



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DUARTE NUNO RODRIGUES DA SILVA

**COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO, NUMA MORDEDURA, PARA
IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA – COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS**

Trabalho de I&D

ÁREA CIENTÍFICA DE MEDICINA DENTÁRIA FORENSE

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

ANA TERESA CORTE-REAL GONÇALVES

FRANCISCO CORTE-REAL GONÇALVES

JULHO 2013

TRABALHO FINAL DO 5.º ANO DE MEDICINA DENTÁRIA COM VISTA A ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO, NUMA MORDEDURA, PARA IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA – COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS

AUTORES

Aluno: Duarte Nuno Rodrigues da Silva

Endereço: Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

Av. Bissaya Barreto, Bloco de Celas 3000-075, Coimbra

Endereço electrónico: duarte.nrds@gmail.com

Afiliação: Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Orientador: Ana Teresa de Carvalho Martins Corte-Real Gonçalves

Afiliação: Doutoramento pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Co-orientador: Francisco Manuel de Andrade Corte-Real Gonçalves

Afiliação: Doutoramento com Agregação pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	6
MATERIAIS E MÉTODOS	9
CARATERIZAÇÃO DA AMOSTRA	9
COLHEITA DO MATERIAL GENÉTICO	9
EXTRAÇÃO DO ADN.....	11
QUANTIFICAÇÃO DO ADN.....	12
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	12
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	16
CONCLUSÕES	20
AGRADECIMENTOS	21
BIBLIOGRAFIA	22
ANEXOS	25
ANEXO I – TABELA DE ABREVIATURAS	26
ANEXO II – ÍNDICE DE FIGURAS	27
ANEXO III – ÍNDICE DE TABELAS	28
ANEXO IV – CONTRIBUIÇÃO PESSOAL.....	29
ANEXO V – ACEITAÇÃO DO POSTER	30
ANEXO VI – POSTER.....	31

RESUMO

Introdução e Objetivos: Evidências biológicas em alimentos parcialmente mordidos, deixados numa cena de crime, podem conter informação genética que permita determinar um perfil genético. O objetivo deste trabalho é estudar duas técnicas diferentes de obter ADN em géneros alimentares.

Material e Métodos: 14 maçãs foram lavadas com hipoclorito de sódio antes de serem mordidas por dois operadores cujo perfil genético era conhecido. Depois, as peças de fruta foram armazenadas e deixadas a secar à temperatura ambiente durante 24 horas. Cada maçã foi primeiramente dividida parcialmente na vertical em duas partes de igual tamanho. Numa das duas, o ADN foi colhido no centro e na outra foi colhido na periferia da mordedura. Ambas as colheitas foram executadas pelo método de dupla zaragatoa. A extração do ADN foi realizada através da utilização do kit PrepFiler[®] Express BTA (Applied Biosystems, 2008) de acordo com as recomendações do fabricante e a sua quantificação foi executada com o kit Quantifiler[®] Duo (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os resultados associados ao estudo foram inseridos num ficheiro do Microsoft Excel 2010[®] e analisados com o *software* SPSS Statistics[®] versão 19.

Resultados e Discussão: Os valores da quantificação situaram-se entre 0,0219 ng/ μ L e 1,7054 ng/ μ L e a hipótese nula foi rejeitada ($p < 0,05$). A diferença entre as duas técnicas foi provada. Em pele humana, assim como em estudos prévios com alimentos, executa-se o procedimento de dupla zaragatoa no centro da mordedura, isolando o ADN apenas do interior da mordedura e os resultados, apenas de saliva, eram baixos. Esta nova condição experimental de colheita à periferia das maçãs permitiu resultados, quantitativos e qualitativos, estatisticamente superiores pela recolha de células epiteliais dos lábios e escapando à atividade enzimática da maçã.

Conclusão: A técnica da periferia revela-se como a técnica de eleição, para se obter maior quantificação de ADN, na mordedura da maçã.

PALAVRAS-CHAVE: Mordedura, perfil genético, identificação

ABSTRACT

Introduction and Aims: *Biological evidences from partially eaten food, left in a crime scene, may contain genetic information of the biter that can generate a DNA profile. The aim of this paper is to study two different methods to obtain DNA on foodstuff.*

Material and Methods: *14 apples were cleaned with sodium hypochlorite before being bitten by two operators whose genetic profile was known. Then, they were stored and allowed to dry at environment temperature for 24 hours. Each bitten apple had been previously partially divided vertically in to two equal size parts. In one of the two areas, DNA was collected from the inner and in the other part from the periphery of the bitemark. For both of them the double swab technique was performed. DNA extraction was executed using the PrepFiler™BTA kit (Applied Biosystems, 2008) according to the manufacturer's instructions and its quantification was realized with the Quantifiler™Duo kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The results, associated with this study were inserted in Microsoft Excel 2010™ and analyzed with SPSS Statistics™ 19th version.*

Results and Discussion: *Quantification values were between 0,0219 ng/μL to 1,7054 ng/μL and the null hypothesis was rejected ($p < 0,05$). The difference between the two methods was proved. In human skin, as well as in previous studies on foodstuff, DNA was just collected from the inner part of the bitemark using this method and extraction results, only of saliva, were lower. This new experimental condition of collecting DNA at periphery allowed, in quantity and quality, statistically better results through collection of epithelial lip cells that escaped from apple enzymatic activity.*

Conclusion: *The periphery technique reveals itself as the technique of choice in obtaining greater quantification of DNA in the bitemark of the apple.*

KEYWORDS: *Bitemark, genetic profile, identification*

INTRODUÇÃO

A investigação numa cena de crime passa pela ligação entre o suspeito e a vítima através das evidências encontradas. A análise de marcas dentárias, em pele ou objetos inanimados, é um método adequado para relacionar os intervenientes e estabelecer uma identificação positiva (1,2).

Desde 1954, nos Estados Unidos da América (EUA), as marcas dentárias são utilizadas como evidências periciais (3). O primeiro relato da sua utilização como evidência num homicídio reporta-se a 1870, pela análise morfológica entre os dentes do suspeito e a lesão produzida pelos mesmos, no braço da vítima (1).

No século XX, final da década de 90, foi referenciada a análise genética de vestígios biológicos, em situações envolvendo as marcas dentárias, em pele (designadas por mordidas). Desde então, os tribunais têm vindo a aceitar estes métodos de análise, morfológica e genética, como complementares para estabelecer uma validada ligação entre o suspeito e a vítima (3). Pelo exposto, as mordeduras humanas constituem, atualmente, uma evidência quer física, quer biológica (4,5).

Destacamos na uniformização de critérios da metodologia de análise das marcas de mordida, o primeiro *workshop* da *American Board of Forensic Odontology* (ABFO) sobre o tema, em 1984 – momento crucial para o estabelecimento de *guidelines* (linhas de orientação) conferindo a esta análise um relevante contributo médico-legal (6).

Considerando que a mesma dentadura pode originar variações nas marcas deixadas em pele ou objetos, o padrão recai sobre dois arcos em forma de “U” simetricamente opostos e com um espaço a separá-los nas bases (1,6). Frequentemente, são encontradas em indivíduos, sujeitos a crimes violentos de rapto, homicídio, abuso infantil ou sénior e em casos de violência doméstica. Tanto podem ser da autoria do agressor, como das vítimas (1,7–9).

As marcas dentárias podem ser encontradas em objetos (designadas por mordeduras) inanimados do quotidiano, por exemplo alimentos trincados (maçãs, queijos, bolos ou sanduíches). As mordeduras podem permitir a caracterização morfológica dos dentes do sujeito que as infligiu, bem como, possibilitar a colheita de vestígios biológicos na superfície do objeto. O procedimento de colheita de amostra para a genotipagem destaca-se nas situações em que a análise morfológica da mordedura está inviabilizada por má qualidade física (2,4,6–12).

Durante o ato de morder, até serem armazenadas ou durante o exame e registo de evidências podem ocorrer distorções. Por outro lado, a deformação do material pode ocorrer pelas características da sua composição, pelo calor ou traumatismo, tornando a interpretação morfológica difícil ou mesmo inviável (4,6,9,13).

Face a registos físicos de baixa qualidade, com pouca ou nenhuma validade forense, o património genético individual é o elemento de identificação (5,7).

A molécula de ADN presente na célula – no núcleo e na mitocôndria –, possibilita o acesso a informação para caracterizar a evidência biológica deixada na sequência de um crime (11,12). O material genético pode ser obtido de distintos componentes biológicos, nomeadamente da saliva e células epiteliais, da mucosa oral e da língua (2,4,7,9). Comparativamente ao dente, as características dos marcadores genéticos que permitem a identificação, existem desde o nascimento do indivíduo e permanecem inalteráveis ao longo da sua vida (4). O poder discriminatório de cada marcador autossómico, comparativamente ao ADN mitocondrial, é um fator considerado na expressividade do resultado. Por outro lado, o resultado do somatório dos marcadores utilizados na identificação deve permitir uma combinação, *per si*, suficientemente discriminatória, com a atribuição de um valor numérico de probabilidade de identificação. Esta identificação é realizada com os perfis existentes numa base de dados ou perante um perfil conhecido, por exemplo de um familiar (14,15).

Os microssatélites ou STR (*short tandem repeat*) são marcadores a amplificar para uma identificação (9,13,16). A análise molecular de uma amostra é baseada no conhecimento da sequência dos fragmentos de ADN, interpretando semelhanças ou diferenças dos *loci* polimórficos (2,14).

Os estudos apontam uma relação inversa entre o tamanho dos *loci* e o sucesso na genotipagem (9,11–14,16). Ocasionalmente, surgem mesmo situações de extrema degradação em que não é possível obter material autossómico de qualidade. Nestes casos, pode-se analisar as regiões híper-variáveis do ADN mitocondrial que permanecem inalteráveis em situações forenses externas. Porém, é menos informativa, porque apenas transmite informação da linhagem materna do indivíduo (13,14).

Os avanços tecnológicos permitem, de facto, contornar algumas dificuldades do sucesso da identificação genética, em situações forenses extremas, como por exemplo a escassa quantidade ou degradação da evidência biológica (2,14).

A quantidade de ADN colhida da amostra é importante em todas as etapas subsequentes (17). Peter Gill e colaboradores, em 2000, referem que 1 ng de ADN, isto é,

menos de um bilionésimo de grama, é o valor de quantificação que delimita uma amostra segura, cuja genotipagem permite a identificação, de uma amostra vestigial, em que a validação de todos os marcadores para a identificação pode não ser possível (9,18).

Na colheita da amostra para a análise genética, a partir de objetos inanimados, destacamos dois métodos relatados na bibliografia: a aplicação de tiras de fita adesiva e a aplicação de esfregaço por zaragatoa do centro da mordedura. O procedimento da dupla zaragatoa, da autoria de David Sweet, consiste na utilização de duas zaragatoas, a primeira húmida e a segunda seca (7,8).

Este trabalho pretende comparar duas técnicas de colheita de material, na obtenção da maior quantidade de ADN. Ambas as técnicas foram executadas no mesmo alimento aplicando o método de dupla zaragatoa. Propomo-nos correlacionar a dinâmica da mordedura com a obtenção dos vestígios biológicos para uma identificação genética.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caraterização da amostra

De um universo de 14 maçãs (Gala, categoria II, Continente®) foram colhidas 28 amostras.

As peças de fruta foram lavadas com uma solução hipoclorito a 50%. Em cada maçã foi efetuado um corte parcial e retirada uma secção fina, de modo a orientar a linha média dentária (fig. 1). Cada maçã foi mordida com arrancamento de material, orientando a linha média interincisiva no corte efetuado (fig. 2). Cada mordedura foi efetuada com um intervalo de uma hora.



Figura 1 - Maçã à qual foi já retirada uma secção fina a orientar a linha média dentária.



Figura 2 - Mordedura com arrancamento de material, orientando a linha média interincisiva.

As maçãs foram deixadas à temperatura ambiente, em local seco, por um período superior a 24 h. Posteriormente, foram numeradas de 1 a 14 e marcadas à direita da mordida com a letra C (para colheita da amostra no centro da mordedura) e à esquerda P (para recolha na periferia da mordedura).

Colheita do material genético

Numa câmara de fluxo laminar (10) procedeu-se à preparação da amostra para a colheita e extração do ADN (8).

Tendo por base o procedimento *double swab* de Sweet (1,6,7,9,11,17,19), o lado C de cada maçã, foi raspado em ziguezague com uma zaragatoa esterilizada e humedecida em água desionizada efetuando pressão média sobre o centro da mordedura (fig. 3), sendo

esta zaragatoa descartada; a mesma superfície foi seguidamente raspada por uma zaragatoa seca da qual, no final, foram cortados pequenos fragmentos para o interior das colunas de colheita (Lyses Columns, PrepFiler[®]) (fig. 5) (20,21).



Figura 3 - *Double swab technique* sobre o centro da mordedura (colheita da amostra C).



Figura 4 - *Double swab technique* à periferia da mordedura (colheita da amostra P).

No lado P de cada uma das maçãs procedeu-se, sincronizadamente, à colheita na periferia da mordedura, pelo mesmo procedimento que no lado C, correspondente (fig. 4).

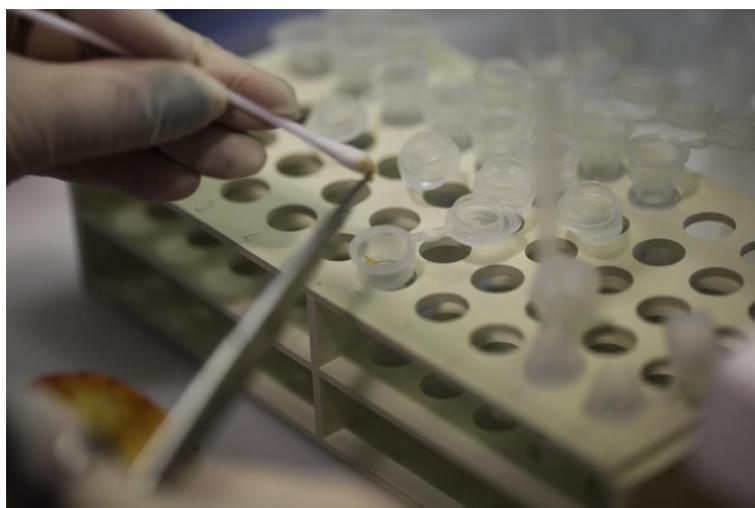


Figura 5 - Corte de pequenos fragmentos da zaragatoa seca (segunda da *double swab technique*) para as colunas de colheita.

Cada uma das colunas de colheita foi colocada sobre o seu tubo (Spin Tubes, PrepFiler[®]) previamente identificado com a data, o operador, o número da maçã (1 a 14) e o lado da recolha (C ou P) (20,21).

Extração do ADN

Esta etapa foi executada com o Kit PrepFiler® Express BTA (Applied Biosystems, 2008) (20) para o *robot* AutoMate Express Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems, 2010) (fig. 6) (11), seguindo-se as recomendações do fabricante.

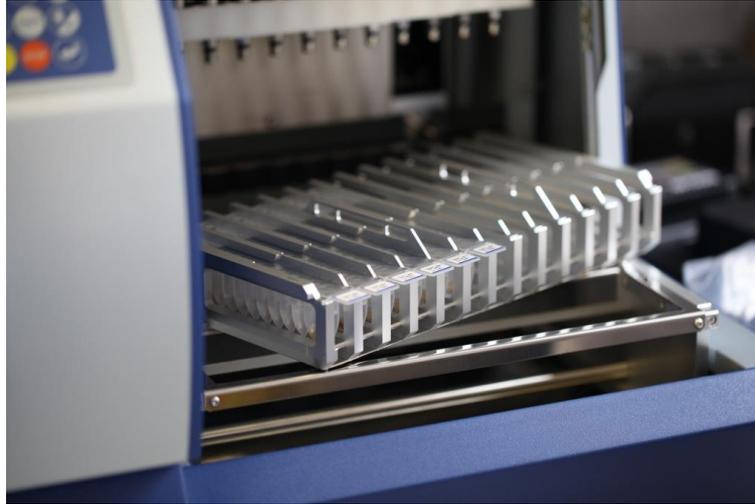


Figura 6 - Kit PrepFiler® Express BTA introduzido no *robot* AutoMate Express Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems).

Foi preparada uma *reaction mix*: de tampão de lise (Lysis Buffer, PrepFiler®), Proteinase K (PrepFiler®) e DTT (PrepFiler®). O primeiro reagente proporciona as condições ideais de trabalho, para que subsequentemente ocorra a lise celular pelos outros dois (4,9,10).

A cada tubo, com a coluna que continha fragmentos de corte de zaragatoa, foi adicionado 230 µL daquela solução de lise para extração do ADN (8). Da mesma maneira se adicionou a *reaction mix* a um tubo, constituindo assim o controlo negativo. Depois, fizeram-se 3 controlos positivos com ADN de fontes conhecidas (10).

As amostras foram centrifugadas a 750 rpm, num termoagitador a 56°C, durante 40 minutos. Esta etapa pretende o desprendimento das células das fibras da zaragatoa e a lise celular (8,11).

Subsequentemente, distribuíram-se os 32 tubos pelo *robot* utilizando o kit PrepFiler® Express BTA (*Bone, Teeth, and Adhesive-containing substrates*) (21) e, escolheu-se o programa adequado para o efeito (fig. 7 e fig. 8).

No *robot* AutoMate Express Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems) uma solução tampão começa por homogeneizar a amostra. O método de extração tem por

princípio a ligação de partículas magnéticas ao ADN. O tamanho destas partículas proporciona uma maior área de superfície disponível para captar as moléculas de ADN que vão ficando disponíveis durante o processo de adição e remoção de soluções, num único tubo (11).



Figura 7 - Pontas de titulação distribuídas pela fileira T2 do *robot*. As amostras celulares lisadas foram depois distribuídas pela fileira S.

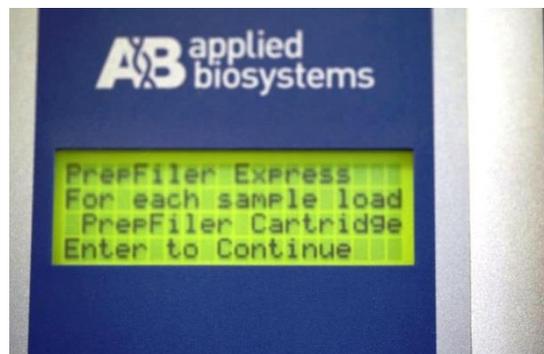


Figura 8 - Seleção do programa de extração associado ao kit PrepFiler[®] Express BTA (Applied Biosystems).

Após a extração, os tubos com as amostras foram armazenados em congelador a -20°C.

Quantificação do ADN

Esta etapa foi executada com o kit Quantifiler[®] Duo (Applied Biosystems – Foster City, CA, USA), responsável por assegurar a quantificação do ADN através da técnica qPCR-RT, seguindo-se as recomendações do fabricante.

Adicionou-se a *Reaction Mix* – com todos os reagentes para a PCR, incluindo a Taq DNA polimerase – aos *primers* (iniciadores) e, a mistura foi colocada num vórtex para homogeneizar (7,10). Em cada poço foram distribuídos 23 µL daquela solução. O tabuleiro com os poços foi, então, selado com película adesiva transparente para que o aparelho pudesse fazer a quantificação em cerca de 1,5 h.

Análise Estatística

A análise de resultados foi executada a partir de um ficheiro do Microsoft Excel 2010[®] e através do *software* SPSS Statistics[®] versão 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A diferença entre os grupos de amostras foi analisada com o Teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas, já que a distribuição amostral dos dados apresentava grandes desvios à normalidade, principalmente na amostra C. Os testes foram avaliados ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Foram colhidas no total 28 amostras a partir de 14 maçãs: 14 amostras C e 14 amostras P.

Com o método de dupla zaragatoa, de cada peça de fruta obtiveram-se duas amostras biológicas de saliva, para isolamento do ADN, por ser diferente a técnica de colheita de um lado e outro da mordedura.

Para a quantificação do ADN em cada uma das 28 amostras obtiveram-se os resultados apresentados nas Tabela I e Tabela II, onde estão disponíveis também os valores obtidos dos controlos positivos e negativos.

Tabela I - Resultados da quantificação a partir das colheitas no centro da mordedura na maçã.

Amostra	HUMAN (ng/μL)
1C	0,1615
2C	0,0609
3C	0,1464
4C	0,0326
5C	0,0627
6C	0,3126
7C	0,1436
8C	0,7771
9C	0,1056
10C	0,0252
11C	0,1567
12C	0,0675
13C	0,1469
14C	0,3566
BTA (-)	Indeterminado
CTR (+) 0,1	0,1681
CTR (+) 10	4,3562
CTR (+) 40	48,8176

Tabela II - Resultados da quantificação a partir das colheitas à periferia da mordedura na maçã.

Amostra	HUMAN (ng/μL)
1P	1,7054
2P	0,0219
3P	0,6821
4P	0,1036
5P	0,0764
6P	0,2722
7P	0,7142
8P	1,0216
9P	0,0577
10P	0,3944
11P	0,5671
12P	0,1522
13P	0,6312
14P	0,3371
BTA (-)	Indeterminado
CTR (+) 0,1	0,1681
CTR (+) 10	4,3562
CTR (+) 40	48,8176

O maior valor de IPC na reação de quantificação foi de 29,6797 (< 30).

De maneira geral, as amostras colhidas no limite da mordedura – à periferia (P) – continham mais material genético do que as amostras colhidas no interior da mordedura – centro (C) –, excetuando as maçãs numeradas com 2, 6, 9 e 14.

Os valores mínimos, máximos e medianos de quantificação, em ambos os locais das maçãs mordidas, são mostrados na Tabela III.

Tabela III - Extremos mínimos e máximos, médias, medianas e desvios padrão dos resultados da quantificação, a partir da colheita das amostras no centro (amostra C) e na periferia (amostra P).

Amostra	n	Mínimo (ng/μL)	Máximo (ng/μL)	Média	Desvio padrão	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75
C	14	0,0252	0,7771	0,182564	0,1964036	0,062250	0,145000	0,199275
P	14	0,0219	1,7054	0,481221	0,4634487	0,096800	0,365750	0,690125

O mínimo valor de quantificação foi obtido de uma colheita à periferia (amostra P) sendo de 0,0219 ng/μL. Por sua vez, o mínimo obtido de uma amostra C foi de 0,0252 ng/μL.

O valor máximo de quantificação a partir de uma amostra P foi de 1,7054 ng/μL, ou seja, claramente superior ao máximo 0,7771 ng/μL conseguido numa das colheitas ao centro (amostra C).

Em média no centro da mordedura pôde-se colher, da saliva, ADN quantificado em 0,182564 ng/μL. Por outro lado, à periferia da maçã colheu-se da saliva, em média, ADN quantificado em 0,481221 ng/μL.

No diagrama de caixas e bigodes, seguidamente exibido (fig. 9), encontram-se distribuídos para uma melhor visualização os valores supramencionados.

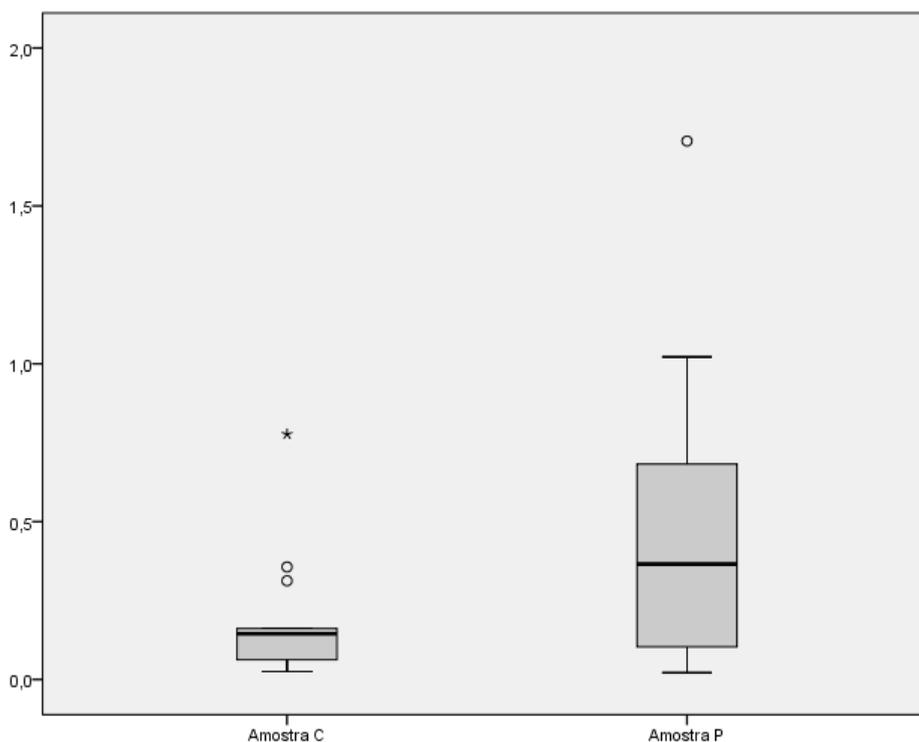


Figura 9 - Diagrama de extremos e quartis com resultados da quantificação (ng/ μ L) a partir da colheita das amostras no centro (Amostra C) e na periferia (Amostra P). * e \circ constituem *outliers* na quantificação.

A hipótese nula, indicadora de normalidade, é rejeitada pelo nível de significância ($p < 0,05$, teste de Wilcoxon). Existe diferença estatisticamente significativa entre os valores medidos nas amostras C e P ($p = 0,016$), sendo que são superiores na amostra P.

DISCUSSÃO

O exame das marcas dentárias em alimentos tem uma componente típica morfológica e molecular (4,5).

A análise molecular dos vestígios biológicos encontrados nas marcas dentárias em objetos inanimados, como alimentos, tem-se revelado um importante contributo médico-legal para a exclusão e identificação positiva do suspeito. A genotipagem do vestígio permite obter um valor numérico de probabilidade na identificação, que permite maior objectividade. Pelo exposto, a análise molecular foi a componente utilizada neste estudo (4,6,9,13,14).

Selecionou-se o alimento maçã (comercialmente disponível) por estar frequentemente associado à cena do crime (4).

De modo a reduzir a componente de variabilidade da nossa amostra, achou-se pertinente aplicar as duas técnicas de colheita de material ao mesmo alimento. Pelo que este foi dividido parcialmente antes de efetuar o ato de morder (19).

As mordeduras nas maçãs foram intervaladas por períodos de aproximadamente uma hora. Este intervalo entre as mordeduras procurou assegurar que não se esgotassem as células de descamação epitelial da mucosa oral. Apesar de ser intenso o grau de renovação (*turn-over*) celular, não é possível controlar a deposição de células epiteliais na mordedura. Pang e colaboradores, em 2007, mostraram que as pessoas deixam quantidades muito díspares de células epiteliais mediante o contacto nas mais diversas superfícies, em intervalos de tempo diferente. Considerou-se ainda que a quantidade de ADN na evidência biológica poderá variar perante fatores como a força gerada durante o contacto, as atividades realizadas pelo sujeito antes do contacto, bem como a predisposição de cada organismo para a descamação de células epiteliais (17). Anzai-Kanto e colaboradores, em 2005, também tinham sugerido que a quantidade de células de descamação provenientes de um mesmo indivíduo mediante cada contacto variava fortemente com as atividades do quotidiano – se comeu, bebeu, fumou, beijou ou mordeu algo (10).

Em relação às técnicas de colheita utilizadas neste estudo teve-se por princípio a *double swab technique*, no sentido de otimizar as mesmas (7,19). Sweet e colaboradores, em 1997, e Pang e colaboradores, em 2007, mostraram através de protocolos experimentais, que o procedimento de dupla zaragatoa é, efetivamente, o mais eficiente na colheita de células desidratadas, como as existentes numa mancha seca de saliva, para a extração de ADN, quando comparado com o clássico procedimento de zaragatoa

humedecida única, ou com as fitas adesivas, que podem não ser suficientes para recuperar ADN de uma evidência forense (7,17,19). A primeira zaragatoa humedecida solta as células epiteliais, na mancha seca de saliva, que são depois recolhidas, facilmente, por raspagem suave com a segunda zaragatoa (4,7,9,17,19). Pretende-se assegurar uma recolha de células máxima com um mínimo de pressão física. Podemos considerar que a recolha num só passo (zaragatoa simples) exigiria uma pressão mais firme e humedecimento vigoroso para uma recuperação de material suficiente que, por sua vez, aumentaria o risco de arrastar mais impurezas (7,9) favorecendo a contaminação, além de inibir a PCR (10). Deve-se considerar ainda que em alimentos de consistência mole, tipo pastel de nata, uma pressão elevada pode alterar a conformação da mordedura e inviabilizar a aplicação posterior de técnica de análise morfológica (4).

Optou-se por uma metodologia de extração do ADN em fase sólida. Esta metodologia corresponde à ligação seletiva da molécula a um substrato, tal como partículas de sílica, resinas paramagnéticas ou mesmo pérolas magnéticas. Assim, as moléculas de ADN são retidas, enquanto as proteínas e outros componentes celulares são lavados, para depois serem libertadas na forma de ADN purificado. O kit PrepFiler[®] Express BTA (Applied Biosystems) utilizado neste estudo pode ser considerado “agressivo” contudo eficiente quando se pretende provocar a lise celular a fim de maximizar a obtenção de ADN de tecidos duros ou de amostras de vestígios, como é o caso da maçã em decomposição (11).

No final, o ADN purificado foi congelado a -20°C por se tratar de um curto período até à quantificação, doutra forma a congelação dever-se-ia processar a -80°C. Estas baixas temperaturas inibem a atividade das nucleases que podem ainda danificar as sequências nucleotídicas, mas que em situações normais são necessárias para reciclar estes componentes (11).

A principal finalidade da quantificação em casos forenses é determinar se, efetivamente, existe uma quantidade suficiente de ADN amplificável (*short tandem repeat*, STR) por PCR (11). O procedimento de quantificação realizado nas amostras deste estudo, justificou-se pelo facto destas amostras se caracterizarem pela presumível escassez de ADN. Por outro lado, pela necessidade de conhecer a concentração de ADN extraído da amostra para executar as diferentes amplificações dos marcadores polimórficos de uma identificação (11,12).

A informação obtida dos valores da concentração de ADN extraído da amostra irá orientar as diferentes amplificações dos marcadores polimórficos de uma identificação.

As nossas amostras apresentaram valores de IPC inferiores a 30. Estes resultados revelam inexistência de inibidores na solução de extração. A presença de inibidores da reação de PCR significaria interferência na reação de amplificação dos marcadores da identificação e, conseqüentemente o insucesso da genotipagem.

O valor de quantificação do controle negativo – indeterminado – clarifica o controlo da contaminação dos tubos e reagentes, bem como do procedimento técnico (2,12). De igual modo a quantificação nos controlos positivos apresentou valores correspondentes ao adequado procedimento técnico.

No universo da amostragem, os valores de quantificação obtidos permitiram a sua análise estatística. O ADN foi colhido com sucesso por ambas as técnicas, e não se pode ignorar a diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos na quantificação das amostras C e P, como evidenciado anteriormente na Figura 9 e Tabela III.

A técnica que corresponde à periferia da mordedura revelou, com significância estatística, ser a que permite maiores valores de quantificação face à técnica que corresponde à colheita do interior da mordedura.

Os nossos resultados podem-se explicar tendo em conta que a mordedura na polpa da maçã deposita predominantemente saliva que, por si, deixará disponíveis menos células epiteliais e leucócitos na mordedura. Além disso, a polpa da maçã é rica em enzimas que potencialmente degradam o ADN e inibem a reação de PCR.

No nosso estudo, não se discriminou a molhabilidade da superfície polpa e casca, logo a primeira zaragatoa do procedimento *double swab technique* foi rolada uma única vez e, aproximadamente, com a mesma quantidade de humidade e tempo, independentemente da amostra ser tomada no centro ou à periferia da mordedura. Pang e colaboradores, em 2007, propuseram que uma superfície que seja boa absorvente e esteja seca será, portanto, difícil de humedecer, podendo mesmo exigir várias zaragatoas húmidas, que reidratem as células e permitam que elas se soltem do substrato. Apenas desta maneira vão aderir, eficazmente, às fibras da zaragatoa seca final que as recuperará por força de ação capilar associada ao mecanismo de raspagem executado (17).

Em 2012, Khare e colaboradores afirmaram que em casos de mordeduras a quantidade de saliva depositada é muito baixa (9). Porém, um estudo de recolha de saliva depositada em pele de Anzai-Kanto e colaboradores, em 2005, avançava já uma hipótese passível de extrapolação para a casca e periferia da polpa da maçã – zonas tocadas pelos lábios deixam por fricção mais células nessa zona da mordedura (10).

O mínimo valor de quantificação foi obtido de uma colheita à periferia (amostra P) sendo de 0,0219 ng/μL, inferior ao mínimo obtido de uma amostra C de 0,0252 ng/μL. Possivelmente deveu-se a uma menor pressão ao executar a raspagem da segunda zaragatoa, ou mesmo, do menor humedecimento da primeira. Ao invés, pode ter ocorrido uma maior degradação da amostra – suponha-se, por exemplo, que a maçã estivesse mais madura e atravessasse uma fase de grande atividade enzimática, com maior degradação do ADN. Claro que pode ter ocorrido qualquer outra falha, nomeadamente, durante o processo de extração ou quantificação.

Os valores *outliers* de quantificação 1,7054 ng/μL para uma amostra P e 0,7771 ng/μL, 0,3566 ng/μL e 0,3126 ng/μL para amostras de C podem corresponder às primeiras mordeduras e como tal poderão ter maior número de células epiteliais.

Salienta-se que o nosso estudo terminou na quantificação das amostras por se considerar que os dados daí obtidos satisfizeram a análise estatística apresentada. Em estudos posteriores ir-se-á, então, avaliar a amplificação dos marcadores autossómicos de uma identificação e a possível validação de todos alelos de cada *locus* polimórfico.

CONCLUSÕES

No universo da nossa amostragem, a extração do ADN foi efetuada com sucesso por ambas as técnicas.

As duas técnicas distinguem-se estatisticamente como métodos de colheitas em mordeduras.

A técnica da periferia revela-se como a técnica de eleição, para se obter maior quantificação de ADN, na mordedura da maçã.

AGRADECIMENTOS

Aos elementos do Serviço de Genética Forense do INMLCF, I.P. nas pessoas de Vanessa Bogas e Pedro Brito, pela disponibilidade e colaboração na componente laboratorial deste trabalho de investigação.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Teresa Corte-Real Gonçalves, pela motivação extraordinária que me deu, pelo trabalho que fizemos juntos, e pelas horas que dedicou a este experimento.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves, pelo interesse que manifestou em apoiar este projeto.

Às funcionárias das bibliotecas do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, e em particular da Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pelo auxílio na pesquisa bibliográfica.

À Dra. Bárbara Oliveiros do Instituto de Bioestatística e Informática Médica – IBILI – FMUC pelo contributo na análise estatística dos resultados.

Aos meus amigos João, Flávio e Zé pelas dicas de redação digital desta tese.

Às minhas amigas Catarina, Sabrina e Andreia pela compreensão e informações cedidas.

À minha amiga Sara por me entender tão bem e, sobretudo, pela companhia em vários dias de pesquisa e leitura bibliográfica, bem como por fazer de motorista quando foi necessário.

Finalmente, aos meus pais e à minha irmã pela preocupação, carinho e esforço para que tudo me corresse pelo melhor.

BIBLIOGRAFIA

1. Bell K, S BL, N R, Tulsa, Okla. Identification and documentation of bite marks. *Journal of Emergency Nursing*. 2000;26:628–30.
2. Carvalho SPM, Sales-Peres A, Ribeiro-Bicudo LA, Silva RHA. Quality evaluation of DNA obtained from stored human saliva and its applicability to identification in Forensic Dentistry. *SciELO Brasil [Internet]*. 2010 [cited 2013 Jun 1];25(1):48–53. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/roc/v25n1/10.pdf>
3. Bowers CM. Problem-based analysis of bitemark misidentifications: the role of DNA. *Forensic science international [Internet]*. 2006 May 15 [cited 2013 Jun 1];159 Suppl S104–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600549>
4. Sweet D, Hildebrand D. Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: a case report. *International journal of legal medicine [Internet]*. 1999 Jan;112(3):201–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10335888>
5. Bowers CM, Pretty IA. Expert disagreement in bitemark casework. *Journal of forensic sciences [Internet]*. 2009 Jul [cited 2013 Jun 1];54(4):915–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486248>
6. David TJ, Golden GS, Loomis PW, Freeman A, Berman G. *American Board of Forensic Odontology Diplomates Reference Manual*. Marietta Georgia; 2012. p. 67–75; 107–118.
7. Sweet D, Lorente M, Lorente JA, Valenzuela A, Villanueva E. An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *Journal of forensic sciences [Internet]*. 1997 Mar;42(2):320–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9068193>
8. Sweet D, Lorente J a, Valenzuela a, Lorente M, Villanueva E. PCR-based DNA typing of saliva stains recovered from human skin. *Journal of forensic sciences [Internet]*. 1997 May;42(3):447–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9144934>
9. Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S. DNA Extraction and Gene Amplification from Saliva Deposited On Skin Using Double Swab Technique. *Red [Internet]*. 2012 [cited 2013 Jun 1];5(2):61–9. Available from: http://www.rfppl.com/subscription/upload_pdf/Art.3_774.pdf

10. Anzai-Kanto E, Hirata MH, Hirata RDC, Nunes FD, Melani RFH, Oliveira RN. DNA extraction from human saliva deposited on skin and its use in forensic identification procedures. 2005;19(3).
11. Butler JM. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Maryland, USA: Elsevier Ireland Ltd; 2012. p. 1–299.
12. Butler JM. Forensic DNA Typing - Biology, Technology, And Genetics Of STR Markers. Second Edi. MA, USA: Elsevier Ireland Ltd; 2005. p. 34–153.
13. Butler JM, Shen Y, McCord BR. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. Journal of forensic sciences [Internet]. 2003 Sep;48(5):1054–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14535668>
14. Decorte R. Genetic identification in the 21st century - Current status and future developments. Forensic Science International. 2010;201:160–4.
15. Durdiaková J, Kamodyová N, Ostatníková D, Vlková B, Celec P. Comparison of different collection procedures and two methods for DNA isolation from saliva. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC [Internet]. 2012 Apr [cited 2013 Jan 13];50(4):643–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22149741>
16. Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD, et al. Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs - results of a collaborative European (EDNAP) exercise. Forensic science international [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2013 Jun 1];164(1):33–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343834>
17. Pang B, Cheung B. Double swab technique for collecting touched evidence. Legal Medicine. 2007;9.
18. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. Forensic science international [Internet]. 2000 Jul 24;112(1):17–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882828>
19. Bruin KG, Verheij SM, Veenhoven M, Sijen T. Comparison of stubbing and the double swab method for collecting offender epithelial material from a victim's skin. Forensic

science international. Genetics [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Mar [cited 2012 Nov 19];6(2):219–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606013>

20. Applied Biosystems. PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit. 2008.
21. Applied Biosystems. PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits. 2010.

ANEXOS

ANEXO I – TABELA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celcius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BTA	Osso, dente e substratos adesivos (do inglês <i>bone, teeth, and adhesive-containing substrates</i>)
h	Horas
µL	Microlitros
ng	Nanogramas
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR-RT	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês <i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
rpm	Rotações por minuto
STR	Microssatélites (do inglês <i>short tandem repeat</i>)

ANEXO II – ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Maçã à qual foi já retirada uma secção fina a orientar a linha média dentária.	9
Figura 2 - Mordedura com arrancamento de material, orientando a linha média interincisiva.	9
Figura 3 - <i>Double swab technique</i> sobre o centro da mordedura (colheita da amostra C). ...	10
Figura 4 - <i>Double swab technique</i> à periferia da mordedura (colheita da amostra P).	10
Figura 5 - Corte de pequenos fragmentos da zaragatoa seca (segunda da <i>double swab technique</i>) para as colunas de colheita.	10
Figura 6 - Kit PrepFiler [®] Express BTA introduzido no <i>robot</i> AutoMate Express Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems).	11
Figura 7 - Pontas de titulação distribuídas pela fileira T2 do <i>robot</i> . As amostras celulares lisadas foram depois distribuídas pela fileira S.	12
Figura 8 - Seleção do programa de extração associado ao kit PrepFiler [®] Express BTA (Applied Biosystems).	12
Figura 9 - Diagrama de extremos e quartis com resultados da quantificação (ng/μL) a partir da colheita das amostras no centro (Amostra C) e na periferia (Amostra P). * e ° constituem <i>outliers</i> na quantificação.	15

ANEXO III – ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Resultados da quantificação a partir das colheitas no centro da mordedura na maçã.	13
Tabela II - Resultados da quantificação a partir das colheitas à periferia da mordedura na maçã.	13
Tabela III - Extremos mínimos e máximos, médias, medianas e desvios padrão dos resultados da quantificação, a partir da colheita das amostras no centro (amostra C) e na periferia (amostra P).....	14

ANEXO IV – CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

Em termos de prática laboratorial, o orientando esteve presente:

- Na caracterização da amostra, sendo um dos autores das mordeduras;
- Na colheita das amostras procedendo ao registo fotográfico;
- Na extração e quantificação do ADN observando e auxiliando a equipa de laboratório.

ANEXO V – ACEITAÇÃO DO POSTER

Bitemarks in foodstuffs - an approach for genetic identification of the bitter

A Corte-Real¹, Duarte Rodrigues¹, F. Corte-Real^{1,2}, M. João Anjos²

¹*Faculty of Medicine, University of Coimbra*

²*Central Branch, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences*

Biological evidences from partially eaten food, left in crime scene, may contain genetic information of the bitter that can generate a DNA profile. The aim of this paper is to study two different methods to obtain the DNA on foodstuff.

15 apples were cleaned with sodium hypochlorite before to be bitten by the same individual. Then, they were stored and allowed to dry at environment temperature for 24 hours. Each bitten apple had been previously dived vertically in to two equal size parts. In one of the two areas, DNA was collected from the inner and in the other part from the periphery. For both of them double swab technique was performed. DNA extraction was executed by the using of PrepFiler™BTA kit according to the manufacturer's instructions and it quantification realized with Quantifiler™Duo kit, both by Applied Biosystems. The results, associated with the study viability of the polymorphisms for an identification (European standard set), were analyzed with SPSS™ software.

Quantification values stayed between 0,0219 ng/μl to 1,7054 ng/μl and the hypothesis nule was rejected ($p < 0,05$). Difference among the two methods was proved. In human skin we perform this technique in the middle of a bite mark, as well as in previous studies just collected DNA from the inner of foodstuff and the extraction results just from saliva were lower. This new experimental condition of collected DNA at periphery allowed results statistically, quantity and quality, better through collection of epithelial lip cells escaped from apple enzymatic activity.

Keywords: bitemark, genetic profile, identification

Abstract Notification - ISFG 2013 Congress

“17 May 2013

Dear Ana Corte-Real,

On behalf of the Organising Committee and ISFG Congress Committee, we would like to thank you for submitting an abstract for the 25th World Congress of the International Society for Forensic Genetics being held at the Melbourne Convention and Exhibition Centre, 2 – 7 September 2013.

There has been a large number of high quality abstracts received from authors for this congress with each abstract undergoing a review process. The ISFG Board has worked to ensure a diverse and motivating program has been developed.

I am pleased to advise you that your abstract titled “Bitemarks in foodstuffs - an approach for genetic identification of the bitter” (abstract no: 152.00) has been accepted as a Poster Presentation.”

ANEXO VI – POSTER

Bitemarks in foodstuffs - An approach of genetic identification of the bitter

Corte-Real A.¹, Silva D.N.¹, Corte-Real F.^{1,2}, João Anjos M.²

¹Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal
²Central Branch, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences




Introduction and Aims

Biological evidences from partially eaten food, left in crime scene, may contain genetic information of the bitter that can generate a DNA profile. This procedure stands out in situations where morphological analysis of the bitemark is not possible. Compared to the tooth, genetic markers are present since the birth and remain unchanged throughout our lives, allowing to assign a numeric probability of identifying with greater discriminatory power. Study two different methods to obtain the DNA on foodstuff.

Material and Methods

14 apples were cleaned with sodium hypochlorite before to be bitten by the same individual. Then, they were stored and allowed to dry at environment temperature for 24 hours. Each bitten apple was previously divided vertically in to two equal size parts. In one of the two areas, DNA was collected from the inner and in the other part from the periphery of the bitemark. For both of them double swab technique was performed. DNA extraction was executed by the using of PrepFilerTMMETA kit according to the manufacturer's instructions and quantification was realized with QuantifilerTMDuo kit (both from Applied Biosystems). The results, associated with this study were inserted in Microsoft Excel 2010TM and analyzed with SPSS StatisticsTM software 19[®].



Figure 1 - Apple with a slice (MC) to guide the double swabbing in the bitemark.



Figure 2 - Double swab technique performed in the inner of the bitemark.



Figure 3 - Double swab technique in the periphery of the bitemark.



Figure 4 - Final pieces of the swabbed apple to be collected evidence.



Figure 5 - 96 PrepFilerTMMETA kit in the small Applied Biosystems.



Figure 6 - Applied Biosystems QuantifilerTMDuo kit.

Results (Cont.)



In general, the samples collected from the periphery (P) of the bitemark contained more genetic material than samples from the inner (C) -, except apples numbered 2, 6, 9 and 14.

The null hypothesis, indicating normality, was rejected by the significance level ($p < 0.05$, Wilcoxon test).

Sample	Inner (ng/ul)	Periphery (ng/ul)
01	0,2838	0,7306
02	0,4968	0,10258
03	0,2888	0,28871
04	0,2858	0,1088
05	0,2817	0,10784
06	0,4128	0,10752
07	0,4488	0,10742
08	0,2771	0,10658
09	0,4388	0,10777
10	0,4307	0,10688
11	0,4387	0,10871
12	0,4217	0,10822
13	0,4488	0,10812
14	0,4388	0,10822
15	0,4388	0,10822
16	0,4388	0,10822
17	0,4388	0,10822
18	0,4388	0,10822
19	0,4388	0,10822
20	0,4388	0,10822
21	0,4388	0,10822
22	0,4388	0,10822
23	0,4388	0,10822
24	0,4388	0,10822
25	0,4388	0,10822
26	0,4388	0,10822
27	0,4388	0,10822
28	0,4388	0,10822
29	0,4388	0,10822
30	0,4388	0,10822
31	0,4388	0,10822
32	0,4388	0,10822
33	0,4388	0,10822
34	0,4388	0,10822
35	0,4388	0,10822
36	0,4388	0,10822
37	0,4388	0,10822
38	0,4388	0,10822
39	0,4388	0,10822
40	0,4388	0,10822
41	0,4388	0,10822
42	0,4388	0,10822
43	0,4388	0,10822
44	0,4388	0,10822
45	0,4388	0,10822
46	0,4388	0,10822
47	0,4388	0,10822
48	0,4388	0,10822
49	0,4388	0,10822
50	0,4388	0,10822
51	0,4388	0,10822
52	0,4388	0,10822
53	0,4388	0,10822
54	0,4388	0,10822
55	0,4388	0,10822
56	0,4388	0,10822
57	0,4388	0,10822
58	0,4388	0,10822
59	0,4388	0,10822
60	0,4388	0,10822
61	0,4388	0,10822
62	0,4388	0,10822
63	0,4388	0,10822
64	0,4388	0,10822
65	0,4388	0,10822
66	0,4388	0,10822
67	0,4388	0,10822
68	0,4388	0,10822
69	0,4388	0,10822
70	0,4388	0,10822
71	0,4388	0,10822
72	0,4388	0,10822
73	0,4388	0,10822
74	0,4388	0,10822
75	0,4388	0,10822
76	0,4388	0,10822
77	0,4388	0,10822
78	0,4388	0,10822
79	0,4388	0,10822
80	0,4388	0,10822
81	0,4388	0,10822
82	0,4388	0,10822
83	0,4388	0,10822
84	0,4388	0,10822
85	0,4388	0,10822
86	0,4388	0,10822
87	0,4388	0,10822
88	0,4388	0,10822
89	0,4388	0,10822
90	0,4388	0,10822
91	0,4388	0,10822
92	0,4388	0,10822
93	0,4388	0,10822
94	0,4388	0,10822
95	0,4388	0,10822
96	0,4388	0,10822

Table 1 - Results of quantification from samples collected from the inner.

Table 2 - Results of quantification from samples collected from the periphery.

Results

Quantification values stayed between 0,0219 ng/ul to 1,7054 ng/ul

Sample	n	Minimum	Maximum	Mean	Standard deviation	Percentage 25	Percentage 75	Percentage 95
C	14	0,0219	0,7771	0,16384	0,194028	0,08292	0,14388	0,19871
P	14	0,0218	1,7054	0,48121	0,481687	0,08602	0,30771	0,80122

Table 3 - Minimum, maximum, average, standard deviation and percentiles of quantification of the two techniques.

Conclusion

In the universe of our sample, DNA extraction was successfully performed by both techniques (DNA collection from the Inner and periphery of the bitemark), allowing to achieve good DNA quantities to perform STR typing. The two techniques differ in statistical significance as methods of collecting evidence bitemarks. The periphery technique seems to be the method of choice to obtain greater DNA quantification from an apple bitemark.

References

1. Silva D, Corte-Real A, Corte-Real F, Anjos JM. Genetic identification of bitemarks in foodstuffs: a comparison of two techniques. *Journal of Forensic Sciences*. 2013;58(1):1-8.

2. Silva D, Corte-Real A, Corte-Real F, Anjos JM. Genetic identification of bitemarks in foodstuffs: a comparison of two techniques. *Journal of Forensic Sciences*. 2013;58(1):1-8.

3. Silva D, Corte-Real A, Corte-Real F, Anjos JM. Genetic identification of bitemarks in foodstuffs: a comparison of two techniques. *Journal of Forensic Sciences*. 2013;58(1):1-8.

4. Silva D, Corte-Real A, Corte-Real F, Anjos JM. Genetic identification of bitemarks in foodstuffs: a comparison of two techniques. *Journal of Forensic Sciences*. 2013;58(1):1-8.

5. Silva D, Corte-Real A, Corte-Real F, Anjos JM. Genetic identification of bitemarks in foodstuffs: a comparison of two techniques. *Journal of Forensic Sciences*. 2013;58(1):1-8.

6. Silva D, Corte-Real A, Corte-Real F, Anjos JM. Genetic identification of bitemarks in foodstuffs: a comparison of two techniques. *Journal of Forensic Sciences*. 2013;58(1):1-8.

7. Silva D, Corte-Real A, Corte-Real F, Anjos JM. Genetic identification of bitemarks in foodstuffs: a comparison of two techniques. *Journal of Forensic Sciences*. 2013;58(1):1-8.

8. Silva D, Corte-Real A, Corte-Real F, Anjos JM. Genetic identification of bitemarks in foodstuffs: a comparison of two techniques. *Journal of Forensic Sciences*. 2013;58(1):1-8.

9. Silva D, Corte-Real A, Corte-Real F, Anjos JM. Genetic identification of bitemarks in foodstuffs: a comparison of two techniques. *Journal of Forensic Sciences*. 2013;58(1):1-8.

10. Silva D, Corte-Real A, Corte-Real F, Anjos JM. Genetic identification of bitemarks in foodstuffs: a comparison of two techniques. *Journal of Forensic Sciences*. 2013;58(1):1-8.

Acknowledgments

The valuable assistance of Vanessa Bogas from INMLCF, I.P.



25th World Congress of the
International Society for Forensic Genetics
Melbourne, 2013