

LEONARDO SORIANO DE MELLO SANTOS

**VIABILIDADE DA UTILIZAÇÃO DE AMOSTRAS
BIOLÓGICAS OBTIDAS DE DENTES HUMANOS PARA
OBTENÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS DE DNA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Biologia Buco Dental Área de Concentração: Odontologia Legal e Deontologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior

Co-Orientador: Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello

PIRACICABA

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Sa59v Santos, Leonardo Soriano de Mello.
Viabilidade da utilização de amostras biológicas obtidas de dentes humanos para obtenção de perfis genéticos de DNA. / Leonardo Soriano de Mello Santos. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Eduardo Daruge Júnior, Darcy de Oliveira Tosello
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Odontologia legal. 2. Genética forense. 3. Dente serotino. I. Daruge Júnior, Eduardo. II. Tosello, Darcy. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Viability of the acquirement of genetic DNA profiles using human teeth

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Forensic dentistry. 2. Forensic genetics. 3.

Molar, third

Área de Concentração: Odontologia Legal e Deontologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Darcy de Oliveira Tosello, Luiz Francesquini Júnior, José Roque

Camargo

Data da Defesa: 17-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 17 de Fevereiro de 2009, considerou o candidato LEONARDO SORIANO DE MELLO SANTOS aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "D. Tosello", written over a horizontal line.

PROFa. DRa. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "José Roque Camargo", written over a horizontal line.

PROF. DR. JOSÉ ROQUE CAMARGO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Luiz Franceschini Júnior", written over a horizontal line. The signature is enclosed within a large, hand-drawn oval.

PROF. DR. LUIZ FRANCESCHINI JÚNIOR

Dedico este trabalho a meus pais Ferreira e Lucia, ícones em vida, fontes de amor incondicional, dos quais sem o incentivo, carinho e o investimento, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** primeiramente pela dádiva divina que é a vida; poder estar neste mundo e crescer com os ensinamentos que a vida proporciona.

Meus pais queridos Ferreira e Lucia, fontes de amor e suporte pra tudo de bom que pude realizar em minha vida até aqui. Sem vocês, além de nada disso ser possível, nada teria muito sentido também ! Amo vocês, meus pais, meus melhores amigos !

Minha irmã Luciana. Teu amor, tua alegria, teu sorriso, crescer contigo, são coisas que só um irmão mais velho privilegiado como eu tiveram a graça. Te amo minha irmã.

Meu cunhado André. Teu bom humor e teus cuidados com a minha irmã, te fizeram ganhar um irmão que hoje podes ver em mim !

À minha namorada Isis Galesi. Estamos juntos a quase dois anos e parece que já faz uma vida. Cada vez que te vejo é como a primeira vez que te vi, só que hoje como minha companheira e grande incentivadora, tens um valor que poucas mulheres neste mundo têm. Muito obrigado por você existir na minha vida meu amor!

Ao Professor **Doutor Eduardo Daruge**. Sua amizade, seus ensinamentos, conversar com você me fizeram e me fazem crescer muito, não só como profissional, mas como ser humano também. Jamais esquecerei das suas aulas e de nossas conversas, seja na sua sala, no laboratório ou na sala de alunos da Odontologia Legal. Pessoa fabulosa de se conviver, além de aprender bastante ao seu lado, compartilhar o amor pela pesquisa em DNA forense nesta caminhada pela Unicamp. Obrigado professor por tudo ! Saiba que tem um amigo fiel em mim !

Ao Professor **Doutor Eduardo Daruge Júnior**. Me faltam palavras pra agradecer todo apoio e todos os conhecimentos passados. Sua amizade pra mim hoje, é como a amizade de um irmão pelo outro. Nunca fui tão bem recebido em um lugar como fui, ainda quando pleiteava um lugar no curso de especialização na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, como fui recebido por você ! Muitíssimo obrigado por tudo e conte comigo sempre meu comandante !

Ao Professor **Doutor Fausto Bérzin**. Obrigado professor pela aposta em mim e pelos ensinamentos. Conversar com você enche de forças qualquer aluno por ver sua paixão pela sua profissão e sua naturalidade na demonstração de conhecimento e sabedoria !

Ao Professor **Doutor Luiz Francesquini Júnior**. Seus ensinamentos e seu senso crítico em busca de aperfeiçoamento e sua amizade me motivaram muito, sempre, e ajudaram a construir o profissional Odontologista que sou hoje ! Muito obrigado Fran por tudo !

Agradecimentos sinceros ao professor e amigo **Doutor Francisco Carlos Groppo**, sem cujas amizade, presteza e agilidade na ajuda da realização da análise estatística deste trabalho, sua qualidade ficaria decerta comprometida ! Muito obrigado Chico !

Agradeço também ao hoje meu grande amigo **Felippe Bevilacqua Prado**. Se hoje sou um pesquisador decente, tua colaboração neste processo foi essencial. Amigo não é aquele que só concorda contigo e que te dá forças; também é aquele que te puxa a orelha no momento que acha necessário, sempre visando teu crescimento pessoal. Sentirei muita falta do nosso convívio na sala de alunos da Odontologia Legal. Não sei se sabes ainda, mas ganhastes um irmão para a vida inteira ! Ao amigo **Júlio Takahashi Kawaguchi**. Todo seu incentivo, aulas e amizade colaboraram e muito na caminhada que aqui se encerra. Conte comigo sempre na continuação da próxima caminhada que se inicia hoje !

Aos meus amigos e colegas de turma do mestrado: **Alessandro Santana, Ana Amélia, Isamara Caputo, Marcus Vinícius, Glauco Bazzo, Raquel Agostini, Mariana Pereira, Kátia Carvalho, Patrícia Rocha e Mirna de Corletto**. Fazer esta caminhada ao lados de vocês foi algo extremamente gratificante ! Nossos longos papos, trocas de conhecimento, amizade, tudo isso fazem com que hoje eu seja uma pessoa melhor. Obrigado pelo carinho e pela amizade de todos vocês, cada um de seu jeito e com suas peculiaridades.

Meus mais sinceros agradecimentos aos meu amigos e colegas também do curso de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Faciais, **Aladim, Bruno, Danilo, Dênis, Karen, Lucas, Marcelo, Mário, Paula, Pedro, Roberta e Wolsey** por toda a força durante o processo de recolha da amostra, em especial ao meu grande amigo **Dr. Paulo Afonso de**

Oliveira Júnior, sem o qual a autorização, não me seria sequer permitida a presença na clínica da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas de Piracicaba (APCD), muito obrigado Paulo !

Aos colegas e amigos da especialização em Odontologia Legal e Deontologia. A interação e o convívio com vocês todos, foi de vital importância para o transcorrer da minha caminhada. O carinho e o respeito de todos, dão sempre novas forças pra continuar almejando um futuro melhor dentro da nossa classe de Odontologistas.

Aos meus bons **amigos da turma 49 da graduação** da FOP-UNICAMP que me fizeram sentir em casa enquanto em Piracicaba, seja nos jogos de futebol os quais sempre fui incluído, seja nas noites de poker na república Acapulco onde sempre fui bem recebido ! Um agradecimento especial ao meu amigo **Guilherme Guarda** ! Fostes parceiro e amigo em momentos essenciais da minha estadia em Piracicaba. Obrigado pela tua amizade Gui !!

À **Célia Manesco**. Celinha, tua paciência e tua dedicação com todos nós alunos e em particular comigo, faz com que nos sintamos em casa quando estamos na faculdade. Você está sempre pronta a ajudar e colaborar com tudo que lhe solicitamos, muitas vezes significando a interrupção de suas atividades cotidianas. Muito obrigado !

Meus mais sinceros agradecimentos também ao corpo de funcionários do laboratório de DNA criminal da Polícia Civil do Espírito Santo, nomeadamente meu grande facilitador dos trabalhos de mestrado **Professor Doutor Luís Renato de Silveira Costa**, que também durante essa caminhada, ganhou em mim um amigo sincero pra vida inteira ! Agradeço muitíssimo aos Peritos Criminais **Eduardo Tavares Cunha e André Barbosa** pela atenção e amizade dispensadas durante o processamento da amostra desta pesquisa, como também pela amizade ! Muito obrigado meus amigos !

Agradeço também a todos os funcionários da biblioteca: **Cida e Eliseu**, por toda a presteza quando freqüentando este ambiente essencial pra construção do aprendizado em todas as esferas da faculdade. Agradecimento especial à bibliotecária **Sueli Oliveira** que, por várias vezes me ajudou e muito no processo da construção deste trabalho A vossa dedicação é refletida no nosso conforto quando precisamos dos vossos serviços.

"Nunca ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os outros foram".
Alexander Graham Bell

RESUMO

Alguns fatores relacionados ao estado e lugares que dentes humanos se encontram, nos que diz respeito a estes enquanto amostras com finalidade forense, ainda constituem desafio ao que tange o uso dos mesmos como material para obtenção de perfis genéticos de DNA. Este estudo visou comparar a extração de DNA feita a partir de dentes humanos com a extração por meios de amostras de sangue fixadas em papel FTA® utilizadas como grupo controle, de maneira a comparar os alelos mapeados e definir se os dentes constituem nestas circunstâncias, fonte viável de amostras para obtenção de perfis genéticos, comparando os protocolos. Dezoito participantes foram abordados e, aceitaram participar da pesquisa por meio de TCLE's, doaram voluntariamente amostras de sangue e os elementos dentários terceiros molares superiores direitos, estes indicados para exodontia por outros profissionais. Verificou-se que os dentes humanos constituíram fontes viáveis de acordo com a análise estatística realizada (Teste de Poisson), onde $p < 0,0001$, entretanto quando comparado com o protocolo de extração de material genético através do sangue, deixa de ser viável devido ao número de passos necessários para a obtenção dos resultados. Ainda, 78,125% dos alelos possíveis de serem mapeados, o foram com sucesso.

Palavras-Chave: Odontologia Legal; Genética Forense; Dente Serotino.

ABSTRACT

Several factors related to how and where human teeth are found in forensic cases still a challenge to obtain genetic DNA profiles, as using these elements as source for genetic material. This study aimed to compare the DNA extraction done through blood stains in FTA® paper cards, used as control group, and compare the mapped alleles from these to ones extracted from human teeth samples, as the simplicity of these protocols when in comparison. Eighteen participants were convinced to join this study. Blood samples and superior right third molars (element 18) were donated. As result, teeth provided good sources of biologic sampling to obtain genetic profiles when analyzed by Poisson statistic analysis ($p < 0,0001$), however, when compared to genetic material extraction protocol by blood, teeth analysis is no longer viable due to extensive laboratorial steps in order to gain the same results. Also 78,125% of the possible loci to be mapped and amplified were indeed.

Key Words: Forensic Dentistry; Forensic Genetics; Molar, Third.

Lista de Abreviaturas e Siglas

CODIS: Combined DNA Index System / Sistema de Indexação de DNA Combinado

DBS: Dried Blood Spots / Manchas de Sangue Seco

DNA: Desoxiribonucleic Acid / Ácido Desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

FBI: Federal Bureau of Investigation

INTERPOL: International Criminal Police Organization / Organização Policial

Internacional de Combate ao Crime

Pb: Pares de Bases

PCR: Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase

STR's: Pequenas seqüências repetidas em tandem

Sumário	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
3 PROPOSIÇÃO	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 COLETA	17
4.2 ARMAZENAGEM	17
4.3 TRANSPORTE	17
4.4 EXTRAÇÃO DE MATERIAL PARA ANÁLISE	17
4.5 AMPLIFICAÇÃO	20
4.6 LEITURA	21
5 RESULTADOS	23
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE 1	37
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
APÊNDICE 2	40
Ficha de Coleta de Dados	
ANEXO 1	42
Aprovação do CEP/FOP/UNICAMP e Autorizações	
ANEXO 2	46
Protocolos Utilizados na Pesquisa	

1 INTRODUÇÃO

Devido ao crescimento em importância da análise forense de DNA na solução de crimes violentos, um grande interesse se desenvolveu neste ramo da ciência, além da constante mudança na tecnologia empregue para esta finalidade. A análise de DNA incorpora técnicas e princípios de muitos campos do conhecimento, tais como biologia molecular, bioquímica, genética e estatística (Kobilinsky, 2008).

A evidência em DNA tem se tornado uma técnica forense padrão para a investigação e a resolução de um grande espectro de crimes que variam de crimes à propriedades privadas a crimes de natureza mais grave como estupro e assassinatos fazendo com que o tempo de resolução de um crime, em média, reduzir de 89 a 45 dias entre identificação e acusação de um suspeito (Bond *et al.*, 2008).

A disciplina de Odontologia Forense apenas foi incorporada na grade acadêmica dos cursos de Odontologia no Brasil em 1931, através do decreto 19.852/31. Desde então, essa especialidade tem mostrado crescimento contínuo e importante maturidades científica e profissional. A antropologia forense, que é uma das atribuições da odontologia forense, é um dos melhores exemplos deste desenvolvimento, passando de estágios como a simples observação até os recentes e sofisticados testes de laboratório, incluindo trabalhos de genética forense (Silva *et al.*, 2007).

O dente humano é composto de esmalte, dentina, cemento e polpa. O esmalte é um tecido altamente mineralizado, consistindo em 96% de mineral e 4% de material orgânico e água. O conteúdo inorgânico do esmalte é um cristalino de fosfato de cálcio e hidroxiapatita, também encontrada no osso, cartilagem calcificada, dentina e cemento. Já a dentina é a porção de tecido duro do complexo dentina-polpa que constitui a maior parte do dente. A dentina madura é composta quimicamente, por peso, aproximadamente de 70% material inorgânico, 20% de material orgânico e 10% de água (adsorvida na superfície do mineral ou nos interstícios entre os cristais). Seu componente inorgânico consiste, principalmente, em hidroxiapatita, e a fase orgânica em colágeno tipo I (Ten Cate, 2001).

Pelo fato de o esmalte dentário ser a substância mais dura do corpo humano, não é surpresa que os dentes e estruturas dentais freqüentemente resistem a eventos *post mortem*

que provocam a destruição de outros tecidos. Incineração, mutilação, decomposição, todos podem sujeitar o corpo a mudanças que tornam a identificação de um cadáver difícil, ou mesmo impossível. Contudo, em quaisquer casos cujos registros dentários *ante mortem* possam ser recuperados, comparação de eventos dentários pode superar estes obstáculos. De fato, identificação pessoal através dos dentes é um dos métodos mais confiáveis em identificação humana e, como tal, é o alicerce de referência da prática forense da odontologia na maioria das jurisdições (Willems, 2000).

A habilidade de recuperar seqüências de DNA e dados de STR's de ossos e dentes expostos por algum tempo a uma variedade de condições ambientais se tornou uma ferramenta valiosa para a identificação de indivíduos desaparecidos e ossadas não identificadas. Devido a baixos níveis de DNA endógeno, danos ambientais, bacterianos tal como a presença de inibidores oriundos do ambiente em questão, co-extraem DNA de specimens degradados, portanto consistindo de um desafio ainda maior (Loreille *et al.*, 2007).

A maior parte dos kits para análise de STR's, constituem em sua base, os 13 loci preconizados pelo FBI e utilizados no CODIS (Combined DNA Index System, Sistema Combinado de Indexação de DNA), sendo que variações são feitas mediante a empresa que os fabrica na expectativa de criar kits multiplex únicos a serem comercializados. Como exemplos de loci que podem ser utilizados em complemento aos 13 inseridos no CODIS, são os que foram estudados por Hill *et al.* (2008), que são os seguintes: D1GATA113E02, D1S1627, D1S1677, D2S441, D2S1776, D3S3053, D3S4529, D4S2364, D4S2408, D5S2500, D6S474, D6S1017, D8S1115, D9S1122, D9S2157, D10S1248, D10S1435, D11S4463, D12ATA63A05, D14S1434, D17S974, D17S1301, D18S853, D20S482, D20S1082 e D22S1045.

Oz *et al.* (2008) relataram a importância ainda de se ter adicionado a quaisquer kits STR comerciais o marcador para o cromossomo Y, de maneira a evitar identificações equivocadas em casos de desastres em massa e ataques terroristas, visto que estes autores relataram que é crescente o número que falhas relatadas em relação à amplificação do alelo da amelogenina.

Algumas ferramentas vêm sendo desenvolvidas ao longo do tempo de maneira a melhorar a quantidade e a qualidade do DNA a ser extraído de remanescentes arqueológicos, onde dentes e ossos humanos, são a única fonte de material biológico a ser extraído com finalidade forense, como o kit Invitrogen Charge Switch® que tem a finalidade de purificar amostras advindas de esqueletos humanos em pouco estado de preservação de maneira rápida e eficiente (Barbaro *et al.*, 2008).

Durante as duas últimas décadas, uma nova metodologia foi incorporada e chamada de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction) técnica desenvolvida pelo Dr. Kary Mullins em 1983 que, literamente, permite a amplificação de quantidades minúsculas de DNA a concentrações aceitáveis para análise diagnóstica (Slavkin, 1997).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Já em 9000 A.C., mesmo sem compreender alguns conceitos, que seriam descobertos mais tarde, o homem selecionou as melhores sementes para o plantio e escolheu os animais mais vigorosos para a reprodução. Os primeiros filósofos da humanidade já falavam de alguns fenômenos genéticos (sem saber a suas causas) e com o desenvolver da sociedade pessoas de todas as áreas como médicos, matemáticos, físicos, padres e filósofos, também contribuíram com idéias para o entendimento da hereditariedade.

Gregor Johan Mendel, um monge Augustiniano, na cidade Tcheca hoje conhecida por Brno, em 1866 através da análise dos cruzamentos entre ervilhas, deduziu a presença de fatores hereditários que eram propagados de forma estável de geração a geração, sendo responsáveis pela formação de características individuais.

Pesquisas focalizando a transmissão da hereditariedade, mesmo que ainda não definidos quanto a sua natureza em 1869 ganharam força com o bioquímico suíço Friedrich Miescher, que relatou a presença de uma proteína que ele chamou de “nucleína”, em bandagens com pus, sendo esta extraída de glóbulos brancos.

Em 1893, o mesmo Friedrich Miescher afirmou que “A hereditariedade garante, de geração a geração, uma continuidade de forma num nível ainda mais profundo que o da molécula química...”.

Bateson em 1905 foi o primeiro a definir a genética como a ciência da hereditariedade e da variação, em conformidade com o radical *gene* (do grego *gennan*), que denota origem ou agente gerador (Calabrez, 1991 *in* Silva, 1997).

Barry & Watson (2001) relataram que fins da década de 40, muitas eram as especulações acerca do mecanismo de transmissibilidade de caracteres hereditários e que, inicialmente, acreditava-se que na verdade eram as proteínas as responsáveis por tal mecanismo, pelo fato de serem em 20 suas subunidades essenciais (aminoácidos), o que daria uma grande variabilidade de combinações, ditas necessárias devida a complexidade dos caracteres a serem perpetuados entre gerações.

Tendo esclarecido que o DNA, encontrado em célula eucariontes no núcleo protegido pela carioteca, em 1953, Watson & Crick relataram o que acreditavam ser a estrutura da molécula de DNA, esta em dupla hélice, sendo estabilizada pelas ligações nucleotídicas entre as voltas da hélice e ainda pelas pontes de hidrogênio formadas pelas bases nitrogenadas, modelo este confirmado e atribuindo a estes autores o prêmio nobel de medicina em 1962.

Data de 1956, pelos autores Tjio & Levan, um dos primeiros relatos de estudo dos cromossomos de maneira a elucidar como sua estrutura está relacionada com a herança, ou seja, da transmissibilidade dos caracteres hereditários, onde estes autores chegaram ao número de cromossomos humanos normais igual a 46, através de técnicas de análise cromossômica (Nussbaum *et al.*, 2002).

Watson & Crick ainda sugeriram uma maneira de como era feita a transmissão dos caracteres hereditários, através do mecanismo de duplicação semi conservativa, ou seja, que, ao desnaturar a molécula de DNA, cada fita da hélice serviria de arcabouço para a síntese da fita complementar, teoria confirmada nos experimentos com nitrogênio marcado radioativamente (Meselson & Stahl, 1958) e após o isolamento e purificação da DNA polimerase, enzima responsável pelo processo de duplicação (Kornberg *et al.*, 1958).

A análise de DNA foi desenvolvida a 36 anos onde certas regiões de minissatélites seriam as responsáveis pela “impressão digital” do DNA (Jeffreys *et al.*, 1985). Este estudo dava luz a procedimentos forenses como a individualidade humana, exclusões de paternidade e identificação de casos criminais, substituindo técnicas de análises sorológicas de polimorfismos de proteínas e grupos sanguíneos, estes os marcadores genéticos de eleição até então (Jobim *et al.*, 2006).

Data também de 1985 o primeiro estudo envolvendo a reação em cadeia da polimerase (PCR), hoje o mais utilizado método de amplificação de amostras da DNA nos mais variados tecidos (Lewis, 2004).

Em 1988, o FBI começa a utilizar o DNA como fonte para trabalhar seus casos não solucionados; em 1991 (Lewis, 2004), é publicado o primeiro artigo relacionado aos loci STR.

A partir deste momento, em 1995 a Forensic Special Section no Reino Unido, começa a construir sua base de dados de DNA, o mesmo acontecendo com o FBI em 1998, ao lançar o CODIS (Combined DNA Index System) (Lewis, 2004). Em junho de 2000, entra em operação o Banco de Dados Nacional de DNA do Canadá que, até então, já processou mais de 120.000 amostras biológicas dentre elas: sangue, saliva e cabelos, aplicados em cartão amostra de papel FTA® da Whatman (Fitzco Inc., Spring Park, MN; 21) (Frégeau *et al.*, 2008).

A alguns anos, a mídia tem dado mais atenção ao assunto, podendo citar a decodificação do genoma humano, bem como o uso destas informações em termos de terapêutica médica. Junto com estes avanços em técnicas de biologia molecular, novos questionamentos surgem em outras áreas das ciências biológicas, como a área forense, mais especificamente o referente ao processo de identificação humana, gerando socialmente expectativas em torno destes procedimentos (Oliveira, 2001).

Recentemente, podemos citar sua utilidade na identificação das vítimas do ataque ao World Trade Center em 11 de setembro de 2001, onde, o laboratório Myriad Genetics Inc, realizou testes com vários tipos de amostras (lâminas de barbear, pentes, escovas de dentes) de pessoas supostamente desaparecidas durante o atentado (Lewis, 2004).

2.2 Aspectos Biomoleculares do DNA

Comprovado o modelo de Watson & Crick (1953), a molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) é composta de quatro nucleotídeos básicos (Adenina, Timina, Citosina e Guanina) ligados entre si através de ligação de pontes de hidrogênio, estabilizados por ligações fosfodiéster entre as voltas da dupla hélice formada pelas seqüências de nucleotídeos que se arranjam em forma de fita. Cada nucleotídeo é composto por um grupo fosfato, uma base nitrogenada e um açúcar (Pentose; Desoxirribose). As ligações fosfodiéster são feitas na extremidade 5' da cadeia, proporcionada pelo carbono 5 no anel da pentose com o grupo fosfato do nucleotídeo seguinte do giro da hélice.

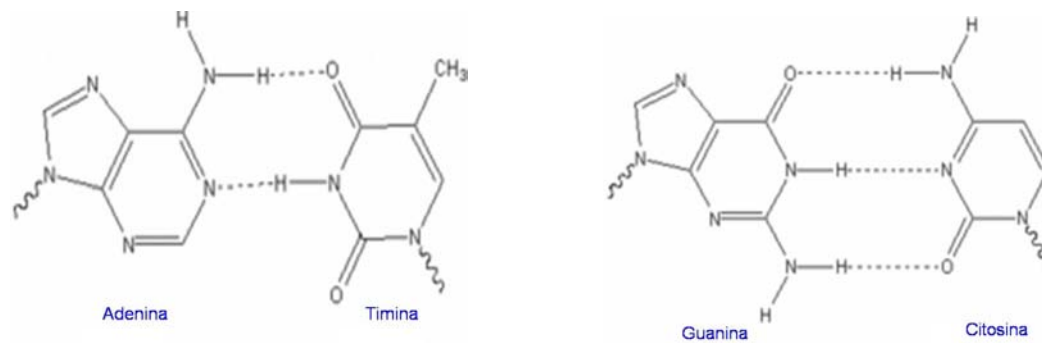


Figura 1 – Nucleotídeos de DNA pareados por pontes de hidrogênio. Fonte: (Wikipedia, 2007).

Cada giro corresponde a uma distância de 3,4 nm (nanômetros) equivalentes a 10 pares de base, com uma amplitude de 2 nm (Alberts *et al.*, 2005) (Figura 2).

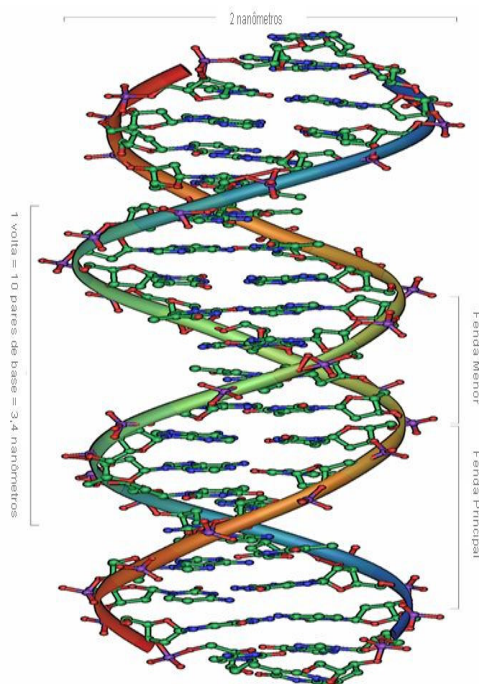


Figura 2 – Dupla hélice de DNA mostrando as ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos da hélice, amplitude e diâmetro da molécula. Fonte: (Wikipedia, 2007).

Ainda, a molécula de DNA não se encontra livre no núcleo da células e sim, associadas a um grupo de proteínas conhecidas como histonas, de maneira a se compactar para diminuir o espaço ocupado dentro das mesmas. A associação é feita por octâmeros de

histonas (1 par de H2A, H2B, H3 e H4) associação esta conhecida por cromatina, enroladas em helicóide e estabilizadas por uma subunidade da histona H1, formando uma estrutura conhecida por nucleossomo, com 1nm de comprimento. Esta estrutura compacta-se ainda mais em um nível onde será estabilizada por um arcabouço proteico, formando a estrutura conhecida por fibra de 30 nm. Esta espiraliza-se, de maneira a chegar a uma espessura de 700nm, sendo este o nível de compactação final, pois trata-se da mesma espessura de um cromossomo (Alberts *et al.*, 2005).

A maior parte do DNA de uma célula não é codificante (junk DNA; DNA lixo). Estas porções de DNA são conhecidas como íntrons e são removidas antes do processo de tradução pelo mecanismo de splicing (rompimento), restando assim apenas as regiões codificantes (éxons) de maneira que estes dividem-se em códons (trincas de nucleotídeos que darão origem a um aminoácido de determinada proteína), sendo os códons em sua sequência, os responsáveis pela transmissão através das proteínas, da síntese de qualquer que seja a informação necessária naquele momento pela célula (Alberts *et al.*, 2005).

As bases para a utilização dos testes de identificação da individualidade humana pelo estudo do DNA, encontram-se na diversidade ou polimorfismo de diversos locos de minissatélites, microsatélites ou HLA (antígenos leucocitários humanos). Cada um de nós apresenta uma cromátide materna e uma paterna, e a segregação dessas estruturas repetitivas segue a lei de Mendel, em que um alelo é de origem materna e o outro de origem paterna para cada loco (Jobim *et al.*, 2006).

Os exames de DNA apresentam vantagens quando utilizados, em relação a quaisquer outras técnicas de investigação seja *in vivo*, ou *post mortem* (Calabrez, 1991 citado em Silva, 1997; Jobim *et al.*, 2006): Alto poder discriminatório (Inclusão); Possibilidade de ser obtido de qualquer material biológico; Maior resistência a agressões ambientais (difícilmente desnatura); Análise específica quando misturado a outras substâncias; Permite estudos evolutivos (DNA mitocondrial).

As regiões de pequenas sequências repetidas em tandem (STR) que são utilizadas para a realização deste tipo de exame, o são devido ao fato de possuírem características únicas que variam de indivíduo para indivíduo em suas sequências de nucleotídeos encontradas em tandem (STR's) em determinadas regiões (loci) no genoma humano. Esta

característica de unicidade é conhecida por polimorfismo, sendo que, quanto mais polimórfico for um loci, menos comum este é em determinado grupo de indivíduos, sendo mais específico ainda quando utilizado seja em pesquisa de paternidade, seja em análises forenses, fator determinante para a confiabilidade no exame realizado (Alberts *et al.*, 2005).

Os STR's proporcionam algumas vantagens em relação a outras técnicas: Estão presentes em todo o genoma; Permitem amplificar simultaneamente vários loci (Kits Multiplex); Permitem o manuseio de amostras com mistura; Permitem a amplificação de amostras com menos de 1ng de DNA (Jobim *et al.*, 2006).

Watson & Crick (1953) reportaram em artigo publicado pela revista Nature, o mecanismo de estabilidade estrutural e comportamento da molécula de DNA com um modelo de laboratório, sugerindo ainda o funcionamento do mecanismo de transmissibilidade dos caracteres hereditários pelo modelo da duplicação semi conservativa.

Kornberg *et al.* (1958) realizaram experimentos de extração e purificação da enzima DNA polimerase, esta responsável pela síntese de DNA quando em fase de duplicação, ratificando o sugerido por Watson & Crick (1953) da duplicação semi conservativa da molécula de DNA.

Meselson & Stahl (1958) confirmaram através de experimentos de bases nitrogenadas marcadas com nitrogênio radioativo, a teoria da duplicação semiconservativa da molécula de DNA, proposta por Watson e Crick (1953).

Jeffreys *et al.* (1985) realizaram experimentos de polimorfismos de DNA, constatando que seriam regiões hipervariáveis as quais chamou de "minisatélites" as responsáveis pela diversidade da expressão gênica em cada indivíduo.

Calabrez (1991) citado em Silva (1997) relatou em sua tese de mestrado, vantagens de se lançar mão da técnica de STR associada ao PCR, quando comparada ao VNTR concluindo utilizar no STR, quantidades menores na amostra a ser analisada, quando comparada ao VNTR.

Walsh *et al.* (1991) relataram sucesso no uso da resina Chelex® 100 como instrumento para extração de material nuclear em amostras biológicas com a técnica de amplificação baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Hanaoka *et al.* (1995) citado em Silva (2007) realizaram obtenção de material genético para amplificação por PCR de diferentes tecidos dentais e concluíram que a polpa dentária é o tecido que produz melhor sinal de amplificação por esta técnica, e, dentina e cimento produzem sinais semelhantes.

Galvão (1996) relatou em seu livro sobre estudos médico legais a importância da presença do profissional odontologista no quadro de IML's no Brasil, ressaltando o trabalho conjunto deste profissional com médicos legistas de maneira a solucionar casos onde as experiências de ambos sejam postas à prova em conjunto.

Slavkin (1997) realizou um levantamento nas ferramentas que podem ser utilizadas em Odontologia Legal com o intuito de atingir um objetivo nesse aspecto, principalmente à identificação. Fez um breve relato de algumas dessas ferramentas como a identificação pela arcada dentária mediante comparação com registros ante mortem e exames de DNA.

Wilson (1997) realizou uma revisão de como funcionam fatores de inibição e de facilitação no processo de amplificação de ácidos nucleicos, enfatizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Henke *et al.* (1999) realizaram estudos de comparação de 24 sistemas diferentes de marcação para verificação de polimorfismo em testes de paternidade, constatando que nenhum deles é completamente exato, sendo o que apresentou melhores resultados foi a análise de minissatélites.

Hsu *et al.* (1999) obtiveram sucesso na identificação de 183 das 202 (90,6%) vítimas fatais do acidente com o Taoyuan airbus em 1998 utilizando análise comparativa de 16 loci de familiares e de fragmentos das vítimas do acidente.

Vu *et al.* (1999) publicaram artigo sobre efeitos do volume da amostra, temperatura de armazenamento, conservantes e tempo na tipagem e extração de DNA para genotipagem dos loci DQA1 e PM usando amostras de urina e amplificação baseada em PCR. Os autores concluíram que o volume da amostra viabiliza o exame em função de proporcionar maior quantidade de material, a temperatura de armazenamento deve ser abaixo dos -20°C, pois amostras a temperatura ambiente tendem a se deteriorar, alguns conservantes inibem amplificação e quanto mais tempo se leva para trabalhar uma amostra, mais inviável esta tende a ser.

Grattapaglia *et al.* (2000) relataram vantagens em se utilizar baterias de 16 ou mais loccus STR como número adequado a serem analisados via PCR em exames de paternidade de maneira a minimizar falsas inclusões e interferências de mutações, concluindo que este número (16 locci) é o ideal, estatisticamente falando, para realização de tais exames.

Meyer *et al.* (2000) relataram com sucesso a extração de perfis genéticos de DNA de amostras arqueológicas, sendo as utilizadas tanto ossos, quanto dentes humanos.

Willems (2000) relatou em seu livro baseado no encontro de procedimentos da International Oral Forensic Odonto Stomatology, aspectos relacionados a evidências de DNA quando a fonte de material biológico é o dente, tal como extração e uma breve revisão de literatura em biologia molecular.

Oliveira (2001) relatou em sua tese de doutorado sucesso na análise da frequência alélica dos loci DYS390, DYS391 e DYS393 em indivíduos brasileiros, tanto no que diz respeito ao polimorfismo destes loci, quanto na utilização destes, visto que são pertencentes ao cromossomo Y, na sua utilização em análises de dimorfismo sexual.

Ten Cate (2001) relatou em seu livro aspectos relacionados à histologia bucal, tais como desenvolvimento, estrutura e função, onde descreve em natureza percentual, a composição química básica de dentes humanos.

Nussbaum *et al.* (2002) relataram em livro publicado os vários aspectos de genética enquanto ciência médica, onde realizaram um breve histórico da evolução dos conceitos em hereditariedade, passando desde Mendel até Watson & Crick e citando ainda a determinação de quantos cromossomos autossômicos possui o ser humano, pesquisa realizada por Tjio e Levan.

Gaytmenn & Sweet (2003) realizaram estudo de comparação quantitativa de DNA oriundo de diferentes regiões de dentes humanos, sendo que foi consideradas as seguintes regiões: ápice da coroa, corpo da coroa, corpo radicular e ápice radicular. Como resultado obtiveram que o ápice coronal não proporcionou quantidade mínima necessária para a realização de um exame de DNA, e o corpo radicular foi a região que proviu maior quantidade de material genético.

Malaver & Yunis (2003) avaliaram os sinais proporcionados por diferentes tecidos de origem dentária, de corpos enterrados em 1995 e exumados em 2000. 20 dentes no total,

sendo que a polpa dentária foi o tecido que proporcionou maior sinal de amplificação, seguida de sinais semelhantes entre dentina e cimento.

Wade & Trozzi (2003) publicaram livro contendo o protocolo de coleta, armazenamento e transporte de amostras biológicas recolhidas, abordando as várias origens de material genético para análise, protocolos estes utilizados pelo Federal Bureau of Investigation (FBI), a polícia federal norte americana.

Lewis (2004) relatou em livro publicado, vários aspectos da biologia molecular aplicados à determinação de doenças de fundamentação genética, fazendo comentários pertinentes acerca da aplicabilidade deste campo à área forense.

Moreira (2004) realizou um estudo em sua dissertação de mestrado, sobre a padronização de prontuários de identificação humana utilizados por peritos Odonto-Legistas em IML's no Brasil e constatou através de comunicação pessoal com estes Institutos, que dos 26 estados da união e seu Distrito Federal, apenas 14 capitais de estado possuem o profissional Odonto-Legista no seus quadros de funcionários.

Remualdo (2004) avaliou em tese apresentada à Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Odontologia Legal e Deontologia, três métodos de extração de DNA provenientes de polpa dentária quando estes dentes são submetidos a variações de temperatura, concluindo que o melhor dos três métodos utilizados é o preconizado por Rivero et al (2002), dentre os utilizados para comparação.

Alberts *et al.* (2005) relataram em seu livro os fundamentos para conhecimento da biologia celular, necessários para a compreensão do funcionamento biológico da célula, não só referente à molécula de DNA, como também em relação ao ciclo de divisão celular e todos os requisitos básicos visando a manutenção da homeostase.

O Conselho Federal de Odontologia em 2005, promulgou a resolução 63 que constitui da atribuição de procedimentos odontológicos a serem realizados por cada uma das especialidades durante o exercício da profissão de cirurgião-dentista.

Campos (2006) relatou em tese de mestrado as lesões mais frequentes encontradas em crianças agredidas na grande Vitória-ES, suas principais causas, ressaltando o grau de severidade de acordo com o código penal. Este autor ressalta ainda em seu trabalho a importância da presença do Odontologista no quadro de funcionários de Institutos Médico-

Legais na Brasil, pelo fato de algumas lesões nas regiões de face e intrabuciais, passarem despercebidas por médicos legistas não habituados/habilitados a realizar este tipo de exame.

Jobim *et al.* (2006) realizaram em livro publicado, um breve histórico da evolução das pesquisas de transmissibilidade de caracteres hereditários, mencionando várias técnicas que se costumavam utilizar em pesquisa de identificação humana, como o sistema ABO, os VNTR, chegando até os dias de hoje onde, em sua maioria, estas pesquisas são realizadas por análise das STR's via amplificação por PCR.

Kontanis & Reed (2006) realizaram estudos com os efeitos ácido tânico (composto oligomérico com grupamento fenol livre) como inibidor de amplificação em amostras de DNA analisadas por PCR real time e relataram que este a partir de concentração igual ou maior que 1,4ng/25µL, inibem totalmente a amplificação por se ligarem covalentemente a *Taq* DNA Polimerase inativa.

Lo & Chan (2006) relataram em artigo publicado à *Methods Molecular Biology*, o funcionamento da Reação em Cadeia da Polimerase enquanto procedimento de amplificação genômica e algumas peculiaridades do processo em si, juntamente com uma breve revisão de literatura.

Mályusz *et al.* (2006) relataram aumento na quantidade de DNA extraído de dentes quando estes foram tratados com Enzyrim (Arte Cópia, Zurich, Switzerland), que é uma mistura de enzimas normalmente utilizadas para maceração. Relatam ainda como vantagens estas enzimas serem baratas, fáceis de utilizar, não tóxicas e de fácil descarte.

Loreille *et al.* (2007) relataram com sucesso a utilização de um protocolo diferenciado que lança mão de total desmineralização de amostras de dentes e ossos para extração e amplificação de amostras de DNA e mapeamento dos STR's.

Projic' *et al.* (2007) relataram sucesso no uso do Kit AmpF1STR® Identifier (Applied Biosystems) em estudo de genética de populações realizado em uma população na Croácia.

Silva *et al.* (2007) em livro editado, relacionaram vários fatores históricos e científicos ao que diz respeito a pesquisas de finalidade forense, como eram feitas, e como são feitas nos dias de hoje, enfatizando a pesquisa de STR's autossômicos associada à reação em cadeia da polimerase.

Barbaro *et al.* (2008) realizaram com sucesso a validação do kit Invitrogen Charge Switch® que tem a finalidade de purificar amostras de DNA de ossos e dentes humanos com finalidade forense.

Bond *et al.* (2008) analisaram sob vários aspectos o valor de amostras de DNA recuperadas de cenas de crime, e o impacto positivo que esta técnica trouxe ao processo de investigação de crimes de uma maneira geral.

Frégeau *et al.* (2008) relataram o uso com sucesso de duas bases de trabalhos robóticas (TECAN Genesis RSP 150/8 e Freedom EVO liquid handling) com pontas não descartáveis, onde a rotina de limpeza das pontas robóticas (pré programável) auxiliou bastante de maneira a reduzir contaminações furtivas advindas do processamento manual de amostras de DNA com finalidade forense.

Hill *et al.* (2008) compararam 26 novos marcadores STR com os 13 utilizados pelo CODIS, constatando que aqueles produzem de 50 a 150 pares de base a partir dos produtos de PCR por promover a aproximação das seqüências de primer ao máximo das regiões de repetição identificadas. Feita a análise, estes autores afirmam que estes 26 novos marcadores provaram-se de grande utilidade, e devem ser utilizados como complemento dos 13 loci utilizados pelo FBI no CODIS para quaisquer eventuais tipos de perícia.

Kobilinsky (2008) revisou o capítulo do livro Molecular Forensics de R. Rapley, relacionado à prática forense dentro da genética, atribuições dos especialistas e sua importância no contexto social.

Oz *et al.* (2008) defenderam com três casos a importância da inclusão de marcadores para STR's no cromossomo Y, de maneira que, em casos de desastres em massa e ataques terroristas, por exemplo, não venham a ter identificações equivocadas, em se tratando do gênero de cadáveres não identificados, relatando ainda estes autores a falha crescente em número de casos relatados na amplificação do alelo da amelogenina.

Park *et al.* (2008) desenvolveram um protocolo de amplificação direta de loci STR de DNA por PCR a partir de sangue, manchas de sangue em papel FTA® e saliva, sendo que obteve amplificações de qualidade com amostras de sangue e manchas de sangue, e as amostras em saliva forneceram amplificações pobres, utilizando o kit AmpFISTR Identifiler (Applied Biosystems).

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve por objetivos verificar:

- a) a viabilidade de dentes humanos enquanto amostra como fonte de material biológico para obtenção de perfis genéticos de DNA visto que empiricamente, pequenas quantidades de DNA são relativamente bem preservadas em fósseis, múmias enterradas, e vários remanescentes de tecidos humanos de origem dentária e óssea.
- b) Comparar a outros protocolos, tendo como grupo controle amostras de sangue advindas dos mesmos indivíduos aos quais os dentes pertencem em uma população brasileira.
- c) Ressaltar a importância do papel do Odontologista em IML's no Brasil

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética Nacional em Pesquisa (CONEP), e no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de Campinas sob o nº 37/2008 (Certificado em Anexo).

O grupo de estudo foi constituído de 18 elementos dentários, terceiros molares superiores direitos (elemento 18) íntegros extraídos por indicação de outros profissionais Cirurgiões-Dentistas, por diversos motivos, mais comumente indicação ortodôntica. Cada elemento dentário é oriundo de um indivíduo, o mesmo o sendo para as amostras de sangue coletadas em gaze estéril e gotejadas em papel FTA[®] da Whatmann Biosciences.

Dos 18 participantes 9 eram do sexo masculino e 9 eram do sexo feminino.

Os pacientes foram abordados na clínica do Curso de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucal Maxilo Faciais da EAP-APCD de Piracicaba, no período de 20 de junho a 08 de agosto de 2008, com autorização do Coordenador deste curso, CD Paulo Afonso de Oliveira Júnior (Autorização em Anexo), onde todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) tal e qual realizaram a doação formal do elemento dentário envolvido, como no termo de doação de dente sugerido pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta Faculdade (Anexo 2, embutido no TCLE). A idade dos pacientes variou de 16 a 37 anos de idade (Média = 21,6).

Após a exodontia dos elementos dentários, estes foram de imediato limpos física e quimicamente com gaze e álcool 70% respectivamente. Foram então acondicionados em envelopes de papel Kraft e conservados a -20°C conforme especificado por Gaytmenn & Sweet em 2003, de maneira a preservar os mesmos. As amostras de sangue após gotejadas nos cartões de papel FTA[®] sofreram o mesmo tratamento de congelamento até o momento de serem trabalhadas em laboratório conforme estipulado por Remualdo em 2004, pois amostras guardadas a temperatura ambiente tendem a se deteriorar, perdendo portanto sua viabilidade enquanto material de análise (Vu *et al.*, 1999).

4.1 Coleta

Foram selecionados como objeto de estudo, em se tratando dos elementos dentários, os molares sem restaurações, por terem a câmara pulpar mais ampla e, portanto, mais material disponível para estudo. Posteriormente, realizada a limpeza, foram acondicionados em envelopes de papel kraft com os cantos vedados e transportados em valise térmica. O fato de terem sido escolhidos terceiros molares superiores direitos foi única e exclusivamente por razões de padronização, não comprometendo posteriores estudos análogos a este, no caso da escolha de outros elementos dentários.

4.2 Armazenagem

As amostras de sangue, as gases foram embebidas em sangue no momento transoperatório e gotejadas em papel FTA®, este com a propriedade de manter a molécula de DNA mais estável para posterior análise, armazenadas em envelope de papel kraft limpo acondicionadas até o momento da análise em refrigerador a -20°C (Gaytmenn & Sweet, 2003). Os dentes foram limpos em álcool 70% e acondicionados também em envelopes de papel kraft, submetidos à mesma temperatura.

4.3 Transporte

Em seguida, o material foi levado ao Laboratório de DNA criminal da Polícia Civil do Espírito Santo (Vitória-ES), onde foi submetido ao processo de extração, amplificação e leitura.

4.4 Extração de Material para Análise

Dentes Humanos

Protocolo de Extração de Material Biológico de Dentes em Anexo (Rivero *et al.*, 2002)

Os elementos dentários, depois de limpos, foram submetidos a congelamento com nitrogênio líquido e pulverizados em um moíno criogênico, em seguida 0,25g do dente

pulverizado é colocado em um tubo de eppendorf, adicionado de 1mL de água ultrapura bidestilada e centrifugado. Em seguida a 1000 RPM por 5 minutos. Despreza-se o sobrenadante lavando então o corpo de fundo com 1000µL de solução PBS, centrifugando novamente, agora a 2000 RPM por 5 minutos.

Desprezou-se novamente o sobrenadante, repetindo a lavagem com PBS e a centrifugação a 2000 rotações por minuto (RPM) por 5 minutos.

Logo em seguida, o corpo de fundo deve ser submetido à digestão enzimática pela Proteinase K, adicionando de 200 a 400 µL de tampão de lise estéril (composição em protocolo anexo) e proteinase K na concentração final de 500µg/mL.

Estes tubos deverão ser mantidos em banho maria de 3 a 5 dias na temperatura de 55°C até a completa dissolução do corpo de fundo, devendo os tubos, em intervalos de 24 horas, terem adicionados de 10 a 30 µL de proteinase K (concentração 250µg/mL) e invertidos pelo menos uma vez ao dia.

Ao final desta etapa, o tubo deverá estar praticamente transparente, procedendo-se então à inativação da proteinase K (tubos a 95° C por 10 minutos em banho seco ou banho maria).

Assim, promoveu-se então a extração de DNA ao adicionar 200µL de acetato de amônia 4M no tubo contendo o lisado para a precipitação da proteína. Homogeniza-se vigorosamente o tubo por 20 segundos, incubando em seguida em gelo durante 5 minutos. Após este passo, centrifugou-se o tubo a 11063 RPM durante 3 minutos.

A proteína será o precipitado no fundo do tubo, assim, o DNA que encontra-se no sobrenadante é transferido para outro tubo de eppendorf. Para precipitar o DNA, adiciona-se 600µL de isopropanol 100%, centrifugando após homogenização a 16000 g durante 5 minutos. Despreza-se o sobrenadante e lava-se o DNA contido no corpo de fundo com etanol 70% a temperatura ambiente, dissolvendo então o DNA em 30 a 50µL de tampão de diluição TE (composição em protocolo anexo) a 4°C.

A solução de EDTA, promove a descalcificação da amostra, considerando que o cálcio é inibidor de amplificação de STR's (Loreille *et al.*, 2007) de amostras pela técnica do PCR, tal como polissacarídeos, proteínas, lipídios e sais (Park *et al.*, 2008). No caso do

cálcio, Loreille *et al.* (2007) relatam ainda que muitas vezes é necessário acondicionar as amostras oriundas de ossos e dentes em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) por este promover tanto descalcificação, quanto inativação de DNAses através de ação quelante em cátions bivalentes como o magnésio e o cálcio, ambos os fatores responsáveis por inibição de amplificação por PCR.

Protocolo de Extração de Material Biológico de Sangue em Anexo (Walsh *et al.*, 1991)

Sangue

As gotas de sangue submetidas ao papel FTA[®] são recortadas do mesmo, colocadas em 1mL de água ultrapura para diluição da amostra durante 30 minutos. Os tubos são então vortexados para homogeneizar a mesma. Procede-se uma centrifugação a 14.000 RPM por 3 minutos. Retira-se o sobrenadante, deixando apenas no eppendorf o equivalente a 50µL.

Neste momento são adicionados 170µL da resina Chelex[®] 100 que, ao ser acondicionada em banho maria (56° C) por 30 minutos, tem a propriedade de promover a lise das membranas celulares liberando o núcleo das células de defesa (linfócitos e polimorfonucleares) (Walsh *et al.*, 1991). Procede-se novamente vortexação dos tubos de maneira a homogeneizar a amostra, com posterior fervura durante 8 minutos para a lise da carioteca e liberação do material nuclear. Leva-se então a amostra à centrífuga, para que células lisadas e as cariotecas precipitem, deixando o material nuclear no sobrenadante por serem mais leves, após uma última etapa de centrifugação a 14.000 RPM durante 3 minutos. Congela-se a amostra para amplificações posteriores; caso for amplificar no mesmo momento, centrifugar por apenas 1 minuto.

O sobrenadante então é submetido à técnica de amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) para visualização do seqüenciamento das STR's.

Validação do Método

As amostras de sangue coletadas foram utilizadas como grupo controle, devido ao fato de serem consideradas amostras biológicas que classicamente proporcionam a realização de exames com a segurança da obtenção de resultados satisfatórios. Assim, tanto o fato de se conseguir realizar o exame de DNA a partir de dentes humanos, quanto as diferenças de protocolo e fatores de o porque deste elemento não ser utilizado em prática rotineira em IML's no Brasil, serão considerados na comparação com o padrão protocolo de extração de material biológico a partir de sangue.

4.5 Amplificação

A amplificação pela técnica da PCR que consiste na amplificação de seqüências de DNA extraído, utilizando pares de nucleotídeos conhecidos como iniciadores de reação (primers), sendo estes de pequenas extensão e complementares a ambas as fitas do DNA a ser amplificado. No começo da reação o DNA é desnaturado com o aumento da temperatura (considerando que este encontra-se em meio estável-solução tampão); ressalta-se ainda que esta solução contém *Taq*DNA polimerase (advinda do bacilo *Termophilus aquaticus*, capaz de suportar mudanças de temperatura sem comprometer sua estrutura, por viver junto a geisers) e dNTPs livres (Oliveira, 2001).

A reação começa ao elevar-se a temperatura a 90°C de maneira a promover a desnaturação da cadeia de DNA (separação das duas fitas na hélice), também conhecida por *melting* através da quebra das pontes de hidrogênio entre as fitas, que é o que mantém os nucleotídeos unidos uns aos outros (Jobim *et al.*, 2006; Lo & Chan, 2006).

Posteriormente, procede-se um rápido resfriamento de maneira a promover a reunião das fitas (*annealing*), sendo que, a tendência seria de as fitas se juntarem novamente por complementariedade dos pares de base, entretanto estas juntam-se aos primers, por estes estarem em grande quantidade na solução.

Assim, os dNTPs em alta concentração, juntamente com o funcionamento da DNA polimerase, após certo aumento na temperatura, promoverão a composição da nova

seqüência a ser replicada através da catalização, incorporando o nucleotídeo necessário na posição terminal do primer, com posterior alongamento da fita, processo este conhecido por polimerização ou extensão (Jobim, Costa e da Silva 2006; Lo & Chan, 2006).

Cada vez que esta seqüência de eventos acontece, diz-se de o fim de um ciclo, sendo o produto final de vários ciclos, a amplificação da amostra desejada. O produto de um ciclo de amplificação serve como molde (template) para outro ciclo (Oliveira, 2001).

Após vários ciclos de amplificação, a amostra encontra-se pronta para análise, onde a quantidade de seqüências repetidas em tandem em cada um dos locci pode ser lida em uma corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida, ou agarose, devido às características das malhas do gel em questão, considerando a polaridade negativa da molécula de DNA, ou ainda ser lido em seqüenciador automático, por capilaridade, utilizando comumente a formamida como veículo na leitura.

4.6 Leitura

Kit e Locci Utilizados para Análise

Optou-se pela utilização do kit AmpF1STR® Identifiler (Applied Biosystems), amplamente utilizado na literatura mundial, por sua conhecida eficácia (Projic' *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2008) que contém os seguintes locci com regiões de microssatélite para análise: D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, vWA, TPOX, D18S51, FGA, D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D5S818 (que são os 13 locci preconizados pelo FBI (Polícia Federal Norte Americana – Tabela 1), adicionados dos locci D2S1338, D19S433 exclusivos do kit Identifiler associados, ainda, ao alelo da Amelogenina (utilizado para identificação de gênero) (Projic' *et al.*, 2007).

Tabela 1- Relação dos 13 loci STR utilizados pelo FBI, juntamente com a sua descrição em termos do STR, posição cromossômica e estimativas de poder de exclusão esperado (PE_{esp}) e observado (PE_{obs}) na população brasileira (Fonte: Grattapaglia *et al.*, 2000).

Locci	Descrição do Loci/Cromossomo	PE_{esp}	PE_{obs}
D21S11	STR de tetranucleotídeo TCTA-TCTG/ 21	0,702	0,681
FGA	“Human alpha fibrinogen gene”; STR de tetranucleotídeo CTTT/ 4	0,741	0,683
CSF1PO	“Human c-fms proto-oncogene for CSF- 1”; STR de tetranucleotídeo AGAT/ 5	0,508	0,470
D13S317	STR de tetranucleotídeo AGAT/ 13	0,626	0,579
D16S539	STR de tetranucleotídeo AGAT/ 16	0,614	0,537
D18S51	STR de tetranucleotídeo AGAA/ 18	0,766	0,715
D3S1358	STR de tetranucleotídeo TCTA/ 3	0,589	0,529
D5S818	STR de tetranucleotídeo AGAT/ 5	0,511	0,459
D7S820	STR de tetranucleotídeo AGAT/ 7	0,622	0,568
D8S1179	STR de tetranucleotídeo TCTA-TCTG/ 8	0,653	0,588
THO1	“Human tyrosine hydroxylase gene”; STR de tetranucleotídeo AATG/ 11	0,613	0,524
TPOX	“Human tyroid peroxidase gene”; STR de tetranucleotídeo AATG/ 2	0,477	0,405
vWA	“Human von Willebrand factor gene”; STR de tetranucleotídeo AGAT/ 12	0,634	0,576

5 RESULTADOS

Foram processadas 18 amostras de materiais oriundos de dentes humanos extraídos *in vivo*.

O dente mostrou-se mais resistente que o osso à ação do nitrogênio líquido sendo necessário duplicar o tempo e as etapas de pulverização (o que consumiu conseqüentemente maior quantidade de nitrogênio líquido).

Todas as amplificações feitas (uma para cada amostra) foram submetidas à eletroforese por capilaridade, tendo a formamida 5% como veículo, em sequenciador automático por duas vezes, tendo sido utilizada o padrão de leitura de 50 em escala para melhor visualização e validação dos alelos.

Tabela 2 - Quantidade de locci amplificados em cada amostra, tendo como fonte de material genético, dentes humanos.

Amostras (material dentário pulverizado)	Número de marcadores amplificados
Amostra 1	11 e amelogenina
Amostra 2	11 e amelogenina
Amostra 3	12 e amelogenina
Amostra 4	12 e amelogenina
Amostra 5	11 e amelogenina
Amostra 6	11 e amelogenina
Amostra 7	11 e amelogenina
Amostra 8	12 e amelogenina
Amostra 9	11 e amelogenina
Amostra 10	12 e amelogenina
Amostra 11	11 e amelogenina
Amostra 12	12 e amelogenina
Amostra 13	11 e amelogenina
Amostra 14	12 e amelogenina
Amostra 15	12 e amelogenina
Amostra 16	11 e amelogenina
Amostra 17	12 e amelogenina
Amostra 18	12 e amelogenina

O resultado obtido foi que, dos 288 locci possíveis de serem amplificados na amostra (n=18 multiplicados por 16 locci em cada amostra), 225 foram amplificados e marcados com sucesso, perfazendo um total de 78,125% de locci marcados dentre os possíveis de o serem, muito possivelmente em função da ação inibidora em amplificação exercida pelo cálcio contido nas amostras dentárias.

A análise estatística foi realizada através do teste de Poisson, onde a finalidade deste teste é comparar um valor obtido com um valor considerado ideal. Realizada a análise, obteve-se $p < 0,0001$ o que significa que o resultado obtido foi significativamente menor que o esperado, visto o valor de $p=1$ encontrado no grupo de amostras de sangue, já que todos

os 288 alelos foram mapeados neste grupo. Assim, o uso dos elementos dentários isoladamente não fica comprometido quando analisados estatisticamente, visto que as amostras apresentaram regularidade na distribuição do número de alelos mapeados, ainda estando de acordo com os 13 loci utilizados pelo FBI em perícias criminais, de acordo com o postulado por Wade & Trozzi (2003).

6 DISCUSSÃO

A legislação pátria no que concerne à legitimidade da execução de exames de DNA realizados por cirurgiões dentistas especialistas em odontologia legal (Odontolegistas) é clara, considerando o afirmado pela lei 5.081/66 cominada com a resolução 63/05 do Conselho Federal de Odontologia (CFO) ao que segue citado:

→ Lei 5.081/66, art 6: I. Praticar todos os atos pertinentes à odontologia, decorrentes de conhecimentos adquiridos em curso regular ou em cursos de pós-graduação; IV. Proceder à perícia criminal odontolegal em foro civil, criminal, trabalhista e em sede administrativa; IX. Utilizar, no exercício da função de perito-odontólogo, em casos de necropsia, as vias de acesso do pescoço e da cabeça.

→ Resolução 63/05; das atribuições do especialista em Odontologia Legal e Deontologia compete: a) Identificação humana; b) Perícia em foro, cível, criminal e trabalhista; j) Perícias em vestígios correlatos, inclusive de manchas ou líquidos oriundos da cavidade oral ou nela presentes.

Em casos extremos onde corpos carbonizados são encontrados em cenas de crimes, acidentes, ou ainda quando ossadas são o único material a ser aproveitado de maneira a identificar a vítima comparadas a possíveis pessoas desaparecidas, os únicos materiais a serem coletados pelos peritos são, no caso, dentes e ossos.

A mais provável razão deste tipo de exames não ser feito a partir de amostras biológicas oriundas de dentes humanos, explica-se pela ausência, ainda, da figura do perito odontolegista, estatutariamente, no quadro de funcionários dos Institutos Médico-Legais (IMLs) no Brasil. Por isso, os dentes humanos não serem a escolha natural na prática rotineira destas instituições e sim na devida ordem conforme a disponibilidade: saliva, sangue, tecidos, ossos, dentes.

Considerando pois, os dentes como fontes viáveis de obtenção de material biológico para análise de perfis genéticos de DNA, mesmo se tratando até mesmo de amostras arqueológicas (Meyer *et al.*, 2000) e amostras de cadáveres enterrados até 5 anos (Malaver & Yunis, 2003), sugere fortemente a presença do profissional odontolegista nestas instituições, podendo então, este tipo de amostra biológica começar a ser adotada em

prática com mais frequência nos serviços médico-legais, incluído o odontologista no quadro de funcionários, este com mais experiência para lidar com tais elementos.

Moreira (2004) reportou que dos 26 estados e o Distrito Federal no Brasil, apenas 14 responderam positivamente ao questionamento da existência ou não do profissional Odontologista no IML daquela capital de estado, o que denota ainda a ausência deste profissional no quadro de funcionários destas instituições.

Campos (2006) já relatou a importância da inclusão deste profissional em IML's no Brasil, no que diz respeito a exames de corpo de delito em crianças que, por vezes, médicos legistas deixam passar algumas lesões em região de cabeça, pescoço e cavidade bucal, despercebidas, o que reforça a necessidade de um perito odontologista no quadro de funcionários destas instituições.

Galvão (1996) relatou a importância de médicos legistas e odontologistas trabalharem em cooperação nos IML's, ressaltando o trabalho conjunto destes profissionais, ao reportar que um IML que não possua um odontologista em seu quadro de funcionários é um IML claudicante, ou seja, deficiente.

As amostras foram conservadas a temperatura inferior a -20°C, considerado o adequado, até o momento da análise, de acordo com Vu *et al.* (1999).

No objeto deste estudo, foram selecionados apenas os terceiros molares direitos superiores, de maneira a padronizar o estudo, sendo que análises realizadas de maneiras análogas com outros dentes que não estes, em teoria também obteriam sucesso, não comprometendo a mesma em função da escolha do elemento dentário.

Malaver & Yunis (2003) avaliaram diferentes tecidos de origem dentária como fonte para análise forense em 20 dentes humanos obtidos de corpos não identificados enterrados em 1995 e exumados em 2000, proporcionando 45 amostras de DNA (5 de polpa, 20 de dentina e 20 de cemento). A polpa foi o tecido que produziu maior sinal de amplificação por PCR, enquanto que dentina e cemento produziram sinais mais fracos e semelhantes entre si. Como a utilização de dentes humanos, quaisquer que fossem as suas partes, constituiria este como fonte viável de obtenção de material genético, esperavam-se resultados semelhantes, visto que os dentes foram extraídos *in vivo* e armazenados como mandam protocolos internacionais, até o momento do processamento da amostra.

Considerando que os dentes foram pulverizados inteiros, todas as suas partes (esmalte, dentina, cemento e polpa) ajudariam a produzir sinais significativos no momento da leitura das STR's.

Já Gaytmenn & Sweet (2003) realizaram estudo análogo, entretanto não comparando sinais oriundos de tecidos dentários e sim sinais de amplificação mediante a região do dente analisada, onde a comparação foi feita entre o ápice da coroa, corpo da coroa, corpo da raiz e ápice da raiz, constatando que há quantidade suficiente de DNA em todas as regiões analisadas, exceto no ápice da coroa, e que a região que proporcionou melhor quantidade de DNA foi o corpo radicular.

Hanaoka *et al.* (1995) citado em Silva *et al.* (2007) avaliaram extração de DNA de 50 dentes (polpa e tecidos mineralizados). O DNA obtido de polpas dentárias foi de 3 a 40 µg e nenhuma correlação foi encontrada entre período de armazenagem e a quantidade de DNA. Os tecidos calcificados foram testados mediante diferentes concentrações de solução descalcificante. O tecido pulpar apresentou maior peso molecular, o que proporcionou boa análise por sondas multilocus. Os tecidos mineralizados mostraram resultados satisfatórios apenas pela técnica de PCR, compatibilizando com este estudo, visto que apenas as raízes dos elementos dentários foram utilizadas, desprovidas de polpa, e perfis adequados foram obtidos das mesmas.

No quesito extração, Mályusz *et al.* (2006) relataram que ainda pode-se lançar mão do uso de um combinado de enzimas chamado Enzyrim, este que inicialmente era utilizado para maceração, entretanto de eficácia comprovada por estes autores no que diz respeito a um aumento na quantidade de DNA extraído, quando tratados dentes com este produto.

Remualdo (2004) avaliou a amplificação de PCR de DNA extraído de dentes submetidos a calor (200°C, 400°C, 500°C e 600°C) durante 60 minutos, testando três tipos diferentes de métodos de extração. 50% das amostras foram amplificadas, somente as submetidas a temperaturas mais baixas (200°C e 400°C), confirmando então que dentes, quando bem armazenados e não sujeitos a ação de químicos, constituem fonte viável para obtenção de perfis de DNA, protocolo que portanto, como o realizados neste estudo, forneceu extração, amplificação e leitura aceitáveis, quando os dentes fossem submetidos a

altas temperaturas. Não sendo o caso deste estudo, preservados os elementos dentários, estes protocolos teriam e tiveram eficácia no objetivo do mesmo.

Fatores que inibem a amplificação de ácidos nucleicos por PCR estão presentes visando os DNAs de várias fontes. Os inibidores geralmente atuam em um ou mais dos três pontos essenciais da reação das seguintes maneiras: interferem com a lise celular, necessária para o processo de extração; interferem com a degradação ou captura dos ácidos nucleicos; e/ou inibem a atividade da polimerase para amplificação da sequência alvo (Wilson, 1997).

Alguns elementos químicos como polissacarídeos, proteínas, lipídios, sais, (Park *et al.*, 2008) ácido tânico e outros compostos oligoméricos com grupos fenol livres (Kontanis & Reed, 2006) agem como inibidores de amplificação direta por PCR.

No que relaciona a tipo de técnica utilizada, foi lançado mão a amplificação por PCR, seguida de análise de STR's, entretanto Henke *et al.* (1999) realizaram estudos de comparação entre sistemas quando utilizados em testes de paternidade, dentre eles ABO, MNS, Rh, STR's, etc., e constataram que nenhum destes é completamente inquestionável, por diversos fatores como mutações, alelos silenciosos, que acabam por não ser amplificados pelos métodos convencionais, sendo o que apresentou melhores resultados foi a análise de minissatélites.

7 Conclusões

Findas as atividades laboratoriais, pudemos concluir que:

- a) Dentes humanos constituem sim, fontes viáveis para obtenção de perfis genéticos de DNA, entretanto quando comparado com o protocolo de extração de material genético através do sangue, deixa de ser viável devido ao número de passos necessários para a obtenção dos resultados;
- b) A viabilidade pode ser discutida considerando o fator protocolo de extração. Quando dentes são comparados a amostras como sangue, saliva e tecidos, verifica-se o aumento na quantidade de passos laboratoriais visando extrair material biológico a partir destes, além da necessidade de uma quantidade maior de reagentes para esta finalidade, neste caso, portanto, inviabilizando o trabalho em locais onde as condições para realização deste tipo de exame não sejam ideais, o que não foi o caso deste estudo, visto que o laboratório de DNA criminal da Polícia Civil do Espírito Santo, desfruta de excelentes instalações, instrumentos e materiais de qualidade.
- c) O uso de dentes humanos em prática rotineira em IML's no Brasil não é feito ainda pela falta do profissional Cirurgião-Dentista nestes, devido à especialidade Odontologia Legal e Deontologia, ainda em crescimento, estar procurando mostrar sua relevância frente à sociedade, o que sugere incluir o profissional Odontologista no quadro de funcionários em IML's no Brasil de maneira a somar esforços em determinados casos onde, por exemplo, em ossadas e corpos carbonizados, dentes sejam a única opção para identificação do mesmo via análise do perfil genético de DNA, visto que o Odontologista, em função de sua formação acadêmica, é o mais indicado para tal, possuindo este profissional, conhecimentos inerentes à anatomia e histologia dentárias.

8 REFERÊNCIAS*

1. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, *et al.* Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre-RS: Artmed; 2005. p.189, 254-7.
2. Barbaro A^a, Cormaci P, Barbaro A^b. Validation of DNA typing from skeletal remains using the Invitrogen Charge Switch® Forensic DNA Purification Kit. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2008: Article in Press; 3 pages. Received 3 September 2007; accepted 10 October 2007.
3. Bond JW, Phil D, Hammond C. The Value of DNA Material Recovered from Crime Scenes. Journal of Forensic Sciences 2008; 53(4): 797-801.
4. Brasil. Conselho Federal de Odontologia. Resolução CFO 63/2005. Consolidação das Normas para Procedimentos nos Conselhos de Odontologia. Disponível em URL: <http://www.cfo.org.br/index.htm> [2008 out. 10].
5. Brasil. Lei 5.081 de 24 de Agosto de 1966. Regulamenta o exercício da Odontologia na Brasil. Disponível em URL: <http://www.cfo.org.br/index.htm> [2008 nov. 18].
6. Calabrez MCT. A pesquisa de DNA em odontologia forense. In: SILVA M. Compêndido de Odontologia Legal. São Paulo-SP: Medsi; 1997: p. 167-221.
7. Campos JC. Lesões Corporais em Crianças e Adolescentes vítimas de Violência Familiar na grande Vitória [dissertação]. Piracicaba: FOP-UNICAMP; 2006.
8. Frégeau CJ, Lett M, Elliot J, Yensen C, Fourney RM. Automated Processing of Forensic Casework Samples Using Robotic Workstations Equipped with non disposable tips: Contamination Prevention. Journal of Forensic Sciences 2008; 53(3): 632-51.

* De acordo com a Norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver.

9. Galvão LCC. Estudos Médico Legais. Porto Alegre: Sagra de Luzzato; 1996. p. 135-6.
10. Gaytmenn R, Sweet D. Quantification of Forensic DNA from Various Regions of Human Teeth. *Journal of Forensic Sciences* 2003; 48(3): 1-4.
11. Grattapaglia D, Bolzon A, Ferreira ME. Número adequado de Locos analisados via PCR em exames de paternidade: Vantagens em se utilizar baterias de 16 ou mais Locos STR para proteção contra falsas inclusões e mutações. *Revista Laes & Raes* 2000; 126: 122-139.
12. Henke L, Fimmers R, Josephi E, Cleef S, Dulmer M, Henke J. Usefulness of conventional blood groups, DNA-minisatellites, and short tandem repeat polymorphisms in paternity testing: a comparison. *Forensic Sciences International* 1999; 103: 133-42.
13. Hill CR, Kline MC, Coble MD, Butler JM. Characterization of 26 MiniSTR Loci for Improved Analysis of Degraded DNA Samples. *Journal of Forensic Sciences* 2008; 53(1): 73-80.
14. Hsu CM, Huang NE, Tsai LC, Kao LG, Chao CH, Linacre A, *et al.* Identification of victims of the 1998 Taoyuan Airbus crash accident using DNA analysis. *International Journal of Legal Medicine* 1999; 113(1): 43-46.
15. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature Magazine* 1985; 134: 67-73.
16. Jobim LF, Costa LR, da Silva M. Identificação Humana: Identificação pelo DNA, Identificação Médico-Legal e Perícias Odontológicas (Tratado de perícias criminalísticas). Vol II. Campinas-SP: Millenium Editora; 2006: p.5, 8, 13.
17. Kobilinsky L. Review of: Molecular Forensics. *Journal of Forensic Sciences* 2008; (53)2: 507.
18. Kontanis EJ, Reed FA. Evaluation of Real Time PCR Amplification Efficiencies to Detect PCR Inhibitors. *Journal of Forensic Sciences* 2006; (51)4: 795-804.
19. Kornberg A, Adler J, Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES. Enzymatic synthesis of deoxiribonucleic acid. IV. Linkage of single deoxynucleotides to the

- deoxynucleoside ends of deoxyribonucleic acid. *Procedures of the National Academy of Sciences* 1958; 44: 641-47.
20. Lewis R. *Genética Humana: Conceitos e Aplicações*. 5ª ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan; 2004. p.
21. Lo YM, Chan KC. Introduction to Polymerase Chain Reaction. *Methods Molecular Biology* 2006; 336: 1-10.
22. Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International* 2007; *Genetics* 1: 191-95.
23. Malaver PC, Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croatian Medical Journal* 2003; 44(3): 306-9.
24. Mályusz V, Scharck T, Simeoni E, Ritz-Timme S, von Wurmb-Schawrk N. Enzyrim: A new additive to increase the DNA yield from different materials such as teeth, blood or saliva. *International Congress Series* 2006; 1288: 562-64.
25. Meselson M & Stahl FW. The replication of DNA in *Escherichia Coli*. *Procedures of the National Academy of Sciences* 1958; 44: 671-82.
26. Meyer E, Wiese M, Bruchhaus H, Claussen M, Klein A. Extraction and Amplification of Authentic DNA from Ancient Human Remains. *Forensic Science International* 2000; 113: 87-90.
27. Moreira, APL. *Padronização dos Prontuários utilizados por Peritos Odonto-Legistas nos Institutos Médico-Legais em Procedimentos de Identificação Humana*. [dissertação]. Piracicaba: FOP-UNICAMP; 2004.
28. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson *Genética Médica*. 6ª ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan: 2002, p. 3.
29. Oliveira, RN. *Frequência Alélica dos Lócus DYS390, DYS391 e DYS393 em Indivíduos Brasileiros e sua Aplicação à Identificação Humana*. [dissertação] Piracicaba: FOP-UNICAMP; 2001.
30. Oz C, Zaken N, Amiel M, Zamir A. A Y-chromosome STR Marker Should Be Added to Commercial Multiplex STR Kits. *Journal of Forensic Sciences* 2008; (53)4: 858-61.

31. Park SJ, Kim JY, Yang YG, Lee SH. Direct STR Amplification from Whole Blood and Blood- or Saliva-Spotted FTA[®] without DNA Purification. *Journal of Forensic Sciences* 2008; 53(2): 335-341.
32. Projic´ P, Škaro V, Šamija I, Pojskic´ N, Durmic´-Pašic´ A, Kovačević L, *et al.* Allele frequencies for 15 short tandem repeat loci in representative sample of Croatian Population. *Croatian Medical Journal* 2007; 48: 473-7.
33. Remualdo, VR. Avaliação de Três Métodos de Extração de DNA de dentes Humanos Submetidos ao Calor. [dissertação] São Paulo: FOU SP; 2004.
34. Rivero ERC, Valenzuela MGS, Souza SCOM, Nunes FD. Método de extração de DNA de material arqueológico pelo acetato de amônio e pelo isopropanol. *Pesq Odont Bras* 2002; 16(supl): 210.
35. Silva RHA, Sales-Peres A, Oliveira RN, Oliveira FT, Sales-Peres SHC. Use of DNA technology in forensic dentistry. *Journal of Applied Oral Sciences* 2007; 15(3): 156-61.
36. Slavkin HC. Sex, enamel and forensic dentistry: a search for identity. *Journal of the American Dental Association* 1997: 128; 1021-25.
37. Ten Cate R. *Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função*. 5ª ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan; 2001: p. 143 e 205.
38. Vu NT, Chaturvedi AK, Canfield DV. Genotyping for DQA1 and PM loci in urine using PCR-based amplification: Effects of sample volume, storage temperature, preservatives, and aging on DNA extraction and typing. *Forensic Sciences International* 1999; 102: 23-34.
39. Wade C & Trozzi YE. *Handbook of Forensic Services*. Federal Bureau of Investigation. FBI Laboratory Publication. Quantico, Virginia; 2003: p. 38-9, 43-4.
40. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex[®] 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques* 1991; 10(4): 506-13.
41. Watson J, Crick F. Molecular Structure of Nucleic Acids. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature Magazine*. 1953; 4356(171): 737-8.

42. WIKIPEDIA, The Free Encyclopedia. [acesso 2007 Mar 19]. Disponível em:
http://en.wikipedia.org/wiki/DNA#Base_pairing.
43. Willems G. Forensic Odontology-Proceedings of the European IOFOS Millenium Meeting. Leuven-Belgium: Leuven University Press; 2000. p. 87-91.
44. Wilson IG. Minireview: Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Applied and Environmental Microbiology 1997; 63(10): 3741-51.

BIBLIOGRAFIA*

1. Berry A, Watson J. DNA, o segredo da Vida. Editora Scharcz LTDA, 2005.
2. Schrödinger E. O que é a vida? Aspecto físico da célula viva. São Paulo-SP: Unesp; 1977.

* De acordo com a Norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver

APÊNDICE 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre “A Viabilidade da Utilização de Amostras Biológicas Obtidas de Dentes Humanos para Obtenção de Perfis Genéticos de DNA”, que está sendo desenvolvida pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade de Campinas.

1. Para que você decida em participar ou não da pesquisa são prestadas as seguintes informações:
2. O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior, Cirurgião Dentista, Professor Titular da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas.
3. O trabalho será desenvolvido como parte da Dissertação de Mestrado de Leonardo Soriano de Mello Santos, Cirurgião Dentista, do Mestrado em Biologia Buco Dental com ênfase em Odontologia Legal e Deontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas.
4. O objetivo da pesquisa é analisar a viabilidade de amostras de DNA colhidas a partir de dentes humanos quando comparada com o já consagrado método de análise pelo sangue, visto que em alguns casos o dente não se apresenta como forma viável de obtenção de material genético, e que a nível nacional, carecemos de uma pesquisa neste âmbito.
5. Este estudo se faz importante, pois sendo o dente o órgão do corpo humano que resiste às temperaturas mais elevadas, como em casos de corpos carbonizados, poderemos lançar mão deste como fonte de material genético. Além disso, o dente humano também resiste a condições ambientais extremas e vários agentes de natureza física.
6. O participante cederá voluntariamente o elemento dentário extraído, visto que rotineiramente, este seria descartado; e uma amostra de sangue, que será coletada do alvéolo durante o procedimento cirúrgico, embebendo uma gase estéril no mesmo.
7. Essa pesquisa não oferece riscos, porque os métodos, ou seja, as práticas são de uso rotineiro.
8. Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá deixar a pesquisa no

momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.

9. Não haverá nenhum tipo de despesas para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.

10. Não haverá benefício direto ao voluntário. O grande benefício desta pesquisa para todos os que participam, é possibilitar um melhor entendimento sobre a percepção do exame em diferentes grupos sociais o que poderá trazer subsídios importantes para o redirecionamento quanto ao manuseio do material e sua utilidade em pesquisa.

11. A participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

12. O termo de consentimento livre e esclarecido será impresso em duas vias, sendo que uma ficará com o pesquisador, devidamente assinada, e outra com o participante.

13. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP: Av Limeira 901, FOP-Unicamp, CEP 13414-903, Piracicaba – SP. Fone/Fax 19-21065349, e-mail cep@fop.unicamp.br e *webpage* www.fop.unicamp.br/cep

Muito Obrigado pela sua participação!!

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido(a) sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a mesma.

Piracicaba, ____ / ____ / ____

Assinatura do participante (RG ou CPF)

Fone: (19) 8181-6085

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Departamento de Odontologia Legal e

Deontologia

E-mail: leonardosoriano@hotmail.com

Departamento Médico Legal

Av. Nossa Senhora da Penha, 2290 - Santa

Luzia - Vitória - ES

CEP: 29045-402

Telefone: (27) 3137-9016 / (27) 9982-1137

APÊNDICE 2**TABELA ALÉLICA
SANGUE PARTICIPANTES 01 a 18**

LOCCI	STR'S
D3S1358	
TH01	
D13S317	
D16S539	
vWA	
TPOX	
D18S51	
FGA	
D8S1179	
D21S11	
D7S820	
CSF1PO	
D5S818	
Amelogenina	
D2S1338	
D19S433	

TABELA ALÉLICA
DENTES PARTICIPANTES 01 a 18

LOCCI	STR'S
D3S1358	
TH01	
D13S317	
D16S539	
vWA	
TPOX	
D18S51	
FGA	
D8S1179	
D21S11	
D7S820	
CSF1PO	
D5S818	
Amelogenina	
D2S1338	
D19S433	



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "A Viabilidade da utilização de amostras biológicas obtidas de dentes humanos para obtenção de perfis genéticos de DNA", protocolo nº 037/2008, dos pesquisadores **EDUARDO DARUGE JÚNIOR** e **LEONARDO SORIANO DE MELLO SANTOS**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 27/05/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "The viability in using human teeth as biological sampling to acquire DNA genetic profiles", register number 037/2008, of **EDUARDO DARUGE JÚNIOR** and **LEONARDO SORIANO DE MELLO SANTOS**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 27/05/2008.

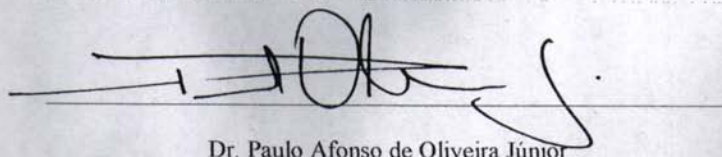

Prof. Pablo Agustín Vargas
 Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Jaeks-Jorge Júnior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

Eu, CD Paulo Afonso de Oliveira Júnior, coordenador do curso de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Faciais da EAP-APCD (Escola de Aperfeiçoamento Profissional da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas Regional Piracicaba), autorizo o CD Leonardo Soriano de Mello Santos (CRO-PA 3657) a freqüentar a clínica de especialização do referido curso, de maneira a viabilizar a abordagem de pacientes com indicação para exodontia de terceiros molares que estejam dispostos a participar como amostra da pesquisa intitulada “A VIABILIDADE DA UTILIZAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS OBTIDAS DE DENTES HUMANOS PARA A OBTENÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS DE DNA ” referente a dissertação de mestrado do profissional supracitado, sem nenhum ônus adicional a este profissional ou a nenhum dos pacientes abordados interessados em participar.

Piracicaba, 12 de Fevereiro de 2008.



Dr. Paulo Afonso de Oliveira Júnior

Coordenador do Curso de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo
Faciais (EAP-APCD-Piracicaba)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

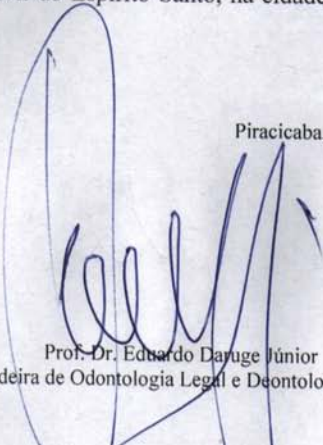


Deliberação CAD n. 04/2003: O conteúdo do presente documento é de responsabilidade exclusiva do subscritor do mesmo, eximindo qualquer responsabilidade da UNICAMP.

AUTORIZAÇÃO PARA TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA FINS DIDÁTICOS

AUTORIZO O **DR. LEONARDO SORIANO DE MELLO SANTOS**, cirurgião-dentista, brasileiro, solteiro, aluno de mestrado da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, portador do R.G. 2589492 SSP/PA, CPF 575.012.622-68, residente e domiciliado na Rua Quinze de Novembro, n.1315, Apto 74, na cidade de Piracicaba, SP, a transportar dentes humanos e amostras de sangue pertencentes ao Laboratório de Odontologia Legal desta Faculdade, para a finalidade específica de análise das amostras de maneira a viabilizar a dissertação de mestrado deste profissional intitulada “A Viabilidade da Utilização de Amostras Biológicas para obtenção de Perfis Genéticos de DNA” aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade sob o Protocolo 37/2008, no Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil do Espírito Santo, na cidade de Vitória, capital do estado do Espírito Santo.

Piracicaba, 04 de Junho de 2008.


Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior
Prof. Titular da Cadeira de Odontologia Legal e Deontologia da FOP-UNICAMP

Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Av. Limeira, 901 - Caixa Postal 52 CEP 13414-903 Piracicaba-SP -
Fone: (19) 2106-5200 - Fax (19) 2106-5218 ou (19) 3421-0144 - www.fop.unicamp.br



**GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO
SECRETARIA DE ESTADO DA SEGURANÇA PÚBLICA
POLÍCIA CIVIL
SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍCIA TÉCNICO CIENTÍFICA
LABORATÓRIO DE DNA CRIMINAL**

TÉRMO DE AUTORIZAÇÃO

Na condição de Responsável Técnico pelo Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil do Espírito Santo, como forma de viabilizar a execução do Projeto de Pesquisa intitulado **"A VIABILIDADE DA UTILIZAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS OBTIDAS DE DENTES HUMANOS PARA OBTENÇÃO DE PERFIS GENÉTICOS DE DNA"**, sob a responsabilidade do **DR. LEONARDO SORIANO DE MELLO SANTOS (Autor)** considerando a importância do projeto para o desenvolvimento da ciência e para maior segurança nos cálculos dos índices de probabilidade de paternidade, imprescindíveis nas análises de perfis genéticos de DNA, **AUTORIZO**, pelo presente termo, ciente de que não haverá custos financeiros para a Instituição Policial a qualquer tempo e nenhum tipo de prejuízo ou comprometimento da rotina das atividades periciais, a realização neste Laboratório das etapas de extração, amplificação e seqüenciamento do DNA nuclear, objeto do estudo proposto.

Vitória, 12 de maio de 2008.

Dr. Luís Renato da Silveira Costa

Médico Legista – Médico do Trabalho – Especialista em Genética Forense

Doutor em Ciências pela FOP / Unicamp – SP

Responsável Técnico pelo Laboratório

Luiz Renato da S. Costa
Médico Legista
Resp. Técnico Lab. DNACR.PC.ES
Matr.: 198952

ANEXO 2

Protocolo de Extração de DNA a partir de manchas de sangue através do uso da Resina Chelex® 100 (Walsh, Metzger & Higuchi, 1991).

1. Pipetar 1mL de água estéril destilada em um tubo estéril de 1,5mL. Adicionar um dos seguintes (conforme o caso) e agitar gentilmente: a) 3µL de sangue; b) porção com mancha de sangue com mínimo de 3mm².
2. Manter a temperatura ambiente de 15 a 30 minutos; agitar ocasionalmente por inversão ou vortexar gentilmente.
3. Centrifugar de 2 a 3 minutos a 10.000-15.000 rpm.
4. Remover com cuidado o sobrenadante (deixar no tubo cerca de 20 a 30µL) e descartar. Se tratando de uma mancha de sangue, deixar o local onde esta se encontra juntamente com o pellet.
5. Adicionar Chelex 5% a um volume final de 200µL.
6. Incubar a 56°C de 15 a 30 mins.
7. Vortexar com vigor de 5 a 10 segs.
8. Incubar em água fervente por 8 mins.
9. Vortexar com vigor de 5 a 10 segs.
10. Centrifugar de 2 a 3 minutos a 10.000-15.000 rpm.
11. A amostra agora encontra-se pronta para a amplificação por PCR. Recomenda-se que 20µL do sobrenadante seja adicionado ao PCR mix.
12. Armazenar o remanescente a temperatura de 2 a 8°C ou congelar. Para reutilizar, repetir os passos de 9 a 11.

Protocolo de Extração de DNA a partir de Dentes através do método isopropanol/acetato de amônia (Rivero *et al.*, 2002)

1. Transferir 0,25g do dente (triturado previamente em moínho criogênico) para um tubo eppendorf esterilizado adicionando 1mL de água ultrapura;
2. Centrifugar 1000 rpm por 5 mins.;
3. Desprezar o sobrenadante e lavar o corpo de fundo com 1000μL PBS 1x, centrifugando-se então em 2000 rpm por 5 mins, e desprezar o sobrenadante;
4. Lavar o corpo de fundo com 1000μL de PBS 1x, centrifugando novamente em 2000 rpm por 5 mins, e desprezar novamente o sobrenadante;
5. Submeter o corpo de fundo a digestão enzimática com proteinase K: adicionar ao corpo de fundo 200 a 400μL de tampão de lise estéril (NaCl 1M; Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M, pH 8,0; SDS 10%) e proteinase K na concentração final de 500μg/mL. Os tubos serão mantidos a 55°C em banho maria por três a cinco dias até a completa dissolução do corpo de fundo do tecido. Será adicionada proteinase K (10 a 30μL na concentração de 250μg/mL) em intervalos de 24 horas, e os tubos serão invertidos pelo menos uma vez ao dia;
6. Após a completa dissolução do material (a solução no tubo eppendorf estará praticamente transparente) procede-se a inativação da proteinase K, incubando-se os tubos a 95°C durante 10 mins, no banho seco ou banho maria;
7. Para extração de DNA, adiciona-se 200μL de acetato de amônia 4M no tubo contendo o lisado, para a precipitação da proteína. O tubo será homogeneizado por 20 segundos vigorosamente, incubando em gelo durante 5 mins, e centrifugado a 13000 g durante 3 mins. A proteína precipitada será observada como corpo de fundo no tubo. O sobrenadante, contendo o DNA será transferido para outro tubo eppendorf;
8. Para a precipitação do DNA, adiciona-se 600μL de isopropanol 100%, que homogeneizado, será centrifugado a 16000 g durante 5 mins. O sobrenadante será então desprezado e o corpo de fundo de DNA obtido será lavado com etanol 70% a temperatura ambiente e o corpo de fundo de DNA será dissolvido em 30 a 50μL de tampão de diluição TE (Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, pH 8,0) e mantido a 4°C.