



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

Mestrado Integrado em Medicina Dentária
2021-2022

**A Utilização da Saliva na Medicina Dentária
Forense: uma *Scoping Review***

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção
do grau de Mestre em Medicina Dentária*

Por:

Giovana Maitan Siqueira

Viseu, 2022



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

UISEU

Mestrado Integrado em Medicina Dentária
2021-2022

A Utilização da Saliva na Medicina Dentária
Forense: uma *Scoping Review*
Versão Definitiva

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção
do grau de Mestre em Medicina Dentária*

Por:

Giovana Maitan Siqueira

Orientadora: Prof. Doutora Cristina Figueiredo

Coorientadores: Prof. Doutora Maria José Correia

Prof. Doutor Nuno Rosa

Viseu, 2022

*Para o meu Pai, Mãe e Irmã.
Para a minha Avó Zenaide.
Em memória do meu Avô Airton.
Obrigada por tudo.*

*“However difficult life may seem there is always something you can do and
succeed at!”
Stephen Hawkings*

AGRADECIMENTOS

Prof^a. Doutora Cristina Figueiredo, obrigada por toda orientação e disponibilidade para a realização deste projeto. Foi muito gratificante poder aprender ainda mais consigo.

Prof^a. Doutora Maria José Correia, obrigada por coorientar este projeto, por toda disponibilidade e por ter me ensinado tanto ao longo destes cinco anos.

Ao meu pai, que é a minha maior inspiração desde pequena, meu dentista favorito. Obrigada por todo apoio, dedicação e paciência, espero poder aprender ainda mais consigo.

À minha mãe, que mesmo longe durante todos estes anos sempre esteve presente. Obrigada por todas as palavras carinhosas e momentos de descontração pelo telefone.

À minha irmã, que foi o meu porto seguro ao longo de todos estes anos. Obrigada por tudo que fizeste e fazes por mim, sem ti nada seria igual.

Às minhas companheiras de casa e da vida, obrigada por todos os bons momentos que vivemos juntas. Vocês tornaram esta jornada incrível e inesquecível.

Ao Gonçalo, obrigada por seres minha fortaleza nos dias não tão bons. Obrigada por todo apoio, paciência e companheirismo.

RESUMO

Introdução: A medicina dentária forense é um dos ramos das ciências forenses. Através da análise de evidências e vestígios dentários assim como de evidências de registos dentários, tem como objetivo identificar ou fornecer informações sobre determinado indivíduo ou indivíduos. Por meio de métodos de identificação, o médico dentista pode auxiliar na estimativa de idade, identificação do sexo e na identificação humana propriamente dita. Atualmente o interesse forense pela saliva tem aumentado, pois em casos de investigações forenses a saliva pode estar presente em marcas de mordida, impressões labiais, copos, restos de comida etc. Deste modo o objetivo deste estudo é identificar os tipos de recolha e análise utilizados na saliva e de que forma contribui para a identificação humana.

Materiais e métodos: O tipo de estudo desenvolvido foi uma Scoping Review, que tem como objetivo esclarecer temas pouco abordados ou compreendidos, mapear e identificar lacunas nas evidências existentes. A pesquisa foi realizada nas bases de dados *PubMed/Medline*® e *Web of Science*® utilizando termos de texto livre em conjunto com operadores booleanos AND e OR.

Resultados: Obtivemos uma amostra de 27 artigos incluídos em que foi possível mapear e identificar 2 tipos de recolha, sendo eles o single swab e o double swab technique. Estes demonstraram boa aplicabilidade no que diz respeito à recolha de amostras de saliva em diferentes superfícies e em diferentes estágios de degradação. Em relação aos tipos de análise estes foram divididos em análises enzimáticas, serológicas e moleculares. Desta forma os contributos forenses mapeados neste estudo foram: identificação do sexo, estimativa de idade, mapeamento genético, deteção de drogas, diagnóstico de doenças e determinação do grupo sanguíneo.

Conclusão: A Medicina Dentária Forense e o uso do ADN nesta área, nos oferece novas concessões em relação à identificação humana através da saliva e devem ser acrescentadas aos meios de investigação das ciências forenses.

Palavras-chave: Medicina Dentária Forense; Saliva; ADN; Identificação Humana

ABSTRACT

Introduction: Forensic dentistry is one of the branches of forensic science. Through the analysis of dental evidence and traces as well as evidence from dental records, it aims to identify or provide information about a particular individual or individuals. Through identification methods, the dentist can assist in age estimation, sex gender identification, and actual human identification. Currently the forensic interest in saliva has increased because in cases of forensic investigations saliva may be present in bite marks, lip prints, glasses, food remains etc. Thus, the aim of this study is to identify the types of collection and analysis used in saliva and how it contributes to human identification.

Materials and methods: The type of study developed was a Scoping Review, which aims to clarify less understood issues and identify gaps in existing evidence. The search was conducted in the PubMed/Medline ® and Web of Science® databases using free-text terms in conjunction with Boolean operators AND and OR.

Results: We obtained a sample of 27 included articles in which it was possible to map and identify 2 types of collection, being the single swab and the double swab technique. These showed good applicability regarding the collection of saliva samples on different surfaces and in different stages of degradation. Regarding the types of analysis, they were divided into enzymatic, serological and molecular analyses. Thus, the forensic contributions mapped in this study were: gender identification, age estimation, genetic mapping, drug detection, disease diagnosis and blood group determination.

Conclusion: Forensic dentistry and the use of DNA in this area offers us new concessions in relation to human identification through saliva and should be added to the means of investigation of forensic sciences.

Keywords: Forensic Dentistry; Saliva; DNA; Human identification

Índice

1. Introdução:	3
1.1 A Medicina Dentária Forense	3
1.2 Métodos de identificação dentários	4
1.2.1 Método Comparativo	4
1.2.2 Método Reconstutivo	4
1.3 Saliva na Medicina Dentária Forense	4
1.3.1 Utilização	5
1.4 Objetivos:	7
2. Materiais e Métodos:	11
2.1 Tipo de Estudo	11
2.2 Questão de investigação	11
2.3 Fontes de Informação e Estratégia de Pesquisa	11
2.4 Critérios de Seleção dos Estudos	12
2.5 Extração de dados	13
3. Resultados da Pesquisa	17
3.1 Características dos Estudos	21
3.2 Parâmetros avaliados	22
4. Discussão	27
4.1 Técnicas de Recolha de Saliva	27
4.2 Tipos de análises	28
4.2.1 Análises Enzimáticas	28
4.2.2 Análises Serológicas	29
4.2.4 Análises Moleculares	30
4.5 Contributo Forense	32
4.5.1 Determinação do Sexo	32
4.5.2 Estimativa de idade	32
4.5.3 Detecção de Drogas	33
4.5.4 Diagnóstico de doenças	33
4.5.5 Detecção do grupo sanguíneo	33
4.5.6 Mapeamento genético	34
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela I.....	12
Tabela II.....	19
Tabela III.....	21
Tabela IV.....	23
Tabela V.....	24
Figura 1.....	6
Figura 2.....	17

ABREVIATURAS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ARN – Ácido Ribonucleico

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

MDF – Medicina Dentária Forense

PCR – Polymerase Chain Reaction

RSID – Rapid Stain Identification

RIA – Radioimmunoassay

MC – Melting Curve Analysis

INTRODUÇÃO

1. Introdução:

1.1 A Medicina Dentária Forense

A Medicina Dentária Forense (MDF) é um dos ramos das ciências forenses que apresenta como objetivo o fornecimento de informação sobre determinado contexto judicial, através da análise das informações provindas da cavidade oral ⁽¹⁾. Apresenta um papel fundamental na identificação humana em múltiplas situações da prática médico-legal ⁽²⁾.

Esta área de especialização inclui a recolha, análise e interpretação de vestígios orais, evidências dentárias e/ou evidências de registos dentários, sendo utilizada para identificar um indivíduo ou fornecer informações exigidas pelas autoridades para identificar casos de negligência, maus tratos ou abuso ^(3,4).

Os conhecimentos técnico-científicos dos Médicos Dentistas Forenses são essenciais para o auxílio na identificação humana. A MDF pode atuar nas mais variadas situações, nomeadamente em acidentes de viação, acidentes de trabalho e em casos de abusos ou crimes. Baseia-se fundamentalmente na recolha e análise de evidências e vestígios orais, na avaliação de dano corporal da(as) vítima(s) envolvidas e em casos de acidentes em massa. ^(1,3)

Através de métodos de identificação dentários, o médico dentista forense auxilia na na estimativa de idade, na identificação do sexo e na identificação humana propriamente dita. ^(1,3).

Os métodos de identificação utilizados podem ser divididos em métodos comparativos e métodos reconstitutivos, dependendo da forma utilizada para proceder à identificação do indivíduo. Ambos os métodos requerem uma avaliação sistemática da cavidade oral, com identificação e caracterização dos tratamentos existentes ^(1,5).

1.2 Métodos de identificação dentários

1.2.1 Método Comparativo

É um método que visa comparar os registros dentários *postmortem* e *antemortem* de um indivíduo, com o objetivo de determinar se os dois registros correspondem à mesma pessoa ⁽⁴⁾. Para que este método de comparação seja aplicável, é imprescindível que haja evidência relativa à identidade do indivíduo (de modo a ser possível procurar a informação necessária), esteja envolvida uma população circunscrita, o indivíduo a identificar tenha recorrido a cuidados dentários e os procedimentos efetuados estejam descritos numa ficha clínica ⁽⁵⁾.

1.2.2 Método Reconstutivo

Esta metodologia de identificação é utilizada quando os registros *antemortem* não estão disponíveis ou quando não há dados disponíveis sobre a identidade de um indivíduo. Em conjunto com outros dados e características do indivíduo é possível reconstruir um perfil e reduzir a pesquisa pela sua identidade⁽⁴⁾. Entre muitas das características passíveis de identificar o sexo, a população de origem e a idade são os que assumem maior relevância⁽⁴⁾.

1.3 Saliva na Medicina Dentária Forense

A saliva é um fluido oral segregado pelas glândulas salivares, sendo composta por água, ácidos nucleicos, anticorpos, células epiteliais de esfoliação e microrganismos⁽⁶⁾. Possui propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais pela presença de imunoglobulinas, lactoferrina e lisozima⁽⁷⁾⁸⁾. A sua principal função é a proteção fornecida contra patógenos encontrados nos tecidos orais, no trato respiratório superior e no sistema digestivo⁽⁸⁾.

Atualmente o interesse forense pela saliva e a sua utilização como vestígio forense tem aumentado. Em casos de investigação forense a saliva pode estar presente e ser detetada em marcas de mordida e impressões labiais, podendo a análise da saliva recolhida apresentar um papel de extrema importância na

identificação do indivíduo. A saliva também tem sido frequentemente utilizada em casos de envenenamento com metais pesados, para detecção de drogas, situações em que existe abuso de álcool e abusos sexuais ⁽⁶⁾.

1.3.1 Utilização

Nos últimos anos, a saliva ganhou popularidade no campo das ciências forenses não só devido à facilidade de recolha mas também pela segurança no seu manuseio quando comparado com o sangue ⁽⁹⁾.

Tem sido utilizada na obtenção de perfis biológicos, nomeadamente para a determinação da idade, sexo e de outras características individuais que podem ser utilizadas como parâmetros de identificação ^(7,9).

O estudo do microbioma humano, nomeadamente do Ácido desoxirribonucleico (ADN) microbiano presente na secreção salivar, pode fornecer informações vitais sobre o estilo de vida, coabitação e condição médica do indivíduo, auxiliando as diferentes análises forenses ^(5,6). Na cavidade oral existe uma grande variedade de espécies bacterianas, que sofrem alterações decorrentes da idade, do estilo de vida, e das interações sociais. Diferentes localizações geográficas podem corresponder a diferenças de composição e função do microbioma salivar devido a diferentes padrões alimentares, medidas de higiene oral, tipo de clima, temperatura ou até mesmo à existência de surtos de doenças ⁽⁷⁾.

A saliva permite a determinação da idade do indivíduo devido à metilação do ADN. Esse tipo de alteração no ADN ocorre devido a modificações epigenéticas ao longo da vida, podendo ser afetada devido a fatores externos, como uso de tabaco, exposição ao sol e a dieta ⁽¹⁰⁾. Permite também a identificação do sexo através da detecção dos níveis hormonais presentes na saliva ^(6,7,9,11).

Manchas de saliva podem estar presentes na pele, roupas, papel, copos, beatas e outros objetos. Estão descritos na literatura várias metodologias utilizadas com o objetivo de detetar vestígios de saliva seca, nomeadamente através da utilização de enzimas como a fosfatase alcalina e a amilase ^(6,9). A utilização destes agentes químicos na detecção de saliva apresenta, no entanto, algumas limitações uma vez que a sua utilização depende da quantidade de

saliva disponível e do tempo decorrido desde a deposição da amostra e a sua recolha ⁽⁹⁾.

Constituintes salivares presentes nas manchas de saliva, podem ser degradadas devido às condições em que se encontra (tempo, exposição ao sol, exposição a outros microrganismos...) o que pode impedir uma análise bem-sucedida. Nestes casos a utilização do ADN mitocondrial é mais conveniente devido à sua resistência à degradação e ao elevado número de cópias existentes por célula⁽¹¹⁾.

Qualquer vestígio de saliva proveniente de marcas de mordidas e/ou impressões labiais, deixa uma marca salivar, capaz de fornecer variadas informações sobre o sexo, idade, estado de saúde e características pessoais.

O conceito de assinatura salivar baseia-se no facto das informações encontradas na saliva serem únicas para cada indivíduo⁽⁷⁾. Na Figura 1 está representado um resumo geral da utilização atual da saliva em medicina dentária forense.

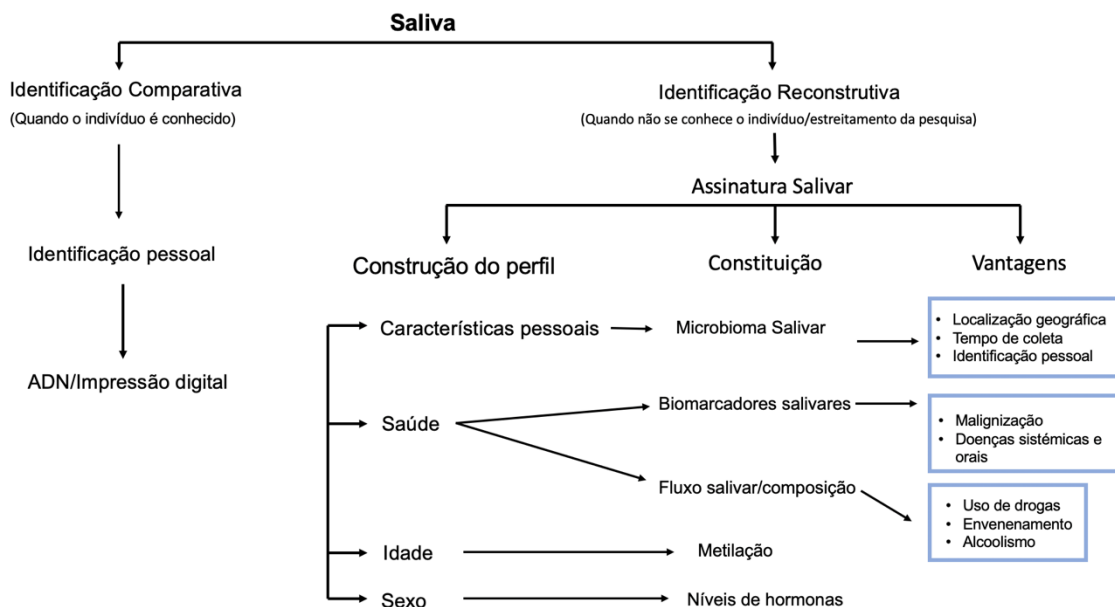


Figura 1- Esquema do uso da saliva na Medicina Dentária Forense, adaptado de Kapoor *et al* ⁽⁷⁾.

1.4 Objetivos:

Com o intuito de compreender a aplicabilidade da saliva na medicina dentária forense, temos o objetivo de mapear as evidências científicas acerca do tema, identificar os tipos de recolha utilizados e compreender as análises efetuadas neste ramo e de que forma contribui para a identificação humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. Materiais e Métodos:

2.1 Tipo de Estudo

O tipo de estudo a desenvolver neste tópico é uma *Scoping Review*. Nos últimos anos têm sido necessárias novas abordagens, no que se refere ao desenvolvimento de evidências de pesquisa com diferentes objetivos e questões, sendo a *Scoping Review* uma abordagem de grande utilidade para sintetizar essas evidências. Este tipo de revisão é comumente utilizado para esclarecer temas ainda pouco compreendidos ou sistematizados, de forma a auxiliar futuras revisões sistemáticas e /ou direcionar futuras áreas de pesquisa⁽¹²⁾.

A preferência pela realização de uma *Scoping Review* baseia-se no facto de ser um tipo de revisão que visa mapear as evidências já existentes subjacentes a uma área específica, identificar lacunas na evidência existente e realizar uma investigação preliminar que justifique uma futura revisão sistemática⁽¹²⁾.

Esta *Scoping Review* foi realizada seguindo as normas de orientação apresentadas nas *guidelines Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR)*.

2.2 Questão de investigação

A questão de investigação formulada foi “Qual a informação existente na literatura científica em relação ao papel da saliva na Medicina Dentária Forense, quais os métodos de recolha e de análise utilizados e qual sua aplicabilidade na identificação humana?”.

2.3 Fontes de Informação e Estratégia de Pesquisa

A pesquisa para a presente *Scoping Review* foi realizada em duas bases de dados diferente: *PubMed/Medline*® e *Web of Science*®, utilizando diferentes termos Medical Subject Headings (MeSH) em simultâneo com os operadores booleanos AND e OR, e foi realizada no dia 27 de Dezembro de 2021. Os

descritores de pesquisa utilizados foram: “saliva”, *forensic odontology*” e “*forensic dentistry*”.

A equação obtida foi: ("saliva"[MeSH Terms] OR "saliva"[All Fields] OR "salivas"[All Fields] OR "saliva s"[All Fields]) AND ("forensic dentistry"[MeSH Terms] OR ("forensic"[All Fields] AND "dentistry"[All Fields]) OR "forensic dentistry"[All Fields] OR (("forensic medicine"[MeSH Terms] OR ("forensic"[All Fields] AND "medicine"[All Fields]) OR "forensic medicine"[All Fields] OR "forensics"[All Fields] OR "forensic"[All Fields] OR "forensically"[All Fields]) AND ("shigaku"[Journal] OR "odontology"[Journal] OR "odontology"[All Fields]))))

2.4 Critérios de Seleção dos Estudos

Para a seleção e análise dos resultados foram definidos critérios de inclusão e exclusão demonstrados na Tabela I.

Tabela I: Critérios de Inclusão e Exclusão

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
Estudos que envolvam análise laboratorial da saliva	Estudos de outras vertentes da literatura
Estudos que refiram métodos de recolha de saliva	Estudos que não respondam aos objetivos propostos
Estudos informativos referentes ao uso de saliva como método de identificação humana	Artigos não encontrados na íntegra
Estudos que envolvam a saliva e as ciências forenses	
Estudos em inglês, português e espanhol	

Após eliminação de duplicados e triplicados, foram avaliados os títulos e os resumos dos artigos obtidos. Esta avaliação foi efetuada por dois investigadores independentes (GS e CF), de maneira a verificar quais os artigos que se inseriam no âmbito do trabalho e cumpriam os critérios de inclusão

previamente estabelecidos. Em caso de dúvida, um terceiro investigador (MJC) efetuou a avaliação.

2.5 Extração de dados

A extração de dados foi efetuada com recurso à realização de tabelas no programa *Excel*. Neste formulário foram incluídas informações sobre: tipos de recolha utilizados, tipos de análise utilizados assim como o contributo forense de cada artigo.

RESULTADOS

3. Resultados da Pesquisa

Através da pesquisa inicial, com os termos e equações mencionadas na estratégia de pesquisa, foram identificados 147 artigos: 85 na *Pubmed/Medline*[®] e 62 na *Web of Science*[®]. Destes artigos foram excluídos 34 duplicados, originando um total de 113 artigos restantes.

De seguida, após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão pela leitura do título, foram excluídos 20 artigos, resultando num total de 93 artigos. Destes, 24 foram excluídos pela leitura do resumo.

Dos 69 artigos disponíveis para avaliação integral, 5 foram excluídos por não estarem disponíveis na íntegra e 37 excluídos por não apresentarem informações significantes para os objetivos propostos, obtendo-se assim uma amostra significativa de 27 artigos incluídos para esta revisão.

O fluxograma realizado para a pesquisa está representado na Figura 2. Este apresenta esquematicamente os resultados da pesquisa bibliográfica efetuada e resume o processo de seleção.

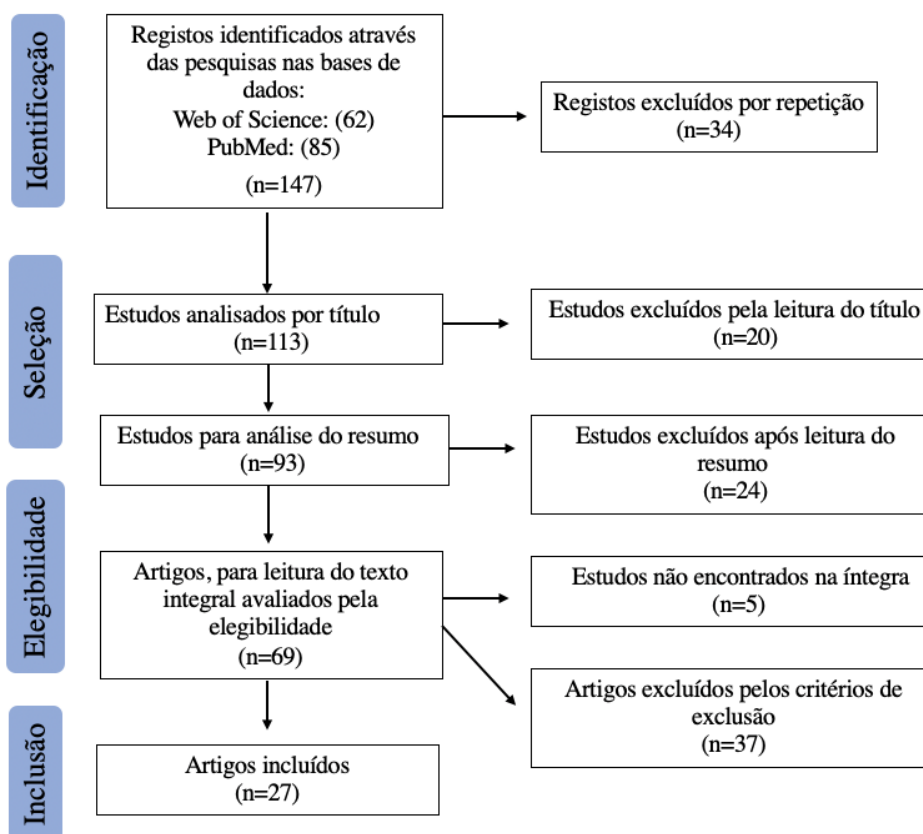


Figura 2: Processo de seleção dos estudos seguindo o protocolo PRISMA.

Os 27 artigos selecionados foram lidos na íntegra e os dados foram mapeados e inseridos num formulário de mapeamento de dados (Tabela II).

Tabela II: Artigos selecionados

Código	Artigo
A1	Saxena S, Kumar S. Saliva in forensic odontology: A comprehensive update. J Oral Maxillofac Pathol 2015;19:263-5.
A2	Khare P et al Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. J Forensic Dent Sci 2014;6:81-5.
A3	Lijnen I, Willems G. DNA research in forensic dentistry. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2001;23(9):511–7.
A4	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. Braz Oral Res 2005;19(3):216-22.
A5	Martí-Álamo S, A Mancheño-Franch, Marzal-Gamarra C, Carlos-Fabuel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. J Clin Exp Dent. 2012;4(4)
A6	Sakurada K et al., Current Methods for Body Fluid Identification Related to Sexual Crime: Focusing on Saliva, Semen, and Vaginal Fluid, MDPI Diagnostics 2020, 10, 693
A7	Bhuptani D, Kumar S, Vats M, Sagav R, Age and gender related changes of salivary total protein levels for forensic application, Journal of Forensic Odontostomatology 2018. May; (35): 26-33
A8	Ohta J, Noda N, Sakurada K, Comparison of Catalytic and Immunological Amylase Tests for Identifying of Saliva from Degraded Samples, J Forensic Sci, May 2019, Vol. 64, No. 3
A9	Ohta J, Sakurada K, Oral gram-positive bacterial DNA-based identification of saliva from highly degraded samples. Forensic Sci Int Genet. 2019;42(April):1
A10	Muruganandhan J, Sivakumar G. Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry. J Forensic Dent Sci 2011;3:38-45
A11	de Oliveira Musse J, Marques JAM, <i>et al.</i> Deoxyribonucleic Acid Extraction and Quantification from Human Saliva Deposited on Foods with Bitemarks. J Contemp Dent Pract 2019;20(5):548–551.
A12	Watanabe K, Akutsu T, Takamura A, Sakurada K, Practical evaluation of an RNA-based saliva identification method, Science and Justice 57 (2017)
A13	W. Kim et al, Detection of ABH blood group antigens in the saliva of Koreans and their stability according to storage of saliva samples, Forensic Science International 129 (2002) 58±63

Código	Artigo
A14	Sweet D, Lorente M, Lorente JA, Valenzuela A, Villanueva E. An Improved Method to Recover Saliva from Human Skin: The Double Swab Technique. J Forensic Sci. 1997;42(2):14120J.
A15	Sweet D, Hildebrand D. Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: A case report. Int J Legal Med. 1999;112(3):201–3.
A16	Sweet D, Shutler G. Analysis of salivary DNA evidence from a bite mark on a body submerged in water. J Forensic Sci 1999;44(5):1069–1072.
A17	Rashmi M. et al., Genotypic comparison of bacteria recovered from human bite marks and teeth using arbitrarily primed PCR, Journal of Applied Microbiology 2005, 99, 1265–1270
A18	Power D.A et al, PCR-based detection of salivary bacteria as a marker of expired blood, Science and Justice 50 (2010) 59–63
A19	Pandeshwar P, Das R. Role of oral fluids in DNA investigations. J Forensic Leg Med. 2014;22:45–50.
A20	M.L. Chávez-Briones, Relevance of sampling and DNA extraction techniques for the analysis of salivary evidence from bite marks: a case report, Genetics and Molecular Research 14 (3): 10165-10171 (2015)
A21	Rashmi Met al., Evaluation of the Secretor Status of ABO Blood Group Antigens in Saliva among Southern Rajasthan Population Using Absorption Inhibition Method, Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2016 Feb, Vol-10(2)
A22	Chauhan I, Sugirtharaj G, Sathyan S, Beena VT, Banerjee M. Evaluation of salivary DNA obtained from dental prosthesis and its applicability in forensic investigations. J Forensic Leg Med [Internet]. 2016;42:100–5.
A23	John SJ, Rajaji D, Jaleel D, Mohan A, Kadar N, Venugopal V. Application of Saliva in Forensics. Oral Maxillofac Pathol J. 2018;9(2):85–7.
A24	G. Sujatha et al., Determination of reliability and practicality of saliva as a genetic source in forensic investigation by analyzing DNA yield and success rates: A systematic review, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 31 (2019) 218–227
A25	Keerthana T, Sindhu Ramesh, Age Estimation Using DNA Extracted from Human Saliva as a Diagnostic Measure in Forensic Odontology, J Res Med Dent Sci, 2021, 9 (2): 132-139.
A26	Kadashetti V, Shivakumar K.M, Review on Forensic Odonto-Stomatology, Bangladesh Journal of Medical Science Vol. 20 No. 01 January'21. Page : 17-23
A27	Jayachandran S. Review of salivary diagnostics – A current scenario. J Indian Acad Oral Med Radiol 2020;32:205-8.

3.1 Características dos Estudos

Na Tabela III estão descritos os artigos incluídos nesta Scoping Review. Informações como Autor, data de publicação e tipo de estudo estão indicadas na tabela. Os artigos incluídos encontram-se distribuídos entre os anos de 1997 e 2021. Foram analisados 8 artigos de revisão, 17 artigos que desenvolveram investigação *In Vitro* e 2 artigos case report. (Tabela III)

Tabela III: Artigos incluídos e tipos de estudo

Artigo	Autores	Ano	Tipo de Estudo
A1	Sweet <i>et al.</i>	1997	<i>In vitro</i>
A2	Sweet e Hildebrand	1999	Relato de Caso
A3	Sweet e Shutler	1999	Relato de caso
A4	Lijnen e Willems	2001	Revisão
A5	Kim <i>et al.</i>	2002	<i>In vitro</i>
A6	Anzai-Kanto <i>et al.</i>	2005	<i>In vitro</i>
A7	Rahimi <i>et al.</i>	2005	<i>In vitro</i>
A8	Power <i>et al.</i>	2010	<i>In vitro</i>
A9	Muruganandhan e Sivakumar	2011	Revisão
A10	Marti-Àlamo <i>et al.</i>	2012	Revisão
A11	Pandeshwar e Reshma	2014	<i>In vitro</i>
A12	Khare <i>et al.</i>	2014	<i>In vitro</i>
A13	Saxena e Kumar	2015	Revisão
A14	Chaves-Briones <i>et al.</i>	2015	<i>In vitro</i>
A15	Metgud <i>et al.</i>	2016	<i>In vitro</i>
A16	Chauhan <i>et al.</i>	2016	<i>In vitro</i>
A17	Watanabe <i>et al.</i>	2017	<i>In vitro</i>
A18	Shanly <i>et al.</i>	2018	Revisão
A19	Bhuptani <i>et al.</i>	2018	<i>In vitro</i>
A20	Sujatha <i>et al.</i>	2019	Revisão
A21	Ohta <i>et al.</i>	2019	<i>In vitro</i>
A22	Ohta e Sakurada	2019	<i>In vitro</i>
A23	Musse <i>et al.</i>	2019	<i>In vitro</i>
A24	Jayachandran e Sadaksharam	2020	<i>In vitro</i>
A25	Sakurada <i>et al.</i>	2020	Revisão
A26	Keerthana e Ramesh	2021	<i>In vitro</i>
A27	Kadashetti e Shivakumar	2021	Revisão

3.2 Parâmetros avaliados

Foram avaliados diferentes parâmetros nomeadamente o método de recolha de saliva utilizado e a aplicabilidade da metodologia a nível forense.

Numa primeira fase o objetivo foi extrair informações acerca do método de recolha de saliva. Os dados extraídos dos artigos incluídos nesta revisão resultaram na identificação de dois métodos de recolha distintos a técnica *single swab* e técnica *double swab*.

Numa segunda fase o objetivo foi identificar a análise salivar utilizada no âmbito forense e a identificação da contribuição na identificação humana a nível forense. Os dados extraídos resultaram no mapeamento de 3 tipos de análises: análises enzimáticas, serológicas e moleculares. Em relação ao contributo forense os dados foram divididos em identificação do sexo, estimativa de idade, mapeamento genético, deteção de drogas, diagnóstico de doenças e determinação do grupo sanguíneo.

Todas as informações recolhidas estão representadas pelas tabelas IV. A tabela V apresenta as principais conclusões obtidas pela análise dos artigos seleccionados.

Tabela IV: Extração de dados e análise descritiva

Artigo	Tipo de Recolha	Tipo de Análise	Contributo Forense
A1	Double swab technique	Enzimática Serológica Molecular	Determinação do sexo Deteção de drogas Mapeamento genético
A2	-	Molecular	Mapeamento genético
A3	Double swab technique	Molecular	Mapeamento genético
A4	Double swab technique	Molecular	Mapeamento genético
A5	-	Serológico	Diagnóstico de doenças Deteção de drogas
A6	-	Enzimática Serológica Molecular	Identificação de saliva
A7	-	Serológica Molecular	Estimativa de idade
A8	-	Enzimática Serológica	Identificação de saliva
A9	-	Molecular	Identificação de saliva Mapeamento genético
A10	Double swab technique	Molecular	Determinação do sexo Mapeamento genético
A11	Single Swab technique Double Swab technique	Molecular	Mapeamento genético
A12	-	Enzimática Serológica Molecular	Identificação de saliva Mapeamento genético
A13	-	Serológica	Determinação do grupo sanguíneo
A14	Double Swab Technique	Molecular	Mapeamento genético
A15	Double Swab technique	Molecular	Mapeamento genético
A16	Single Swab technique Double Swab Technique	Molecular	Mapeamento genético
A17	-	Molecular	Mapeamento genético
A18	-	Molecular	Mapeamento genético
A19	Double Swab Technique	Enzimático, serológico e molecular	Estimativa de idade Mapeamento genético
A20	Single Swab technique	Molecular	Mapeamento genético
A21	-	Serológico	Determinação do grupo sanguíneo
A22	-	Molecular	Mapeamento genético
A23	Single Swab technique Double Swab technique	Enzimática e Molecular	Determinação do sexo Estimativa de idade Deteção de drogas Mapeamento genético
A24	-	Molecular	Mapeamento genético
A25	-	Molecular	Estimativa de idade
A26	-	Molecular	Mapeamento genético
A27	-	Serológica e molecular	Diagnóstico de doenças

Tabela V: Resultados descritivos da recolha de dados.

	Técnicas de Recolha de Saliva	Análises Enzimáticas	Análises Serológicas	Análises Moleculares
Análises Utilizadas	Single Swab Technique; Double Swab Technique,	Phadebas Amylase Test®.	Rapid Stain Identification® (RSID); SALigAE-saliva Test®; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Radioimmunoassay (RIA);	Restriction fragment length polymorphism (RFLP); Polymerase Chain Reaction (PCR).
Contributo Forense	Recolha de saliva seca.	Avaliação quantitativa de saliva.	Diagnóstico de doenças; Deteção de drogas; Deteção e diferenciação de diferentes fluidos; Determinação do grupo sanguíneo.	Comparação de amostras de ADN; Diagnóstico de doenças genéticas.

DISCUSSÃO

4. Discussão

4.1 Técnicas de Recolha de Saliva

Em casos de violência doméstica, abuso e outros tipos de desregramentos a presença de danos corporais relacionados com marcas de mordida é uma fonte fundamental de ADN. Este facto possibilita a recolha dessa saliva para posteriormente ser analisada.

Um grande número de técnicas forenses baseia-se na evidência física deixada pelo agressor, isto é, analisam as marcas em si, a morfologia dos dentes, da arcada dentária, a posição dentária entre outros. No entanto o vestígio oral que permanece na lesão pode ser passível de ser recolhido e analisado, mesmo em condições em que já tenha ficado seco.

Após a deteção da saliva no local da lesão, ou na cena do crime, é possível proceder à sua recolha através de métodos *single swab* ou *double swab*.

A técnica do *single swab*, é conhecida como um método clássico de recolha de fluídos e consiste no uso de uma zaragatoa ou um filtro de papel para recolher a amostra⁽¹³⁾. Apresenta-se como uma metodologia de fácil execução.

A técnica *double swab* é fundamentalmente utilizada nos casos em que existe evidência da presença de saliva seca e é realizada com recurso a duas zaragatoas diferentes. A primeira zaragatoa é impregnada em água destilada e esfregada delicadamente na região onde se realiza a recolha, a segunda zaragatoa é utilizada seca, de forma a recolher a amostra hidratada pelo primeiro passo. Esta técnica mostra-se mais efetiva quando comparada com a técnica *single swab*, uma vez que a humidade presente na primeira etapa reidrata o vestígio forense e aumenta a sua adesão às fibras de algodão da zaragatoa do segundo passo ^(14,15).

4.2 Tipos de análises

4.2.1 Análises Enzimáticas

O mundo contemporâneo vive de uma constante inovação e apresenta-se pautado pelo desenvolvimento de novas tecnologias, colocadas ao serviço das variadas ciências, nomeadamente das ciências forenses.

Os fluidos orais originários de marcas de mordida, impressões labiais, ou que estejam presentes em beatas de cigarros ou copos, entre outros objetos, apresenta-se como uma excelente fonte de ADN ^(11,16,17).

Em cenas de crime em que não é possível detetar a saliva, ou em casos em que a saliva se encontra diluída com outros fluidos e/ou seca, é necessária a deteção para que posteriormente seguir-se à quantificação e análise propriamente dita.

A técnica de deteção salivar através da enzima alfa-amilase tem demonstrado grande utilidade⁽¹⁸⁾. Esta enzima é produzida pelas glândulas salivares e pode ser encontrada em animais, plantas e microorganismos. No corpo humano pode ser encontrada em diferentes fluidos corporais como no leite materno, suor, sémen e na saliva. Apesar de poder ser detetada em diferentes fluidos, as suas concentrações mostraram-se maiores na saliva quando em comparação com outros fluidos corporais⁽¹⁹⁾.

Atualmente existem várias técnicas de deteção de saliva baseadas na enzima alfa-amilase. O Phadebas Amylase Test^R é um teste baseado na atividade da enzima, quando em contato com o amido presente no teste, este degrada-o originando um substrato de cor azul, desta forma é possível quantificar a presença de saliva pela colorimetria apresentada no teste ^(20,21).

Hedman, verificaram no decurso do seu estudo que o Phadebas Amylase Test^R é útil uma vez que se revelou capaz de detetar saliva em manchas secas encontradas em diferentes superfícies ⁽²¹⁾.

Benjamin *et al.* realizaram dois testes salivares diferentes o RSID^R e o SALIgAE Test^R, ambos os testes são utilizados para detetar a presença de saliva tendo como base a deteção da enzima alfa-amylase, e não na sua atividade. Estes demonstraram maior sensibilidade em comparação ao Phabeas Test^R, que apresentou falsos-positivos por não ser específico para a alfa-amilase salivar

humana. Desta forma os testes RSID^R e SALIgAE Test^R são efetivos no que diz respeito à detecção de saliva em âmbito forense, oferecendo mais especificidade e sensibilidade na identificação de saliva humana do que o Phabeas Amylase Test^R (20).

Akutsu et al. defendem que os testes RSID^R e SALIgAE^R se mostraram s mais sensíveis, quando em comparação ao Phadebas Amylase Test^R, contudo, estes também apresentaram resultados positivos quando realizados em outros fluídos corporais (22).

4.2.2 Análises Serológicas

As análises serológicas realizadas em saliva, atualmente ganharam grande interesse no que diz respeito à detecção de drogas de abuso, álcool e para o diagnóstico de doenças.

A técnica Radioimmunoassay (RIA) pode ser utilizada na saliva para rastreio de vários tipos de drogas, como anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepinas, cocaína e opioides. O uso da RIA permite também a detecção de *Cannabis* em até de 4 horas após o consumo (23).

O método enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) é um método utilizado para medir anticorpos, antígenos e proteínas. Podendo ser utilizado para o diagnóstico de doenças autoimunes, detecção e diferenciação de diferentes fluidos corporais e até para a determinação dos diferentes grupos sanguíneos (22,24).

Akutsu et al., analisou a presença da proteína estaterina, que é predominante na nossa cavidade oral, estando envolvida estabilização e o transporte do cálcio na saliva. Este estudo foi analisado a presença da estaterina através do método ELISA em amostras em que há uma mistura de fluidos (saliva, sangue e sêmen).

Conclui-se que o método ELISA pode ser aplicado em casos forenses, nomeadamente para a detecção de saliva em diferentes fluidos e para o

diagnóstico de doenças, pois apresenta uma relação custo-benefício favorável, assim como uma alta especificidade ⁽²²⁾.

4.2.4 Análises Moleculares

Após as evidências serem coletadas, o ADN contido pode ser isolado e quantificado. O método *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) é uma análise que identifica variações nas sequências de ADN (chamados polimorfismos) de forma a diferenciar indivíduos, espécies e populações ⁽²⁵⁾. No entanto, esta técnica apresenta-se como mais demorada e necessita de uma grande quantidade de ADN na amostra, o que, em cenários forenses nem sempre é possível, podendo apresentar-se como uma limitação para a sua utilização ⁽¹⁵⁾.

Ocasionalmente, a recolha de uma grande quantidade de saliva e consequentemente uma grande quantidade de ADN pode ser difícil, por isso a técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR) parece ser uma boa alternativa no que diz respeito a amostras degradadas ou quando se apresentam com pouca quantidade de material genético.

A técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é uma técnica utilizada para análise de ADN. Têm a capacidade de possibilitar a amplificação de sequências de ADN e analisá-las mesmo quando há uma pequena quantidade de ADN na amostra. As maiores vantagens da técnica são a sua precisão, sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez e facilidade da análise ^(15,26).

Esta técnica apresenta-se como uma grande mais valia dado possibilitar a análise de ADN de uma amostra, mesmo que esta tenha passado por um processo de degradação.

No estudo de Chauhan et al. em 2016, foi recolhida e analisada a saliva de uma prótese dentária depois de um período de tempo armazenada. O estudo demonstrou que o ADN salivar recuperado que se encontrava aderido ao material da prótese, é uma fonte adequada para a análise do ADN pela técnica de PCR ⁽²⁷⁾.

Num estudo realizado por Sweet e Hildebrand, foram analisadas amostras de ADN recolhidas de um pedaço de queijo deixado numa cena de crime. Devido às condições de armazenamento e manuseio da evidência não foi possível recuperar e analisar o ADN da amostra, pois este possuía inibidores que não possibilitaram a análise PCR ⁽¹³⁾.

Desta forma é necessário ter em consideração as condições gerais em que se encontra o vestígio, a degradação devido ao tempo, condições de armazenamento, exposição solar e exposição a componentes químicos, podem levar a resultados negativos e impossibilitar a consequente amplificação e análise da amostra.

As amostras quando degradadas são mais difíceis de analisar apropriadamente, pelo que são necessárias de novas metodologias baseadas em biomarcadores salivares. Marcadores de ADN bacteriano têm mostrado ser uma boa fonte para análise e identificação de saliva humana, uma vez que apresenta semelhanças com o ADN mitocondrial, que tem grande valor nas análises forenses⁽²⁸⁾.

No entanto precisam de ser realizados mais estudos de forma a aumentar a compreensão das vantagens e limitações da sua utilização, uma vez que a contaminação por outras bactérias pode levar a resultados inconclusivos.

Um estudo desenvolvido por Ohta *et al.* avaliou a presença de ADN bacteriano proveniente de bactérias gram-positivas como marcadores salivares em casos variados de degradação de amostras (degradação pelo calor, por microrganismos e por radiação Ultravioleta. Este estudo foi desenvolvido uma vez que o ADN bacteriano presente na nossa cavidade oral humana, possui uma grande similaridade com o ADN mitocondrial (grande resistência a degradação e alto número de cópias) ⁽²⁸⁾.

Ohta *et al* e Sakurada *et al*, ao utilizar o método melting curve (MC), detetaram a presença de marcadores salivares de ADN bacteriano independente. O ADN das bactérias *S.salivarius*, *S.oralis* e *P.maculosa* foram considerados marcadores altamente precisos⁽²⁸⁾.

O ADN da *S. oralis* e *S. salivarius* mostrou ser mais específico para a deteção de saliva humana, inclusivamente demonstrou melhores resultados

quando comparado com os testes enzimáticos baseados na amilase. Em contrapartida a *P.maculosa* não mostrou tanta especificidade, pois por ser uma bactéria essencialmente presente na flora intestinal mais estudos precisam de ser realizados para melhorar o entendimento da sua aplicabilidade ⁽²⁸⁾.

Contudo, há de levar em consideração de que o microbioma oral não é igual em todos os indivíduos, ou seja, ainda é necessário compreender a precisão da técnica, relativamente a quais e quantas espécies bacterianas deveriam analisar.

4.5 Contributo Forense

4.5.1 Determinação do Sexo

A determinação do sexo através da saliva, pode ser realizada pela identificação da cromatina sexual e pela proteína amelogenina.

A cromatina sexual ou corpúsculo de Barr é normalmente encontrado em indivíduos do sexo feminino, ou seja, genótipo XX dos genes sexuais. Amostras com uma maior deteção de corpúsculos de Barr são representativos do género feminino, podendo ser um critério discriminatório na identificação humana ^(9,29).

As amelogeninas são proteínas essenciais para a formação do esmalte, são produzidas pelos genes AMEL que estão presentes nos cromossomas X nas mulheres e Y nos homens. Desta forma os genes AMEL podem fornecer uma base para a análise de ADN e identificação do sexo ⁽¹⁷⁾.

4.5.2 Estimativa de idade

A estimativa da idade ao longo dos anos baseou-se em análises morfológicas ou interpretações radiográficas. Atualmente existem técnicas laboratoriais para a estimativa de idade baseadas na metilação do ADN e/ou na análise de proteínas salivares como a estaterina, histatina e proteínas ricas em prolina ^(30,31).

Bhuptani *et al.*, avaliou os níveis de proteínas salivares em voluntários com idades compreendidas entre os 3 e os 60 anos de idade, de forma a correlacionar a idade com a concentração de proteínas na saliva. Concluiu que

uma maior concentração e presença de proteínas está relacionada a crianças e adolescentes, estando menos prevalente em adultos ⁽³⁰⁾.

4.5.3 Detecção de Drogas

Novas metodologias e análises têm sido desenvolvidas de modo a utilizar a saliva como método de detecção de drogas.

As concentrações de drogas na saliva normalmente refletem uma pequena fração do que está disponível no sangue, ou seja, os resultados provenientes das análises salivares para a detecção de drogas pode nos fornecer informações atualizadas sobre a droga consumida assim como a sua quantidade ^(9,29).

4.5.4 Diagnóstico de doenças

O diagnóstico de doenças por muito anos foi realizado com base na análise do sangue. Atualmente o diagnóstico de doenças realizado pela saliva tem sido desenvolvido pela sua facilidade de recolha.

Devido aos biomarcadores específicos encontrados na saliva, pode-se detetar uma variedade de doenças infecciosas como o citomegalovírus, doenças autoimunes como doença celíaca e síndrome de Sjogren, estágios iniciais de cancro oral e cancro do pulmão ^(32,33).

4.5.5 Detecção do grupo sanguíneo

Constituintes salivares como as glicoproteínas possuem um papel fundamental na cavidade oral, seja para proteção tecidual, lubrificação e/ou modulação da microbiota oral. A mucina de alto peso molecular presente na saliva é um dos principais transportadores de antígenos do grupo sanguíneo.

Kim *et al*, concluíram que a análise do grupo sanguíneo em amostras de saliva é aceitável quando esta é armazenada a baixas temperaturas. Quando as amostras são expostas a longos períodos de espera, temperaturas inadequadas, ou microrganismos há degradação da amostra o que pode levar a resultados negativos e inviabilizar a análise ⁽³⁴⁾.

4.5.6 Mapeamento genético

O ADN possui um papel fundamental no que diz respeito à presença de todas as informações genéticas de um indivíduo.

O mapeamento genético consiste na análise do ADN quando não há outras informações ou evidências acerca do(s) indivíduo(s). Desta forma o mapeamento genético pode basear-se na identificação do sexo, na estimativa de idade, no diagnóstico de síndromes e de doenças genéticas.

No caso de países em que existam bases de dados de ADN, a comparação do ADN com os existentes pode ser o caminho mais rápido para a identificação humana. Contudo, quando não há meios de comparação, a análise do ADN para reconstrução do perfil pode ser uma alternativa.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

A Medicina Dentária Forense tornou-se, nas últimas décadas, uma área de atuação de grande importância na nossa sociedade. Através das novas inovações tecnológicas que têm vindo a ser desenvolvidas, a saliva ganhou um maior interesse nas ciências forenses, por ser um fluido corporal rico de informações passíveis a serem analisados, têm sido realizados muitos estudos sobre suas aplicabilidades.

Diante desta revisão podemos concluir que:

- A Medicina Dentária Forense e o uso do ADN nesta área, nos oferece novas concessões em relação á identificação humana através da saliva e devem ser acrescentadas aos meios de investigação das ciências forenses.
- As análises e recolhas apresentadas mostraram grande confiabilidade, especificidade, e aplicabilidade no nosso cotidiano.
- A saliva como fonte de ADN pode nos forneces uma alta gama de resultados que podem ser aplicados nas mais variadas situações: em investigações forenses, abusos, acidentes, identificação de pessoas não documentadas, para o diagnóstico de doenças, deteção de abuso de drogas...

Acreditamos que por ser uma nova área de pesquisa, esta precisa de mais estudos para sua utilização ideal. Nomeadamente para a elaboração de técnicas padronizadas, de forma a evitar a contaminação das amostras e facilitar a avaliação em ambiente laboratorial. Numa perspetiva clínica, a recolha, análise e armazenamento de amostras salivares recolhidas de pacientes poderia ser crucial no que diz respeito á criação de banco de dados de ADN. Além de apresentar uma rápida recolha, facilidade e ser indolor, a formulação de testes rápidos para aplicação em ambiente clínico poderia ser de grande utilidade no que diz respeito para o diagnóstico de doenças, exames de rotinas e mapeamento populacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prajapati G., Sarode S.C., Sarode G.S., Shelke P., Awan K.H., Patil S. Role of forensic odontology in the identification of victims of major mass disasters across the world: A systematic review. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199791.
2. Vieira D.N. Prefácio. In: Lidel, editor. *Medicina Dentária Forense*. Lisboa: Lidel; 2012. p. xiii-xiv.
3. Mohammed F, Fairozekhan AT, Bhat S et al. *Forensic Odontology*.
4. Ata-Ali J, Ata-Ali F. Forensic dentistry in human identification: A review of the literature. *J Clin Exp Dent*. 2014;6(2):162–7.
5. Saukko P, editor. *Knight's Forensic Pathology*. Third Edition ed: Edward Arnold Ltd; 2004 ; Rhonan Ferreira da Silva MMdP, Henrique César Marçal de Oliveira, Eduardo Daruge Júnior. Quantos pontos de concordância são necessários para se obter uma identificação.
6. Saxena S, Kumar S. Saliva in forensic odontology: A comprehensive update. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2015;19(2):263–5.
7. Kapoor P, Chowdhry A. Salivary signature in forensic profiling: A scoping review. *J Forensic Dent Sci*. 2018;10(3):123–7.
8. Kułak-Bejda A, Waszkiewicz N, Bejda G, Zalewska A, Maciejczyk M. Diagnostic value of salivary markers in neuropsychiatric disorders. *Dis Markers*. 2019;2019:14–9.
9. John SJ, Rajaji D, Jaleel D, Mohan A, Kadar N, Venugopal V. Application of Saliva in Forensics. *Oral Maxillofac Pathol J*. 2018;9(2):85–7.
10. Maulani C, Auerkari EI. Age estimation using DNA methylation technique in forensics: a systematic review. *Egypt J Forensic Sci*. 2020;10(1).
11. Pandeshwar P, Das R. Role of oral fluids in DNA investigations. *J Forensic Leg Med*. 2014;22:45–50.
12. Peters MDJ, Godfrey CM, Khalil H, McInerney P, Parker D, Soares CB. Guidance for conducting systematic scoping reviews. *Int J Evid Based Healthc*. 2015;13(3):141–6.
13. Sweet D, Hildebrand D. Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: A case report. *Int J Legal Med*. 1999;112(3):201–3.
14. Sweet D, Lorente M, Lorente JA, Valenzuela A, Villanueva E. An Improved Method to Recover Saliva from Human Skin: The Double Swab Technique. *J Forensic Sci*. 1997;42(2):141–20J.
15. Lijnen I, Willems G. DNA research in forensic dentistry. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2001;23(9):511–7.

16. Ohta J, Noda N, Minegishi S, Sakurada K. Application of DNA repair for *Streptococcus salivarius* DNA-based identification of saliva from ultraviolet-exposed samples. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2020;306:110077. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.110077>
17. Muruganandhan J, Sivakumar G. Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry. *J Forensic Dent Sci*. 2011;3(1):38.
18. Sakurada K, Watanabe K, Akutsu T. Current Methods for Body Fluid Identification Related to Sexual Crime: Focusing on Saliva, Semen, and Vaginal Fluid. *Diagnostics*. 2020;10(9):1–12.
19. Ohta J, Noda N, Sakurada K. Comparison of Catalytic and Immunological Amylase Tests for Identifying of Saliva from Degraded Samples. Vol. 64, *Journal of Forensic Sciences*. 2019. p. 873–7.
20. Pang BCM, Cheung BKK. Applicability of two commercially available kits for forensic identification of saliva stains. *J Forensic Sci*. 2008;53(5):1117–22.
21. Hedman J, Gustavsson K, Ansell R. Using the new Phadebas® Forensic Press test to find crime scene saliva stains suitable for DNA analysis. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2008;1(1):430–2.
22. Akutsu T, Watanabe K, Fujinami Y, Sakurada K. Applicability of ELISA detection of statherin for forensic identification of saliva. *Int J Legal Med*. 2010;124(5):493–8.
23. Aps JKM, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*. 2005;150(2–3):119–31.
24. Pati AR. Saliva as a diagnostic tool in orofacial disorders. *Indian J Forensic Med Toxicol*. 2020;14(4):8343–7.
25. Sakari SL, Jimson S, Masthan KMK, Jacobina J. Role of DNA profiling in forensic odontology. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7(April):S138–41.
26. Musse J de O, Marques JAM, Remualdo V, Pitlovanciv AK, da Silva CAL, Corte-Real F, et al. Deoxyribonucleic acid extraction and quantification from human saliva deposited on foods with bite marks. *J Contemp Dent Pract*. 2019;20(5):548–51.
27. Chauhan I, Sugirtharaj G, Sathyan S, Beena VT, Banerjee M. Evaluation of salivary DNA obtained from dental prosthesis and its applicability in forensic investigations. *J Forensic Leg Med* [Internet]. 2016;42:100–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2016.05.015>
28. Ohta J, Sakurada K. Oral gram-positive bacterial DNA-based identification of saliva from highly degraded samples. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2019;42(April):103–12. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.06.016>

29. Clift A, Lamont CM. Saliva in Forensic Odontology. *J Forensic Sci Soc.* 1974;14(3):241–5.
30. Bhuptani D, Kumar S, Vats M, Sagav R. Age and gender related changes of salivary total protein levels for forensic application. *J Forensic Odontostomatol.* 2018;36(1):26–33.
31. Keerthana T, Ramesh S. Age Estimation Using DNA Extracted from Human Saliva as a Diagnostic Measure in Forensic Odontology. *J Res Med Dent Sci.* 2021;9(2):132–9.
32. Jayachandran S. Review of salivary diagnostics – A current scenario. *J Indian Acad Oral Med Radiol.* 2020;32(3):205–8.
33. Martí-Álamo S, Mancheño-Franch A, Marzal-Gamarra C, Carlos-Fabuel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *J Clin Exp Dent.* 2012;4(4).
34. Kim W, Kim YK, Chung SC, Lee SW, Kho HS. Detection of ABH blood group antigens in the saliva of Koreans and their stability according to storage of saliva samples. *Forensic Sci Int.* 2002;129(1):58–63.