A, Strom M, Budowl B. The polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing: application of Amplified D1S80 and HLA-DQalfa to the identification of fire victims. *Forensic Science International*. 1991; 51: 23-34.

Sakai VT. Detecção de bactérias periodontopatogênicas na saliva de crianças em fase de dentadura mista. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2005.

Sakai VT, Campos MR, Machado MA, Lauris JR, Greene AS, Santos CF. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. *Int J Pediatr Dent*. 2007; 17(3):192-9.

São Paulo. Decreto nº 44.336, de 15 de outubro de 1999. Regulamenta a Lei nº. 9.934, de 16 de abril de 1998, que assegura a gratuidade para realização, por determinação judicial, de exames DNA, aos comprovadamente pobres, nas ações de investigação de paternidade e dá providências correlatas. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo (SP) 1999.

São Paulo. Secretaria de Segurança Pública. Resolução SSP-194 de 02 de junho de 1999. Diário Oficial do Estado. 1999 Jun, 3; seção 1:104.

Sassouni V. Dentofacial radiography in forensic dentistry. J Dent Res. 1963; 42(1):274-302.

Santos CF, Sakai VT, Machado MAAM, Schippers DN, Greene AS. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. J Appl Oral Sci. 2004; 12(1):1-11.

Schie RCAA van, Wilson ME. Saliva; a convenient source of DNA for analysis of bi-allelic polymorphisms of Fc γ receptor IIA (CD32) and Fc γ receptor IIIB (CD16). Journal of Immunological Methodos. 1997; 208:91-101.

Schneider PM. Scientific standards for studies in forensic genetics. Forensic Science International. 2006;165 :238-43.

Silva M. Compêndio de Odontologia Legal. 1ªed. São Paulo: Ed. Medsi; 1997.

Silva LAF, Passos NS. DNA forense: coleta de amostras biológicas em locais de crime para estudo do DNA. Maceió: UFAL; 2002.

Silva LAF; Majella E de. O DNA e os desaparecidos (27/09/2002). [acesso em 2009 jan 10]. Disponível em: www.dnapaternidade.com.br/imprensa%20desaparecidos.htm.

Silva RHA, Musse JO, Melani RFH, Oliveira RN. Human bite mark identification and DNA technology in forensic dentistry. Braz J Oral Sci. 2006; 5: 1193-7.

Silva RHA, Oliveira RN. Odontologia legal e a busca pela identidade humana (2006 Dez 01) [acesso em 2006 dez 20]. Disponível em: URL: <http://www.jornaldosite.com.br>.

Silva RHA, Sales-Peres A, coordenadores. Odontologia Legal: manual-resumo, compêndio de grandes obras medicina legal e odontologia Legal. Bauru; 2004. Silva [Apostila do curso preparatório para concursos em Odontologia Legal].

Silva RHA. Estudo de frequência alélica de cinco loci STR do cromossomo X na população do Estado de São Paulo e sua contribuição na identificação humana. [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2007.

Smith BC. Introduction to DNA analysis. Forensic Odontology. 2001. 45 (2): 229-35.

Siqueira G. Indício e sua suficiência para a condenação (2 set 2003). [acesso em 2009 jan 10]. Disponível em reservadejustica.wordpress.com/tag/prova_indiciaria.

Sociedade Brasileira de Medicina Legal. Recomendações para laboratórios de teste de paternidade. 1ªed., 1999.

Sognnaes RF. The mystery bridges of Martin Bormann's alleged Berlin skull-key clues for forensic identification or another Piltdown case? *Int. Dent. J.* 1975; 25 (3):184-90.

Solheim T. The "Scandinavian Star" ferry disaster 1990- a challenge to forensic odontology. *Int J Legal Med.* 1992; 104 (6): 339-45.

Steagall W, Silva M. A importância da dentística na identificação pelos dentes no arco dental. *Rev. Paulista de Odontologia.* São Paulo. 1996; 5: 23-34, set./out.

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

Strackfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis.* 2002; 8: 69-76.

Sweet D, Lorente M, Valenzuela A, Lorente JA, Alvarez JC. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. *Forensic Sci Int.* 1996; 83: 167-17.

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

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 (2): 320-322.

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

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 D, Hildebrand D. Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: a case report. *Int J Legal Med.* 1999; 112: 201-3.

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

Syrjäen SM, Sainio P. Forensic dentistry: recent development towards an independent discipline in modern dentistry. *Proc Finn Dent Soc.* 1990; 86(3-4):157-70.

Tornaghi H. Curso de processo penal. 1ª ed. São Paulo: Saraiva; 1988.

Tracey M. Short tandem repeat based identification of individuals and parents. *Croat Med J.* 2001; 42(3):233-8.

Trevillato PC, Line SRp. Use of buccal epithelial cell for PCR amplification of large DN fragments. *The Journal of Forensic Odonto-Stomatology.* 2000; 18 (1).

Umeda M. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *J. Periodontol.* 1998; 69 (7): 828-33.

Valenzuela A, Marques T, Exposito N, Martín-de-las-Heras S, García G. Comparative study of efficiency of dental methods for identification of burn victims in two bus accidents in Spain. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002; 23 (4):390-3.

- Valenzuela A, Martin-de-las-Heras S, Marques T, Exposito N, Bohoyo JM. The application of dental methods of identification to human burn victims in a mass disaster. *Int J Legal Med* 2000; 113:236-9.
- Walker MR, Rapley R. Guia de rotas na tecnologia do gene. São Paulo: Atheneu; 1999.
- Walsh DJ, Corey AC, Cotton RW, Forman L, Herrin GL Jr, Word CJ, Garner DD. Isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva. *J Forensic Sci* 1992; 37 (2): 387.
- Wikipédia. UK National DNA Database. (2007). [acesso em 2007 abril 28]. Disponível em http://en.wikipedia.org/wiki/UK_National_DNA_Database.
- Wright FD, Dailey JC. Human bite marks in forensic dentistry. *Dent Clin North Am*. 2001; 45 (2) : 365-97.
- Yamamoto Y, Ishizu H. Km genotyping by polymerase chain reaction (PCR) using allele-specific amplification primers. *Forensic Sci Intern*.1995; 75: 85.
- Yamamoto T, Uchiki R, Kojima T, Nozawa H, Huang XL, Tamaki K, Katsumata Y. Maternal identification from skeletal remains of an infant kept b the alleged mother for 16 years with DNA typing. *J Forensic Sci*. 1998; 43 (3):701-5.

ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 140/2007

Bauru, 5 de novembro de 2007.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"A implantação de banco de saliva humana como ferramenta de apoio para a identificação através da Biologia Molecular"**, de autoria de Suzana Papile Maciel e do Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 31 de outubro de 2007 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Ana Lúcia Álvares Capelloza
Vice-Coordenadora, em exercício

Prof. Dr. Arsênio Sales Peres
Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

ANEXO B – Ofício de aprovação para alteração do título

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – Brasil – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679
Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Of. nº CEP/02 2009/FOB
Proc. CEP nº 140/2007
Bauru, 04 de fevereiro de 2009.

Senhor Professor,

Informamos que após análise por este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, a alteração do título do projeto de pesquisa "A implantação de banco de saliva humana como ferramenta de apoio para a identificação através da Biologia Molecular" de autoria de Suzana Papile Maciel, Prof. Dr. Ricardo Henrique Alves da Silva, sob sua orientação e co-orientação do Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, por "Avaliação da qualidade do DNA obtido de saliva humana armazenada e sua aplicabilidade na identificação forense em Odontologia Legal" foi aprovado considerando que não houve modificação em sua metodologia.

Lembramos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para a publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Maria Teresa Atta
Coordenadora

Prof. Dr. Arsênio Sales Peres
Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 –
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado voluntário, desde já agradecemos pela sua disposição em colaborar conosco, cumprimos, pois com o dever de esclarecer pontos que podem ser desconhecidos por V. Sa. e motivam de maneira direta o intuito de nossa equipe em realizar o presente trabalho e por consequência de utilizar-se de seres humanos no bojo da pesquisa. Como amplamente divulgado após os dois últimos acidentes aéreos brasileiros, o da GOL em 2006 e o mais recente da TAM no presente ano de 2007, cada vez mais necessita-se um preparo mais eficiente para identificar pessoas em casos de catástrofes que a comoção coletiva está em pauta de destaque, haja vista que a demora acarreta ainda mais sofrimento e pesar em familiares e na população como um todo. A identificação dos indivíduos tornou-se imprescindível em todas as esferas das relações humanas, seja ao nível social ou jurídico. Através dela, as pessoas podem preservar seus direitos, bem como terem cobrado os seus deveres cívicos ou penais. Fato posto, esse ensaio tem como objetivo colaborar com as pesquisas na área de identificação humana, com a proposta da utilização da saliva humana nessa identificação. Assim, será avaliada a durabilidade dos métodos de armazenagem da saliva humana para uso em identificação humana em comparação em diferentes tempos (1 mês, 3 meses, 6 meses, 12 meses). Com sua ajuda, sem quaisquer riscos para sua saúde física ou mental, a ciência odontológica de maneira simples, porém eficiente, poderá verter contribuição superlativa ao processo de identificação de um humano, se necessário. Basta que você concorde em nos ceder um pouquinho de sua saliva, digamos que vulgarmente seria uma cusparada bem aproveitada. Para participar desse estudo, você irá apenas contribuir com uma amostra pequena de sua saliva, que será coletada de duas maneiras diferentes:

1º) Com um "Swab bucal", uma espécie de cotonete, que será passado na parte interna de sua boca por um pesquisador e a saliva armazenada num papel específico para esse fim;

2º) Você deverá "Cuspir" num frasco pequeno de vidro que será fornecido pelo pesquisador. Assim, sua saliva será armazenada e passará por alguns procedimentos de laboratório para que possamos "isolar" (estudar) seu DNA nela e mostrar que é possível utilizá-la para a sua identificação.

Caso você queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço da Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da Biblioteca, FOB-USP) ou pelo telefone (14)3235-8357. A pesquisadora responsável também coloca-se à disposição para quaisquer esclarecimentos ou reclamações: Suzana Papile Maciel Carvalho (telefone 19-34242189 ou 19-91075725).

Pelo presente instrumento que atende meramente as formalidades às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa do TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente do procedimento ao qual será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa pode, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 5º, Inciso VI do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

_____, _____ de _____ de 2007.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Suzana Papile Maciel Carvalho
Pesquisadora

Arsenio Sales Peres
Orientador