PATRÍCIA BITENCOURT DA ROCHA

"O ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO HUMANO (DNA NUCLEAR) EM TECIDO ÓSSEO SOB A AÇÃO DE DIVERSAS TEMPERATURAS."

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Buco-Dental, com área de concentração em Odontologia Legal e Deontologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior

PIRACICABA

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

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

R582e

Rocha, Patrícia Bitencourt da.

O estudo do comportamento do material genético humano (DNA nuclear) em tecido ósseo sob a ação de diversas temperaturas. / Patrícia Bitencourt da Rocha. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Eduardo Daruge Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Degradação. I. Daruge Júnior, Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: The study of the genetic material of human DNA (nuclear) in bone tissue under the action of various temperatures

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Degradation

Área de Concentração: Odontologia Legal e Deontologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Eduardo Daruge Júnior, Luiz Francesquini Júnior, José Roque Camargo

Data da Defesa: 13-02-2009

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 13 de fevereiro de 2009, considerou a candidata PATRÍCIA BITENCOURT DA ROCHA aprovada.

PROF. DR. EDUARDO DARUGE JUNIOR

PROF. DR. JOSÉ ROQUE CAMARGO

PROF. DR. LUIZ FRANCASQUINI JUNIOR

Dedico a Deus por permitir que a vida aconteça, me iluminando, protegendo e guiando em tudo na vida.

Aos meus pais Carlos Bitencourt da Rocha e Irene Bitencourt da Rocha, pois foi deles que recebi o dom mais precioso: a vida; pela educação, coragem, amor e determinação para lutar pelos meus ideais. Meu profundo agradecimento, pois puderam me dar à oportunidade de concretizar este objetivo, me incentivando a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos e ensinando-me que é preciso acreditar e investir no estudo e futuro.

A minha irmã, Débora Bitencourt da Rocha que, apesar da distância, tenho certeza de que sempre esteve torcendo por mim e me incentivando, mostrou que esse trabalho não resultou apenas de um esforço individual, mais sim de um somatório de forças e de intenções.

Ao meu irmão Carlos Bitencourt da Rocha Júnior pela sua paciência, amizade, respeito e incentivo. Por apoiar todas as minhas decisões, ensinando-me que é preciso acreditar e investir no que amamos.

A minha querida e amada filha Letícia Caroline da Rocha que, com todo o amor e carinho soube compreender os períodos de viagens, ausências e estudos de extrema necessidade para a realização deste trabalho. Quero deixar o meu profundo agradecimento, pois embora ainda seja apenas uma criança, sempre soube expressar com gestos de carinho e frases de apoio e incentivo. Frase dá quais jamais esquecerei do tipo “... mamãe é só acreditar, tudo vai dar certo, te amo!”.

A minha querida avô e madrinha Leocádia kanzeler (in memorian) pessoa que sempre me orgulhei muito.

Por isso e muito mais sou grata e quero compartilhar esta conquista com vocês!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pela oportunidade de aprender e de crescer, acolhendo todos aqueles que desejam aprimorar seus conhecimentos científicos.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Legal e Deontologia, pela orientação segura e por quem sempre me apoiou e muito me ajudou durante o tempo do mestrado.

Ao Prof. Dr. Fausto Bérzin, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental, que de forma generosa, sempre nos incentivou a carreira docente.

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Daruge, que me apresentou à carreira acadêmica e me concedeu todas as oportunidades de crescimento profissional. Admiro-te pelo seu empenho em formar futuros mestres e pesquisadores, pela arte de fazer pesquisa independente de condições estruturais e materiais. Dedico o resultado de um esforço comum, consciente e honesto em prol do desenvolvimento e valorização da Odontologia Legal.

Ao meu orientador Dr. Eduardo Daruge Júnior, professor titular do curso de Odontologia Legal e Deontologia da Unicamp/FOP, amigo e companheiro, quero registrar o meu agradecimento, não só pela ajuda em realizar este trabalho, mas também pela oportunidade de crescer. Manifesto meu reconhecimento e estima pelas lições de saber, pela orientação constante e por ter colocado em minhas mãos as ferramentas com as quais eu lutarei para abrir novos horizontes, rumo à satisfação plena de meu ideal profissional e humano.

A minha homenagem ao querido Prof. Dr. Luiz Francesquini Júnior que dedicou sua vida ao ensino, modelando nesse caminho muitas vocações, incentivando o raciocínio do estudante e transformando os nossos ideais em realizações. Agradeço pela correção e por participar da banca examinadora, com

suas sugestões valiosas. Um profissional apaixonado pelo ensino, e que teve um papel importante nesta tese, apresentando imensa serenidade e grande sabedoria. Obrigado pela dedicação e renúncia pessoal, por repartir sua experiência de vida e auxílio para trilhar com sabedoria este caminho.

A Dra. Kátia Souza Carvalho, Coordenadora do Departamento-Médico-Legal de Vitória – E.S, pela cessão de insumos e equipamentos que possibilitaram a elaboração desta pesquisa, assim como pela grande oportunidade de aprendizado. Agradeço de coração a hospitalidade tão generosa ao me receber em sua casa, contribuindo pessoalmente para a conquista desse meu ideal. O meu profundo apreço por acreditar em nossos propósitos, participar e colaborar na coleta de dados para esta pesquisa, tornando-a concreta.

Ao Prof. Dr. Luís Renato da Silveira Costa, Médico-Legista, Médico do Trabalho e Especialista em Genética Forense, Responsável Técnico pelo Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil do Espírito Santo, profissional competente e de grande saber, experiente e fonte de uma gama de conhecimento, exemplo de dedicação, abnegação e disponibilidade. Meu apreço, admiração e sinceros agradecimentos pela sua paciência, dedicação, amizade e por sua imensurável ajuda que me foi prestada durante todo o tempo no Laboratório de DNA.

Ao Dr. Emerson Gonçalves da Rocha, delegado de Polícia Civil, Superintendente de Polícia Técnica Científica do Estado do Espírito Santo, pela sua grande simpatia, carinho, eficiência de seu trabalho, sempre pronto a nos ajudar. Meu sincero agradecimento pelo apoio e colaboração para obtenção dos resultados deste trabalho, pela condição oferecida para a realização da interpretação dos dados coletados, provando que um trabalho deste tipo, resulta não de um esforço individual, e sim, de um somatório de forças e de intenções

Ao Departamento Médico Legal do Espírito Santo, pela oportunidade de aprender e de crescer, acolhendo todos aqueles que desejam aprimorar seus conhecimentos científicos. Agradeço a todos os Médicos Legistas desta instituição

que acreditaram e incentivaram a prosseguir esta minha jornada, fossem quais fossem os obstáculos e ensinando-me que é preciso acreditar nos ideais. Sou grata a todos vocês que sempre estiveram torcendo por mim: Dr. Romildo Robbi, José Carlos Frasson, Denise Galvas Terra e Carvalho, Clicie Cristina Lima Turra, Martha Cruz Sperandio, José Carlos da Silva Campos, Leonardo Lessa Arantes, Paulo César R. Boasquevisque, Marcio Mattos Vieira, Maria Juliana Caliman, Augusto César Monjardim, Robson Delttman, Marcos Antonio Ferreira Pinto, Augusto Soares de Carvalho, Walter José Fagundes Pereira, Cássio C. Laiber, Maria das Graças Correa Faria, Josidéia Barreto Mendonça, Fabrício Pelição e Maria do Carmo Frechiani.

A Célia Regina Manesco, pelo auxilio constante e incansável, pelo carinho e amizade. Agradeço pela ajuda inestimável prestada durante o curso do mestrado, através da sua eficiência no seu trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação da FOP-Unicamp, pela amizade, companheirismo, convivência e por todas novas amizades.

A minha querida e amada amiga Bruna Perin e seu esposo Rogério, pelo carinho que sempre dispensaram em mim, por todo o apoio e confiança. Meu profundo agradecimento a minha eterna e sempre amiga pelo companheirismo incondicional, sempre estando ao meu lado nesses 10 anos de convívio, demonstrando nos mais simples gestos do dia-a-dia o significado da verdadeira amizade. Você é a reunião em um único ser humano, dos sentimentos mais nobres, como o amor ao próximo, a solidariedade, a bondade e a compaixão. Por tudo isso e muito mais, tenho orgulho de ti, pois és um exemplo a ser seguido.

Ao meu estimável amigo Eder Cunha Pascoa, a quem eu devo todas as minhas alegrias e conquistas nesta minha nova vida. Sei que Deus te colocou no meu caminho no momento em que mais precisei, veio como um representante dele. Aprendi que o valor das coisas não estão no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis. Meu profundo agradecimento, pois

você sempre acreditou que eu venceria, sempre me incentivou a lutar e ganhar, que tantas vezes me confortou com palavras sábias, que tantas horas destinou a me ouvir, a me entender e a me aconselhar. A pessoa que me ensinou a arte de saber lidar com as situações mais inusitadas sem perder o bom-humor, tornando mais leve e saudável nossa passagem por essa vida. Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

Á Marilene Girello, bibliotecária da FOP/UNICAMP, pela paciência e dedicação na confecção da ficha catalográfica, onde o tempo era tão curto e minha expectativa tão grande.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, sem exceção, pela amabilidade e atenção com que sempre me trataram.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPS) pela concessão de bolsa do mestrado.

"Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, porque cada pessoa é única, para nós, nenhuma substitui a outra.
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai sozinho, nem deixa a sós...Leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo.
Há os que levam muito, mas não há os que não deixam nada.
Esta é a mais bela responsabilidade de nossas vidas: a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso"

Antoine De Saint Exupéry

RESUMO

Um exame de DNA pode ser o único e essencial instrumento para o esclarecimento de um inquérito policial, pois qualquer material deixado no local da investigação, de onde os peritos consigam extrair DNA, pode ser a principal prova contra o autor do delito. A tecnologia atual permite a realização da genotipagem de DNA a partir de quantidades pequenas de amostras biológicas. Em casos de crimes, a evidência biológica encontrada, vestígio, pode ser confrontada com amostra do suspeito e o laudo pode ser utilizado como prova em um processo judicial. O sucesso da análise depende do estado do material analisado. O grau de deterioração, a forma de conservação e o tempo decorrido podem influenciar o resultado ou impedir a identificação. Em casos de carbonização de corpos, comuns em acidentes aéreos, automobilísticos e alguns homicídios os ossos carbonizados são o material humano de primeira escolha para a análise de DNA sendo, o material genético obtido pela coleta de amostras da região do corpo melhor preservada. O estudo do comportamento do material genético humano ainda é muito controverso no meio científico, já que existem poucos trabalhados na área sobre o tempo de exposição e o grau da temperatura de degradação do DNA. Neste trabalho foi proposto analisar o comportamento de material genético humano (DNA Nuclear) obtido de amostra biológica (tecido ósseo) submetido à exposição às temperaturas de 100ºC, 200ºC, 300ºC, 400ºC, 500ºC e 600ºC, por intervalo de tempo de 10, 20 e 30 minutos. Possibilitando através dos resultados a confecção de um protocolo confiável para extração de DNA de ossos carbonizados. O grupo de estudo foi constituído de 50 (cinqüenta) cadáveres não identificados. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o método investigativo através do DNA possui várias vantagens sobre outros meios de identificação, como por exemplo, sorologia tradicional, antropologia forense, impressão digital, tomadas radiográficas, entre outros. Quando a estrutura óssea foi submetida à temperatura de 100ºC à 300ºC pelo período de 30 minutos, foi possível proceder-se a identificação humana por meio da análise do exame de DNA. O nosso estudo avaliou a degradação do DNA tomando-se por base a quantidade de marcadores amplificados. Em um procedimento de análise normal

do sistema comercial *multiloci* através da técnica da PCR esperávamos amplificar até 16 (dezesseis) marcadores genéticos. Obedecendo ao protocolo internacional preconizado pelo programa CODIS do FBI, para assegurar uma identificação humana, se faz necessária uma amplificação mínima de 13 marcadores. Nas amostras submetidas a temperaturas de 400 ºC constatamos a degradação de 90,62% do material, ou seja, das 16 amplificações esperadas e exigidas pelo programa CODIS, apenas encontrou-se um marcador, dado insuficiente para uma identificação humana. Assim como, o estudo mostrou em 100% das amostras submetidas à temperatura acima de 500ºC por um período acima de 10 minutos seria suficiente para a degradação completa do DNA Nuclear, demonstrando a temperatura máxima que um osso do corpo humano pode sofrer.

PALAVRA CHAVE: DNA, degradação, temperatura.

ABSTRACT

An examination of DNA may be the unique and essential tool for the elucidation of a police investigation, since any material left at the site of research, where experts will extract DNA, may be the main evidence against the offender. The current technology allows the realization of the genotyping of DNA from small quantities of biological samples. In cases of crimes, the biological evidence found, trace, may be faced with sample of the suspect and the award may be used as evidence in legal proceedings. The success of the analysis depends on the state of the material analyzed. The degree of deterioration, how to conserve time and may influence the outcome or to prevent identification. In cases of carbonized bodies, common in air accidents, homicides and some automobiles burned bones are the human material of choice for the analysis of DNA is the genetic material obtained by collecting samples from the body better preserved. The study of the behavior of human genetic material is still very controversial in the scientific, since there are few worked in the area about the time of exposure and the degree of temperature of degradation of DNA. This work was proposed to analyze the behavior of human genetic material (DNA Nuclear) obtained in biological sample (bone) subjected to exposure to temperatures of 100ºC, 200ºC, 300ºC, 400ºC, 500ºC and 600ºC, for the time interval of 10, 20 and 30 minutes. Allowing the results through the creation of a reliable protocol for extraction of DNA from bones burned. The study group consisted of 50 (fifty) unidentified bodies. Based on the results, it appears that the method investigated by DNA has several advantages over other means of identification, such as traditional serology, forensic anthropology, fingerprint, radiographic taken, among others. When the bone structure was subjected to a temperature of 100ºC to 300ºC for a period of 30 minutes could be extended to human identification through DNA analysis of the examination. Our study evaluated the degradation of DNA based on the amount of amplified markers. In an analysis of the normal trading system through the technique of *multiloci* PCR amplifying expected by 16 (sixteen) genetic markers. According to international protocol recommended by the FBI's CODIS program, to

ensure a human identification, amplification is needed a minimum of 13 markers. Samples subjected to temperatures of 400 ° C found a degradation of 90.62% of the material, or amplification of the 16 expected and required by the CODIS program, there was only a marker, as insufficient to identify a human. As the study showed in 100% of the samples subjected to temperature above 500 º C for a period longer than 10 minutes would be sufficient to complete the degradation of nuclear DNA, showing the maximum temperature that a bone in the human body can suffer.

KEYWORDS: DNA, degradation, temperature

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Eletroforese Capilar
CODIS	Combined DNA Index System
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
dsDNA	DNA dupla fita
FOP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba
IML	Instituto-médico-legal
IMLs	Institutos-médico-legais
OMS	Organização Mundial de Saúde
pB	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
STRs	*Short tandem repeats* ou "repetições curtas em *tandem*", também denominados de microssatélites
Tm	*Melting Temperature*
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VNTRs	V*ariable number of tandem repeats* ou "número variável de repetições em *tandem*", também denominados de Minissatélites

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 01

2. REVISÃO DA LITERATURA 04

3. PROPOSIÇÃO 27

4. MATERIAL E MÉTODOS 28

5. RESULTADOS 35

6. DISCUSSÃO 46

7. CONCLUSÃO 53

REFERÊNCIAS 54

APÊNDICE 60

ANÊXOS 64

1. INTRODUÇÃO

Por ser extremamente longo e quimicamente monótono, o DNA foi, durante muitos anos, a molécula celular mais difícil de ser estudada. Entretanto com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, na década de 70, essa situação modificou-se completamente. Atualmente, é possível localizar, isolar, preparar e estudar qualquer segmento de DNA. Esse método tem revolucionado profundamente todas as áreas biológicas.

O estudo do comportamento genético humano (DNA Nuclear) em tecido ósseo sob a ação de diversas temperaturas tem considerável importância para o desenvolvimento da ciência devido à carência de pesquisas sobre o tema, o que dificulta o trabalho dos peritos quando da necessidade de se identificar corpos carbonizados.

Tem se observado um crescimento do número de acidentes coletivos como quedas de aviões, incêndios, acidentes de trânsito e de trabalho. Tal fato tem gerado uma grande variedade da natureza dos diversos tipos de mortes, dificultando sobremaneira a coleta e obtenção dos vestígios presentes nos locais de crimes, principalmente nos casos de carbonizações.

Em 2005, Bezerra relatou que nas circunstâncias de um incêndio quando a temperatura atinge um grau tão elevado ao ponto de carbonizar um indivíduo, somente seria possível a sua identificação com o uso da análise do exame de DNA.

Pena (2005) descreveu que a prova pericial no esclarecimento de um crime, é um importante subsídio para busca da verdade, sendo que a aquisição e análise de material humano, feita através do DNA são conclusivas de identificação podendo então inocentar ou incriminar uma pessoa.

Bonaccorso (2006) retratou que há bem pouco tempo a ciência da investigação na identificação de casos criminais pautava-se apenas nas análises

sorológicas dos polimorfismos de proteínas e grupos sangüíneos e em alguns marcadores genéticos.

Em 2007, Watson, no seu livro: DNA O segredo da vida, refere que o exame forense de amostras biológicas teve seu início por volta do princípio do século XX com a aplicação dos grupos sangüíneos ABO em evidências relacionadas a crimes ou a identificação de pessoas.

Ainda descreveu que atualmente, os grupos sangüíneos eritricitários, como os sistemas ABO, Rh (CcDEe) e MNSs, foram substituídos na maioria dos centros de pesquisa, sendo pouco utilizados, tendo-se em vista que através da análise do DNA, pode-se impetrar o poder discriminatório, limite este, necessário para inferir a identificação absoluta.

Matte (2007) citou que o exame de DNA revela-se universal, pois em qualquer local em que se proceda ao exame deve-se obter os mesmos resultados. Mas ressaltou que tal fato somente é possível, desde que, o método seja realizado em condições técnicas corretas.

Koch (2008) descreveu quatro grandes vantagens da aplicação do exame de DNA. A primeira e principal importância é, sem sombra de dúvida, a possibilidade de sua aplicação sobre toda e qualquer fonte de material biológico.

Visto isto a uma ampla variedade de líquidos corporais que encontramos nos exames de evidência; todavia um exame sorológico completo pode ser realizado somente no sangue e não em outros tecidos ou líquidos corporais. Entretanto, com estudos de DNA qualquer quantidade com ínfima porção de material biológico, incluindo o sangue, cabelos, ossos, saliva, sêmen, tecido, urina, ou qualquer outro fluido biológico, pode ser analisada para associar um suspeito ao crime.

A segunda e mais amplamente propalada vantagem do exame de DNA é seu potencial discriminatório.

A terceira vantagem do DNA é sua resistência aos fatores ambientais, pois este é uma molécula robusta, relativamente resistente aos ácidos, álcalis e detergentes, diferentemente dos determinantes protéicos, lipídicos e carboidratos.

Observamos que a informação da tipagem do DNA foi encontrada na seqüência nucleotídica e que independe da conformação da molécula. Conseqüentemente, os exames com DNA, diferentemente dos marcadores sorológicos tradicionais, podem ser realizados com maior segurança em amostras muito antigas e que estiveram expostas a maiores agressões ambientais, como por exemplo, a temperatura.

Finalmente, a quarta vantagem do exame de DNA reside na possibilidade de separá-lo da célula espermática de qualquer outro DNA celular.

Em vista a estes fatos, o presente estudo buscou determinar o comportamento do material genético humano (DNA nuclear) em tecido ósseo sob a ação de diversas temperaturas e comparar as vantagens e desvantagens de métodos investigativos com o exame de DNA Nuclear em ossos de corpos carbonizados presentes na revisão da literatura. Enfatizou-se ainda discutir os aspectos éticos e legais pertinentes ao tema.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Benecke (1997) citou em sua obra que o avanço da ciência e tecnologia a nível forense teve seu ponto culminante em meados dos anos 80, quando as técnicas de identificação, fundamentadas na análise direta do ácido desoxirribonucléico (DNA) tornaram-se uma das mais poderosas ferramentas para a identificação humana e investigações criminais.

Conforme Kling (1999), muito se passou desde a proposta de Bentham, em 1832, nos Estados Unidos, em empregar a tatuagem como processo de identificação civil. Em tempos mais remotos premidos pela necessidade de identificar seus semelhantes, empregavam-se os mais bárbaros e desumanos processos de identificação.

Ainda este autor citou que destituídos de quaisquer recursos científicos, tais "tratamentos" consistiam na marcação com ferro em brasa em indivíduos que houvessem praticado, por exemplo, um delito, ou tratando-se simplesmente de um escravo em fuga.

Também descreveu que a descoberta dos antígenos eritrocitários, já neste século, tornou-se possível a idéia de discriminar indivíduos através de análises sangüíneas, mesmo aqueles que tiveram morte violenta, como por exemplo, vítimas de acidentes aéreos.

Segundo Duarte *et al*. (2001) o primeiro método de utilização da análise do DNA para identificar indivíduos foi desenvolvido em meados da década de 1980 por Sir Alec Jeffreys, da Universidade de Leicester e, apesar do seu enorme poder potencial, houve sérias reservas quanto o seu uso real, pois no início, havia muitas dúvidas quanto à reprodutibilidade e à confiabilidade dos métodos.

Luftig (2001) mencionou, que em agosto de 1986, na Inglaterra, um caso criminal envolvendo o estupro e homicídio de duas adolescentes foi solucionado com a determinação da autoria do delito após toda a população masculina de dois vilarejos do condado de Leicester ter contribuído com a doação

de amostras de sangue para confronto com vestígios de sêmen coletados do corpo das vítimas. Estava assim inaugurada uma nova página no emprego da biologia molecular e sua utilização na identificação humana criminal.

No The New York Times, em setembro de 2001, o autor Atman, descreveu a importância do uso do exame de DNA.

Relatou que nos últimos tempos, esta área da ciência, vem crescendo e ganhando respeito, devido a sua extraordinária importância no conjunto dos interesses da coletividade, pois cada vez mais ela se exercita em razão das necessidades de ordem pública e social. Principalmente devido ao grande aumento do número de acidentes coletivos, configurando-se em tragédias, como quedas de aviões, incêndios, acidentes de trânsito e de trabalho.

Também citou que, considerando o grande desenvolvimento social, o avanço tecnológico no setor de transportes, a natureza dos diversos tipos de mortes, o estado de decomposição cadavérica e os vestígios presentes nos locais de crimes, percebeu-se a grande importância do estudo do comportamento do material genético humano sob a ação de diversas temperaturas.

Segundo Jobim (2003), o estudo do DNA possibilitou informações sobre a individualidade humana, iluminando a ciência da investigação e da identificação em casos criminais. Uma mudança total na tecnologia aconteceu a seguir, pois o estudo do polimorfismo do DNA substituiu, em curto espaço de tempo, as análises sorológicas dos polimorfismos de proteínas e grupos sangüíneos, até então, usados exclusivamente na área forense.

Para o autor as técnicas de amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) na última década tiveram um enorme progresso. Foram também desenvolvidos novos métodos de extração do DNA do sangue periférico, tecidos*, ossos,* cabelos, manchas de sangue, material vaginal, entre outros. Citou ainda que essa explosão científica, de vasto potencial de aplicação, necessita de especialistas com formação em biologia molecular na análise

forense, pois somente o domínio do conjunto das técnicas permite a perfeita avaliação do DNA em medicina legal.

Desalle (2004) descreveu que a sensibilidade do exame de DNA constitui uma enorme vantagem sobre outros métodos de identificação humana. Ressaltou que a tipagem do polimorfismo do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), pode ser efetuada com o DNA de algumas poucas células, de longe superando a sensibilidade dos exames tradicionais.

De acordo com Lewis (2004), o estudo do material genético humano (DNA) é uma área interdisciplinar por excelência, de amplas possibilidades e de profunda dimensão; como nenhuma outra disciplina científica, tendo se tornado de importância fundamental para inúmeros aspectos dos interesses humanos e estando presente na humanidade de diversas maneiras. De fato, as questões genéticas parecem emergir diariamente em nossas vidas.

De acordo com os pesquisadores, Mehrdad, (2005), os incêndios em locais públicos são apenas um dos vários tipos de desastres coletivos de grande magnitude que podem ocorrer. Estes desastres podem ser decorrentes de causas naturais (enchentes ou terremotos), atos intencionais (atentados a bombas), e causas acidentais (incêndios e queda de avião).

Andelinovic *et al*. (2005) citaram que Independente da causa que levou a ocorrência de um grande número de vítimas graves ou fatais, a identificação das vítimas é uma ação necessária e que deve ser realizada o mais brevemente possível, não somente pelo fator humano (o direito das famílias receberem e enterrarem os corpos das vítimas), mas também por questões cíveis (emissão de certidão de óbito, pensões e seguros de vida) e criminais (quando há um culpado pelo ato, este deve ser responsabilizado e as famílias das vítimas indenizadas).

Descreveram ainda que esta identificação de vítimas pode ser realizada com o auxílio de técnicas como a antropologia forense, a impressão digital, a odontologia forense, a radiologia e o exame de DNA.

Segundo Tsokos *et al*. (2005), qualquer que seja a técnica utilizada, a preservação do local e das vítimas é fundamental, pois, no momento em que se vasculham os destroços, pode ocorrer a fragmentação dos corpos e também a contaminação das amostras, o que dificultará a obtenção de resultados rápidos. Desta forma, para que essa organização dos destroços seja efetiva, é necessária a formação de uma equipe forense multidisciplinar.

Alonso *et al*. (2005) relataram que a coleta de amostras para o exame de DNA deve ser realizada logo após a identificação possível pelos médicos-legistas, odonto-legistas e papiloscopistas, mesmo quando esta identificação for positiva, pois pode ser necessário um futuro confronto genético para elucidação de dúvidas com relação a identidade do indivíduo e troca de corpos.

Para Edson *et al*. (2005), a escolha do tipo de amostra a ser coletada depende da conservação da amostra.

Ainda este autor, citou que os dentes e ossos são os materiais que se preservam por mais tempo, mesmo quando submetidos a diferentes fatores de degradação.

Também descreveu que a limpeza do material pode ser um fator importante antes da extração do DNA para diminuir o risco de contaminação com perfis genéticos de outras vítimas. Paralelamente à coleta de amostras dos corpos e fragmentos, deve ser realizada a coleta de material de referência dos supostos cadáveres. Existem duas possibilidades: o uso de referências diretas, como escovas de dentes, biópsias anteriores e amostras de sangue de laboratórios de análises clínicas, ou referência de familiares próximos como sangue ou swab oral da mãe, pai, filhos ou irmãos.

Remualdo (2005) citou na sua tese de doutorado, a importância deste estudo, pois de acordo com o seu levantamento bibliográfico, ainda existe uma carência de pesquisas sobre o tema, o que dificulta o trabalho dos peritos quando da necessidade de identificação de uma pessoa, seja ela vítima de um

assassinato ou de um acidente que resulte em carbonização. E esta incerteza diante da possibilidade de existência de material genético em corpos carbonizados pode gerar contestações judiciais.

Referência ainda, que no ponto de vista das aplicações práticas na atividade pericial forense, os exames de DNA Nuclear são empregados, dentre outras, na identificação de cadáveres carbonizados.

Bezerra (2005) relatou que em um grau tão avançado de carbonização somente é possível identificar com o uso da análise de DNA.

De acordo com Pena (2005), a determinação de identidade genética pelo DNA pode ser usada para demonstrar a culpabilidade dos criminosos, exonerar os inocentes, identificar corpos e restos humanos em desastres aéreos e campos de batalha, determinar paternidade com confiabilidade praticamente absoluta, elucidar trocas de bebês em berçários e detectar substituições e erros de rotulação em laboratórios de patologia clínica.

Tsuchiya (2005) descreveu que o exame de DNA foi apontado como a maior revolução científica na esfera forense desde o uso e reconhecimento das impressões digitais como uma característica pessoal.

Descreveu também que as técnicas de identificação fundamentadas na análise direta do ácido desoxirribonucléico ostentam pelo menos duas vantagens sobre os métodos convencionais de identificação: a estabilidade química do DNA, mesmo após longo período de tempo, e a sua ocorrência em todas as células nucleadas do organismo humano, o que permite condenar ou absolver um suspeito com uma única gota de sangue ou através de um único fio de cabelo encontrado na cena do crime.

Malaghini *et al*. (2006) abordaram que com o conhecimento atual, ao menos duas grandes vantagens devem ser citadas sobre a tipagem molecular: o DNA possui uma alta estabilidade química mesmo após um longo período de

tempo e está presente em todas as células nucleadas do organismo humano, o que facilita a obtenção do mesmo.

Segundo Smarra (2006), a existência legal de uma pessoa é definida pelo nascimento com vida e seu devido registro civil, bem como a pessoa deixa de existir legalmente com o devido assento de óbito no Cartório de Registro Civil.

Ainda citou que, para ser emitida a Declaração de Óbito constitui-se em uma exigência legal a perfeita identificação da pessoa. São aceitas pela Justiça a identificação de pessoas através da dactiloscopia ou pelo reconhecimento direto, o que é rotineiramente realizado no Instituto Médico Legal – IML.

Todavia, em se tratando de cadáveres em condições especiais tais como carbonizados, não é possível o emprego destas metodologias; assim, o cadáver ou a ossada é encaminhado pela Autoridade Policial ou pelas Equipes de Perícias Médico-Legais, ao Núcleo de Antropologia para o exame de identificação médico-legal.

Referenciou que a identificação médico-legal realizada pelo Núcleo de Antropologia do IML consiste no exame do cadáver em busca de sinais particulares, no exame das arcadas dentárias e na limpeza dos restos mortais para que se possa examinar a ossada e confrontar com registros prévios das características individualizadoras da pessoa que se procura, inclusive com o exame de vínculo genético (DNA).

Ainda esta autora, descreveu a necessidade do material biológico adequado estar disponível nos restos mortais, o que nem sempre ocorre, resultando exames inconclusivos na maioria das vezes. Estas dificuldades na tentativa de identificação acarretam a demora na emissão da certidão de óbito, quando não inviabiliza a emissão administrativa, sendo necessário providenciar o assento de óbito por via judicial, o que causa aos familiares transtornos de ordem legal, econômica, social e emocional, tais como: impossibilidade do ato

inumatório, gerando ansiedade e sofrimento moral, problemas com a sucessão, origens de pendências financeiras, etc.

Matte (2007) relatou que a imagem institucional da Polícia Técnico-Científica, da Polícia Judiciária e até do Judiciário ficam prejudicadas, pois a própria persecução penal requer a individualização da vítima de homicídio, sem a qual não prospera o inquérito ou o processo criminal, resultando na sensação de morosidade nos processos de apuração e/ou julgamentos.

O autor ainda descreveu que o exame de DNA, cuja metodologia somente foi implementada a partir de 02 de junho de 1999, com a Resolução nº 194 da Secretaria de Estado da Segurança Pública, vem trazendo muitas vantagens. Pois a tecnologia atual permite que se realize a genotipagem de DNA a partir de quantidades muito pequenas de amostras biológicas, com consideráveis ganhos de tempo e de exatidão.

Também citou que esse exame constitui-se no único e essencial instrumento para o esclarecimento de um inquérito policial, pois qualquer material deixado no local da investigação, de onde os peritos consigam extrair DNA, pode ser a principal prova contra o autor do delito, bem como na identificação legal vítima.

Koch *et al*. (2008) descreveram que em agosto de 2004 ocorreu um incêndio no supermercado Ycuá Bolaños em Assunção, no Paraguai.

No momento do incêndio estavam presentes cerca de mil pessoas entre funcionários e clientes. Destas, mais de 400 morreram. Estabeleceu um caos em meio à tragédia, onde centenas de pessoas buscavam informações a respeito das vítimas e reclamavam pelos corpos de seus familiares.

Relataram ainda que o Ministério Público do Paraguai montou um esquema de organização envolvendo representantes de inúmeras entidades, possibilitando que a entrega dos corpos fosse agilizada. Num primeiro momento, os familiares fizeram o reconhecimento visual das vítimas e também através da

identificação de objetos pessoais, seguindo para identificação humana pelo método de DNA.

Referenciaram a notória aplicação e utilização das técnicas do exame de DNA, pois apresenta esta molécula um altíssimo poder discriminatório, revelando uma das mais poderosas ferramentas para a identificação humana e investigações criminais.

De acordo com o relato dos autores, dois dias após o desastre, chegou ao local um grupo pericial formado por um consórcio internacional de colaboração, onde estavam presentes peritos médicolegistas e odonto-legistas do Rio Grande do Sul, peritos médico-legistas de Brasília, peritos e papiloscopistas da Polícia Federal, peritos da Espanha e papiloscopistas do Chile. Este grupo ficou responsável pela identificação dos 86 corpos que não haviam sido reconhecidos pelos familiares.

Descreveram que os corpos foram armazenados em dois caminhões frigoríficos e transportados a um ginásio onde foram separados de acordo com o sexo, idade e possibilidade de reconhecimento. Ao mesmo tempo em que era realizada a identificação por meio dos métodos antropométricos, arcada dentária, radiografias e lesões cirúrgicas, os papiloscopistas realizavam a coleta e comparação de impressão digital. Mais da metade dos corpos foi identificado durante este processo. O restante apresentava um grau tão avançado de carbonização que somente seria possível identificar com o uso da análise de DNA.

2.1- O DNA NOS DIAS ATUAIS

Segundo Jobim (2003) no ano de 1978, Alec Jeffreys, pela primeira vez, usou a genômica, ciência ainda emergente na época, para pesquisar as alterações no DNA humano e descobriu abundantes variações em determinadas regiões do DNA. A origem das variações na seqüência do genoma humano

começou então a ser revelada. Hoje sabemos que estas alterações podem chegar a aproximadamente 10 milhões.

Ainda este autor citou que Jeffreys em 1984 conseguiu demonstrar que uma análise de perfis genéticos de DNA poderia identificar uma pessoa, com grau de certeza quase absoluto.

Veríssimo *et al*. (2004) consideram que o desenvolvimento da biologia molecular e da genética nas últimas décadas permitiu o estabelecimento de um amplo conjunto de técnicas aplicadas à investigação biológica. Dentre esses grandes avanços tecnológicos destaca-se a possibilidade de amplificação de DNA utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Pena (2005) descreveu que a tecnologia moderna invadiu tão rapidamente nossa vida que até esquecemos quando foi criada. Há mais de vinte anos Alec Jeffreys, professor da Royal Society Wolfson na Universidade de Leicester, Inglaterra, enfatizou a importância do DNA como referência para a identificação de indivíduos (DNA fingerprinting).

Remualdo (2005) citou que a identificação pelo DNA e a possibilidade da caracterização de perfis genéticos a partir da análise de materiais biológicos apostos nos mais variados tipos de suporte afetou a vida de milhares de pessoas no planeta e tem sido utilizada rotineiramente na Medicina Legal para estabelecer relação entre suspeitos e vítimas, entre vítimas e vestígios, entre suspeitos e vestígios; caracterizar relação de parentesco; identificar vítima em desastres e catástrofes e principalmente para possibilitar a identificação de corpos em decomposição, de restos corporais e de ossadas que dão entrada nos Serviços Médico-Legais.

2.2 - ANÁLISE DE DNA EM OSSO HUMANO: ESTUDO QUALITATIVO

De acordo com a pesquisadora Arruda, (2000), no Museu do Homem do Sambaqui, em Santa Catarina, algumas ossadas indígenas com milhares de anos, encontradas em meio a restos de fogueiras, conchas e animais, podem esconder segredos gravados em seu DNA.

Porém, esta autora, descreveu em seu estudo que o estado de conservação dos esqueletos torna-se bastante afetado pelo ambiente, o que dificulta muito mais o trabalhar de extração, amplificação e análise do DNA.

Tal fato foi o que levou a pesquisadora a fazer seu mestrado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP.

Na pesquisa, ela descobriu que o método com melhores resultados para a análise das ossadas catarinenses é o de extração orgânica, que faz uso de alguns solventes orgânicos específicos, como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico para isolar e purificar o ácido nucléico.

A autora conseguiu extrair e amplificar algumas amostras por PCR, ou seja, método in vitro capaz de sintetizar milhões de cópias idênticas de DNA a partir de uma seqüência de DNA conhecida.

Relatou ainda, "Alguém que se depare com as mesmas condições que eu, e que queira extrair DNA de ossos antigos vai saber que o melhor método para obtenção de produtos de PCR mais visíveis para essa situação foi o método orgânico".

Também citou que foram testados nove métodos diferentes de extração de DNA em peças de 190 esqueletos, preferencialmente o fêmur, por este possuir bastante substância esponjosa e compacta, da qual o material analisado foi retirado.

Segundo esta autora, a principal dificuldade de se fazer o estudo nessas ossadas é a degradação sofrida pela molécula de DNA causada pelo ambiente litorâneo e pela presença de substâncias contaminantes.

Descreveu ainda que os sambaquis - aglomerado formados por restos de alimentos de origem animal, fogueiras, esqueletos humanos, artefatos, moluscos e cerâmicas, deixados por povos primitivos que utilizavam as praias para se alimentar, dormir e até mesmo enterrar seus mortos - ficaram expostos à maré, e a água prejudicou profundamente a estrutura da molécula de DNA, causando modificações químicas irreversíveis.

Também constatou, além dos danos hidrolíticos, os ossos sofreram também com a presença de substâncias contaminantes no solo, como o ácido húmico, capaz de inibir a ação da enzima TaqDNA polimerase, responsável por catalizar o processo da amplificação por PCR .

Ressaltou ainda, ao extrair o DNA de qualquer tipo de tecido, o importante é avaliar todas as características do ambiente onde se encontra o material a ser pesquisado.

Citou que: "No meu caso o ambiente foi fatídico, já que ele pode favorecer a preservação da molécula de DNA ou degradá-la por completo".

2.3 - PROCESSO DE CREMAÇÃO: TEMPERATURA X TEMPO

De acordo com as normas da Lei nº 6.015, o processo de cremação inicia-se à temperatura de 400ºC e finaliza-se a 1 200ºC. Os gases da combustão, antes de serem expelidos pela chaminé, são submetidos à temperatura superior a 1200ºC, sendo permanentemente controladas e medidas as suas características. O forno pode trabalhar a uma cadência de uma cremação cada 75 minutos. Após a cremação, as cinzas são reduzidas a pó por centrifugação e introduzidas numa pequena urna própria. As cinzas resultantes da cremação apresentam uma cor clara, têm peso aproximado de 2 Kg e volume de cerca de 2 litros.

2.4 - LIMITAÇÕES QUANTO AO USO DO DNA

Bonaccorso (2004) descreveu a situação quando gêmeos idênticos são suspeitos de crime em que o autor deixou vestígios, o DNA em nada poderia colaborar para a elucidação do delito, uma vez que não consegue distingui-los por serem geneticamente idênticos.

Segundo esta autora, neste caso a datiloscopia convencional seria útil, se dentre os vestígios deixados, existissem impressões digitais.

Ainda referenciou as condições de preservação do material biológico de um cadáver carbonizado ou que tenha ficado por muito tempo submerso no mar, muitas vezes não permitem, através da análise do DNA, que se alcancem dados com significância estatística para que se possa afirmar sua identidade, ao passo que neste sentido seria mais significativo o exame de sua arcada dentária.

Também citou outro ponto importante a ser abordado sobre as limitações do DNA, principalmente na área criminal, o que diz respeito a peculiaridades da análise.

Descreveu que muitas vezes, qualquer vestígio de roupas coloridas, que possa ser encontrado nas evidências biológicas, acaba inibindo a reação de PCR.

No entanto, esta autora, conclui que apesar de certas limitações da análise de DNA, deve-se acima de tudo enfatizar sua importância como prova extremamente poderosa, se realizada segundo as recomendações técnicas exigidas.

2.5 - ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

Atualmente as perícias previstas do Odonto-legista, estão disciplinadas no que dispõem as seguintes leis:

Lei 5081/66

ART.6 - Compete ao cirurgião-dentista:

> *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 odontolegal em foro civil, criminal, trabalhista e em sede administrativa;*
>
> *IX - utilizar, no exercício da função de perito-odontólogo, em casos de necropsia,*

Resolução 63/2005 – CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA

Cap. II – Atividades privativas do Cirurgião-Dentista

Art 4.I- Praticar todos os atos pertinentes privativas à Odontologia decorrentes de conhecimentos adquiridos em curso regular ou em cursos de pós-graduação;

Art 4. IV – Proceder à perícia odontolegal em foro civil, criminal, trabalhista e em sede administrativa;

Art 4. IX – Utilizar, no exercício da função de perito-odontológico, em casos de necropsia;

SEÇÃO VIII - Odontologia Legal

Art..63. Odontologia Legal é a especialidade que tem como objetivo a pesquisa de fenômenos psíquicos, físicos, químicos e biológicos que podem atingir ou ter atingido o homem, vivo, morto ou ossada, e mesmo fragmentos ou vestígios, resultando lesões parciais ou totais reversíveis ou irreversíveis.

Parágrafo único. A atuação da Odontologia Legal restringe-se à análise, perícia e avaliação de eventos relacionados com a área de competência do cirurgião-dentista, podendo, se as circunstâncias o exigirem, estender-se a outras áreas, se disso depender a busca da verdade, no estrito interesse da justiça e da administração.

Art..64. 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 infortunística;

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; e,

o) exames por imagens para fins odonto-legais.

Resolução CFO – 20/2001

Art. 1 - Esta Resolução estatui as normas que definem a função e regulamenta as atividades dos peritos/auditores, concernentes à ética profissional odontológica.

Art. 2 – Considera-se perito o profissional que auxilia a decisão judicial e administrativa, por solicitação da autoridade judiciária ou por designação do conselho, fornecendo laudo-técnico detalhado, realizado através de perícia, com a verificação de exames clínicos, radiográficos, digitalizados, fotografias, modelos de arcos dentais, exames complementares e outros que auxiliarão na descrição de laudos-técnico, com absoluta imparcialidade, indicando sempre a fonte de informação que o amparou.

Art. 3 – São atribuições específicas do perito, devidamente nomeado, executar o laudo-técnico com absoluta isenção e imparcialidade, responder os quesitos formulados de forma objetiva, abster-se de emitir opiniões pessoais, reportar-se sempre a fundamentos científicos e citando a sua fonte.

Resolução CFO – 42/2003

Cap. III – Dos deveres fundamentais

Art. 4 IV – Manter atualizados os conhecimentos profissionais, técnico-científicos e culturais, necessários ao pleno desempenho do exercício profissional;

Art 4 XII – Assumir responsabilidade pelos atos praticados;

IV – Das auditorias e perícias odontológicas

Art. 6 - Constitui infração ética: I- deixar de atuar com absoluta isenção quando designado para servir como perito ou auditor, assim como ultrapassar os limites de suas atribuições e de sua competência;

XV – Da pesquisa científica

Art. 39 – Constitui infração ética: IV – infringir a legislação que regula a utilização do cadáver para estudo;

Código Penal Brasileiro

Art. 342 - Falsa perícia é crime previsto no Código Penal Brasileiro, com pena de reclusão de 1 a 3 anos e aplicação de multa.

2.5.1 - DE ACORDO COM A LITERATURA

Abreu (1922) descreveu que a Odontologia Legal não foge dos vastos domínios da Medicina Legal. A Odontologia Legal oferece campo largo às aplicações médico-legais, dentre as quais sobreleva pela sua importância e pela sua maior freqüência, ao que concerne ao problema de identificação, sendo esse o assunto de maior interesse e de aplicação mais rigorosa dentro dos limites traçados a Odontologia.

Na sua obra “Medicina Legal Aplicada à Arte Dentária”, afirma que é preciso, indispensável que o perito tenha educação especializada, que lhe dá, nesse particular, vantagem incomparável sobre o mais abalizado clínico.

Leite (1962) considerou que a Odontologia Legal tem como objetivo principal servir a Justiça. Consta principalmente de conhecimentos odontológicos e jurídicos.

Para Basauri, citado por Fernández (1967),

> "É necessária uma profunda e vasta campanha de divulgação entre os meios estudantis e profissionais, para levá-los ao convencimento de que a aplicação desta ciência depende da preparação de CD´s especializados, que desenvolverão suas atividades de caráter indispensável, em toda sociedade perfeitamente constituída".

Para Keiser-Nielsen (1968) apontou que é necessário promover a Odontologia Legal como um assunto de estudo para a graduação e a pós-graduação nas universidades, para encorajar os Cirurgiões-dentistas a se tornarem treinados como peritos neste campo e cooperarem desta forma com a Justiça.

Cameron & Sims (1974) descreveram que a Odontologia Legal pode ser grosseiramente dividida em três campos maiores de atividade, denominados: civil, criminal e pesquisa. A área civil compreende a imperícia, negligência, identificação de restos humanos, onde a morte não seja devida à avaliação suspeita, identificação de pessoas vivas em desastres maiores ou em massa. Na área criminal, destacam-se as identificações de pessoas a partir de seus dentes e marcas de mordida. A pesquisa aborda o treinamento acadêmico e a pós-graduação.

Daruge *et al*. (1975) destacaram que a Odontologia Legal pode ser considerada em duas partes distintas: na primeira parte, o conjunto de normas que regulam a conduta do CD no exercício da profissão, abrangendo o estudo de toda a legislação odontológica, da deontologia ou ética, dos Conselhos Federais

ou Regionais e suas normas complementares e da Previdência Social; a segunda parte compreende a aplicação dos conhecimentos odontológicos ao Direito.

Estes autores descreveram que o seu conteúdo abrange os estudos sobre todas as perícias odontológicas, isto é, identificação, infortunística, enfim, todo conhecimento adquirido no campo odontológico ou fora dele que possa ser aplicado no esclarecimento das questões judiciais. A odontologia Legal tem como conteúdo, conhecimentos odontológicos e conhecimentos jurídicos.

Destacaram também as inúmeras denominações atribuídas a esta disciplina e na tentativa de expressar um significado com mais objetividade, surgiram as denominações: “Odontologia Forense”, “Odontologia Pericial”, “Odontologia Judiciária”, “Odontologia Política”, “Odontologia Aplicada á Medicina Legal”, “Jurisprudência Odontológica”.

Ressaltaram ainda, que a maioria dos autores brasileiros e sul-americanos dão preferência à denominação Odontologia Legal por ter ela um significado mais amplo, abrangendo assim os conhecimentos sobre deontologia e de todos os problemas legais da Odontologia.

De acordo com Bang (1982) a Odontologia Legal inclui: exames de indivíduos vivos, requeridos para estabelecer a identificação individual no evento de fraude; estimativa da idade; determinação do sexo; comparações de marcas de mordidas em caso de abuso infantil ou de outras ações criminais. Exames em indivíduos mortos: fornecem identificação individual de corpos carbonizados; de indivíduos afogados em decomposição; vítimas de desastres em massa e restos de corpos misturados.

Basauri *et al*. (1990) apontaram que a Odontologia Legal inclui, mas não se limita à identificação de restos humanos, análise de marcas de mordida, abuso infantil, lesões corporais, imperícias, negligencia, além disso a disciplina está relacionada à pesquisa em muitas das suas áreas de competência.

Descreveram ainda que a odontologia Legal não se limita a uma área específica da ciência odontológica, mais especificamente, ela tem como finalidade sintetizar os princípios, conhecimentos, e áreas de atuação da Odontologia (Histologia, Patologia Oral, Materiais Dentários, Jurisprudência Odontológica, Anatomia Dental, Morfologia, a guarda do prontuário odontológico e a Radiologia Oral), com os princípios, conhecimentos e áreas de atuação não encontradas dentro do currículo odontológico usual (Criminalística, Fotografia, Jurisprudência Forense, Radiologia, Antropologia, entre outras).

Segundo Lima (1992) o campo de atuação da Odontologia Legal é tão vasto, quando aos casos e problemas por ela apresentados. Está área é desafiadora e intrigante. Considera que requer dedicação, uma experiência inicial em Odontologia, imaginação temperada com senso comum e vontade de aprender, freqüentemente, por esforço próprio. Contudo, o Odonto-legista vai crescendo em satisfação e inteligência, conforme entra em contato com outros peritos, juristas e profissionais de outras áreas.

SERPA (1994/1995) esclareceu que:

> "Ficam nítidas duas vertentes de atuação na Odontologia Legal: na área pericial e na área deontológica. Ressaltou que a Odontologia Legal é um mundo fascinante, porque o especialista é preparado para desvendar mistérios, fazer descobertas difíceis, assumindo um papel e investigação científica realmente estimulante, oferecendo à Justiça uma contribuição significativa e contundente no esclarecimento de crimes. Esta abertura patrocinada pela Filosofia e pelas noções de Direito favorecem a busca do mais correto e do mais justo".

Galvão (1996) descreveu que atualmente a Odontologia Legal ou Forense desempenha papel importantíssimo nas perícias forenses. Podendo,

hoje, até afirmar que o Instituto Médico-Legal que não dispõe do Serviço ou Seção Odonto-Legal é, de certa forma, um IML capenga, claudicante.

De acordo com Silva (1997) definiu a Odontologia legal sendo a aplicação dos conhecimentos de ciência odontológica a serviço da Justiça.

Grant (1998) apontou a Odontologia Legal como a especialidade que, em termos concretos, auxilia (como ramo da Medicina Legal) na identificação de cadáveres e as possíveis causas da morte. Ressalta, ainda, que a Odontologia Legal é o código estabelecido pelas autoridades de cada pais para o desenvolvimento de prática odontológica.

Gonçalves *et al.* (1999) esclareceram que, embora todo Cirurgião-dentista possui os conhecimentos e habilidade fundamentais em Odontologia Legal, os especialistas nesta área requerem conhecimentos e habilidades específicas e, para funcionar efetivamente, estes devem estar familiarizados com os conceitos sobre Antropologia, Fotografia, Radiologia, Sorologia, Patologia, Análise de marca de mordida, Jurisprudência e outras técnicas forenses, como por exemplo o exame de DNA. Consideram o campo de atuação da Odontologia Legal muito amplo, abrangendo os problemas relacionados à justiça.

Conforme Vanrell (2002) a Odontologia Legal tem três áreas precípuas de atuação, a saber: a) exame diagnóstico e terapêutico, bem como a avaliação dos danos de maxila, mandíbula, dentes e tecidos moles da boca; b) a identificação de indivíduos achados em investigações criminais e/ou em desastres em massa; c) a identificação, exame e avaliação de mordeduras que aparecem, com freqüência, em agressões sexuais, maus-tratos infantis e em situações de defesa pessoal. Considerou a Odontologia Legal como a disciplina que oferece à Justiça os conhecimentos da Odontologia e suas diversas especialidades.

Para Fixott (2003) a Odontologia Legal foi descrita sendo a ciência que correlaciona princípios odontológicos e jurídicos sob a inspiração de esclarecer dados de interesse da Justiça. Está normalmente associada aos casos de identificação humana e aos processos de responsabilidade profissional, mas a

sua área não se restringe a essas atribuições, de uma forma em geral ela ainda colabora com o esclarecimento da cidadania, pois contribui com o esclarecimento da verdade para a população.

2.5.2 - ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS DO ESTABELECIMENTO LABORATÓRIAL

Os exames de DNA são realizados em laboratórios públicos ou privados, estando previstos das seguintes leis:

ANVISA

De acordo com a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os procedimentos técnicos em laboratórios analíticos deveram seguir as devidas normas: todas as etapas da cadeia de custódia das amostras biológicas devem ser documentadas de modo apropriado, a fim de evitar contaminações e a adequação das condições de trabalho à ISO/IEC 17.025. Em adição, Os procedimentos para estabelecer padrões de qualidade, como a calibração de equipamentos e a presença de um segundo analista devem ser implementados no país para que as análises se equivalham em termos de segurança e credibilidade àquelas realizadas em laboratórios de referência no exterior. Em adição, por fazerem uso de técnicas de engenharia genética, as tipagens genéticas devem obedecer às normas estabelecidas na Lei de Biossegurança N° 8.974/95, que seguem abaixo.

Código de Processo Penal

A confiabilidade e a segurança dos testes de identificação por DNA, quando da utilização da Engenharia Genética, podem ser equacionados pela Lei de Biossegurança (N° 8.974/95):

"Art. 1º - Esta lei estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização no uso das técnicas de engenharia genética na construção, cultivo,

manipulação, circulação, comercialização, consumo, liberação e descarte de Organismo Geneticamente Modificado (OGM), visando proteger a vida e a saúde do Homem, dos animais e das plantas, bem como o meio ambiente."

O decreto de regulamentação (N° 1.752/95), normatiza as atividades da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio:

"Regulamenta a Lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995, dispõe sobre a vinculação, competência e composição da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, e dá outras providências."

Aspecto relevante desta legislação é que a mesma protege a saúde dos Homens, animais, vegetais e do meio ambiente sem hierarquizar a proteção. Em suma, a Lei de Biossegurança regulamenta todos os procedimentos laboratoriais que envolvam qualquer tipo de DNA, seja humano, animal, vegetal, transgênico e até mesmo quimeroplástico.

Qualquer instituição domiciliada no País e que utilize técnicas de Engenharia Genética deve possuir o Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB por força da lei N° 8.974/95:

"Art. 2º § 3º - As organizações públicas e privadas, nacionais, estrangeiras ou internacionais, financiadoras ou patrocinadoras de atividades ou de projetos referidos neste artigo, deverão certificar-se da idoneidade técnico-científica e da plena adesão dos entes financiados, patrocinados, conveniados ou contratados às normas e mecanismos de salvaguarda previstos nesta Lei, para o que deverão exigir a apresentação do Certificado de Qualidade em Biossegurança de que trata o art.6º, inciso XIX, sob pena de se tornarem co-responsáveis pelos eventuais efeitos advindos de seu descumprimento."

O decreto de regulamentação N° 1.752/95 também dá competência à CTNBio para estabelecer o Código de Ética de Manipulação Genética:

"Art. 2º Compete à CTNBio:

IV - propor o Código de Ética de Manipulações Genéticas;"

Não bastasse o referido decreto, a sociedade ainda dispõe da Resolução N° 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, ligado ao Ministério da Saúde, que estabelece os procedimentos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos, e o faz de maneira participativa, pois prevê a criação de Comissões de Ética em Pesquisa, com participação de leigos e de membros não pertencentes à instituição proponente da pesquisa.

"VII - Comitê de Ética em Pesquisa – CEP"

Toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004

III - Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde

O gerenciamento dos RSS (resíduos de serviços de saúde) constitui-se em um conjunto de procedimentos de gestão, planejados e implementados a partir de bases científicas e técnicas, normativas e legais, com o objetivo de minimizar a produção de resíduos e proporcionar aos resíduos gerados, um encaminhamento seguro, de forma eficiente, visando à proteção dos trabalhadores, a preservação da saúde pública, dos recursos naturais e do meio ambiente.

O programa a ser elaborado deve ser compatível com as normas locais relativas à coleta, transporte e disposição final dos resíduos gerados nos serviços de saúde, estabelecidas pelos órgãos locais responsáveis por estas etapas.

1 - MANEJO: O manejo dos RSS é entendido como a ação de gerenciar os resíduos em seus aspectos intra e extra estabelecimento, desde a geração até a disposição final, incluindo as seguintes etapas:

1.1 - SEGREGAÇÃO - Consiste na separação dos resíduos no momento e local de sua geração, de acordo com as características físicas, químicas, biológicas, o seu estado físico e os riscos envolvidos.

1.2 - ACONDICIONAMENTO - Consiste no ato de embalar os resíduos segregados, em sacos ou recipientes que evitem vazamentos e resistam às ações de punctura e ruptura.

VI - 5.4.6 - As sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos, podem ser descartadas diretamente no sistema de coleta de esgotos, desde que atendam respectivamente as diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes.

A ANVISA classificou em grupo de risco, para exames de DNA segue a seguinte nomenclatura:

GRUPO A1 - Culturas e estoques de microrganismos; resíduos de fabricação de produtos biológicos, exceto os hemoderivados; descarte de vacinas de microrganismos vivos ou atenuados; meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; resíduos de laboratórios de manipulação genética.

Define que:

VII - 19 - Todos os profissionais que trabalham no serviço, mesmo os que atuam temporariamente ou não estejam diretamente envolvidos nas atividades de gerenciamento de resíduos, devem conhecer o sistema adotado para o gerenciamento de RSS, a prática de segregação de resíduos, reconhecer os símbolos, expressões, padrões de cores adotados, conhecer a localização dos abrigos de resíduos, entre outros fatores indispensáveis à completa integração ao PGRSS

Do Exame de Corpo de Delito e das Perícias em Geral do Código de Processo Penal

II, Art. 166 - Havendo dúvida sobre a identidade do cadáver exumado, proceder-se-á ao reconhecimento pelo Instituto de Identificação.

Art. 170 - Nas perícias de laboratório, os peritos guardarão material suficiente para a eventualidade de nova perícia. Sempre que conveniente, os laudos serão ilustrados com provas fotográficas, ou microfotográficas, desenhos ou esquemas.

Art. 173 - No caso de incêndio, os peritos verificarão a causa e o lugar em que houver começado, o perigo que dele tiver resultado para a vida ou para o patrimônio alheio, a extensão do dano e o seu valor e as demais circunstâncias que interessarem à elucidação do fato.

3- PROPOSIÇÃO

Após estudar a grande importância da utilização do exame de DNA como método investigativo, este trabalho teve como objetivos:

a) Analisar o comportamento de material genético humano (DNA Nuclear) obtido de amostra biológica (tecido ósseo) submetido à exposição às temperaturas de 100 (cem), 200 (duzentos), 300 (trezentos), 400 (quatrocentos), 500 (quinhentos) e 600 (seiscentos) graus Celsius por intervalos de tempo de 10 (dez), 20 (vinte) e 30 (trinta) minutos, comparando os dados obtidos com amostras de tecido ósseo *in natura*. Desse modo, pretendeu-se analisar a temperatura máxima que um corpo humano pode suportar por um determinado período de tempo, sendo possível a extração e amplificação do DNA;

b) Comparar as vantagens e desvantagens de métodos investigativos com o exame de DNA Nuclear em ossos de corpos carbonizados, presentes na revisão da literatura;

c) Discutir os aspectos éticos e legais pertinentes ao tema.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para assegurar a qualidade, integridade e segurança nos exames envolvendo a utilização de DNA, o Laboratório de DNA Criminal do E.S estabeleceu um padrão de procedimentos de coletas e das análises, através de um manual, que será descrito logo abaixo. As etapas envolvem várias fases que podem ser assim enumeradas:

a. Coleta dos materiais;

b. Extração do DNA;

c. Quantificação do DNA;

d. Amplificação do DNA;

e. Análise comparativa do DNA das amostras;

f. Cálculos Estatísticos;

g. Elaboração do Relatório das análises realizadas.

A- Coleta dos materiais

PROTOCOLO DE SELEÇÃO E REMOÇÃO DO MATERIAL ÓSSEO

1-) Foram incluídos na pesquisa os cadáveres não identificados e que estiveram selecionados para serem sepultados pelo Departamento, em cumprimento à rotina administrativa que estabelece que, decorridos 30 (trinta) dias após a data de entrada, compete ao Estado o sepultamento dos corpos, após tomadas as medidas preventivas legais, ou seja, elaboração do laudo de exame cadavérico pós necrópsia, fotografias, coleta de impressões digitais quando possível, registro de dados antropológicos e coleta de amostra biológica (sangue

ou tecidos) para futuro exame de perfil genético de DNA, se necessário (ANEXO 01, 02 e 03);

2-) O grupo de estudo foi constituído de 50 (cinqüenta) corpos não identificados que derem entrada no Departamento Médico Legal de Vitória – ES, no período de agosto a setembro de 2008;

3-) A coleta foi realizada independentemente de sexo, biótipo, característica racial, estatura e cor da pele;

4-) O processo de coleta somente foi iniciado após a autorização e cumprimento de todos os requerimentos necessários para o andamento deste projeto, o mesmo foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da EMESCAM (Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória) (ANEXO 04). Ou seja, nos meses de outubro e novembro de 2008;

5-) O manuseio do material foi feito por pessoal habilitado e treinado para a função.;

6-) O DNA obtido de cada cadáver da pesquisa foi armazenado em refrigerador a - 8º C negativos no Laboratório criminal de DNA do Espírito Santo, preservado por 05 (cinco) anos e não será utilizado para outra finalidade sem nova autorização do CEP e das instituições envolvidas na pesquisa;

7-) Em todos os procedimentos foi dada atenção especial à geração de resíduos e este projeto obedeceu às normas da ANVISA e teve como meta a minimização da geração de resíduos;

8-) Após a liberação dos cadáveres pelo Departamento Médico Legal de Vitória, iniciamos o processo de remoção das amostras de tecido ósseo, considerando os procedimentos normalmente adotados pelo Departamento por ocasião das necropsias, a saber, a abertura e a exposição do tórax mediante a retirada do plastrão condro-esternal, escolhemos como material biológico, o

fragmento de Arco Costal com a extensão aproximada de 4,0 (quatro) centímetros;

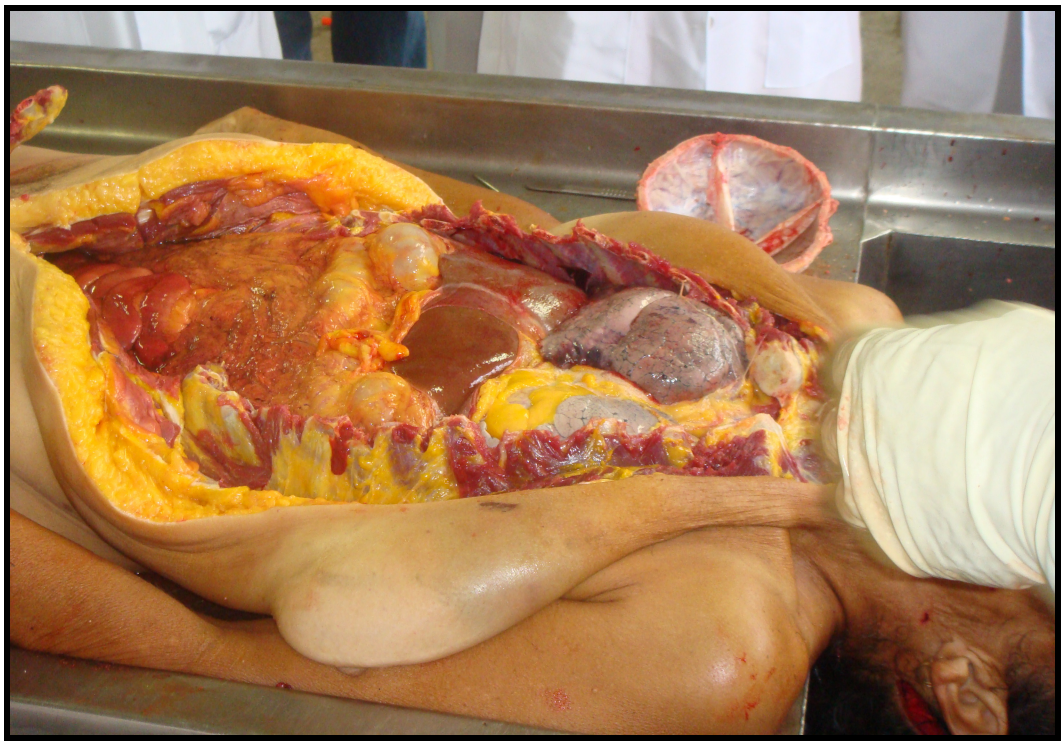

Fig 01. Parte da rotina de Necrópsia adotada pelo Departamento Médico Legal – Abertura toráxica.

9-) Cada amostra de tecido ósseo foi fracionada em 04 (quatro) fragmentos menores com 1,0 cm cada;

- Um fragmento foi processado *in natura* (esta amostra compôs o grupo-controle).

Os demais fragmentos, em número de três foram submetidos isoladamente a temperaturas distintas de 100℃, 200℃ e 300℃ em estufa industrial da marca Pallemax, modelo E-182, com sistema de convecção natural do ar, sistema de aquecimento localizado em seus pavimentos. Esta estufa possui um controlador de temperatura extremamente apurado.

O primeiro estudo foi constituído de 50 (cinqüenta) amostra controle e 36 (trinta e seis) fragmentos de ossos. Desses fragmentos foram submetidos 108

amostras à temperaturas de 100ºC, 108 amostras submetidas à temperaturas de 200ºC e 108 amostras submetidas à temperaturas de 300ºC.

No segundo estudo foram analisadas mais seis amostras, sendo duas amostras submetidas à temperaturas de 400ºC, duas amostras submetidas à temperaturas de 500ºC e mais duas amostras submetidas à temperaturas de 600ºC e com período de tempo de 10, 20 e 30 minutos.

O projeto previa a exposição das amostras a temperaturas e tempos variáveis, que se entendeu necessário. Destaca-se que houve uma pequena alteração nas amostras com exposição de temperatura de 100℃, 200℃ e 300℃ nos tempos de 10, 20 e 30 minutos. Não encontrando alterações de coloração, textura e consistência. Ao corte simulado com lâmina de bisturi e serra manual não observou alteração de resistência quanto à exposição aos tempos de 10 e 20 minutos.

Portanto, inclui-se na pesquisa um segundo grupo de seis amostras nas temperaturas de 400℃, 500℃ e 600℃, com a finalidade de estabelecer em qual temperatura e tempo de exposição ao calor provocaria a degradação do material genético humano (DNA Nuclear). Para tal experimento usamos a estufa da marca Jung, modelo TC 162045, com sistema de programador N1100, apresentando vários ciclos de aquecimento (controle de tempo e temperatura), com distribuidor uniforme de calor e geração de relatório ou gráficos por software, utilizando uma faixa de trabalho de até 650 ºC.

É importante salientar também que o calor gerado pela estufa, é um calor transmitido ao tecido ósseo por meio de convecção (transmissão de calor por efeito de camadas aquecidas, sem passagem de energia de um corpo para outro, mas por movimento de partículas, levando consigo a energia de uma posição para outra). Esta observação deverá ser feita, já que um dos objetivos do projeto seria avaliar a utilização da tecnologia do DNA em ossos expostos a altas temperaturas. Em geral, quando um corpo é exposto a altas temperaturas e posteriormente necessitamos submeter amostras biológicas dele decorrentes

visando uma identificação, a exposição é ao fogo direto (calor direto ou chama) através do meio de transmissão por condução.

10-) Para a coleta do fragmento do Arco Costal utilizamos material cirúrgico estéril, fornecido pelo Hospital Infantil de Vitória;

11-) Após a remoção das amostras, estas foram imediatamente submetidas a um processo de limpeza físico-químico, sem alteração do material genético;

12-) Todas as amostras coletadas foram acondicionadas em recipiente plástico esterilizados com a devida identificação e encaminhadas para armazenamento em câmara fria, à - 8°C, do Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil do ES, onde permaneceram até o processamento que compreendeu as etapas de extração, amplificação e leitura de fragmentos.

OBS: Na presente pesquisa não houve riscos previsíveis para os participantes, tendo em vista que se trata de exames em cadáveres não identificados. Além disso, não haverá publicação da imagem de qualquer dos cadáveres incluídos no estudo. Desse modo, não haverá qualquer tipo de procedimento que implique em risco, de qualquer natureza, aos participantes. Os critérios de segurança relativos a esta pesquisa estão em conformidade com as normas atuais contidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

PROTOCOLO DE COLETA E ANÁLISE DE DNA DO LABORATÓRIO CRIMINAL DO ESPÍRITO SANTO

1-) Um dos primeiros cuidados providenciados pelo Laboratório Criminal foi a genotipagem e seqüenciamento de DNA da equipe técnica e dos pesquisadores, com a finalidade de disponibilizar uma alíquota do seu próprio material genético, afim de confrontar com os resultados, descartando todas as possibilidades de contaminação e reprodução do seu próprio material genético;

2-) O Laboratório de DNA do Espírito Santo disponibiliza áreas de trabalho separadas, com a área para manejo de evidências e armazenamento de materiais. Contém na sua estrutura física 13 salas: recepção, coleta de material, sala informatizada para estudos, sala contendo uma câmara fria, sala para coleta de vestígios, sala para extração de DNA, sala de preparo de soluções, depósito de vidraria, sala de PCR, sala de destilação e deionização, sala de amostra processada, sala de amplificação, sala de câmera escura, e sala de seqüenciamento. Desta forma, o laboratório de DNA Criminal foi desenhado respeitando as normas de segurança e minimizando os riscos de contaminação;

3-) O acesso e uso das áreas de análises foram controladas de modo apropriado aos fins a que foram destinados;

4-) O Laboratório manteve um sistema documentado de controle das amostras para que fossem asseguradas a sua integridade, conforme recomenda a Rede Nacional de Genética Forense (resolução 194);

5-) Para os exames das amostras os marcadores moleculares utilizados seguiram os trezes marcadores definidos pelo CODIS e a amelogenina;

6-) Estes marcadores foram disponibilizados em Kits comerciais multiplex para identificação humana, tendo como padrão a análise de 16 regiões. O Kit comercial multiplex utilizado foi o Identifiler, produzido pelo laboratório Applied Biosystems;

7-) Com relação aos remanescentes biológicos salientamos que a quantidade de material biológico a ser processada é mínima, sendo que, transcorridos os procedimentos de análise, a saber, extração, amplificação e leitura de fragmentos, todo o material coletado foi processado;

8-) Deve-se destacar que as amostras biológicas coletadas foram utilizadas obedecendo-se integralmente os objetivos definidos nesta pesquisa, e não foram amplificadas áreas ou regiões codificantes de proteínas ou que permitam, de alguma forma, a predição sobre serem os doadores portadores de

material genômico relacionado a qualquer tipo de doença;

9-) Para compor o segundo grupo-controle (grupo de segurança) foi utilizado o fragmento de 1 cm dos 50 (cinqüenta) cadáveres em estudo, este fragmento foi processado *in natura*. O protocolo para extração de DNA foi baseado no método descrito por Walsh (1991), esta técnica é empregada rotineiramente nos laboratórios para extração de DNA (Nuclear) utilizando a resina Chelex 100® (BioRad);

10-) A amplificação foi realizada para marcadores genéticos em sistema *multiloci*[1], através da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase). Posteriormente foi executada a leitura dos fragmentos amplificados em seqüenciador genético com eletroforese capilar;

11-) A degradação do DNA foi avaliada tomando-se por base o número de marcadores amplificados. Em um procedimento normal de análise espera-se amplificar 15 (quinze) marcadores, correspondentes a 15 (quinze) regiões cromossomiais, e mais 01 (um) marcador que determina a presença na amostra dos cromossomos X e Y (amelogenina), totalizando 16 regiões;

Os Locis estudados foram:

LOCI	**LOCI**	**LOCI**
D8S1179	HumTH01	HumvWA
D21S11	D13S317	HumTPOX
D7S820	D16S539	D18S51
CSF1PO	D2S1338	D5S818

[1] Kit comercial multiplex para identificação humana, 16 regiões, Identifiler, Applied Biosystems.

D3S1358	D19S433	FIBRA/FGA
AMELOGENINA		

12-) A degradação do material genético (DNA) foi avaliada comparando-se os resultados encontrados, o número de marcadores amplificados e a intensidade de fluorescência dos picos obtidos;

13-) Os alelos encontrados em todas as amostras (uma amostra controle, e seis amostras submetidas ao calor) foram validados de acordo com normas recomendadas pelos fabricantes dos reagentes utilizados.

5- RESULTADOS

Na primeira fase da pesquisa coletou-se 50 amostras controle (Tabela 1), verificou-se que os números de marcadores amplificados e extraídos foram em 100% (50) das amostras coletadas. Verifica-se que é extremamente possível proceder-se a identificação humana por meio da análise do exame de DNA em tecido ósseo, pois em todas as amostras processadas obtivemos marcadores amplificados.

Tabela 1: Relação dos resultados obtidos da análise das amostras de controle

Amostra-controle	Número de marcadores amplificados	Sucesso na amplificação e extração	Amostra-controle	Número de marcadores amplificados	Sucesso na amplificação e extração
1	++++++++++ A	POSITIVO	26	++++++++++ A	POSITIVO
2	++++++++++ A	POSITIVO	27	++++++++++ A	POSITIVO
3	++++++++++ A	POSITIVO	28	++++++++++ A	POSITIVO
4	++++++++++ A	POSITIVO	29	++++++++++ A	POSITIVO
5	++++++++++ A	POSITIVO	30	++++++++++ A	POSITIVO
6	++++++++++ A	POSITIVO	31	++++++++++ A	POSITIVO
7	++++++++++ A	POSITIVO	32	++++++++++ A	POSITIVO
8	++++++++++ A	POSITIVO	33	++++++++++ A	POSITIVO
9	++++++++++ A	POSITIVO	34	++++++++++ A	POSITIVO
10	++++++++++ A	POSITIVO	35	++++++++++ A	POSITIVO

11	++++++++++ A	POSITIVO	36	++++++++++ A	POSITIVO
12	++++++++++ A	POSITIVO	37	++++++++++ A	POSITIVO
13	++++++++++ A	POSITIVO	38	++++++++++ A	POSITIVO
14	++++++++++ A	POSITIVO	39	++++++++++ A	POSITIVO
15	++++++++++ A	POSITIVO	40	++++++++++ A	POSITIVO
16	++++++++++ A	POSITIVO	41	++++++++++ A	POSITIVO
17	++++++++++ A	POSITIVO	42	++++++++++ A	POSITIVO
18	++++++++++ A	POSITIVO	43	++++++++++ A	POSITIVO
19	++++++++++ A	POSITIVO	44	++++++++++ A	POSITIVO
20	++++++++++ A	POSITIVO	45	++++++++++ A	POSITIVO
21	++++++++++ A	POSITIVO	46	++++++++++ A	POSITIVO
22	++++++++++ A	POSITIVO	47	++++++++++ A	POSITIVO
23	++++++++++ A	POSITIVO	48	++++++++++ A	POSITIVO
24	++++++++++ A	POSITIVO	49	++++++++++ A	POSITIVO
25	++++++++++ A	POSITIVO	50	++++++++++ A	POSITIVO

\+ Resultado positivo (a cada sinal + demonstra o número de marcadores amplificados)

A Resultado positivo para amplificação do marcador AMELOGENINA (marcador que determina a presença na amostra dos cromossomos X e Y, no qual refere-se ao sexo do indivíduo)

RESULTADO DA AMOSTRA CONTROLE

O resultado da amplificação do marcador chamado AMELOGENINA, que determina a presença na amostra dos cromossomos X e Y, refere-se ao sexo do indivíduo. Verificou-se que em 100% (50) das amostras de controle analisadas obteve-se a presença deste marcador (Gráfico 1).

Quantidade do marcador da Amelogenina em 50 amostras

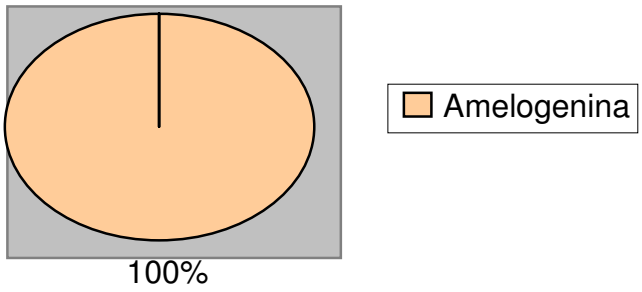

Gráfico 1: Quantidade do marcador amelogenina presentes nas amostras controle.

Com relação ao número de marcadores analisados (D8S1179, HumTH01, HumvWA, D21S11, D13S317, HumTPOX, D7S820, D16S539,

D18S51, CSF1PO, D2S1338, D5S818, D3S1358, D19S433 e FIBRA/FGA) em 50 amostras de controle encontrou-se a quantidade de 10 marcadores acima citado em 10% (5) das amostras, 11 marcadores em 52% (26) e 12 marcadores em 38% (19) (Gráfico 2).

Gráfico 2: Quantidade de marcadores encontrados em 50 amostras de controle

RESULTADO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO CALOR X TEMPERATURA

Com relação à degradação do DNA no tecido ósseo sob a ação das temperaturas de 100ºC, 200ºC e 300ºC, no período de 10 minutos, verificou-se que, em comparação com os resultados das amostras de controle, 100% (36) das amostras submetidas à temperatura de 100ºC e 200ºC obteve-se a extração e amplificação do DNA. Na temperatura de 300ºC verificou-se que, 91,6% (33) tiveram suas amostras amplificadas com uma quantidade menor de marcadores (Gráfico 3). Observa-se que a quantidade de marcadores não diminuiu significativamente na dependência da exposição a temperaturas mais elevadas.

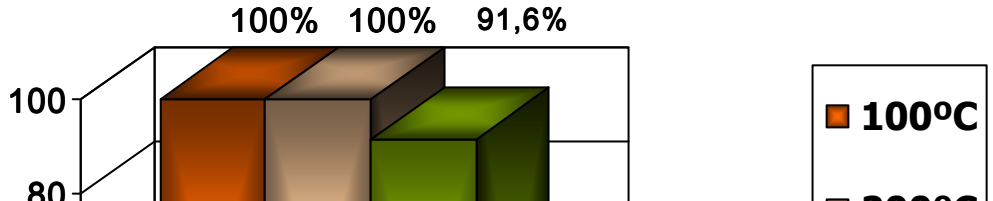

Gráfico 3 - Resultado obtido na primeira fase da pesquisa, foram analisadas 36 amostras nas temperaturas de 100ºC, 200ºC e 300ºC.

Com relação à degradação do DNA no tecido ósseo sob a ação das temperaturas de 100ºC, 200ºC e 300ºC, no período de 20 minutos, verificou-se que, 100% (36) das amostras submetidas ao calor de 100ºC e 200 ºC obteve-se a extração e amplificação do DNA. Ou seja, embora o tempo de exposição dobra-se de 10 minutos para 20 minutos encontramos resultados idênticos comparados com os encontrados nas amostras de controle. Portanto, descartando este período de tempo como fator modificante. Com a exposição de 300ºC amplificamos 88,8% (32) (Gráfico 4). Com o experimento, verifica-se que, o tempo de exposição ao calor na temperatura de 300ºC ainda demonstra ser um fator de pequena relevância, pois consegue-se amplificar uma quantidade muito expressiva.

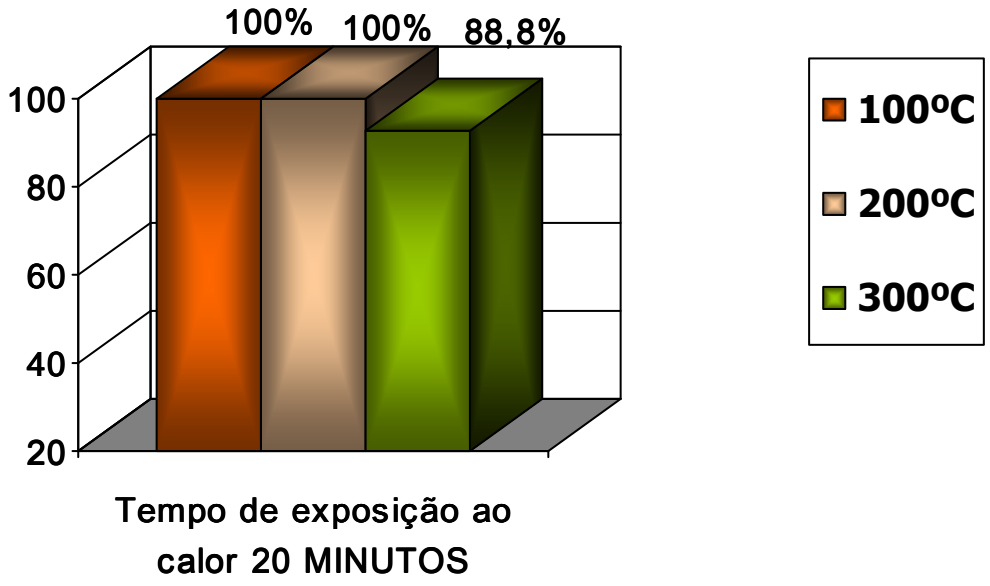

Gráfico 4 - Resultado obtido na primeira fase da pesquisa, foram analisadas 36 amostras nas temperaturas de 100ºC, 200ºC e 300ºC

Com relação à degradação do DNA no tecido ósseo sob a ação das temperaturas de 100ºC, 200ºC e 300ºC, no período de 30 minutos, verificou-se que, 100% (36) das amostras submetidas ao calor de 100ºC e 200 ºC obteve-se a extração e amplificação do DNA. Ou seja, embora o tempo de exposição mudasse de 10 para 30 minutos encontramos resultados idênticos, comparados com os encontrados nas amostras de controle. Desta forma, descartando-o totalmente um período de 30 minutos de exposição ao calor como um fator modificante para a

extração do DNA. Com a exposição de 300ºC amplificamos 86,1% (31) (Gráfico 5). Portanto, verifica-se que, o tempo de exposição ao calor na temperatura de 300ºC ainda demonstra ser um fator de pequena relevância. Resultado extremamente significativo, pois esclarece alguns mitos, como por exemplo, a mitologia que um material biológico exposto a temperaturas elevadas não serve para exame de DNA.

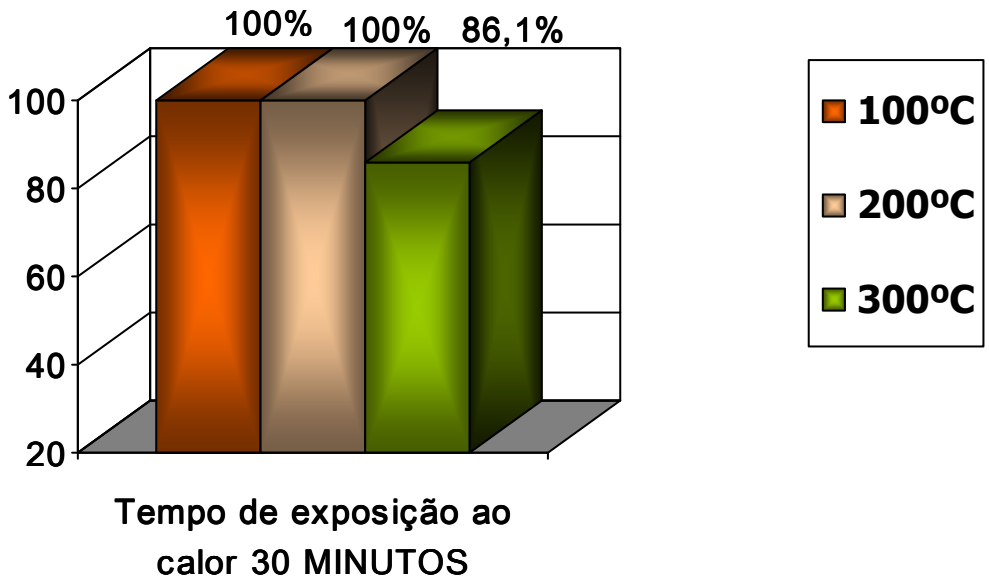

Gráfico 5 - Resultado obtido na primeira fase da pesquisa, foram analisadas 36 amostras nas temperaturas de 100ºC, 200ºC e 300ºC

RESULTADO DA QUANTIDADE DE NÚMERO DE MARCADORES AMPLIFICADOS X TEMPERATURA

Nesta fase da pesquisa processou 36 amostras na temperatura de 100ºC (Tabela 2). Verificou-se que os números de marcadores amplificados e extraídos foram em 100% (36) das amostras coletadas. Certifica-se que é extremamente possível proceder-se a identificação humana por meio da análise do exame de DNA em tecido ósseo sob a ação de 100ºC.

Tabela 2: Relação dos resultados obtidos da análise das amostras submetidas à temperatura de 100ºC.

Amostras exposta à 100ºC	Número de marcadores amplificados	Sucesso na amplificação e extração	Amostras exposta à 100ºC	Número de marcadores amplificados	Sucesso na amplificação e extração
1	+++++++++ A	POSITIVO	19	++++++++++ A	POSITIVO
2	++++++++++ A	POSITIVO	20	++++++++++ A	POSITIVO
3	+++++++++++A	POSITIVO	21	++++++++++ A	POSITIVO
4	++++++++++ A	POSITIVO	22	++++++++++ A	POSITIVO
5	++++++++++ A	POSITIVO	23	++++++++++ A	POSITIVO
6	++++++++++ A	POSITIVO	24	++++++++++ A	POSITIVO
7	++++++++++ A	POSITIVO	25	++++++++++ A	POSITIVO
8	++++++++++ A	POSITIVO	26	++++++++++ A	POSITIVO
9	++++++++++ A	POSITIVO	27	++++++++++ A	POSITIVO
10	++++++++++ A	POSITIVO	28	++++++++++ A	POSITIVO
11	++++++++++ A	POSITIVO	29	++++++++++ A	POSITIVO
12	++++++++++ A	POSITIVO	30	++++++++++ A	POSITIVO
13	++++++++++ A	POSITIVO	31	++++++++++ A	POSITIVO
14	++++++++++ A	POSITIVO	32	++++++++++ A	POSITIVO
15	++++++++++ A	POSITIVO	33	++++++++++ A	POSITIVO
16	++++++++++ A	POSITIVO	34	++++++++++ A	POSITIVO
17	++++++++++ A	POSITIVO	35	++++++++++ A	POSITIVO
18	++++++++++ A	POSITIVO	36	++++++++++ A	POSITIVO

\+ Resultado positivo (a cada sinal + demonstra o número de marcadores amplificados)

A Resultado positivo para amplificação do marcador AMELOGENINA (marcador que determina a presença na amostra dos cromossomos X e Y, no qual refere-se ao sexo do indivíduo)

Verificou-se 36 amostras na temperatura de 200ºC (Tabela 3), sendo que os números de marcadores amplificados e extraídos foram em 100% (36) das amostras coletadas. Nota-se que embora um osso submetido à temperatura de

200ºC, ainda é possível proceder-se um exame de DNA para identificação humana.

Tabela 3: Relação dos resultados obtidos da análise das amostras submetidas a temperatura de 200ºC.

Amostras exposta à 200ºC	Número de marcadores amplificados	Sucesso na amplificação e extração	Amostras exposta à 200ºC	Número de marcadores amplificados	Sucesso na amplificação e extração
1	+++++++++ A	POSITIVO	19	+++++++++ A	POSITIVO
2	++++++++++ A	POSITIVO	20	++++++++ A	POSITIVO
3	++++++++++A	POSITIVO	21	+++++++++ A	POSITIVO
4	++++++++++ A	POSITIVO	22	+++++++++ A	POSITIVO
5	+++++++++ A	POSITIVO	23	++++++++ A	POSITIVO
6	++++++++++ A	POSITIVO	24	+++++++++ A	POSITIVO
7	++++++++++ A	POSITIVO	25	+++++++++ A	POSITIVO
8	++++++++++ A	POSITIVO	26	++++++++ A	POSITIVO
9	++++++++++ A	POSITIVO	27	++++++++++ A	POSITIVO
10	+++++++++ A	POSITIVO	28	+++++++++ A	POSITIVO
11	+++++++++ A	POSITIVO	29	++++++++ A	POSITIVO
12	+++++++++ A	POSITIVO	30	+++++++++ A	POSITIVO
13	++++++++ A	POSITIVO	31	++++++++ A	POSITIVO
14	+++++++++ A	POSITIVO	32	++++++++++ A	POSITIVO
15	+++++++++ A	POSITIVO	33	+++++++++ A	POSITIVO
16	+++++++++ A	POSITIVO	34	+++++++++ A	POSITIVO
17	++++++++ A	POSITIVO	35	+++++++++ A	POSITIVO
18	++++++++ A	POSITIVO	36	+++++++++ A	POSITIVO

\+ Resultado positivo (a cada sinal + demonstra o número de marcadores amplificados)

A Resultado positivo para amplificação do marcador AMELOGENINA (marcador que determina a presença na amostra dos cromossomos X e Y, no qual refere-se ao sexo do indivíduo)

Analisou-se 36 amostras submetidas à temperatura de 300ºC (Tabela 4), sendo que 88,8% (32) das amostras analisadas obtiveram-se uma quantidade

de marcadores amplificados com sucesso. Ou seja, todo material biológico exposto a temperatura elevadas, como por exemplo, locais quentes e secos, calor do sol, calor no subsolo e até cadáveres carbonizados, poderão submeter-se ao exame de DNA, pois o perito que trabalha com genética forense poderá coletar resultados positivos para uma identificação humana.

Tabela 4: Relação dos resultados obtidos da análise das amostras submetidas a temperatura de 300ºC.

Amostras exposta à 300ºC	Número de marcadores amplificados	Sucesso na amplificação e extração	Amostras exposta à 300ºC	Número de marcadores amplificados	Sucesso na amplificação e extração
1	++++++++ A	POSITIVO	19	++++++++ A	POSITIVO
2	++++++++++ A	POSITIVO	20	++++++++ A	POSITIVO
3	++++++++++A	POSITIVO	21	+++++++++ A	POSITIVO
4	+++++++++ A	POSITIVO	22	+++++++++ A	POSITIVO
5	+++++++++ A	POSITIVO	23	++++++++ A	POSITIVO
6	++++++++++ A	POSITIVO	24	+++++++++ A	POSITIVO
7	+++++++++ A	POSITIVO	25	- AMPL A	NEGATIVO
8	+++++++++ A	POSITIVO	26	++++++++ A	POSITIVO
9	++++++++++ A	POSITIVO	27	++++++++++ A	POSITIVO
10	++++++++ A	POSITIVO	28	- AMPL A	NEGATIVO
11	- AMPL A	NEGATIVO	29	++++++++ A	POSITIVO
12	- AMPL A	NEGATIVO	30	++++++++++ A	POSITIVO
13	++++++++ A	POSITIVO	31	++++++++ A	POSITIVO
14	++++++++ A	POSITIVO	32	++++++++ A	POSITIVO
15	++++++++ A	POSITIVO	33	+++++++++ A	POSITIVO
16	+++++++ A	POSITIVO	34	+++++++++ A	POSITIVO
17	++++++++ A	POSITIVO	35	++++++++ A	POSITIVO
18	++++++++ A	POSITIVO	36	++++++++ A	POSITIVO

\+ Resultado positivo (a cada sinal + demonstra o número de marcadores amplificados)

A Resultado positivo para amplificação do marcador AMELOGENINA (marcador que determina a presença na amostra dos cromossomos X e Y;

- AMPL Resultado negativo (quantidade de marcadores muito baixo, fora da quantidade mínima exigida)

Na segunda fase da pesquisa, analisou-se seis amostras nas temperaturas de 400ºC, 500ºC e 600ºC, sendo duas amostras para cada temperatura (tabela 5, 6 e 7).

Verificou-se que, com 400ºC de temperatura direta ao osso, o sucesso da amplificação fica quase impossível. Constatou que 90,62% (15) dos marcadores não foram amplificados. Notou-se a amplificação de apenas um marcador das duas amostras analisadas. E nenhuma amplificação do marcador da amelogenina.

Tabela 5: Relação dos resultados obtidos da análise das amostras submetidas a temperatura de 400ºC.

Amostras exposta à 400ºC	**Número de marcadores amplificados**	**Sucesso na amplificação e extração**
1	**+ (01)**	**NEGATIVO (APENAS UM MARCADOR)**
2	**- (00)**	**NEGATIVO**

Verificou-se que, com temperatura de 500ºC e 600ºC de exposição direta ao osso, o sucesso da amplificação é impossível. Notou-se que 100% (04) das amostras analisadas foram impossíveis a amplificação de qualquer marcador. Portanto, uma temperatura acima de 500ºC por um período acima de 10 minutos seria suficiente para a degradação completa do DNA Nuclear, demonstrando a temperatura máxima que um osso do corpo humano pode sofrer.

Tabela 6: Relação dos resultados obtidos da análise das amostras submetidas a temperatura de 500ºC.

Amostras exposta à 500ºC	**Número de marcadores amplificados**	**Sucesso na amplificação e extração**
1	**-**	**NEGATIVO**
2	**-**	**NEGATIVO**

Tabela 7: Relação dos resultados obtidos da análise das amostras submetidas a temperatura de 600ºC.

Amostras exposta à 600ºC	**Número de marcadores amplificados**	**Sucesso na amplificação e extração**
1	**-**	**NEGATIVO**

2	-	NEGATIVO

Com relação à degradação do DNA no tecido ósseo sob a ação das temperaturas de 100ºC, 200ºC, 300ºC, 400ºC, 500ºC e 600ºC, no período de 10 à 30 minutos Observou-se que, a estrutura óssea sendo submetida à temperatura de 100ºC à 300ºC pelo período de 30 minutos, ainda é possível proceder-se a identificação humana por meio da análise do exame de DNA. Nas amostras submetidas a temperaturas de 400 ºC constatou-se a degradação de 90,62% do material, ou seja, das 16 amplificações esperada apenas encontramos 01 marcador, insuficiente para o programa CODIS do FBI, estabelecer a identificação humana. Em um procedimento de análise normal, a análise preconizada pelo programa CODIS exige no mínimo a amplificação de 13 (treze) marcadores genéticos. Para as amostras submetidas à temperatura acima de 500ºC por um período superior de 10 minutos nota-se que, 100% (04) das amostras tiveram a sua degradação completa do DNA Nuclear, demonstrando a temperatura máxima que um osso do corpo humano pode sofrer. (Gráfico 6)

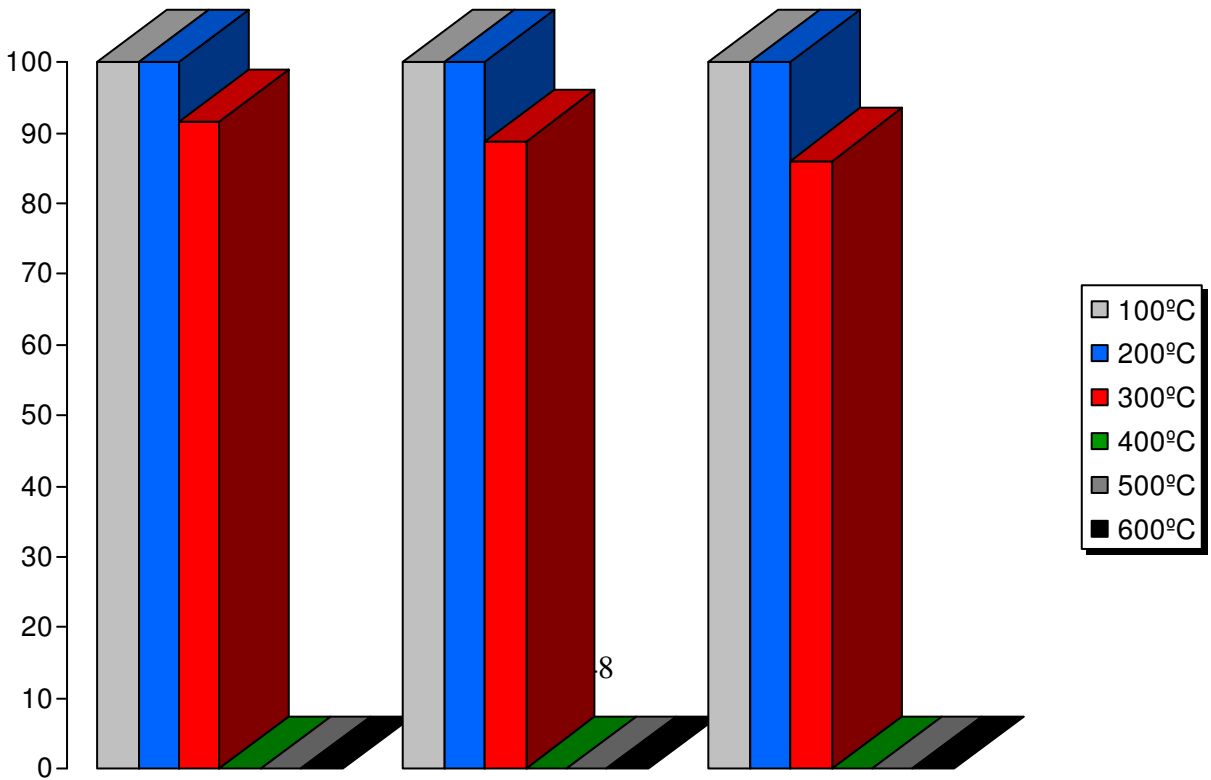

Gráfico 6 – Resultado do tempo de exposição ao calor e ação de diversas temperaturas sob o osso humano

6. DISCUSSÃO

O estudo do comportamento do material genético humano (DNA nuclear) ainda é muito discutido no meio científico, já que existem poucos trabalhados na área. A determinação do tempo de exposição e o grau da temperatura de degradação do DNA ainda são bastante controversos.

Considerou-se a importância desse projeto para o desenvolvimento da ciência, principalmente devido ao grande aumento do número de acidentes coletivos, configurando-se em tragédias, como quedas de aviões, incêndios, acidentes de trânsito e de trabalho, conseqüentemente dificultando o trabalho dos peritos quando da necessidade de se identificar uma pessoa, que tenha resultado em carbonização.

De acordo com Benecke, em 1997, e descrito por Pena (2005) o avanço da ciência e tecnologia em nível forense teve seu ponto culminante em meados dos anos 80, quando as técnicas de identificação, fundamentadas na análise direta do ácido desoxirribonucléico (DNA), tornaram-se uma das mais poderosas ferramentas para a identificação humana e investigações criminais.

A determinação de identidade genética pelo DNA pode ser usada para demonstrar a culpabilidade dos criminosos, exonerar os inocentes, identificar corpos e restos humanos em desastres aéreos e campos de batalha, determinar paternidade com confiabilidade praticamente absoluta, elucidar trocas de bebês em berçários e detectar substituições e erros de rotulação em laboratórios de patologia clínica.

Há bem pouco tempo a ciência da investigação na identificação de

casos criminais pautava-se apenas nas análises sorológicas dos polimorfismos de proteínas e grupos sangüíneos e em alguns marcadores genéticos.

O exame forense de amostras biológicas teve seu início por volta do princípio do século XX com a aplicação dos grupos sangüíneos ABO em evidências relacionadas a crimes ou à identificação de pessoas. Hoje, os grupos sangüíneos eritricitários, como os sistemas ABO, Rh (CcDEe) e MNSs, foram substituídos na maioria dos centros, sendo pouco utilizados, pois através da análise do DNA, podemos impetrar o poder discriminatório, limite este, necessário para inferir a identificação absoluta.

Salientamos que o processo de recombinação gênica tem como proporcionar um alto grau de variabilidade entre os organismos vivos, ou seja, cada indivíduo da espécie humana possui um perfil genético único.

Em um excelente trabalho, sobre a ANÁLISE FORENSE DE DNA, Norma Bonaccorso, Mestranda em Medicina Forense na FDUSP, abordou as limitações do alcance da análise do DNA.

Descreveu em seu trabalho que, nos casos 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 consegue distingui-los por serem geneticamente idênticos.

Considerou que a datiloscopia seria muito mais apropriada em tal identificação, caso entre os vestígios, existissem impressões digitais. Ainda cita que as condições de preservação do material biológico de um cadáver carbonizado ou de um corpo 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 que se possa afirmar sobre sua identidade, ao passo que o exame de sua arcada dentária pode ser muito mais significativo neste sentido.

Apesar de todas as ponderações observadas acerca das limitações da análise de DNA, devemos, acima de tudo, ressaltar sua importância como prova extremamente poderosa, se realizada segundo as recomendações técnicas. Realmente, o exame de DNA não identifica 100% um indivíduo, como nos casos de gêmeos idênticos, mas sim fornece a probabilidade estatisticamente comprovada de sua inclusão ou exclusão.

Com exceção dos gêmeos idênticos, pode chegar a uma semelhança estatística de 99,99%. Isso significa que a probabilidade de uma dada combinação de alelos ocorrerem ao acaso é menor do que 0,01%. Portanto, a chance de existir outro indivíduo com a mesma informação genética nas regiões analisadas é imensamente remota. A variabilidade humana em termos de DNA é enorme. Dois genomas humanos escolhidos ao acaso diferem, aproximadamente, em uma de cada 500 bases do DNA (nucleotídeos). Como o genoma humano tem cerca de 3.10^9 bases, isto implica em 6 milhões de diferenças entre duas pessoas.

Portanto, a segunda e mais amplamente propalada vantagem do exame de DNA é seu potencial discriminatório. Em alguns casos, os estudos de DNA podem revelar a identificação positiva, comparativamente aos exames envolvendo o grupo sangüíneo ABO.

Em uma condição extremamente particular, quando gêmeos idênticos são suspeitos de um crime em que o autor deixou vestígios, o exame de DNA identifica claramente se a autoria foi de “um dos gêmeos”. Logo, não existe a comprovação relativa à “qual dos gêmeos”.

Evidentemente, esta é uma informação importantíssima que, associada a outros dados da investigação criminal, via de regra, identifica claramente o autor. Ou seja, o uso do DNA Forense na investigação criminal, em determinada situações não pode por si só provar a culpabilidade do criminoso, ou a inocência do mesmo, mas estabelece uma ligação clara entre esta pessoa e a cena do crime.

Verifica-se que o exame de DNA, é sem sombra de dúvida, um exame com inúmeras características superiores aos supracitados, tais como, a possibilidade de sua aplicação sobre toda e qualquer fonte de material biológico.

Observa-se uma ampla variedade de líquidos corporais é encontrada nos exames de evidência; todavia um exame sorológico completo pode ser realizado somente no sangue e não em outros tecidos ou líquidos corporais. Ou seja, com estudos do DNA qualquer quantidade traço de inúmero material biológico, incluindo o sangue, cabelos, *ossos*, saliva, sêmen, tecido, urina, ou qualquer outro fluido biológico, pode ser analisada para associar um suspeito ao crime.

A sensibilidade do exame de DNA constitui a terceira grande vantagem deste método. A tipagem do polimorfismo do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), pode ser efetuada com o DNA de algumas poucas células, de longe superando a sensibilidade dos exames tradicionais.

Malaghini *et al*. (2006) descreveu que com o conhecimento atual, ao menos duas grandes vantagens devem ser citadas a respeito da tipagem molecular: o DNA possui uma alta estabilidade química mesmo após um longo período de tempo e está presente em todas as células nucleadas do organismo humano, o que facilita a obtenção do mesmo.

Conseqüentemente, os exames com DNA, diferentemente dos realizados através dos marcadores sorológicos tradicionais, podem ser realizados com maior segurança em amostras muito antigas e que estiveram expostas a maiores agressões ambientais, como por exemplo, a temperatura.

Verifica-se que a quarta vantagem do DNA é sua resistência aos fatores ambientais.

O DNA é uma molécula robusta, relativamente resistente aos ácidos, álcalis e detergentes, diferentemente dos determinantes protéicos, lipídicos e carboidratos.

As proteínas podem ser desnaturadas de forma relativamente mais fácil e sua estrutura terciária conformacional, que é importante na tipagem, é facilmente desnaturável. A informação da tipagem do DNA, por sua vez, é encontrada na seqüência nucleotídica, que independe da conformação da molécula.

Conseqüentemente, os exames com DNA, diferentemente dos marcadores sorológicos tradicionais, podem ser realizados com maior segurança em amostras muito antigas e que estiveram expostas a maiores agressões ambientais, como por exemplo, a temperatura.

Arruda *et al* em 2001, citou que a identificação humana pelo DNA Forense já é aceita em processos judiciais em todo mundo, sendo possível inclusive à identificação de pessoas mortas a dezenas ou centenas de anos, utilizando DNA obtidos de ossos.

Infelizmente, o uso da identificação humana pela arcada dentária, ainda tem suas limitações. Conforme descreveu Cameron & Sims (1974) e Vanrell (2002), na década de 1940, durante a 2ª Guerra Mundial, navios brasileiros que transportavam soldados foram torpedeados. Os autores concluíram que os meios legais, à época, não conseguiram identificar algumas vítimas adultas através do exame dentário, pois tal identificação depende da existência de documentação odontológica fornecida por Cirurgião-dentista.

Desse modo, com a falta de tais documentos para fins comparativos, a identificação dentária teve pouquíssima significância.

No entanto, observamos que o estudo do DNA e as suas aplicações a cada dia vêm tomando proporções gigantescas, evoluindo a cada ano.

Por outro lado, o exame de DNA, cuja metodologia somente foi implementada a partir de 02 de junho de 1999, com a Resolução nº 194 da Secretaria de Estado da Segurança Pública de São Paulo, vem trazendo muitas vantagens. Desta forma a tecnologia atual permite que se realize a genotipagem

de DNA a partir de quantidades muito pequenas de amostras biológicas, com consideráveis ganhos de tempo e de exatidão.

Portanto, esse exame constitui-se em importante instrumento para o esclarecimento de um inquérito policial, pois qualquer material deixado no local da investigação, de onde os peritos consigam extrair DNA, pode ser a principal prova contra o autor do delito. Tal se aplica também na identificação legal corpos carbonizados.

Em 2005, Bezerra relatou que nas circunstâncias de um grau tão avançado de carbonização, somente seria possível identificar os corpos com o uso da análise de DNA.

Deve-se ressaltar também a importância da prova pericial no esclarecimento de crimes por ser um importante subsídio para busca da verdade, sendo que a aquisição e análise de material humano, feita através de DNA, são conclusivas na identificação, inocentando ou incriminando uma determinada pessoa.

Portanto, é desta aquisição e análise de provas que a ciência forense entra para a história.

Um dos princípios básicos do método científico é a reprodutibilidade. Desta forma, tal método revela-se universal, pois em qualquer local, desde que, o método seja realizado em condições técnicas corretas, deve-se obter os mesmos resultados. Desta forma, o DNA passa a ser um importante aliado da justiça, pois fornece respostas com aceitáveis níveis de precisão.

É importante salientar que a preservação do local e das vítimas é fundamental, pois, no momento em que se vasculham os destroços, pode ocorrer a fragmentação dos corpos e também a contaminação das amostras, o que dificultará a obtenção de resultados rápidos. Desta forma, para que essa organização dos destroços seja efetiva, é necessária a formação de uma equipe forense multidisciplinar (Melani, 1999).

Esta identificação de vítimas pode ser realizada com o auxílio de técnicas como a antropologia forense, a impressão digital, a odontologia forense, a radiologia e o exame de DNA (Andelinovic *et al*, 2005).

Com muita astúcia em 2005 Alonso *et al;* propõem que a coleta de amostras para o exame de DNA deve ser realizada logo após a identificação possível pelos médicos-legistas, odonto-legistas e papiloscopistas, mesmo quando esta identificação for positiva, pois pode ser necessário um futuro confronto genético para elucidação de dúvidas com relação a identidade do indivíduo e troca de corpos. Em seu trabalho descreve as grandes vantagens do emprego dos exames de DNA.

Jobim (2006) descreveu que o sucesso da análise depende do estado do material analisado. O grau de deterioração, a forma de conservação e o tempo decorrido podem influenciar o resultado ou impedir a identificação.

Em casos de carbonização de corpos, comuns em acidentes aéreos, automobilísticos e alguns homicídios os ossos carbonizados são o material humano de primeira escolha por serem passíveis de investigação para a análise de DNA sendo, o material genético obtido pela coleta de amostras da região do corpo melhor preservada. De acordo com as condições do material é possível obter o DNA nuclear e fazer a análise de marcadores de microssatélites, podendo ser utilizados para identificação individual.

Portanto, devido ao baixo número e à exigüidade dos trabalhos científicos que abordam as rotinas e normas de um laboratório de DNA forense voltado à elucidação de delitos e identificação de pessoa, notou-se a importância desse estudo. Analisando o comportamento de material genético humano (DNA Nuclear) obtido de amostra biológica (tecido ósseo) submetido à exposição de diversas temperaturas.

7. CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, é lícito concluir que:

a) A estrutura óssea sendo submetida à temperatura de 100ºC à 300ºC pelo período de 30 minutos, ainda permite a identificação humana por meio da análise do exame de DNA. Nas amostras submetidas a temperaturas de 400 ºC constatou-se a degradação de 90,62% do material, ou seja, das 16 amplificações esperada apenas encontrou-se um marcador, dado insuficiente para uma identificação humana. Em 100% das amostras submetidas à temperatura acima

de 500ºC por um período acima de 10 minutos seria suficiente para a degradação completa do DNA Nuclear, demonstrando a temperatura máxima que um osso do corpo humano pode sofrer;

b) O método investigativo através do DNA possui várias vantagens sobre outros meios de identificação humana, dentre as quais destaca-se a possibilidade de sua aplicação sobre toda e qualquer fonte de material biológico (tecido muscular, ossos, cabelos, manchas de sangue, material vaginal, entre outros), apresentar uma alta estabilidade química, mesmo após um longo período de tempo, sua genotipagem de DNA é realizada a partir de quantidades muito pequenas de amostras biológicas, sendo possível a identificação humana em pessoas mortas a centenas de anos, utilizando o DNA obtido de ossos. Mesmo expostos a maiores agressões ambientais, como por exemplo, a temperatura, ainda á possível o exame de DNA;

c) O Cirurgião-Dentista tem o direito estabelecido em Lei 5.081/66, Resolução 63/2005, CFO – 42/2003, ANVISA RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004 e pelo Processo Penal de fazer perícias. Porém, para executá-la necessita capacitação técnica e discernimento ético e moral, pois se assim não proceder responderá por falsa perícia, devendo reparar os lesados e a sociedade como um todo.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, H.T. Medicina legal aplicada à arte dentária**.** Rio de Janeiro: Francisco Alves, 1922.

Alonso, A. *et al*. Challenges of DNA Profiling in Mass Disaster Investigations, Croatian Medical Journal 2005;46(4):540-548

Andelinovic, S., Sutloviæ, D., ErcegIvkošiæ, I., Skaro, V., Ivkosiæ, A., Paiæ, F., Reiæ, B., Definis-Gojanoviæ, M., Primorac, D.. Twelve-year Experience

In Identification of Skeletal Remains from Mass Graves. Croatian Medical Journal 2005;46(4):530-539.

Atman, Lawrence. Now, doctors must identify the dead. The New York Times. 2001; setembro-25.

Arruda, J. A., Parreira, K. S. A prova judicial de ADN – Belo Horizonte: Del Rey,2000.

Bang, G.; Melo, F.P. A importância da medicina dentária forense. Ver Port Estomatol Cir Maxilofac, Lisboa, v.23, n.4, p.447-453, out/dez. 1982.

Basauri, C.C. La ciencia odonto-legal y sus aplicaciones. Ver. Esp. Estomat. 11: 35-8: Mayo-Junio 1963. Apud Fernández, C.N. Op. Cit. Ref. 23; 1990

Benecke, Mark. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. Naturwissenschaften, v. 84, p. 181 - 188, 1997.

Bezerra, C. C. Metodologia de atuação pericial em desastre de massa - Relato do caso Paraguai. Perícia Federal - Ano VI – Número 20 – janeiro a abril de 2005 – p6-10.

Bonaccorso, Norma. Análise Forense de DNA. São Paulo: 2004. 24p. Tese (Monografia apresentada no Concurso de Ingresso para professor da ACADEPOL) – Academia de Polícia de São Paulo. Disponível em: http://www.peritocriminal.com.br/dnaforense.htm. Acesso em: 18 mai. 2008.

Brasil. Lei 5081/66. Regula o exercício da Odontologia no Brasil. Disponível em: <http: www.cfo.org.br>.Acesso em: 20 set .2007

Brasil. Resolução CFO 63/2005. Conselho Federal de Odontologia. Estabelece as áreas competentes do Cirurgião-Dentista e do Odonto-legista.

Brasil. Resolução CFO 20/2001. Conselho Federal de Odontologia. Estabelece as normas que definem a função e regulamenta as atividades dos peritos/auditores, concernente à ética profissional odontológica.

Brasil. Resolução RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Brasil. Lei 8.974/95. Código do Processo Penal. Regula a Biossegurança nos laboratórios de DNA.

Brasil. Lei 1.752/95. Código do Processo Penal. Estabelece o Código de Ética de Manipulação Genética.

Brasil. Resolução 196/96. Conselho Nacional de Saúde. Estabelece os procedimentos Éticos das pesquisas envolvendo cadáveres.

Cameron J.M, Sims B.G. Forensic Dentistry. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1974. 158p.

Conselho Federal de Odontologia. Consolidação das Normas para Procedimentos nos Conselhos de Odontologia: Resolução Conselho Federal de Odontologia- 63/2005/93, CFO; 1995.

Daruge E, Massini N, Galdino A. M. Ensaio de Sistematização Sobre o Ensino da Odontologia Legal. Piracicaba: Unicamp; 1975. 328p.

DeSalle, R. & Amato, G. The expansion of conservation genetics. Nat. Rev. Genet. 2004; 425(5): 702-712.

Duarte, Francisco .A. M.; Perez, Augusto. M.; Pena, Sergio. D.; de Barros, Margareth. P. M.; Rossi, Elsie O. A avaliação do DNA como Prova Forense. Ribeirão Preto: FUNPEC. 2001. 283p.

Edson, S.M., Ross, J.P., Coble, M.D., Parsons, T.J., Barritt, S.M. Naming the Dead – Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains. Forensic Science Rev 2004; 6(1):63-90.

Eglinton, G & Logan, G. A. Molecular preservation. Philosophical Transactions of The Royal Society B. 1991; 333: 315-328.

Fernández, C.N. Odontología legal. Hechos y estudios que señalan su importancia. Rev. Asoc Odont Argent, Buenos Aires, v.55, n.5, p.201-206, Mayo 1967

Ferreira, E.F. & D. Grattapaglia. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1996; 220

Fixott, R.H. How to become involved in forensic odontology. Dent Clin North Am, Philadelphia, v.45, n.2, p.417-425, Apr. 2003.

Gonçalves, A.C.; Travassos, D.V.; Silva, M. Campo de atuação do Odonto-legista. Ver. Pós Grad, São Paulo, v.6, n.1, p.60-65, jan/fev/mar. 1999.

Grant E.A, Prendergast W.K, White E.A. Dental Identification in the Noronic Disaster. The Journal of the Canadian Dental Association. 1998; 18(1): 03- 18.

Griffts, AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. Genética Moderna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Jackson, D,P; J. D. Hayden; P. Quirke. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. In PCR-A practical approach. 1991; 29-50.

Jobim, L. Fernando; Costa, R. Luís; Silva, Moacyr. Identificação Humana. Identificação pelo DNA. 2006; 302(2): 5-100.

Keiser-Nielsen, S. Historical cases: In: Hill, I. R. *et al*. Forensic odontology: its scope and history.

Kleinfeld, N. S. Error puts body of one firefighter in a grave of a firehouse colleague. The New York Times.; novembro-28; 2001.

Kling, James. Genetic counseling: the human side of science. The Scientist; julho-19; 1999.

Koch, Analara & Andrade, F. Michelsen. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. Revista RBAC, vol 40 (1): 17-23; 2008.

Koolman, J., Röhm, K. H. Color Atlas of Biochemistry - New York: Editora Thieme Stuttgart; 1996.

Leite, V.G. Odontologia Legal. Bahia: Era Nova, p. 311, 1962

Lewis, Ricki, Genética Humana – Conceito e Aplicações. 2004; 453: 259-312.

Lima, I.C. A atuação do Cirurgião-dentista no instituto médico legal. JAPCD, São Paulo, p.48, jul. 2001.

Luftig, M. A., Richey, S. DNA and Forensic Science. New England Law Review. Vol. 35:3; 2001.

Malaghini, Marcelo.; Alonso, Carlos A.M.; Dall'Stella, Renato.; Schneider, Vicente J. Análises de Material Genético na Investigação Criminal – um relato sobre a evolução dos processos de padronização. Disponível em: http://www.labfa.com.br/texto_infmatgencriminal.htm. Acesso em: 08 mar. 2008

Matte, C.H, F *et al.* A utilização da análise de DNA em desastres em massa: participação Brasileira na Identificação dos corpos do incêndio no Paraguai. Instituto Geral de Perícias. Revista do IPG, R.S, ano 3, janeiro 2007

Mehrdad Hajibabaei; Jeremy R. de Waard; Natalia V. Ivanova; Sujeevan Ratnasingham; Robert T. Dooh; Stephanie L. Kirk; Paula M. Mackie; Paul D. N

Hebert. Critical Factors for assembling a high volume of DNA barcodes. Philosophical Transactions of The Royal Society B; 333: 1-9; 2005.

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

Millard, J., Pilon, A. M. Identification of Forensic Samples via Mitochondrial ADN in the Undergraduate Biochemistry Laboratory. Journal Of Chemical Education. Vol. 80, n°4, april 2003.

Mullis *et al*; United States Patent. System for automated performance of the polymerase chain reaction. August 12, 1997.

Pena, S. D. J, Segurança Pública: determinação de Identidade genética pelo DNA. Seminário Temático para a 3 Conferencia Nacional de C,T & Parceria Estratégicas, v.20: 447-460, 2005.

Pollack, Andrew. Identifying the dead, 2,000 miles away. The New York Times. agosto-28; 2003.

Purves, J. D. Dental Identication of fire victims. Forens Sci int. Limerck, V.6, p.217-219, 1975

Remualdo, V. R, *et al.* Análise do STR-F13A01 e MPSs do mtDNA para fins de identificação humana: comparação de três métodos de extração de DNA de dentes submetidos ao calor. Revista RPG Ver Pós Graduação, 12(4):437-43, 2005.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science 239: 487-491, 1988

Serpa, L.Z. Um mundo fascinante. Rev ABO Nac, São Paulo, v.2, n.6, p.386, dez/jan. 1994/1995. Entrevista concedida a Armando Stelluto Jr.

Siegel, J., Knupfer, G., Saukko, P. Encyclopedia of Forensic Sciences. Elsevier, 2000.

Smarra, A., Paradela E., Figueiredo, A. A Genética Forense no Brasil. Scientific American Brasil. 51:87, 2006.

Sweet D. Why a Dentist for Identification? Dental Clinics of North America. 1996; 45(2): 237-251

Silva, M. Compêndio de Odontologia legal. Rio de Janeiro: MEDSI, 1997. 490p.

Tochetto, D. Identificação Humana. Editora Sagra Luzzatto, 1999.

Tsokos, M., Lessig, R., Grundmann, C., Benthaus, S., Peschel, O. Experiences in tsunami victim identification. International Journal of Legal Medicine letter to the editor; 2005, DOI10.1007/s00414-005-0031-4

Tsuchiya T, Iwasa M, Maeno Y, Koyama H, Inoue H, Isobe I, *et al.* Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats. Am J Forensic Med Pathol 2006;23(3):268-71.

Vanrell, J.P. Odontologia legal & odontologia forense. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 365p.

Veríssimo, P; Sanger, W; Winston, K; Wats, M; The DNA application in degraded tissues. Am. J. Forensic Genetic. 2007; 343-349.

Walsh, J. Simon. Recent advances in forensic genetics. Expert Rev. Mol. Diagn.v. 4, n. 1, p. 31 - 40, 2004.

Watson, James. DNA O segredo da vida. 2007; 470

Williams, J.G.K, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

Xião, J. *et al*. A modified simple RFLP-PCR method for single nucleotide polymorfhism (SNP) typing. Genetics and Molecular Biology. v. 29, n. 3, p. 562 – 565, 2004.

Zatz, M. Projeto Genoma Humano e Ética. Perspec. v.14 n.3 São Paulo; jul./set. 2000.

De acordo com a norma da UNICAMP/FOP baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

APÊNDICE – 01

PROTOCOLO INTERNACIONAL PADRONIZADO PARA EXTRAÇÃO DE DNA EM MATERIAL ÓSSEO HUMANO

Para compor o grupo-controle (grupo de segurança) foi utilizado o osso dos 50 (cinqüenta) cadáveres em estudo, este fragmento de osso foi processado *in natura*. O protocolo para extração de DNA foi baseado no método descrito por Walsh (1991), esta técnica é empregada rotineiramente nos laboratórios para extração de DNA (Nuclear) utilizando a resina Chelex 100® (BioRad);

I-Preparo da Amostra

1. Cortamos um segmento de osso, onde a espessura do osso seja maior;
2. Limpamos todas as superfícies externas do osso com auxílio de um lixa;
3. O fragmento obtido é guardado em um recipiente estéril e congelado até o momento da moagem (trituração do osso).

II - Obtenção do Pulverizado de Osso

1. Moemos em Moinho Criogênico, do modelo *KS 775,* previamente limpo, para isto, utilizamos o hipoclorito e expomos na luz UV com permanência mínima de 1 hora;

2. Pesamos 0,3 gramas de osso pulverizado com uma balança *Bioprecisa,* da marca *Eletronik Balance,* modelo *FA2104N*;

3. Colocamos o osso pulverizado em um microtubo de 1,5 ml.

III – Extração

1. Preparamos um tubo controle negativo;
2. Adicionamos 600µl de TEO[2] + 10µl de Proteinase K ao pulverizado de osso e também ao tubo controle negativo;
3. Agitamos suavemente e deixamos incubando por overnight (no mínimo 12 horas);
4. Após retirar as amostras do banho, agitamos as amostras um pouco no vortex;
5. Damos pulso de centrifugação;
6. Adicionamos em cada tubo 600µl de clorofane;
7. Vortexamos até a formação de uma emulsão leitosa;
8. Centrifugamos por 5 minutos a 14.000 rpm;
9. Retiramos sobrenadante;
10. Colocamos em um novo tubo;
11. Após centrifugação observamos as 03 fases distintas, onde o DNA encontra-se na fase superior;
12. Retiramos essa parte cuidadosamente para o novo tubo respectivo, tendo o cuidado de não pipetar a fase protéica, pois esta causa inibição da reação de PCR. O precipitado é rejeitado;

[2] TEO = Tampão de Extração de Osso

13. Colocamos (sobre o liquido e lentamente) 600µl de ETOH a 100% a frio (o qual foi previamente colocado num copo esterilizado e no gelo) em cada amostra e no controle negativo;

14. Invertemos suavemente e uma só vez cada tubo;

15. Colocamos as amostras por 30 minutos a –20°C para precipitação de DNA;

16. Centrifugamos inicialmente por 15 minutos a 14000 rpm para poder observar se há formação de pellet;

17. Decantamos cuidadosamente o etanol;

18. Secamos o pellet à temperatura ambiente até evaporar todo o etanol (mínimo 12 horas, colocar os tubos deitados com a tampa aberta, dentro de um armário fechado e voltados para o lado posterior);

19. Ressuspendemos as amostras com 10, 25 ou 50 µl de H_2O deionizada e autoclavada, conforme o tamanho do pellet ou o que espera obter de DNA a depender da amostra (ou maior volume a depender do tamanho dos pellets para amostras seguras. Para osso, dentina, haste de pêlos etc ressuspender com 25µl);

20. Agitamos e damos um pulso de centrifugação;

21. Colocamos no banho a 56ºC por 30 minutos;

22. Transferimos lotes de no mínimo 5 amostras até o máximo volume de 450 µl que corresponde à capacidade do microcon.

AMPLIFICAÇÃO DE STRs AUTOSSÔMICO

Kit comercial utilizado: Identifiler

1. Organizamos a câmara de fluxo laminar colocando papel, pipetas, ponteiras, becker com saco plástico, tubos de 1,5 ml ou de 0,5 µl, tubos 0,2 µl marcados com identificação da amostra e água estéril.

2. Ligamos a UV e deixamos por 10 minutos.

3. Retiramos as amostras do freezer e esperamos descongelar.

4. Agitamos e centrifugamos as amostras.

5. Cinco minutos antes de terminar a esterilização, retiramos a Taq Gold e as reações de PCR da geladeira (Reaction Mix e Primer Set).

6. Agitamos os tubos.

7. Desligamos a UV.

8. Distribuímos 6,6 µl de água estéril em cada tubo.

9. Pegamos as reações de PCR e a Taq Gold.

10. Preparamos MASTER MIX:

n x 2,5 µl de REACTION MIX
n x 0,4 µl de TAQ GOLD
n x 2,5 µl de PRIMER SET

11. Agitamos no vortex e centrifugamos.

12. Distribuímos 5,4 µl da MASTER MIX

13. Adicionamos 1 µl da extração de DNA (Chelex).

Volume final = 13 µl

O uso de reações MULTIPLEX empregando corantes fluorescentes associado à detecção automatizada para determinação de alelos STR pela técnica da PCR fornece não só informação qualitativa dos alelos presentes na amostra (tipagem), mas também informação quantitativa referente às intensidades relativas das bandas. Como conseqüência, isto possibilita aferir a quantidade de

DNA amplificado. Com freqüência, é possível separar as contribuições principais e secundárias em misturas simples e determinar a presença de "STUTTER BANDS", bandas extras geradas pelo deslizamento da enzima TAQ POLIMERASE e que apresentam uma unidade de repetição a menos que a verdadeira. Vale ressaltar que tal artefato de técnica é comum nas reações MULTIPLEX utilizadas neste caso

ANEXO - 01

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

TÊRMO 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 "**O ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO HUMANO (DNA NUCLEAR) EM TECIDO ÓSSEO SOB A AÇÃO DE DIVERSAS TEMPERATURAS**", a ser desenvolvido pela **Dra. PATRÍCIA BITENCOURT DA ROCHA (aluna do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco Dental)**, sob a orientação do **Prof. Dr. EDUARDO DARUGE JÚNIOR (FOP – UNICAMP/SP)** e colaboração dos **Prof. Dr. EDUARDO DARUGE (FOP – UNICAMP/SP)** e **Dra. KÁTIA SOUZA CARVALHO (DIRETORA DO DEPARTAMENTO MÉDICO LEGAL DE VITÓRIA/ES)**, considerando a importância do projeto para o desenvolvimento da ciência, principalmente devido ao grande aumento do número de acidentes coletivos, configurando sob em tragédias, como quedas de aviões, incêndios, acidentes de trânsito e de trabalho; justifica-se também pela carência de pesquisas sobre o tema, o que dificulta o trabalho dos peritos quando da necessidade de se identificar uma pessoa, que tenha resultado em carbonização, **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 sequenciamento do DNA nuclear, objeto do estudo proposto.

Vitória, 11 de janeiro de 2005.

Luiz Renato da S. Costa
Médico Legista
Resp. Técnico do DNAC-PC/ES
Mat. 19865-7

Dr. Luiz Renato da Silveira Costa
Médico Legista – Médico do Trabalho – Especialista em Genética Forense
Responsável Técnico pelo Laboratório

ANEXO - 02

GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO
SECRETARIA DE ESTADO DA SEGURANÇA PÚBLICA
POLÍCIA CIVIL
SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍCIA TÉCNICO CIENTÍFICA

TÉRMO DE AUTORIZAÇÃO

Pelo presente termo, como forma de viabilizar a execução do Projeto de Pesquisa Intitulado **"O ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO HUMANO (DNA NUCLEAR) EM TECIDO ÓSSEO SOB A AÇÃO DE DIVERSAS TEMPERATURAS"**, a ser realizado pela **Dra. PATRÍCIA BITENCOURT DA ROCHA**, aluna do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco Dental, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. EDUARDO DARUGE JÚNIOR (Pesquisador Responsável e Orientador, Professor da FOP/UNICAMP - SP)** e com a colaboração dos **Prof. Drs. EDUARDO DARUGE, KÁTIA SOUZA CARVALHO e LUÍS RENATO DA SILVEIRA COSTA**, considerando a importância do mesmo para o desenvolvimento da ciência, principalmente devido ao grande aumento do número de acidentes coletivos, configurando-se em tragédias, como quedas de aviões, incêndios, acidentes de trânsito e de trabalho; justifica-se também pela carência de pesquisas sobre o tema, o que dificulta o trabalho dos peritos quando da necessidade de se identificar uma pessoa, que tenha resultado em carbonização. **AUTORIZO**, 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 coleta de amostras biológicas no Departamento Médico Legal de Vitória - ES, em cadáveres não identificados submetidos aos procedimentos rotineiros de necrópsia.

Vitória, 11 de janeiro de 2006.

Dr. Emerson Gonçalves da Rocha
Delegado de Polícia Civil
Superintendente de Polícia Técnico Científica

ANEXO 03

GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO
SECRETARIA DE ESTADO DA SEGURANÇA PÚBLICA
POLÍCIA CIVIL
SUPERINTENDÊNCIA DE POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
DEPARTAMENTO MÉDICO LEGAL
SEÇÃO DE NECRÓPSIAS

DECLARAÇÃO

Atendendo solicitação da aluna do Curso de Mestrado da FOP-UNICAMP Patrícia Bitencourt da Rocha, Declaro para os devidos fins, que será possível a coleta de materiais biológicos em cadáveres não identificados que derem entrada no Departamento Médico Legal, conforme consta em vosso documento, ressaltando-se que não poderá haver prejuízos ao funcionamento do Órgão e, ficando também condicionado à apresentação da Autorização do Comitê de Ética da EMESCAM.

Vitória, 03 de março de 2008.

Dr. Romildo Rabbi
Médico Legista
Chefe da Seção de Necrópsias do DML

ANEXO - 04

EMESCAM
Compromisso com a Vida

DECLARAÇÃO

O projeto de pesquisa **"O Estudo do Comportamento do Material Genético Humano (DNA Nuclear) em Tecido Ósseo sob a Ação de Diversas Temperaturas"** cadastrado com o No **017/2008**, do pesquisador responsável **"Eduardo Daruge Júnior"**, foi analisado e julgado pelo Colegiado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta Instituição.

Declaramos que o referido projeto cumpre plenamente as exigências da resolução 196/96 e resoluções posteriores da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde e, portanto, foi **APROVADO,** pelo Colegiado do CEP na reunião ordinária de 25/08/2008.

Este projeto de pesquisa não poderá sofrer interrupção ou modificação na forma original apresentada sem o prévio conhecimento e consentimento deste CEP. Cabe esclarecer que o pesquisador responsável tem a obrigação de apresentar relatório dos resultados da pesquisa deste projeto ao CEP na data máxima de 25/08/2009, sendo que o não cumprimento deste prazo resultará no impedimento do pesquisador responsável submeter novos projetos de pesquisa para análise neste CEP.

Vitória 18 de Agosto de 2008

Mary Lee dos Santos
Coordenadora Adjunta do
Comitê de Ética em Pesquisa
(CEP-EMESCAM)

Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória - EMESCAM
Av. Nossa Senhora da Penha, 2190, Santa Luiza - Vitória - ES - CEP: 29045-402
Tel.: (27) 3334-3500 - www.emescam.br

1- A HISTÓRIA DO DNA

Em 1859, Gregor Mendel, tinha terminado uma série de experiências com ervilhas. Suas observações estavam relacionadas com o descobrimento da “nuclein”. Mendel podia mostrar que determinados traços nas ervilhas, tais como sua forma ou cor, foram herdados em blocos diferentes. Estes blocos são o que hoje nós chamamos de genes.

Embora a hipótese de que os genes são feitos de proteínas fosse amplamente aceita na primeira metade do século, aqueles que a apoiavam estavam cientes de que não tinham uma evidência experimental sólida para sua opinião. Em 1865, Gregor Mendel, consegue publicar o seu trabalho sobre experimentos com ervilhas em que propõe as leis da hereditariedade e supõe que as características hereditárias são transmitidas em unidades

Em 1868, quase um século antes que o prêmio Nobel foi concedido a Watson, Crick e Wilkins, um jovem médico suíço chamado Friedrich Miescher, isolou algo que ninguém tinha visto antes no núcleo das células. Ele chamou o composto de “nuclein”, hoje chamado de ácido nucléico.

A necessidade de uma identificação experimental do material genético cresceu bastante durante o final da década de 1930, quando gradualmente tornou-se aparente que o DNA, em vez de ser uma simples molécula inadequada como material genético, era na verdade um longo polímero e, como as proteínas, poderiam existir em um número quase infinito de formas variáveis.

Se tanto a proteína quanto o DNA satisfaziam a necessidade fundamental ao material genético, e ambos estão presentes nos cromossomos, então de que eram feitos os genes? Dois experimentos cruciais finalmente levaram à elucidação de que o material genético era o DNA e não a proteína. O primeiro destes experimentos foi a identificação da natureza química do *princípio*

transformante, uma substância que pode alterar a bactéria *Streptococcus pneumoniae*, de uma forma para a outra, descoberto por Frederick Griffith.

Porém, o próprio Griffith não tentou identificar o que seria o principio transformante, este trabalho foi feito por Oswald Avery e seus colaboradores, no Rockefeller Institute de Nova Iorque.

Em 1882, o alemão Walter Flemming descobre corpos com formato de bastão dentro do núcleo das células, que denomina "cromossomas".

Na época de 1900, um grupo de pesquisadores, formado por um holandês Hugo de Vries, um alemão Carl Correns e o austríaco Erich Tschermak von Seysenegg chegam de forma independente aos resultados de Mendel sobre as leis da hereditariedade.

Dois anos depois, em 1902, um norte-americano chamado Walter Sutton e um alemão Theodor Boveri dão início à teoria cromossómica da hereditariedade.

Não muito longe disso, em 1909, o dinamarquês Wilhelm Johannsen introduz o termo "gene" para descrever a unidade mendeliana da hereditariedade. Utiliza os termos "genótipo" e "fenótipo" para diferenciar as características genéticas de um indivíduo de sua aparência externa.

Em 1915, o norte-americano Thomas Hunt Morgan e outros publicam o livro "O Mecanismo da Hereditariedade Mendeliana", no qual relatam experimentos com drosófilas e mostram que os genes estão linearmente dispostos nos cromossomos.

Em meados de 1940, os membros da comunidade científica estavam cientes que o DNA era a mais provável “molécula da vida”. Eles sabiam também que no DNA participavam quantidades diferentes das quatro bases, adenina, timina, guanina e citosina (geralmente abreviado A, T, G e C), descoberto por

Erwin Chargaff, mas ninguém tinha idéia de como poderia ser a estrutura da molécula.

A fim de decifrar a estrutura do DNA, duas partes distintas de informação necessitavam ser unidas. Para resolver a questão, Watson e Crick usaram a modelagem baseados em todo o tipo de informação disponível à época. Certamente, o modelo tinha que obedecer às leis da química, o que significava que, se um polinucleotídeo fosse espiralado ou pregueado, os diversos átomos não poderiam ser colocados muito próximos uns aos outros, e quaisquer novas ligações químicas que fossem postuladas precisariam existir entre átomos com distâncias apropriadas entre si.

Watson e Crick usaram modelos da vara-esfera para testar suas idéias na possível estrutura do DNA. Outros cientistas usaram métodos experimentais. Entre eles estavam Rosalind Franklin e Maurice Wilkins, que usavam a difração de raio X para compreender a estrutura física da molécula do DNA .

Ao irradiar com o raio-X qualquer tipo de cristal, os raios invisíveis saltam fora da amostra. Os raios criam então modelos complexos na película fotográfica. Olhando os modelos, é possível decifrar indícios importantes sobre as estruturas que compõem o cristal, algumas moléculas biológicas, tais como o DNA, formam cristais se tratados adequadamente.

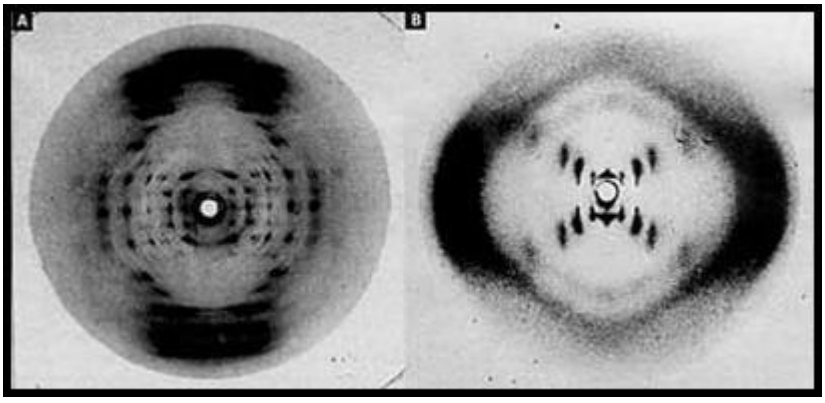

Figura 1 - Foto da difração do raio-X da molécula de DNA. Franklin descobriu que, variando a umidade da preparação, era possível obter uma figura de difração que indicava a existência de uma estrutura helicoidal alongada (B), ao contrário dos resultados obtidos com a forma desidratada, mais curta e compacta (A).

Em 1944 o cientista americano Oswald Avery finalmente provou que o princípio transformante era o DNA, ele publicou o seu trabalho no auge da Segunda Guerra Mundial e apenas 4 dias antes do Dia D. Ao ler o trabalho hoje em dia, não temos dúvida sobre a confiabilidade dos resultados ou a validade das conclusões. O trabalho, entretanto, não convenceu a comunidade científica de que os genes eram feitos de DNA. Muitos biólogos, especialmente na Europa, somente viram o trabalho vários anos após sua publicação, e outros que estavam cientes do trabalho ainda continuaram céticos. Talvez, como ocorreu com Mendel, os cientistas daquele tempo não estivessem preparados para esta idéia totalmente nova. Era necessária uma segunda identificação experimental independente do material genético.

A sentença “Esta estrutura tem novas características que são de considerável interesse biológico” pode ser uma das declarações mais famosas da ciência. Apareceu em abril de 1953, no artigo científico onde James Watson e Francis Crick apresentaram a estrutura de dupla hélice do DNA, a molécula que carrega a informação genética de uma geração à outra.

Foi à famosa “fotografia 51” de Franklin que revelou finalmente a estrutura helicoidal do DNA para Watson e Crick em 1953. Este retrato do DNA que tinha sido cristalizado sob circunstâncias úmidas mostra um X no meio da molécula. O modelo indicava uma estrutura helicoidal.

O cientista Linus Pauling estava ansioso para resolver o mistério da forma do DNA. Em 1954 ele ganhou o prêmio Nobel de Química por seu trabalho em ligações químicas e a estrutura das moléculas e dos cristais. No início de 1953 tinha publicado um artigo onde propôs uma estrutura triplo-helicoidal para o DNA. Watson e Crick tinham trabalhado também previamente em um modelo triplo-helicoidal, em 1951. Mas sua teoria estava errada. Seu erro foi baseado em recordações de uma conversa com Rosalind Franklin, onde ela relatou que tinha estabelecido o índice de água do DNA usando métodos cristalográficos do raio X. Mas Watson não fez anotações. Recordou os números incorretamente.

Nove anos mais tarde, em 1962, eles ganharam o prêmio Nobel de medicina com Maurice Wilkins, por resolver um dos mais importantes de todos os enigmas biológicos. Meio século mais tarde, novas implicações importantes desta contribuição à ciência estão ainda esclarecendo-se. O trabalho de muitos cientistas preparou o caminho para a exploração do DNA.

O mistério de emparelhamento de bases tinha sido resolvido em parte pelo bioquímico Erwin Chargaff alguns anos antes. Em 1949 mostrou que organismos com quantidades diferentes de DNA, apresentavam uma relação de proporcionalidade entre a adenina e a timina. O mesmo acontecia para o par de citosina e guanina. Por exemplo, o DNA humano contém aproximadamente 30% de adenina e 30% de timina; 20% de guanina e 20% de citosina (Figura 2).

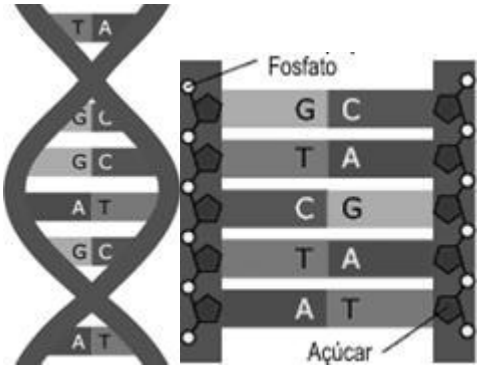

Figura 2- Emparelhamento de bases.

No dia 25 de abril de 1953, a revista Nature publica um artigo científico escrito por Watson e Crick. Descrito: “Não escapou de nossa observação que o pareamento específico que temos postulado sugere um possível mecanismo de cópia para o material genético”. Esta era certamente uma descoberta no estudo de como o material genético passa da geração à geração. Uma vez que o modelo foi estabelecido, sua mera estrutura sugeriu que o DNA era certamente o portador do código genético e assim a molécula chave da hereditariedade, do desenvolvimento da biologia e da evolução. O pareamento específico de bases permite a cópia perfeita da molécula, sendo essencial para a hereditariedade. Durante a divisão da célula, a molécula do DNA pode dividir-se em duas partes.

Uma molécula nova é formada de cada metade, devido ao pareamento que produz duas cópias idênticas.

Este conhecimento de como o material genético é armazenado e copiado causou uma maneira nova de olhar e de manipular os processos biológicos, chamado “biologia molecular”. Com a ajuda das enzimas de restrição (moléculas que cortam o DNA em tamanhos particulares) partes de DNA podem ser cortadas ou introduzidas em lugares diferentes.

Na ciência básica, novas técnicas foram desenvolvidas para compreender melhor o papel de todos os diferentes genes dos seres humanos e animais. Os cientistas puderam também introduzir fragmentos novos do DNA nas células onde faltam partes particulares de genes ou de genes inteiros. Com este DNA novo, a célula torna-se capaz de produzir produtos do gene que não poderia fazer antes. A esperança é que, no futuro, as doenças que surgem devido à falta de uma proteína particular poderiam ser tratadas por este tipo de terapia gênica.

Muitas pessoas têm discutido se Rosalind Franklin não mereceria ter sido agraciada com o prêmio Nobel, visto que seus dados experimentais forneceram uma parte muito importante da evidência para definir a estrutura do DNA.

Rosalind Franklin morreu em 1958. Como regra geral, somente as pessoas vivas são indicadas para o prêmio Nobel. Mas ela poderia ter sido nomeada enquanto ainda estava viva. Os arquivos do Nobel, que contêm entre outras coisas os nomeados ao prêmio, são seguramente guardados. Somente depois que um prêmio particular tenha sido concedido, os arquivos a respeito dos nomeados são liberados.

Neste mesmo ano, em 1958, os norte-americanos Matthew Meselson e Franklin Stahl confirmam a hipótese feita por Watson e Crick de que o DNA replica-se de maneira semiconservativa.

Somente em 1972, o norte-americano Paul Berg obteve moléculas de DNA recombinante, unindo DNA de diferentes espécies e inserindo esse DNA híbrido em uma célula hospedeira.

Três anos mais tarde, em 1975, um grupos de pesquisa desenvolveram métodos de seqüenciamento de DNA.

Em 1976, foi criada a primeira companhia de engenharia genética, a Genentech.

Depois de inúmeros experimentos, em 1980, a Suprema Corte dos EUA decide que formas de vida alteradas podem ser patenteadas.

No ano de 1982, o primeiro animal (camundongo) transgénico é obtido nos EUA.

Três anos, em 1983, depois que a suprema Corte dos EUA decide que formas de vida alteradas podem ser patenteadas, a Companhias nos EUA conseguem obter patentes para plantas geneticamente modificadas. É mapeado nos EUA o primeiro gene relacionado a uma doença, um marcador da doença de Huntington encontrado no cromossoma 4.

Em 1985, um Inglês chamado Alec Jeffreys consegue descrever a técnica de identificação que ficou conhecida como "impressão digital" por DNA.

Os NIH dos EUA aprovam directrizes gerais para a realização de experimentos com terapia genética em seres humanos.

Nem um ano depois, no início de 1986, são testadas em campo pela primeira vez, nos EUA e na França as plantas de tabaco geneticamente modificadas para se tornarem resistentes a herbicida.

No ano de 1988, nos EUA, Philip Leder e Timothy Stewart obtêm primeira patente para um animal geneticamente modificado, um camundongo.

Em 1989, foi criado nos EUA pelo Instituto Nacional para Pesquisa do Genoma Humano (NHGRI), chefiado por James Watson, a determinação da sequência do DNA que compõe os cromossomas humanos.

No início do ano de 1994, foi liberada o primeiro alimento, o tamate, geneticamente modificado cuja venda é aprovada pela FDA.

Em 1995 , é obtida a primeira sequência completa de DNA de um organismo de vida livre, a bactéria Hemophilus influenzae.

Um marco para a história genética, foi em 1997, com o nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero clonado a partir de uma célula de um animal adulto pelo Instituto Roslin (Escócia). Mapa genético completo do camundongo.

Em 2000, pesquisadores do consórcio público Projeto Genoma Humano e da empresa privada norte-americana Celera anunciam o rascunho do genoma humano. No Brasil, pesquisadores paulistas anunciam o seqüenciamento do genoma da bactéria Xylella fastidiosa, a causadora da doença do amarelinho em cítricos. O artigo foi destacado na capa da revista "Nature".

No dia 12 de Fevereiro de 2001, é anunciada a publicação da análise da sequência do genoma humano.

Em 2003, foi realizado a conclusão parcial da análise da sequência do genoma humano (PGH).

2- A MOLÉCULA DE DNA

A estrutura da molécula de DNA foi descrita conjuntamente pelo americano James Watson e pelo britânico Francis Crick em 7 de março de 1953, e esta pesquisa lhes valeu o Prémio Nobel de Fisiologia, em 1962, juntamente com Maurice Wilkins.

Koolman (1996) define o DNA sendo um polímero de nucleotideos unidos entre si por ligações por pontes de hidrogénio, nas células estão dispostos em dupla fita sendo que cada fita esta orientada em sentido contrario a outra, por este motivo é dito anti-paralelo, os nucleotideos são compostos por açúcar (pentose), radicais fosfatos e bases nitrogenadas. As bases nitrogenadas são:

- Adenina
- Guanina
- Citosina
- Timina

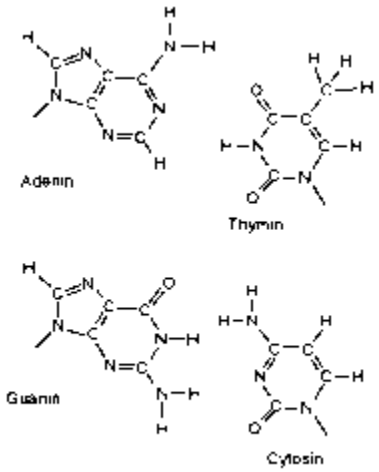

Figura 03: Complementariedade das bases

Griffiths *et al* (2001) descreveram que os nucleotideos de uma fita da molécula de DNA pode interagir com os nucleotides da fita complementar através de pontes de hidrogênio entre suas bases nitrogenadas, sendo que a Adenina se liga por meio de duas pontes de hidrogénio à Timina, e a Citosina se liga através de três pontes com a Guanina.

A replicação do DNA é semi-conservativa porque na formação de uma nova cadeia nucleotidica tem-se como referência uma cadeia nucleotidica molde (ou mãe) do DNA que está sendo replicado.

Watson (2007) definiu o ácido desoxirribonucleico (DNA) como sendo uma molécula orgânica que contém a "informação" que coordena o desenvolvimento e funcionamento de todos os organismos vivos. O DNA é responsável pela transmissão das características hereditárias de cada espécie de ser vivo.

3- PCR

Kleinfeld (2001) O processo de PCR foi descrito por Kary Mullis no final da década de 1980, tendo-lhe sido posteriormente, em 1993, atribuído o Prémio Nobel da Química pelo seu trabalho. Em 1989, a Hoffman La Roche & Perkin-Elmer Corporation patenteou este processo. O método PCR é usado habitualmente nos laboratórios de investigação médica e biológica para uma variedade de tarefas, como a detecção de doenças hereditárias, que é a identificação de "impressões digitais" genéticas, a construção de árvores filogenéticas (árvores de relação entre espécies), a clonagem de genes, testes de paternidade, exames para detecção de agentes patogênicos e etc.

4- EXTRAÇÃO COM CHELEX 100® (BIORAD)

A resina Chelex 100® como método de extração de DNA quela íons que são catalisadores na quebra do DNA, ligando a outras substâncias; como por exemplo, produtos derivados do sangue.

Esta resina contém estruturas esféricas que precisa ser colocada na solução das amostras a serem analisadas.

Trata-se de uma resina que promove a lise das hemácias, no entanto, a sua utilização é conta indicada para extrair material de polpa dentária, pois necessita do rompimento das membranas dos leucócitos, o que é promovida pela Proteinase K.

PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA EM CORPOS CARBONIZADOS ASSOCIADOS COM A DINÂMICA DO FOGO

Purves em 1975, no Canadá, na cidade de Ontário, já realizava incêndios experimentais, com o objetivo de analisar a ação do calor e como este fenômeno age sobre o corpo humano.

Embora, na época, ainda a ciência Forense estava fadada a ser confundida com “papa-defuntos” e houvesse pouca aplicação científica, jurídica e social na área de Identificação Humana em corpos carbonizados, Purves estudava fenômenos ocorridos num incêndio para determinar o comportamento de elementos construtivos ao fogo.

Em sua experiência produziu um incêndio em uma residência de dois pavimentos. Verificou-se o tempo de 42 minutos para chegar-se à máxima temperatura; 1.274℃ no andar térreo, sendo que no mesmo momento a temperatura do segundo andar não superou os 232℃. Quando o teto desabou, a temperatura do 2° andar elevou-se a 1.004℃, porém caiu a 870℃ três minutos depois.

Em outra pesquisa, Purves (1975) procurando reproduzir situações que cercam um incêndio, 1 litro de gasolina foi derramado em um dos cabos do farol de um carro, desenvolveu-se rápida e intensa chama, observando-se uma temperatura de 822℃ em seu interior.

Descreveu ainda que estas diversas circunstâncias, o modo de incidência e as variações de temperaturas apresentam efeitos correspondentes no corpo humano.

Assim é que alterações corpóreas ocorridas em desastres podem estar relacionadas com a exposição, ainda que por instantes, a altas temperaturas, como nos desastres naturais, como por exemplo, raios e erupções vulcânicas.

Melani (1999) descreve que os incêndios são fenômenos que dependem de um grande número de parâmetros, o que os torna essencialmente aleatórios.

Este autor ainda cita que devido à grande diversidade de fatores que podem influenciar na curva de incêndios reais, convencionou-se a adoção de curvas de incêndio padronizadas para servir como modelo para análises experimentais, utilizadas em estudos onde não haja parâmetros precisos relativos às temperaturas envolvidas.

O novo termo à dinâmica do fogo - do inglês *fire dynamics* - tem sido escolhido para descrever os assuntos relacionados com o comportamento do fogo em incêndios interiores.

No entanto, é comum encontrarmos também expressões como: química do fogo, ciência do fogo, entre outros.

Segundo Drysdale, citado por Melani (1999),

> "Como um processo, o fogo pode assumir muitas formas, que envolvem reações químicas entre substâncias combustíveis e o oxigênio do ar. O fogo, quando aproveitado corretamente, fornece grandes benefícios que podem suprir nossas necessidades industriais e domésticas, mas, quando descontrolado, pode causar danos materiais e sofrimento humano".

A partir da década passada, diversos estudos e pesquisas científicas internacionais, criaram uma compreensão mais ampla dos vários fenômenos associados com a dinâmica do fogo, especialmente, na parte relacionada com o comportamento dos incêndios em ambientes interiores.

Estes estudos permitiram aos cientistas uma maior consciência de como o fogo produz gases inflamáveis dentro das estruturas envolvidas e a dinâmica dos incêndios.

De forma geral, podemos dizer que o pesquisador do século XXI, a partir de agora, conquistou um melhor dimensionamento no processo de identificação humana em corpos carbonizados, permitindo muitas vezes dentro de um grau de confiabilidade científica conhecido, afirmar a identificação de vítimas submetidas à ação do fogo.