Proposta de um novo método de recuperação de DNA em mordidas de chiclete

J. de O. MUSSE*¹, W. C. V. BUCKER², V. REMUALDO³, J. A. M. MARQUES⁴, A. T. CORTE-REAL⁵, D. N. VIEIRA⁵, F. CORTE-REAL⁵

¹Departamento de Saúde, Área de Medicina, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil.

²Cirurgião-dentista, Especialista em Odontologia Legal, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

³Diretora do Laboratório Genolab, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

⁴Departamento de Saúde, Área de Enfermagem, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil.

⁵ Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

E-mails: musse_jo@hotmail.com, wernnerbucker@bol.com.br, vanessa@laboratorioyenolab.com.br, marques_jam@hotmail.com, a.cort.real4@gmail.com, dnvieira@fmed.uc.pt; fgoncalves@fmed.uc.pt

Jamilly de Oliveira Musse, Wernner Christian Vasconcelos Bucker, Vanessa Remualdo, Jeidson Antônio Morais Marques, Ana Teresa Corte-Real, Francisco Corte-Real, Duarte Nuno Vieira.

COMO CITAR O ARTIGO:

MUSSE, J.O.¹; BUCKER, W.C.V. ²;REMUALDO.V. ³; MARQUES, J.A.M⁴, REAL, A.T.C⁵ , REAL, F ⁶, VIEIRA, N.D.⁷ **Proposta de um novo método de recuperação de DNA em mordidas de chiclete.** URL: www.italo.com.br/portal/cepep/revista_eletronica.html. São Paulo SP, v.8, n.1, p. 13-25, jan/2018.

RESUMO

Marcas de mordidas encontradas em chicletes em cenas de crime constituem-se em evidências física e biológica utilizadas na identificação de suspeitos. Contudo, as técnicas empregadas na recuperação de DNA salivar podem alterar as características morfológicas das amostras. O objetivo deste trabalho foi propor um novo método de recuperação de DNA em mordidas de chicletes, visando a preservação das marcas de mordidas nesses. Dez chicletes foram mordidos por um pesquisador cujo perfil genético foi conhecido, sendo individualmente acondicionados em coletores estéreis com 10 ml de água destilada em temperatura ambiente e agitados no misturador de soluções tipo vórtex por 10 segundos. A extração do DNA foi realizada através do método fenol-clorofórmio e na quantificação utilizou o Kit Quantifiler[®] Human DNA (Applied Biosystem) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras apresentaram DNA suficiente para amplificação na Reação da Cadeia de Polimerase em tempo real (RT-PCR) com eletroforese capilar. O método de recuperação de DNA proposto por esse estudo minimiza a manipulação das amostras mostrando-se satisfatório e com potencial de utilização na identificação genética de suspeitos de marcas de mordida em chicletes. Contudo, estudos complementares são necessários para verificação do grau de preservação das características morfológicas das amostras submetidas a tal método.

Palavras-chave: marcas de mordidas; DNA; chiclete.

ABSTRACT

Bitemarks found in chewing gum at crime scenes are physical and biological evidences used to identify suspects. However, the techniques used in the salivary DNA recovery may modify the morphological characteristics of the samples. The goal of this paper is to propose a new DNA recovery method in gum bites, aim the preservation of these bite marks. Ten gum were bitten by a researcher whose genetic profile was known, being individually packaged in sterile collectors with 10 ml of distilled water at environment temperature and agitated on the vortex mixer solutions (Phoenix Lufenco) for 10 seconds. DNA extraction was perform using the phenol-chloroform method and the quantification used the Quantifiler® Human DNA Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. All samples showed sufficient DNA for amplification in real time polymerase chain reaction (RT-PCR) using capillary electrophoresis. The DNA recovery method proposed in this study minimizes the samples manipulation showing to be satisfactory and have potential to be use in genetic identification of bitemarks suspects in chewing gum. However, further studies are required to verify the preservation degree of the samples morphological characteristics of the samples subjected to such a method.

Keywords: bitemarks; DNA; chewing gum.

INTRODUÇÃO

Marcas de mordidas constituem-se em impressões dentais humanas ou animais resultantes de mordidas em pele, objetos e alimentos (KENNEDY et al., 2012; VERMA et al., 2014; GUPTA et al., 2014).

As marcas de mordidas são comumente encontradas em crimes violentos como homicídios, crimes sexuais, abuso infantil e crimes contra o patrimônio (KHARE et al., 2014; SAXENA et al., 2010; SILVA et al., 2007), sendo comum encontrar marcas de mordidas em alimentos como maçã, queijos, bolos, sanduíches, chocolate e chicletes (CORTE-REAL et al., 2013; MURUGANANDHANE, SIVAKUMAR, 2011).

Marcas de mordida têm sido aceitas em tribunais como evidência física e biológica da execução e autoria de crimes, uma vez que, além da evidência física dos dentes que produziram tais marcas, permitem a identificação biológica através de material genético deixado na saliva depositada sobre as mesmas (BERMAN et al., 2015; NUNES et al., 2015).

O registro e o estudo comparativo entre as marcas de mordidas encontradas na cena do crime e as recolhidas de um suspeito servem como método de identificação do mesmo (KENNEDY et al., 2012; VERMA et al., 2014). Contudo, a apresentação das marcas de mordidas depende, entre outros fatores, do artefato em essa se encontra, podendo apresentar diferentes níveis de distorção, o que pode comprometer a qualidade das amostras analisadas (BERMAN et al., 2015).

A identificação genotípica dos autores de crimes através do DNA salivar depositado nos objetos mordidos, mostra-se especialmente útil em situações em que a análise morfológica das marcas de mordida

encontra-se prejudicada devido à má qualidade física observada essas amostras (BOWERS, PRETTY, 2009; BERMAN et al., 2015).

A coleta de DNA em artefatos geralmente ocorre através da aplicação de tiras de fita de levantamento ou do emprego da técnica do duplo swab (SAXENA et al., 2010; ATA-ALI et al., 2014). No entanto, a utilização de tais técnicas pode alterar as características morfológicas das marcas de mordidas em chicletes.

Esse estudo teve por objetivo propor um novo método de recuperação de DNA em mordidas de chicletes, com um mínimo de manipulação do mesmo, visando a preservação das marcas de mordidas nesses.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra foi composta por 10 chicletes mascarados por um dos pesquisadores, tendo este o perfil genético conhecido. Todos os chicletes foram individualmente acondicionados em coletores plásticos estéreis previamente preenchidos com 10 ml de água destilada em temperatura ambiente. Após seis horas os mesmos foram agitados no misturador de soluções tipo vórtex, modelo AP 56 (Phoenix Lufenco) por 10 segundos. Em seguida, procedeu-se a extração do DNA pelo método orgânico (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico), tal como descrito por Coomey et al. (1994). Em seguida procedeu-se a quantificação utilizando o Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystem) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente a quantificação, as amostras foram submetidas a Reação da Cadeia de Polimerase em tempo real (RT-PCR) com eletroforese capilar. Para tal, foi utilizado o equipamento RT-PCR iQ[™]5 e o software iQ[™]5 Optical System, versão 2.1, ambos da Bio-Rad Laboratories. Como controle

positivo foi utilizado a saliva do autor das mordidas. O controle negativo foi composto pelos reagentes utilizados no Kit de quantificação. Todo o processo de extração e quantificação de DNA, assim como a PCR, foi realizado no Laboratório Genolab, Blumenau, Brasil, observadas todas as normas de biossegurança pertinentes.

RESULTADOS

Todas as 10 amostras que foram submersas em água destilada e submetidas ao vórtex para retirada da saliva depositada nos chicletes, foram analisadas e tiveram quantidade suficiente de DNA humano para serem submetidas e amplificadas na RT-PCR, conforme dados evidenciados na figura 1.

Figura 1 – Tabela de quantificação de DNA em ng/ml em amostras de chicletes mascarados, Blumenau, maio 2015*.

Amostras	Chicletes
1	6,73
2	5,72
3	7,09
4	4,97
5	5,46
6	4,97
7	5,76
8	5,90
9	6,42

10	5,68
Controle positivo	25,12
Controle negativo	Não amplificou

* Laboratório Genolab, Blumenau, Brasil.

DISCUSSÃO

A análise genética do DNA salivar encontrado em marcas de mordidas em alimentos tem sido utilizada para a identificação positiva ou exclusão odontolegal de suspeitos (SILVA et al., 2006; SWEET et al., 1997; KHARE et al., 2014; SWEET, HILDEBRAND, 1999), sendo comum encontrar marcas de mordidas em chicletes em cena de crime (ADAMOWICZ et al., 2014; LESSIG et al., 2006); razão pela qual optou-se por esse artefato. No entanto, as próprias características físicas do chiclete limitam a coleta de DNA salivar pelas técnicas usualmente empregadas, podendo haver alterações nas características das marcas de mordida encontradas, o que pode comprometer análises odontolegais posteriores (SIDERITS et al., 2010).

Nesse estudo, foi experimentado a recuperação de DNA através da imersão das amostras em água destilada, visando a preservação da estrutura morfológica das mordidas em cada amostra de chiclete. A agitação de cada amostra no vórtex teve por objetivo aumentar a quantidade de DNA em suspensão na água destilada, a fim de otimizar a extração de DNA pelo método de extração orgânico (fenol - clorofórmio - álcool isoamílico).

O método orgânico foi utilizado devido ao seu baixo custo e ao relativo alto grau de pureza do DNA obtido, além do fato de ser

considerado como padrão-ouro para extração de DNA, principalmente em amostras onde a quantidade de material biológico é questionável ou quando suspeita-se da presença de agentes inibidores da PCR (COMEY et al., 2004; BUTLER, 2012).

O processo de quantificação utilizado mostra-se indicado para amostras com aparente escassez de material genético. Soma-se a isso, o fato de possibilitar a identificação de 16 loci genômicos exclusivamente humanos, não sofrendo influência de possível contaminação de DNA bacteriano presente na saliva (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012) e estando em consonância com os padrões internacionais de identificação humana utilizados (MORRIS et al., 2015; INTERPOL, 2009).

A quantidade de DNA obtido em todas as dez amostras e no controle positivo possibilitou a amplificação e análise do DNA em RT-PCR. A não amplificação do controle negativo evidenciou que não houve contaminação do mesmo nos procedimentos realizados no experimento.

A utilização da RT-PCR com eletroforese capilar permitiu uma automação do processo de amplificação e análise do DNA, reduzindo o tempo de trabalho, possibilitando menor utilização de reagentes e menor risco de contaminação cruzada de cada amostra analisada, mostrando-se um método sensível e reprodutível o que aumenta a precisão e a acurácia da análise de DNA humano (RAPLEY, 2007; BALANCHANDER et al., 2015).

O método utilizado nesse estudo possibilita a recuperação de DNA humano e favorece a utilização de marcas de mordidas em chicletes em análises comparativas posteriores. Tais fatos justificam-se pela imersão das amostras em água destilada submetidas a vibração, o que minimiza a manipulação das amostras, diminuindo o risco de eventuais alterações morfológicas das mesmas.

CONCLUSÃO

O método de recuperação de DNA proposto por esse estudo minimiza a manipulação das amostras mostrando-se válido, sensível e reprodutível, sendo satisfatório e com potencial de utilização na identificação genética de suspeitos de marcas de mordida em chicletes. Contudo, estudos complementares são necessários para verificação do grau de preservação das características morfológicas das amostras submetidas a tal método.

REFERÊNCIAS

ADAMOWICZ, M. S., STASULLI, D. M., SOBESTANOVICH, E. M., BILLE, T. W. Evaluation of Methods to Improve the Extraction and Recovery of DNA from Cotton Swabs for Forensic Analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e116351, 2014.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Quantifiler® kits**: user's manual. Life Technologies Corporation, 2012.

ATA-ALI, J., ATA-ALI, F. Forensic dentistry in human identification: A review of the literature. **J Clin Exp Dent**, v. 6, n.2, p. 162-167, 2014.

BALANCHANDER, N.; BABU, N. A.; JIMSON, S.; PRIVADHARSINI, C.; MASTHAN, K. M. K. Evolution of forensic odontology: An overview. **J Pharm Bioallied Sci**, v.7, n.1, p. 176-180, 2015.

BERMAN, G.M.; FREEMAN, A., BRUMIT, P.; MANES, H.; WEEMS, R. A. **American Board of Forensic Odontology Diplomates Reference Manual**, Bellville Michigan, 2015.

BOWERS, C. M.; PRETTY, I. A. Expert Disagreement in Bitemark Casework. **Journal of Forensic Sciences**, v. 54, n.4, p. 915-918, 2009.

BUTLER, J. M. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing**. Academic Press: Maryland, 2012.

COMEY, C.T.; KOONS, B.W.; KATHRYN, M.S.; PRESLEY, W.; SMERICK, J. B.; SOBIERALSKI, C.A. et al. DNA Extraction Strategies for Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. **Journal of Forensic Sciences**, v. 39, p. 1254–1269, 1994.

CORTE-REAL, A.; SILVA, D.N.; CORTE-REAL, F.; ANJOS, M. J. Bitemarks in foodstuffs – An approach for genetic identification of the

bitter. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 4, p.340-341, 2013.

GUPTA, S.; AGNIHOTRI, A.; CHANDRA, A.; GRUPTA, O. P. Contemporary practice in forensic odontology. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 18, p. 244-250, 2014.

INTERPOL. **Interpol handbook on DNA data Exchange and practice: recommendations from the Interpol DNA monitoring expert group**. 2. ed. Lyon: Interpol, 2009.

KENNEDY, D. M; STANTON, J. A. L; GARCIA, J.A; MASON, C.; RAND C. J. et al. Microbial analysis of bite marks by sequence comparison of streptococcal DNA. **PLoS ONE**, v. 7, p. e51757, 2012.

KHARE, P.; RAJ, V.; CHANDRA, S.; AGANWAL, S. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. **J Dent Forensic Sci**, v. 6, n.2, p. 81-5, 2014.

LESSIG, R.; WENZEL, V.; WEBER, M. Bite mark analysis in Forensic routine case work. **Excl J**, v.5, p. 93-102, 2006.

MORRIS, M.; MYHAND, M.; YOUNG, H.; CHANNELL, K.; MORAN, C.; BLACK, R. **CODIS quality manual**. The Arkansas State Crime Laboratory, 2015.

MURUGANANDHANE, J.; SIVAKUMAR, G. Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry. **J Dent Forensic Sci.**, v. 3, n.1, p. 38-45, 2011.

NUNES, L. A. S.; MUSSAVIRA, S.; BINDHU, O. S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systemic review. **Biochemia Medica**, v. 25, n,2, p. 177- 92, 2015.

RAPLEY, R.; WHITEHOUSE, D. **Molecular Forensics**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

SAXENA, S.; SHARMA, P.; GUPTA, N. Experimental studies of forensic odontology to aid in the identification process. **J Forensic Dent Sci.**, v.2, n,2, p. 69-76, 2010.

SIDERITS, R.; BIRKENSTAMM, J.; KHANI, F.; SADAMIN, E.; GODYN, J. Three-Dimensional Laser Scanning of "Crime Scene Gum" as a Forensic Method Demonstrating the Creation of Virtual Tooth Surface Contour and Web-Based Rapid Model Fabrication. **Forensic Science Communications**, v, 2, n. 12, p. 4, 2010.

SILVA, R. H. A.; MUSSE, J. O.; MELANI, R. F. H.; OLIVEIRA, R. N. Human bite mark identification and DNA technology in forensic dentistry. **Braz J oral Sci**, v. 5, n. 19, p. 1193-1197, 2006.

SILVA, R. H. A., SALES-PERES, A.; OLIVEIRA, R. N.; OLIVEIRA, F. T., SALES-PERES, S. H. C. Use of DNA technology in Forensic Dentistry. **J Appl Oral Sci**, v. 17, n.3, p. 156-61, 2007.

SWEET, D.; HILDEBRAND, D. Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: a case report. **Int. J. Legal Med.**, v. 112, n.3, p. 201-203, 1999.

SWEET, D.; LORENTE, M.; LORENTE, J. A.; VALENZUELA, A.; VILLANUEVA, M. D. Na improved method to recover saliva from human skin: The double swab technique. **J Forensic Sci**, v. 42, p. 320-322, 1997.

VERMA, A, K.; KUMAR, S.; RATHORE, S.; PANDEV, A. Role of dental expert in forensic odontology. **J Nat Maxillofac Surg**, v.5, p. 2-5.