

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DE CURITIBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

MARIA CHRISTINA MARINI

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM
TECIDO ÓSSEO - MÉTODO ORGÂNICO COM DIGESTÃO PELA
PROTEINASE K E MÉTODO COM MOVIMENTO DE PRECESSÃO -
UTILIZANDO COMO PARÂMETROS A EFICIÊNCIA DE
AMPLIFICAÇÃO DE STRs AUTOSSÔMICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CURITIBA

2014

MARIA CHRISTINA MARINI

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM
TECIDO ÓSSEO - MÉTODO ORGÂNICO COM DIGESTÃO PELA
PROTEINASE K E MÉTODO COM MOVIMENTO DE PRECESSÃO -
UTILIZANDO COMO PARÂMETROS A EFICIÊNCIA DE
AMPLIFICAÇÃO DE STRs AUTOSSÔMICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Alexandre de Faria

Co-orientador: Prof. Dr. Hemerson Bertassoni
Alves

CURITIBA

2014

Dedico este trabalho à minha mãe. Quem a conheceu sabe a razão e quem não a conheceu ouviu de minha boca tanto e tanto sobre ela que passou a conhecê-la.

Quando depois de mais velha, eu pensei em fazer o curso de direito, disse a ela que terminaria o curso com mais de quarenta anos e que não valia a pena a essa altura de minha vida. Na sua sabedoria ela disse: “é mesmo, se você não fizer o curso este tempo não vai passar e seus quarenta não vão chegar?!”. Hoje sou bacharel em direito, também.

Dedico também ao meu pai, que sempre me mostrou o valor de ser uma mulher independente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Rubens Alexandre de Faria que me proporcionou esta grande oportunidade, com confiança, paciência e, principalmente, compreensão sobre alguns momentos complicados que passei nestes últimos anos de estudo.

Ao Dr. Bertoldo Schneider Junior, por ter acreditado em meu projeto.

Ao Dr. Hemerson Bertassoni Alves, que foi meu co-orientador, por ser um visionário da ciência e ter me permitido trabalhar com ele.

Ao Dr. Marcelo Malaghini e à Dra. Marianna Maia Taulois do Rosario, que muitas vezes me ajudaram dentro do Laboratório de Genética Molecular Forense.

À Farmacêutica e Bioquímica Deborah de Oliveira Menoncello, que com seu poder de organização, me ajudou a administrar o caos, transformando-o em realização.

À Dra. Viviane Monteiro Góes, do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, que me permitiu utilizar vários equipamentos para minha pesquisa.

Ao amigo Leandro Cerqueira Lima, por todas as vezes que teve paciência de me ensinar matemática, sem antes me dar uma boa bronca por eu não estar entendendo!

Ao Instituto de Criminalística do Paraná por ter me dado suporte técnico para a realização desta pesquisa.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná por ter me acolhido.

Aos meus pais Renato e Christina que... Fizeram tudo por mim.

Ao meu irmão Renato que foi sempre meu exemplo de dedicação ao conhecimento.

Ao meu Jorge, amor de minha vida, que ilumina meus dias e acalenta minhas noites.

"Deus segundo Spinoza"

Para de ficar rezando e batendo no peito!
O que eu quero que faças é que saias pelo mundo, desfrutes de tua vida.
Eu quero que gozes, cantes, te divirtas e que desfrutes de tudo o que Eu fiz para ti.

Para de ir a estes templos lúgubres, obscuros e frios que tu mesmo construístes e que acreditas ser a minha casa!
Minha casa está nas montanhas, nos bosques, nos rios, nas praias. Aí é onde eu vivo e expresso o meu amor por ti.
Para de me culpar pela tua vida miserável!
Eu nunca te disse que eras um pecador.
Para de ficar lendo supostas escrituras sagradas que nada tem a ver comigo!
Se não podes me ler num amanhecer, numa paisagem, no olhar dos teus amigos, nos olhos de teu filhinho não me encontrarás em nenhum livro...
Para de tanto ter medo de mim!
Eu não te julgo, nem te critico, nem me irrita, nem me incomoda, nem te castigo.
Eu sou puro amor. Para de me pedir perdão!
Não há nada a perdoar. Se Eu te fiz... Eu te enchi de paixões, de limitações, de prazeres, de sentimentos, de necessidades, de incoerências, de livre-arbítrio. Como posso te castigar por seres como és, se sou Eu quem te fez? Crês que eu poderia criar um lugar para queimar a todos os meus filhos que não se comportam bem pelo resto da eternidade? Que tipo de Deus pode fazer isso? Esquece qualquer tipo de mandamento, são artimanhas para te manipular, para te controlar, que só geram culpa em ti. Respeita o teu próximo e não faças aos outros o que não queiras para ti. A única coisa que te peço é que prestes atenção à tua vida; que teu estado de alerta seja o teu guia. Tu és absolutamente livre para fazer da tua vida um céu ou um inferno. Para de crer em mim!
Crer é supor, imaginar. Eu não quero que acredites em mim. Quero que me sintas em ti quando beijas tua amada, quando agasalhas tua filhinha, quando acaricias teu cachorro, quando tomas banho de mar. Para de louvar-me!
Que tipo de Deus ególatra tu acreditas que Eu seja? Tu te sentes grato? Demonstra-o cuidando de ti, da tua saúde, das tuas relações, do mundo. Expressa tua alegria! Esse é o jeito de me louvar. Para de complicar as coisas e de repetir como papagaio o que te ensinaram sobre mim!
Não me procures fora! Não me acharás. Procura-me dentro... aí é que estou, dentro de ti.

Baruch Spinoza, filósofo, que viveu no séc. XVII

MARINI, Maria Christina. **Comparação entre métodos de extração de DNA em tecido ósseo- método orgânico com digestão pela proteinase K e método com movimento de precessão – utilizando como parâmetros a eficiência de amplificação de STRs autossômicos.** 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

Osso é o tecido mais desafiador para extração e purificação de DNA. Sistemas comerciais equipamentos específicos são frequentemente usados em Laboratórios Forenses para esse objetivo. Este trabalho se concentra principalmente na comparação de dois métodos de extração de DNA de células degradadas de tecido ósseo. Neste contexto, é descrito o método clássico e já apresentado pelos Laboratórios Forenses, que utiliza a proteinase K. Será proposto um método ainda não utilizado rotineiramente em Laboratórios Forenses de Genética Molecular, que se baseia em um dispositivo que imprime na amostra um movimento de precessão. Após um exaustivo levantamento dos casos processados no Laboratório de Genética Molecular Forense da Polícia Científica do Estado do Paraná, do ano de 1998 até o ano de 2013, foram encontrados 817 casos de identificação humana, dos quais 527 foram encaminhados ao órgão solicitante, com resultados conclusivos, sendo 463 foram inclusões e 64 exclusões. Dos casos restantes, 85 foram processados por diversas vezes, sem resultados conclusivos, frente à impossibilidade técnica para extração de DNA da célula, até os dias de hoje. Os 205 não correspondiam às características necessárias para este trabalho. Dos 85 casos com resultados inconclusivos, foram utilizadas neste trabalho 45 amostras já extraídas. Os outros 40 casos não foram utilizados para não prejudicar o arquivo do Laboratório.

Palavras-Chaves: osso – tecido – forense - precessão

MARINI, Maria Christina. **Comparação entre métodos de extração de DNA em tecido ósseo- método orgânico com digestão pela proteinase K e método com movimento de precessão – utilizando como parâmetros a eficiência de amplificação de STRs autossômicos, pela PCR, em conjuntos comerciais e a quantificação de DNA por PCR em tempo real.** 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

The bone is the most challenging tissue for DNA extraction and purification. Expensive commercial kits and specific equipment are often used in forensic laboratories towards that goal. This paper focuses primarily on comparing two methods of DNA extraction from cell degraded bone tissue. In this context is described the classic method and already filed by the forensic laboratories, which uses proteinase K and will be proposed a method not yet routinely used in Forensic Laboratories of Molecular Genetics, which is based on a device that produces a movement of precession. After an exhaustive survey in the archives of the Molecular Genetics Laboratory of Forensic Paraná State Forensic Science, between the years 1998 and 2013, were found 817 cases of human identification, of which 527 with conclusive results, of which 463 were inclusions and 64 exclusions. Of the remaining cases, 85 were processed several times without conclusive results, for technical impossibilities until the present day. The remaining 205 cases were cataloged in the archives of the Laboratory as no appointment, not leave report, canceled, and various tissues. The remaining 85 cases with inconclusive results, were used in this study 45 samples already extracted. The other 40 cases contained very little sample, or were used until the end of the samples sent.

Key Words: bone – tissue – forensics - precession

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – INDIVÍDUO CUJO RECONHECIMENTO É VISUAL	16
FIGURA 2 – CADÁVER EM ADIANTADO ESTADO DE DECOMPOSIÇÃO	17
FIGURA 3 – UNIDADES DE PARES DE BASE NA SEQUÊNCIA DO DNA	25
FIGURA 4 – PROCESSO DE GENOTIPAGEM POR DETERMINAÇÃO DE STR ..	28
FIGURA 5 – ESTRUTURA DO OSSO	30
FIGURA 6 – CARACTERÍSTICA MACROSCÓPICA DE OSSO	31
FIGURA 7 – PRINCIPAIS CÉLULAS ENCONTRADAS NOS TECIDOS ÓSSEOS ..	32
FIGURA 8 – ESQUEMA DE OSSIFICAÇÃO INTRAMEMBRANOSA	33
FIGURA 9 – SECÇÕES DE DOIS OSSOS FEMURAIS DA IDADE MÉDIA	35
FIGURA 10 – MOVIMENTO DE PRECESSÃO.....	38
FIGURA 11 – MOVIMENTO DE PRECESSÃO DOS EQUINÓCIOS.....	38
FIGURA 12 – EQUIPAMENTO PRECELLYS® 24.....	39
FIGURA 13 – SUPORTE PARA AMOSTRAS.....	40
GRÁFICO 1 – RESULTADOS OBTIDOS NAS AMOSTRAS	42
GRÁFICO 2 – TECIDOS USADOS E SEU ESTADO.....	43
FIGURA 14 – EXTRAÇÃO ORGÂNICA POR FENOL CLOROFÓRMICO	46
TABELA 1 – AMOSTRAS QUE TIVERAM DNA AMPLIFICADO E ANALISÁVEL...	51
FIGURA 15 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELOS MÉTODO CLÁSSICO DA AMOSTRA 14	52
FIGURA 16 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO COM MOVIMENTO DE PRECESSÃO DA AMOSTRA 14	53
FIGURA 17 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO CLÁSSICO DA AMOSTRA 19.....	54
FIGURA 18 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO COM MOVIMENTO DE PRECESSÃO DA AMOSTRA 19	54
FIGURA 19 - ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO CLÁSSICO DA AMOSTRA 23.....	55

FIGURA 20 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO DE PRECESSÃO DA AMOSTRA 23.....	56
FIGURA 21 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO CLÁSSICO DA AMOSTRA 25.....	57
FIGURA 22 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO PRECESSÃO DA AMOSTRA 25	57
FIGURA 23 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO CLÁSSICO DA AMOSTRA 31.....	58
FIGURA 24 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO PRECESSÃO DA AMOSTRA 31	59
FIGURA 25 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO CLÁSSICO DA AMOSTRA 32.....	60
FIGURA 26 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO PRECESSÃO DA AMOSTRA 32	60
FIGURA 27 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO CLÁSSICO DA AMOSTRA 34.....	61
FIGURA 28 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO COM MOVIMENTO DE PRECESSÃO DA AMOSTRA 34	62
FIGURA 29 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO CLÁSSICO DA AMOSTRA 41.....	63
FIGURA 30 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO COM MOVIMENTO DE PRECESSÃO DA AMOSTRA 41	63
FIGURA 31 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO CLÁSSICO DA AMOSTRA 43.....	64
FIGURA 32 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO COM MOVIMENTO DE PRECESSÃO DA AMOSTRA 43	65
FIGURA 33 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO CLÁSSICO DA AMOSTRA 44.....	66
FIGURA 34 – ELETROFEROGRAMA COM OS RESULTADOS PELO MÉTODO COM MOVIMENTO DE PRECESSÃO DA AMOSTRA 44.....	66
FIGURA 35 – OSSO COMPACTO E ESPONJOSO	68
FIGURA 36 – AGITADOR PARA FRASCOS	69
FIGURA 37 – O MODELO GORDER E GREDEL DA MEMBRANA CELULAR	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo Geral	13
1.1.2 Objetivo Específico.....	13
1.2 JUSTIFICATIVA	13
1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	14
1.4 EMBASAMENTO TEÓRICO	14
1.4.1 Equipamento Utilizado.....	14
1.4.2 Material Biológico Utilizado	15
1.5 CONCLUSÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 IDENTIFICAÇÃO HUMANA	16
2.2 SISTEMAS DE IDENTIFICAÇÃO.....	17
2.2.1 Reconhecimento e Identificação	18
2.2.2 Antropologia	19
2.2.3 Odontologia Legal	19
2.2.4 Papislocopia	20
2.2.5 Ácido Desoxiribonucleico (DNA)	21
2.3 PROCESSOS DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA POR MEIO DO DNA.....	23
2.3.1 Aspectos Gerais	23
2.3.2 Polimorfismo.....	24
2.3.3 Reação em Cadeira da Polimerasa (PCR).....	26
2.4 ANÁLISE DE FRAGMENTOS	27
2.5 O FRAGMENTO DE DNA	29
2.6 ASPECTOS BIOLÓGICOS	29
2.6.1 A Célula.....	29
2.6.2 Estrutura e Formação do Osso	30
2.7 MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO - DECOMPOSIÇÃO.....	33
2.7.1 Material Biológico Humano no Âmbito Civil.....	35
2.7.2 Material Biológico Humano no Âmbito Forense	36
2.8 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE OSSOS	36
2.9 MOVIMENTO DE PRECESSÃO	37
2.9.1 Precessão dos Equinócios	37
2.9.2 Automação do Movimento de Precessão	39
2.10 CONCLUSÃO.....	40
3 METODOLOGIA	42
3.1 AMOSTRAS	42
3.2 MATERIAIS	43
3.3 REAGENTES	44
3.4 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA ÓSSEO.....	45
3.4.1 Extração de DNA pelo Método Tradicional Orgânico Fenol - Clorofórmio.....	45
3.4.2 Extração de DNA pelo Método com Movimento de Precessão.....	46
3.5 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA	47
3.6 AMPLIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	47
3.7 ANÁLISE DE FRAGMENTOS	48

3.8 CONCLUSÃO.....	48
4 RESULTADOS.....	49
4.1 QUANTIFICAÇÃO.....	49
4.2 ANÁLISE DE FRAGMENTOS.....	49
4.2.1 Altura de Picos de DNA.....	49
4.2.2 Amostra Amplificada nos Dois Métodos.....	50
4.2.3 Análise dos Eletroferogramas.....	50
4.2.4 Análise dos Alelos pela Observação do Eletroferogramas.....	51
4.2.5 Amostra Número 14.....	52
4.2.6 Amostra Número 19.....	53
4.2.7 Amostra Número 23.....	55
4.2.8 Amostra Número 25.....	56
4.2.9 Amostra Número 31.....	58
4.2.10 Amostra Número 32.....	59
4.2.11 Amostra Número 34.....	61
4.2.12 Amostra Número 41.....	62
4.2.13 Amostra Número 43.....	64
4.2.14 Amostra Número 44.....	65
4.3 DISCUSSÕES FINAIS.....	67
5 CONCLUSÃO FINAL.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A identificação humana não é só um problema científico, mas uma questão jurídica e social. Todos os indivíduos têm uma primeira identificação através do nome e de sua filiação, que os individualiza formalmente. O Código Civil Brasileiro (2002) em seu artigo 2º reza que: “A personalidade civil da pessoa começa do nascimento com vida; mas a lei põe a salvo, desde a concepção, os direitos do nascituro”. No momento do nascimento, o indivíduo passa a ter direitos e deveres frente ao ordenamento jurídico. O mesmo código mais adiante frisa no artigo 6º: “A existência da pessoa natural termina com a morte; presume-se esta, quanto aos ausentes, nos casos em que a lei autoriza a abertura de sucessão definitiva”.

Portanto, a não identificação de um indivíduo pode comprometer a vida dos familiares de uma pessoa desaparecida, comprometendo as relações financeiras, comerciais e jurídicas de toda a família.

Segundo Pinheiro (2004) os métodos de identificação são usados de acordo com o estado do corpo encontrado. Quando a identificação antropológica, odonto legal e papiloscópica restaram insuficientes, o DNA passa a ser a última ferramenta para uma identificação definitiva e precisa.

De acordo com Graw, Weisser e Lutz (2000), mesmo o método de identificação pelo DNA pode estar comprometido se o corpo a ser identificado permaneceu exposto a condições tafonômicas extremas, sofrendo interferências químicas e biológicas que podem degradar os tecidos e danificar a estrutura do DNA.

Este fato é corroborado pelos números oferecidos pelo Laboratório de Genética Molecular Forense do Estado do Paraná que, de 817 casos de identificação, desde a criação do Laboratório até o início desta pesquisa, 85 restaram inconclusivos entre outros fatores, pelas condições da amostra.

Este trabalho visa executar os testes de um método novo de extração de DNA genômico, de 45 destes 85 casos inconclusivos. Este método utiliza como princípio, o movimento de precessão aplicado às amostras, produzindo um movimento caotrópico, ou seja, desorganizando a estrutura da proteína, por meio das esferas metálicas (PRECELLYS, 2013).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho científico é estabelecer a eficiência de um protocolo de extração de DNA humano, ainda não utilizado rotineiramente na esfera forense, através de um equipamento que imprime nas amostras objeto, um movimento de precessão, comparando-o com um dos protocolos usados como rotina dos Laboratórios de Genética Forense, nos casos de identificação humana.

1.1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- quantificar o DNA extraído pelos métodos clássico e por movimento de precessão, avaliando a diferença entre os mesmos;
- avaliar a capacidade de amplificação por PCR dos métodos em questão, utilizando os marcadores disponíveis no mercado;
- avaliar a capacidade da identificação humana, considerando os dois métodos citados;
- verificar a velocidade do método.

1.2 JUSTIFICATIVA

Considerando que a ausência de um indivíduo que participava da vida social e civil, causa diversos problemas para os familiares que permanecem, a identificação correta e rápida desse indivíduo é uma questão, muitas vezes, de sobrevivência econômica para essas famílias.

O Estado do Paraná disponibiliza para sua população, um único Laboratório que processa casos de identificação de cadáveres pelo sistema genético. O Laboratório de Genética Molecular Forense da Polícia Científica recebeu desde sua implantação, 817 fragmentos biológicos para serem identificados. Destes casos, 85 foram finalizados como inconclusivos, o que significa que, pela condição de deterioração, armazenamento e carbonização destes fragmentos biológicos o DNA não foi amplificado pelos métodos conhecidos atualmente.

O foco principal deste trabalho é a majoração de resultados conclusivos de identificação, otimizando os processos civis de famílias que não puderam identificar um ente por outros métodos, se destes 85 casos, que até o presente momento não foram identificados geneticamente por dificuldades técnica.

1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Foi realizado um levantamento nos arquivos do Laboratório de Genética Molecular Forense, de todos os casos de identificação de cadáver, cujo resultado restou inconclusivo. Destes, serão utilizados os casos cujas amostras são ossos.

As amostras foram tratadas através de dois métodos:

1 – Método tradicional orgânico fenol-clorofórmio, usualmente utilizado nos Laboratórios de genética forense;

2- Método com movimento de precessão, aqui proposto.

As amostras foram quantificadas por PCR em tempo real, submetidas ao termociclador com amplificação de 15 regiões STRs autossômicas disponíveis comercialmente e analisados por eletroforese capilar laser induzida com auxílio de *software* Genemapper 3.2, para estabelecer um comparativo de eficiência dos dois métodos, no que tange a extração de DNA da célula.

1.4 EMBASAMENTO TEÓRICO

1.4.1 EQUIPAMENTO UTILIZADO

Frente aos métodos de extração de DNA de osso, uma nova metodologia tem sido usado na prática forense com esse objetivo. Trata-se do Precellys® 24, introduzido no ano de 2008 pelo Bertin Technologies e representa uma abordagem nova de preparação de amostras teciduais. Esse equipamento, representado na Figura 12 apresenta recipientes com pequenas esferas em movimento de alta velocidade para moer, homogeneizar, ou lisar os tecidos em ciclos que podem ser reguláveis (PRECELLYS, 2013).

1.4.2 MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO

Salamon et al. (2005) explicam que quando da morte de um indivíduo, o DNA está preservado dentro dos grãos de cristais agregados que não perdem essa característica nem mesmo com a degradação dos tecidos.

As células que se apresentam mais protegidas são os osteócitos, pois se encontram depositados sob o fosfato de cálcio, que estão assentados em cristais de hidroxiapatita, resguardados, ainda, por uma camada de colágeno, que eles mesmos produzem e ainda solidificados com mais fosfato de cálcio.

Os osteócitos, para Salamon et al. (2005) são uma fonte mais conservada de DNA do que os osteoclastos e osteoblastos que se encontram em uma camada mais superficial do tecido ósseo. Porém, o DNA se encontra em pouca quantidade na matriz dura e calcificada e demanda procedimentos mais elaborados para a liberação e purificação desse DNA.

1.5 CONCLUSÃO

Graças à ciência e a tecnologia que se vale de experimentos, observação e descrição de resultados, a comunidade científica busca alcançar os objetivos propostos, que são oferecidos em sua generalidade, pelas dificuldades encontradas. A proposição deste trabalho caminha neste sentido e busca uma melhor resposta, para se chegar a uma identificação humana segura e confiável.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Identificação humana, segundo França (2001), é o processo que leva à determinação da identidade de uma pessoa, fazendo-a diferente de todas as outras e igual somente a ela mesma. O valor e a necessidade da identificação recaem sobre as exigências da vida em sociedade que se traduzem em necessidades civis, administrativas e até mesmo penais, exigindo uma forma de comprovação confiável e única.

A identificação de uma pessoa, cuja morte ocorreu recentemente, pode ser feita através da observação de rosto, cor de cabelos, olhos, ou até através de impressões digitais. A Figura 1 mostra uma pessoa baleada recentemente. Sua identificação pode ser feita pela observação de seu rosto.



Figura 1 - Indivíduo cujo reconhecimento é visual
Fonte: Instituto de Criminalística do Estado do Paraná (2009)

Porém, segundo Pinheiro (2004), muitas vezes essa identificação pode ficar comprometida caso o cadáver esteja em um determinado estágio de decomposição, ou sofreu carbonização, afogamento, esquartejamento, mutilações, ou fatores que podem comprometer a simples observação. A identificação médico legal, odonto-legal, ou papiloscópica pode ficar prejudicada frente à destruição dos elementos que

seriam utilizados para identificação através desses métodos ou se a pessoa a ser identificada não apresenta arquivos prévios para comparação.

A Figura 2 mostra uma pessoa encontrada depois de algumas semanas de sua morte. Seu reconhecimento está prejudicado frente ao avançado estado de decomposição do corpo. A identificação através da papiloscopia também fica impraticável, pois suas mãos foram amputadas, objetivando dificultar sua identificação.



Figura 2 - Cadáver em adiantado estado de decomposição
Fonte: Instituto de Criminalística do Estado do Paraná (2009)

De acordo com Graw, Weisser e Lutz (2000), a identificação através da análise do DNA (ácido desoxirribunucleico), seria um método de eleição em casos como o relatado.

2.2 SISTEMAS DE IDENTIFICAÇÃO

Segundo Oliveira et al. (1996), constitui-se uma das grandes áreas de estudo e pesquisa, tanto da Odontologia Legal quanto da Medicina legal, a forma de se identificar um ser humano depois da morte, considerando que este corpo pode estar em qualquer dos estágios do processo morte, seja esqueletizado, macerado, putrefeito, ou qualquer deles cuja identificação visual seja impraticável.

Segundo Oliveira et al. (1996) o processo de identificação é dinâmico e, frente à necessidade de organização, sistematização e estabelecimentos de protocolos dos procedimentos próprios a uma identificação *post-mortem* bem sucedida, é necessário dividi-la em Identificação Geral e Identificação Individual. A Identificação Geral irá tratar dos aspectos sinalépticos, formadores do biótipo do indivíduo, iniciando-se com o estabelecimento da espécie animal através do estudo anatômico e macroscópico, tendo como comparação outros animais e, ainda, utilizando-se da antropometria.

De acordo com Oliveira et al. (1996) os Institutos Médicos Legais (IML) são providos de profissionais na área de Antropologia Forense, para onde os cadáveres em situação de difícil identificação são encaminhados. É nessa fase que, através da atuação multidisciplinar de Médicos Legistas, Odonto-legais, farmacêuticos, químicos, biólogos, pode-se estimar o sexo, a estatura, determinação do grupo étnico ou a cor da pele do indivíduo a ser identificado, além de causa e tempo de morte.

Para esses autores, quando se trata da identificação individual, existe a necessidade de se estudar elementos anteriores à morte, através de arquivos médicos ou odontológicos, para se estabelecer uma individualidade através de comparação. Essa identidade é atingida quando se estabelece coincidências suficientes, excluindo as discrepâncias e conflitos na comparação.

2.2.1 RECONHECIMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Oliveira et al. (1996) argumentam que, em uma visão jurídica, o reconhecimento pode ser entendido como uma identificação empírica, sem rigor científico. É visual, realizado por pessoas próximas ao indivíduo objeto de identificação e pode estar associada a erros e falhas. Esses equívocos no momento da identificação, muitas vezes não se dão por má fé, mas são próprias do restrito poder do método. Podem ocorrer influências emocionais por parte do reconhecedor, tanto pelo ambiente quanto pela própria situação de visualizar um corpo morto e que pode ser uma pessoa íntima.

Segundo Garrido (2009) a identificação, por outro lado é processada através de técnicas e métodos próprios até se atingir a identidade. Essa identificação pode

se dar por diversos processos, quais sejam a antropometria, a odontologia legal a datiloscopia e o DNA.

2.2.2 ANTROPOLOGIA

Para Garrido (2009), não se pode estabelecer com exatidão quando as técnicas para identificar um indivíduo tiveram início. O método antropométrico teria sido a primeira forma de organização sistemática na identificação humana e foi introduzido por Bertillon em 1882.

O método antropométrico, segundo Garrido (2009) se utiliza das características visuais e métricas considerando aspectos morfológicos e cromáticos, como, como a posição de sobrelhas, formato do queixo, lóbulo da orelha, cor da íris, pele ou dos cabelos.

No ramo médico-legal da identificação humana, ainda segundo o autor, é possível realizar, por exemplo, a estimativa de sexo pela análise do crânio, a determinação da idade pela característica dos ossos e, ainda, a identificação pelos detalhes dos seios da face, no que pode ser enquadrado na antropologia forense.

2.2.3 ODONTOLOGIA LEGAL

Segundo Araujo e Pasquali (2009) o estudo dos dentes é de fundamental importância para a determinação da identidade, especialmente em cadáveres carbonizados, tendo em vista que os dentes precisam de uma elevada temperatura para serem calcinados, de 1200° C a 1700° C (os molares). Os componentes de reparação dentária também possuem ponto de fusão muito elevado (ouro= 1063° C; prata= 960° C; platina= 1733° C etc.). Observam-se, nesse exame: a fórmula dentária, o modo de implantação dos dentes, as anomalias, as alterações patológicas, o desgaste, a cor, os aparelhos de prótese.

Entretanto, segundo Araujo e Pasquali (2009), para que a Odontologia legal possa contribuir efetivamente com a identificação de uma vítima, faz-se necessária a existência de registros anteriores, seja por meio de uma ficha clínica onde existam os assinalamentos dentários em odontograma, ou mesmo radiografias, modelos de gesso, enfim qualquer documento que possa representar um primeiro registro daquele suspeito, única forma de possibilitar a comparação dos dados para a

identificação. Por esse motivo, é indispensável que todos os profissionais tenham conhecimento sobre a importância de se manter prontuários completos e atualizados de seus pacientes.

Araujo e Pasquali (2009) afirmam que as radiografias são exames complementares de importância vital para a identificação odonto-legal, uma vez que permitem avaliar características anatômicas, como tamanho e forma das coroas, anatomia pulpar, posição e forma da crista do osso alveolar, além das características únicas e individuais resultantes de tratamentos dentários.

Para esses autores, vale salientar que, para a identificação pelos arcos dentários, não existe um número mínimo de pontos concordantes necessários para se estabelecer uma identificação positiva. O fundamental é que não existam grandes discrepâncias como, por exemplo, a presença no cadáver, de um elemento dentário extraído em vida pela suposta vítima.

Os elementos dentários podem, ainda, fornecer material biológico para análises de DNA, pois sua alta resistência ao calor colabora para proteger o material genético existente na polpa dentária e na dentina.

2.2.4 PAPILOSCOPIA

Garrido et al. (2009) afirma que entre as técnicas de identificação humana atualmente utilizadas, a papiloscopia ocupa lugar importante. Ela se baseia na perenidade; individualidade; variabilidade e imutabilidade das papilas dérmicas. Esta ciência pode ser dividida em: datiloscopia (identificação por meio das impressões digitais); quiroscopia (identificação por meio das impressões palmares) e podoscopia (identificação por meio das impressões plantares).

Segundo Galante-Filho et al. (1999) histologicamente, as papilas dérmicas são dobramentos da derme moldados a partir dos quatro meses de vida embrionária e que se mantêm até a completa putrefação dos tecidos. Para Daugman (2007) na verdade, a constituição das papilas dérmicas é um fenômeno epigenético, o que explica as diferenças encontradas mesmo entre gêmeos idênticos. Além disso, para Galante-Filho et al. (1999) variações fenotípicas ocorrem no decorrer da vida, em virtude de pressões ambientais, como cortes e escoriações ou mesmo patologias. Segundo Garrido e Giovanelli (2009) as primeiras referências sobre as papilas epidérmicas foram feitas por Malpighi no século XVII, mas foi só no século XIX que

Faulds, Herschel, Darwin e Galton sistematizaram sua utilização e Juan Vucetich, na Argentina, criou o método de identificação dactiloscópico atualmente utilizado.

De acordo com Jordão, Santiago e Montenegro (2011) o Sistema Vucetich se baseia na classificabilidade dos tipos básicos de conformação das papilas dérmicas nas falanges distais (dactilos): arco; presilha interna; presilha externa; verticilo. Estes tipos básicos podem apresentar variações melhor descritas em trabalhos próprios.

2.2.5 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

Para Galante-Filho et al. (1999) na atualidade, as técnicas genéticas vêm ganhando terreno na identificação humana. Estas iniciaram com a análise do sistema de grupo sanguíneo ABO e fator Rhesus positivo ou negativo do sangue, evoluindo para a identificação de isoenzimas. Esta última técnica foi desenvolvida em 1930 e aplicada a partir de 1950, aumentando consideravelmente o número de sistemas polimórficos (fosfoglicomutase, esterase D, glioxilase, adenosina desaminase, fosfatase ácida, adenilatocinase, anidrase carbônica, peptidase A, glicose-6p desidrogenase) para a identificação. Posteriormente, passou-se a utilizar, na identificação humana, grupos sorológicos (transferrina, haptoglobina), variantes da hemoglobina, sistema Human Leukocyte Antigens HLA, até que se alcançou diretamente o material genético em 1980 com Ray White, descrevendo o primeiro marcador polimórfico de tamanho de fragmentos de restrição, chamado *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Segundo Oliveira et al. (1996) com o advento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de 1985, abriu-se caminho para a aplicação mais ampla dos testes de DNA na identificação humana.

Já em 1988, o FBI (*Federal Bureau of Investigation*) investigava casos com o uso de DNA. Com o início da década de 1990 e a descrição de sequências no DNA denominadas microssatélites (STR – pequena sequência repetida *in tandem*), foi possível incrementar enormemente a análise do material genético com intuito forense.

Butler (2005) explica que estas regiões repetidas em tandem no genoma humano são bastante polimórficas, isto é, apresentam uma variedade de tamanhos na população e, assim, a análise permite discriminar pessoas ou linhagens de pessoas (quando em cromossomos sexuais). A análise de STRs é feita por meio da

amplificação do material genético extraído das amostras de interesse com iniciadores (primers específicos para, no mínimo, 15 (quinze) loci gênicos autossômicos e 8 (oito) loci do cromossomo Y). Além disso, é sempre feita a amplificação da região marcadora de gênero denominada amelogenina. O material amplificado é analisado em sequenciadores automáticos que, por meio de uma eletroforese capilar, separa as diferentes configurações (alelos) destes locais de STRs amplificados. Como estes alelos são transmitidos por herança genética mendeliana, são feitas vinculações genéticas como paternidade, maternidade e irmandade.

É possível ainda, utilizar a tipagem individual para comparação com amostras questionadas obtidas em locais de crime, ou coletadas de vítimas de crimes sexuais, a fim de obter um índice de verossimilhança. Para isto, são utilizados cálculos populacionais baseados nas frequências alélicas previamente obtidas na população, implicando assim em resultados estatisticamente válidos.

Para Butler (2005) a introdução de técnicas para identificação com o uso do DNA foi sendo desenvolvidas em meados dos anos 80, revolucionando o mundo forense e proporcionando peso científico às pesquisas sobre crime, além de identificar cadáveres não identificáveis através de métodos antropológicos até então utilizados.

Segundo Shutler (2004), graças ao geneticista inglês Dr. Alec Jeffreys, a identificação através do DNA é hoje conhecida. Ele verificou que certas regiões da molécula do DNA apresentavam sequências que eram repetidas ao longo de sua cadeia, uma ao lado da outra, e que o número de repetições poderia identificar um indivíduo de outro. Essas regiões foram denominadas de VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) ou Repetição Consecutiva de Número Variável e a técnica usada para examiná-las é conhecida como FRLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) usando enzimas de restrição para cortar a região do DNA que circunda as VNTRs.

Butler (2005) argumenta que este método foi utilizado pela primeira vez em um caso forense no ano de 1986, para desvendar dois crimes de estupro cujas características eram semelhantes em seu modo de operação. Duas jovens que viviam muito próximas foram estupradas e mortas. Ambos os assassinatos ocorreram perto da aldeia de Narborough em

Leicestershire, Inglaterra, com características semelhantes, o que levou a polícia a suspeitar que o mesmo homem havia cometido os dois crimes.

Um homem confessou os crimes e seu sangue foi comparado ao sêmen recuperado das cenas de crime. Porém, o perfil genético deste não correspondia às evidências existentes. Deste modo, a primeira utilização de DNA foi demonstrar inocência de alguém que poderia ter sido condenado. Frente aos fatos, a investigação prosseguiu e todos os homens adultos em três aldeias locais foram geneticamente tipados numa busca completa pelo assassino.

Mais de 4000 homens foram testados sem sucesso. Cerca de um ano depois, uma mulher em um bar ouviu um homem se vangloriando por ter dado uma amostra de seu sangue para ajudar um amigo chamado Colin Pitchfork. Ele foi então interrogado e seu sangue tipado geneticamente, chegando-se ao verdadeiro assassino. Ele foi posteriormente condenado e sentenciado à prisão perpétua.

Butler (2005) argumenta que desde que foi usado pela primeira vez, há quase 20 anos, o teste de DNA progrediu para se tornar uma ferramenta sensível e eficaz para trazer os culpados à justiça e exonerar os inocentes.

Partindo destes crimes, explica Butler (2005) o DNA passou a ser utilizado com habitualidade nos casos forenses. A técnica vem sendo desenvolvida desde então, garantindo maior confiabilidade e força legal nos processos onde é usada.

2. 3 PROCESSOS NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA POR MEIO DO DNA

2.3.1 ASPECTOS GERAIS

Segundo Chambers e MacAvoy (2000), a interpretação genética da variabilidade humana, normal ou patológica, repousa sobre o mesmo princípio fundamental estabelecido para todas as espécies eucarióticas com reprodução sexuada, segundo o qual, as informações genéticas necessárias ao desenvolvimento do ser humano, desde o momento em que se forma o zigoto até a morte do indivíduo dele resultante, estão contidas, basicamente, em seus cromossomos.

O genoma dos eucariontes, para Chambers e MacAvoy (2000) é pleno de sequências repetidas de DNA, que se constituem de variados tamanhos e são designados pelo comprimento da unidade de repetição central e pelo número de repetições em sequência, ou o comprimento total dessas regiões de repetição. Longas unidades repetidas podem conter várias centenas a vários milhares de bases na repetição do núcleo. Estas regiões são frequentemente referidas como DNA satélite e pode ser encontrado em torno do centrômero cromossômico.

Para Klugliak e Nickerson (2001), "O Projeto Genoma Humano" traz em si uma expressão equivocada, implicando a existência de um único genoma humano. Naturalmente, todas as pessoas no planeta, com a exceção dos gêmeos idênticos, possui um genoma singular, e embora comparando aleatoriamente dois genomas, estes serão cerca de 99,9% idênticos, ainda deixa milhões de diferenças entre os 3,2 bilhões de pares de bases existentes. São precisamente essas diferenças que representam variação hereditária entre os indivíduos, incluindo a susceptibilidade à doença.

2.3.2 POLIMORFISMO

Segundo Beiguelman (2008) a Ciência Forense utiliza-se das informações contidas nas regiões hipervariáveis e que são não codificantes para identificar indivíduos. O que caracteriza o polimorfismo dessas regiões é a possibilidade de um mesmo loco apresentar variados tipos de alelos na população.

Beiguelman (2009) afirma que se deve considerar que um gene que apresenta seus alelos com frequência entre 1% e 99% pode ser classificado como um gene polimorfo. Já os alelos cuja frequência é inferior a 1%, são denominados idiomorfos e aqueles cuja frequência é superior a 99%, são classificados como monomorfos. Porém, um loco polimórfico pode ter entre os seus alelos um ou vários alelos idiomorfos. Dá-se o nome de polimorfismo genético, ou sistema genético polimórficos aos caracteres que resultarem de locos onde estejam presentes pelo menos dois alelos polimórficos. O termo "caráter" é utilizado em Genética com um sentido muito amplo, já que designa qualquer característica, normal ou patológica, passível de ser notada durante qualquer fase no desenvolvimento de um indivíduo, isto é, desde a sua formação até a sua morte.

Para Butler (2005) o polimorfismo no DNA pode ocorrer de duas formas quais sejam o de “sequência” e o de “comprimento”. O de sequência constitui-se por mutações pontuais de um nucleotídeo em cada região analisada e se apresenta dispersa pelo genoma, diferenciando os indivíduos.

O polimorfismo de comprimento, segundo Butler (2005), é determinado por sequências de nucleotídeos, formando um centro e que se repete consecutivamente. A diferença entre os indivíduos se dá pela determinação do tamanho do centro e pelo número de vezes que ele ocorre sequencialmente.

Assim, o polimorfismo de comprimento se agrupa em duas classes e depende do número de nucleotídeos presentes no centro que forma a região repetida. Se o centro apresenta entre 7 a 100 pares de bases é denominada de região minissatélite ou Repetição Consecutiva de Número Variável (VNTR). Se o núcleo apresentar de 1 a 6 pares de bases a região é denominada microssatélites ou Repetições Curtas Consecutivas (STR), exemplificado no esquema da figura 3.

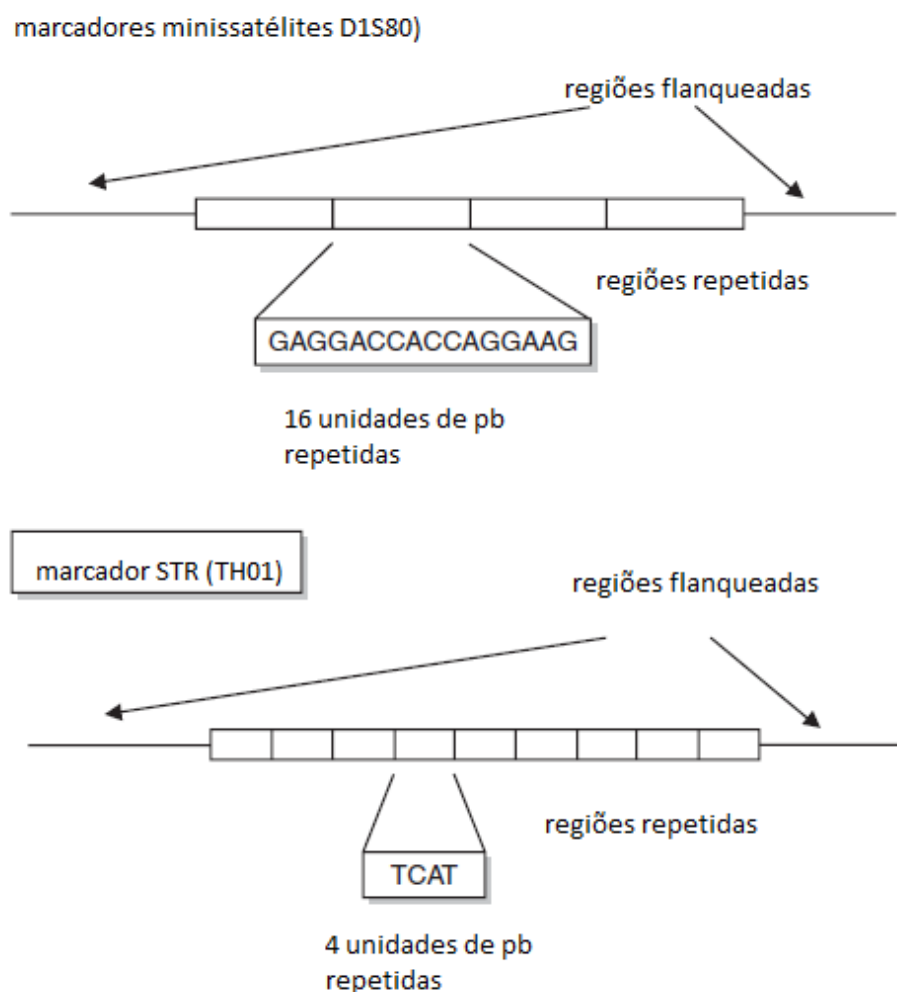


Figura 3 – Unidades de pares de base na sequência do DNA .

Fonte: BUTLER (2005, p. 96),

Butler (2005) afirma que o DNA teve sua primeira análise através da técnica de Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) que permite a analisar regiões minissatélites – VNTRs.

Sondas multilocos têm a vantagem de ter alto poder de discriminação, mas, por outro lado, é uma técnica muito trabalhosa e que demanda muito tempo. Sua automação é difícil e requer uma quantidade grande de DNA íntegro para que o resultado seja proveitoso e, em casos de mistura, é quase que inviável. Neste viés a análise através da RFLP é atualmente pouco utilizada.

De acordo com Butler (2005) na área forense, geralmente, as amostras estão degradadas, ou estão em quantidade reduzida o que pede uma técnica cuja sensibilidade e especificidade sejam maiores.

2.3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Samuels (2008) argumenta que entre os anos de 1985 e 1995 uma técnica inovadora tornou-se usual em Biologia Molecular e passou a responder algumas demandas não solucionadas até então. A técnica da Reação em cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), concebida por Kary Mullins. Nessa técnica não se utiliza a tradicional clonagem molecular. Uma cópia da sequência pré-determinada dentro do genoma pode ser amplificada para alguns microgramas, partindo-se de quantidades ínfimas como picogramas de DNA total. Foi possível, assim, detectar e analisar quantidades pequenas de DNA e até mesmo amostras degradadas pelo tempo.

Segundo Garrido (2009) a PCR cumpre todas essas características e, ainda, o resultado é obtido com mais rapidez do que com a técnica da RFLP. Por serem fragmentos menores e a técnica mais apurada, a análise dos STRs através da PCR traz vantagens quando se trata de DNA degradado, ou em pequenas quantidades. Os STRs tornaram-se marcadores de DNA mais usados, pois são facilmente amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), sem os problemas de amplificação diferencial.

2.4 ANÁLISE DE FRAGMENTOS

Butler (2005) argumenta que a tecnologia e os métodos para estimar as frequências e estatísticas relacionadas ao DNA, evoluíram para o ponto onde a confiabilidade e a validade das amostras de DNA coletadas e analisadas não devem ser postas em dúvida.

Butler (2005) explica que o processo de coleta de dados, através de equipamentos como o Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer, deixa o analista com apenas uma série de picos em um módulo esquemático chamado de electroferograma. Estes picos irão representar os alelos do indivíduo analisado e conterá em cada locus proposto, um alelo proveniente da informação paterna e outro da materna. A informação contida no pico (tamanho e quantidade de DNA) deve ser convertido para uma linguagem comum que vai permitir que dados sejam comparados entre os laboratórios. Esta linguagem comum é o genótipo de amostra.

Um locus é traduzido em seu genótipo como um alelo, no caso de um homocigoto, ou alelos, no caso de um heterocigoto, presente em uma amostra e é normalmente relatado como o número de repetições em sequência, presentes no alelo. Uma amostra, ou genótipo de um perfil de STR, é produzido pela combinação de todos os genótipos do locus em uma única série de números. Este perfil é o inserido em um relato de caso, ou um banco de dados de DNA, para fins de comparação com outras amostras.

Os dados da amostra coletados a partir do sequenciador da empresa Applied Biosystems®, modelo Genetic Analyzer ABI 3130, ou outros instrumentos apropriados, são geralmente representados na forma de picos que correspondem aos diferentes alelos STR amplificados a partir de amostras de DNA. Estes picos estão presentes em vários locais no eletroferograma de uma amostra e, geralmente, são representados como sinais de intensidade de fluorescências pelo tempo que passa pelo detector (no caso da ABI310, ou 3100).

Os marcadores STR multiplex em uso hoje, se utilizam de várias bandas, ou usualmente denominados *dyes* de fluorescência, que podem ser trabalhados espectralmente. As várias cores dos *dyes* são separadas e os picos, representando os fragmentos de DNA, são identificados e associadas com a cor apropriada. Os fragmentos de DNA são então dimensionados pelo comparador para um tamanho padrão interno.

Finalmente, para Butler (2005) o produto obtido através da PCR está correlacionado a uma escada alélica que foi dimensionada de forma semelhante, com padrões internos. A escada alélica contém alelos com repetições conhecidas e é muito usado como uma régua de medição para correlacionar os tamanhos dos produtos de PCR com o número de unidades repetidas de um locus determinado. Pela comparação dessa amostra desconhecida e da escada alélica conhecida o genótipo da amostra desconhecida é determinado.

Butler (2005) afirma que o processo de genotipagem por determinação de STR pode ser esquematizado como na Figura 4. Os pacotes de programas computadorizados de análise de fragmento de DNA e genotipagem de STR, realizam grande parte das análises, mas uma revisão dos dados por analistas treinados é sempre requisitado.

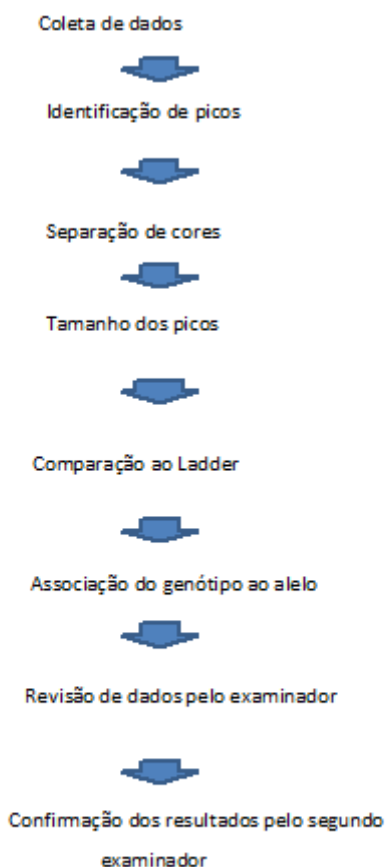


Figura 4 – Processo de genotipagem por determinação de STR
Fonte: BUTLER (2005, p. 374)

2.5 O FRAGMENTO DE DNA

Os fragmentos de DNA representados pelos picos em electroferogramas capilares podem ser dimensionados em relação a um padrão interno de tamanho que é misturado com as amostras de DNA. O tamanho do padrão interno é tipicamente marcado com uma cor diferente, colorindo de modo a ser espectralmente distinguidos a partir dos fragmentos de DNA de tamanho desconhecido. Estes padrões são chamados de “*size standards*” e irão calibrar o fragmento de DNA.

2.6 ASPECTOS BIOLÓGICOS

2.6.1 A CÉLULA

Segundo Butler (2005), a célula é a unidade básica da vida, a fábrica que produz a mais bruta matéria, além de produzir energia e proporcionar toda a capacidade para sustentar a vida. É necessária uma diversidade de proteínas e enzimas para manter essa fábrica em operação. Cerca de 100 milhões de células compõe um ser humano médio e todas tem origem a partir de uma única programação genética. O DNA está dentro do núcleo das células humanas, e contém o código de informações necessário para replica-las e construir as enzimas necessárias para sua manutenção.

Para Butler (2005) o DNA armazena as informações necessárias para seguir através de gerações futuras. É uma máquina programada para determinar, no ser humano, suas características e muitos outros atributos.

O DNA, para esse autor, tem dois propósitos principais que se prestem a fazer cópias de si mesmo para que as células possam se dividir, dando continuidade à informação inicial e, transportar instruções sobre como produzir proteínas, para que as células possam dar seguimento à construção da máquina da vida. Assim, informações codificadas dentro da estrutura do DNA em si são passadas de geração em geração, como um meio de informação sobre um determinado indivíduo, sendo que parte desse DNA é proveniente da sua mãe e parte provenientes do seu pai.

2.6.2 ESTRUTURA E FORMAÇÃO DO OSSO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo formado pela associação de fibras protéicas e cristais minerais, como demonstra a Figura 5. O componente principal da matriz é composto por fibras colágenas com cristais de hidroxiapatita que se formam nos espaços entre as fibras (Afarensis, 2006).

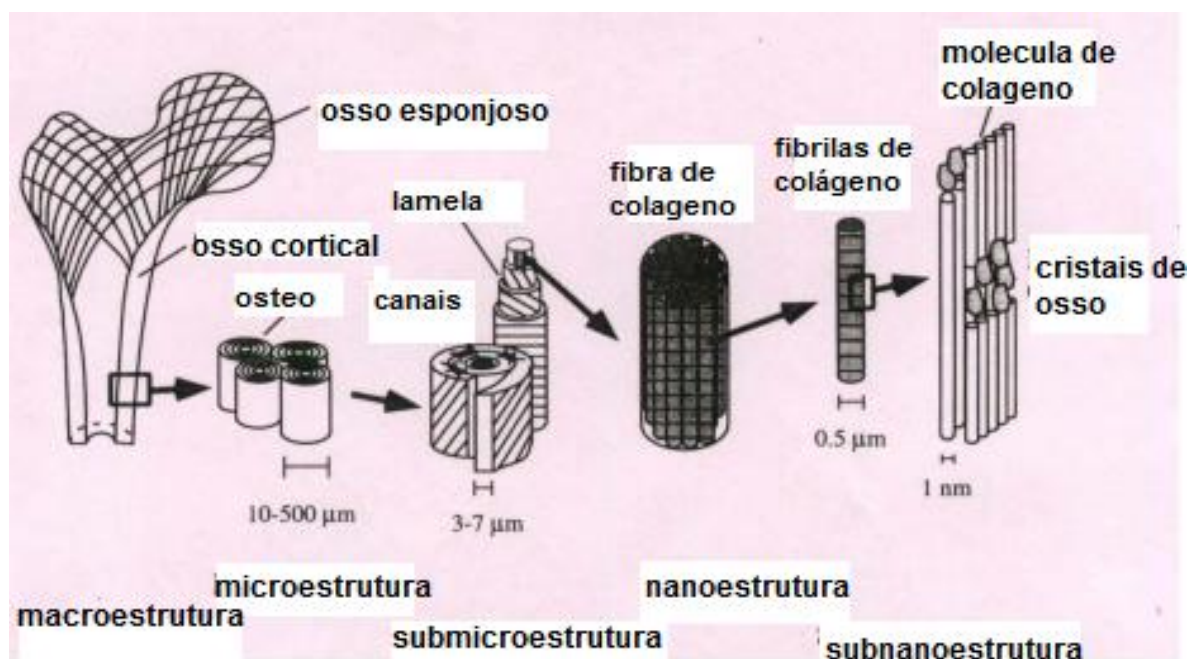


Figura 5 - Estrutura do osso

Fonte: [http:// scienceblogs.com/afarensis/2006/02/27/an_interesting_inovation_on_dn](http://scienceblogs.com/afarensis/2006/02/27/an_interesting_inovation_on_dn) (2006).

Segundo Trueman e Martill (2002) a flexibilidade do tecido é provida pela fase protéica que é constituída principalmente de colágeno, formando a matriz onde os cristais minerais se desenvolvem. O que compõe a matriz óssea é parte orgânica e parte inorgânica. A parte orgânica é formada principalmente por fibras colágenas. A parte inorgânica, onde os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio, que formam cristais de hidroxiapatita, que são formados por fosfato de cálcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), representando um depósito de 99% de todo cálcio corporal. A interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz resulta na extrema rigidez do tecido ósseo.

De acordo com Bessetti (2007) o cálcio e o colágeno, substâncias próprias do tecido ósseo, além de alguns ácidos como o húmico e o fúlvico que podem estar

presentes nas amostras, dependendo das condições ambientais onde se encontram, são os principais inibidores da PCR.

Através da observação visual da superfície de um segmento de osso, ele é formado por áreas sem cavidades visíveis, representando o osso compacto, e áreas com muitas cavidades que se comunicam entre si, osso esponjoso, como demonstrado na Figura 6 que representa a característica macroscópica de osso em região posterior a mandíbula, mostrando na periferia o tecido compacto e ao centro o tecido esponjoso.

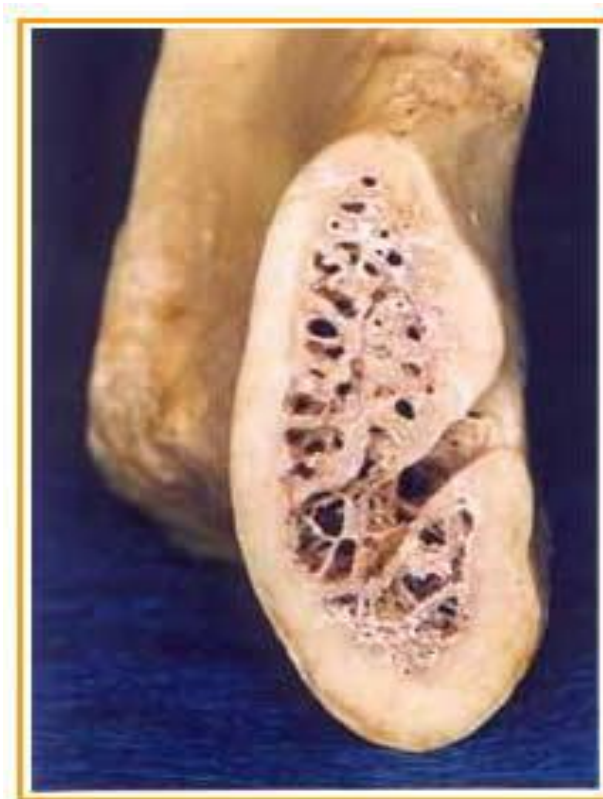


Figura 6 - Característica macroscópica de osso
Fonte: BESSETTI (2007).

Segundo Bassetti (2007), o que diferencia esses dois tecidos é apenas a disposição dos seus elementos constitutivos e a quantidade de espaço medular, sendo semelhante o tipo de célula e a substância intercelular. As células ósseas são de três tipos: osteoblastos, osteócitos e osteoclasto, como podem ser observados na Figura 7, e que são constituídas de células sem muita diferença, mas mudanças de forma de uma mesma célula em diferentes estágios.

Células Ósseas

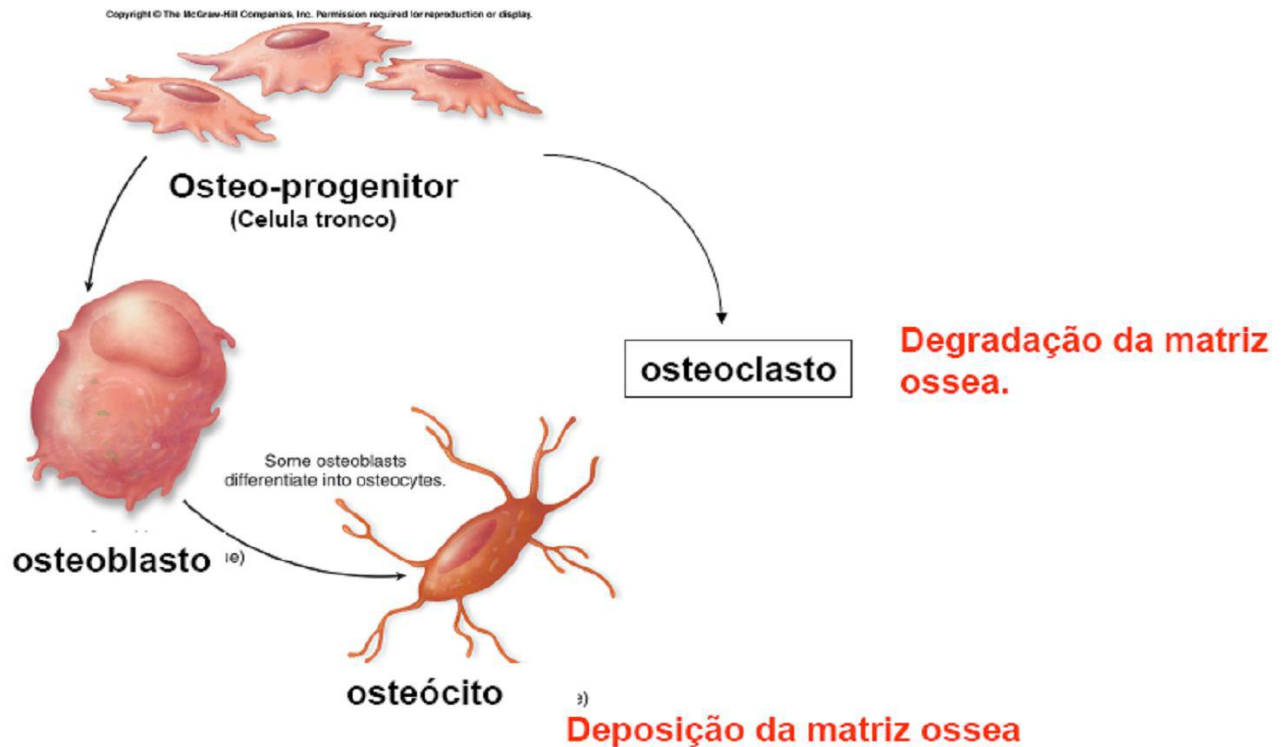


Figura 7 - Principais células encontradas nos tecidos ósseos

Fonte: <http://www.anato.ufrj.br/material/GarciaOsteologia1.pdf> (2013).

Segundo Junqueira (2004), a produção da parte orgânica da matriz é executada pelos osteoblastos, que são células jovens, com intensa atividade metabólica, encontradas na superfície do osso – o perióstio – que é uma fina membrana que reveste o osso. Quando da formação do osso, a matriz óssea ao ser calcificada, vai se depositando ao redor do corpo da célula e de seus prolongamentos. Desta forma os osteoblastos vão ficando em lacunas, como que aprisionados pela matriz que foi recém sintetizada. Portanto, alguns dos osteoblastos permanecem livres na superfície, enquanto outros se tornam gradualmente embutidos na sua própria secreção. Este material formado consistindo essencialmente de colágeno do tipo I, chamado osteóide é rapidamente convertido em matriz óssea dura pela deposição de cristais de fosfato de cálcio sobre ele. Uma vez aprisionado na matriz dura, a célula original formadora de osso, agora chamada de osteócito, não tem oportunidade de se dividir, como observado na Figura 8, embora continue a secretar mais matriz em pequenas quantidades em torno de si mesma.

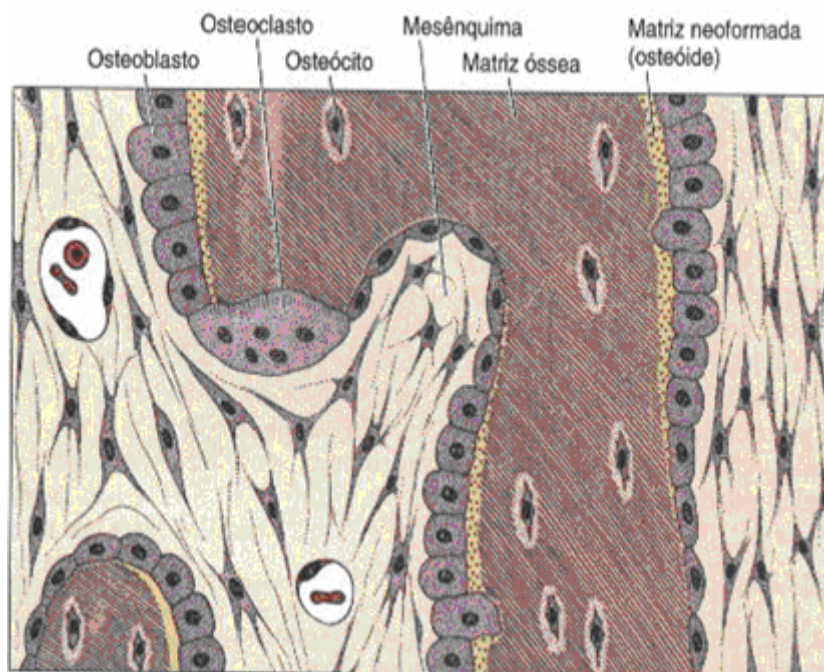


Figura 8 – Esquema de ossificação intramembranosa
 Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO (2004, p. 488).

2.7 MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO - DECOMPOSIÇÃO

Segundo Hercules (2005) quando da decomposição do corpo de um indivíduo morto, cujo início culmina com a parada circulatória, ocorre a interrupção do aporte de oxigênio aos tecidos, trazendo como consequência, reações químicas celulares que passam a ser anaeróbicas, com a interrupção da queima de glicose na fase de produção de ácido láctico, sem que haja produção de gás carbônico e água. Com essas alterações metabólicas ocorre o acúmulo de radicais ácidos, diminuindo o pH do sangue e liberando enzimas do lisossomo. As células sofrem, assim, autólise.

França (2005) argumenta que com a falta de oxigênio e consequente autólise, a proliferação da flora saprófita é favorecida, e é iniciada partindo das espécies encontradas no intestino grosso e durante esse processo as enzimas bacterianas passam a degradar protídios, lipídios e glicídios liberando gases metano, sulfídrico e carbônico. Participam da decomposição outros grupos micóticos saprofitas, decomposição essa que culmina com os gêneros *Trichoderma*, *Monosporium* e *Sterigmatocystis*, encerrando o trabalho de destruição cadavérica.

Para Misner et al. (2009), na fase de esquelitização, apenas o tecido ósseo restou, fato que se deve à proteção da barreira física composta pelos minerais da estrutura óssea contra o ataque de microorganismos. O tempo necessário para ocorrer esse processo depende das condições tafonômicas, ou seja, dos fatores biológicos e geológicos que possam ter influenciado e contaminado aquele material orgânico morto, como por exemplo o meio físico onde o corpo se encontra se em água, sob o solo, ou ao ar livre.

Hercules (2005) explica que no caso do corpo ter sido deixado ao ar livre a decomposição é duas vezes mais rápida do que submerso em água e oito vezes mais rápido se enterrado no solo.

Pode influenciar também, a região geográfica onde o corpo se encontra, ou a estação do ano, devido à temperatura e umidade.

Animais de maior porte, também podem auxiliar na decomposição e no desaparecimento de partes do corpo, se esse for localizado por um animal faminto.

Para O'Rourke, Hayes e Carlyle (2000), mesmo sendo o melhor tecido para a extração de DNA *post mortem*, existem, ainda dois obstáculos a serem vencidos, a degradação do material molecular, que diminui a quantidade de material possível de amplificação e materiais orgânicos que são extraídos com o DNA e que inibem a PCR.

Goodwin, Linacre e Hadi (2007) argumentam que, continuando no processo de decomposição, o DNA vai perdendo sua integridade, pois vai sendo degradado por enzimas como as nucleases lisossomais, além do ataque de microorganismos que desmineralizam os ossos, formando túneis e perfuração destruindo as macromoléculas existentes.

A Figura 9 mostra dois ossos femurais da Idade Média, sendo que na espécie à esquerda revela várias áreas de destruição por microorganismos colonizadores de ossos, produzindo largos canais. A espécie à direita está quase intacta (aumento de 400X).

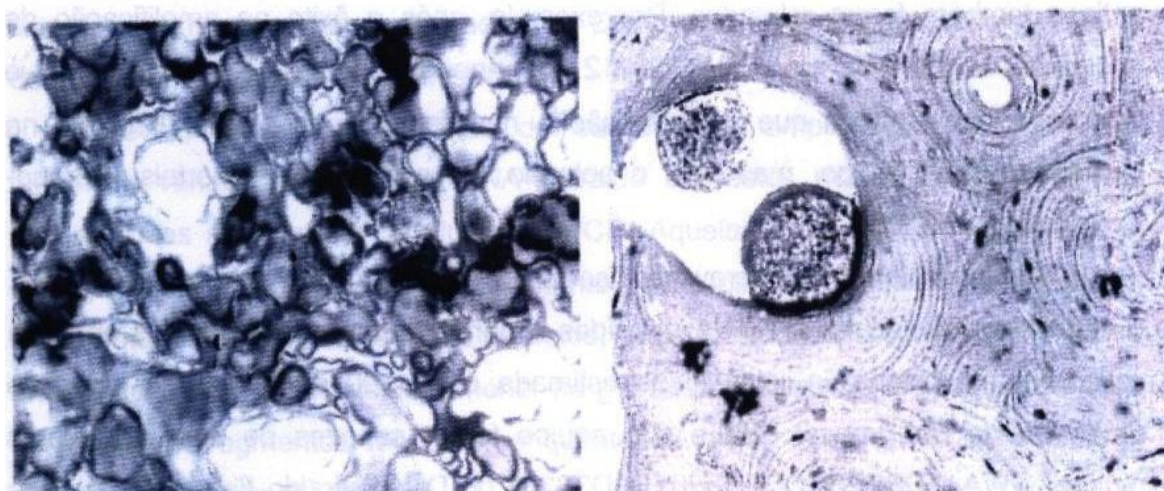


Figura 9 – Secções de dois ossos femurais da Idade Média

Fonte: Hummel (2003, p. 298).

Segundo Marota e Rollo (2002), se a molécula for mantida em um ambiente frio, seco, anóxico e distante de microorganismos, esta poderia ter uma vida longa. De acordo com Baubliené, Daugnora e Miceikiené (2003), pesquisas demonstram que, se esta mesma molécula fosse mantida, hipoteticamente, com concentrações fisiológicas de sais, pH neutro e temperatura em torno de 15°C, seriam necessários 100.000 anos para que houvesse destruição total do DNA, mesmo assim ele poderia ser recuperado dentro desse período.

Sendo assim, segundo Holland et al. (2003), o que garante a qualidade e a obtenção do material genético está mais relacionado com a forma de preservação deste e o ambiente onde está localizado do que com sua idade.

2.7.1 MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO NO ÂMBITO CÍVIL

De acordo com Iwamura, Vieira e Muñoz (2004) esforços substanciais e relevantes para a identificação de cadáveres e restos humanos após as guerras, distúrbios sócio-políticos e desastres de massa têm sido continuamente feitos e reportados. No entanto, esses esforços não são restritos apenas a identificação de casos de catástrofes. Devido à dinâmica das sociedades modernas, há sempre famílias que procuram pessoas desaparecidas. Por outro lado, não é raro ter cadáveres não identificados e restos humanos em Institutos Médicos Legais. Além desses casos, solicitações judiciais de coleta de amostras biológicas em cadáveres

exumados podem ocorrer, frente à erros na identificação ou para pesquisas de paternidade na esfera civil.

2.7.2 MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO NO ÂMBITO FORENSE

Para Cooper (1997), quando se trata de casos forenses, os cadáveres relacionados com crimes, podem ser encontrados sob diversas condições. Podem ser encontrados sobre a terra nos mais variados estágios de decomposição, submersos, ou sob o solo assim permanecendo por períodos longos de tempo. Em muitos desses casos a coleta de sangue resta impossível e o material mais viável é o tecido muscular ou o tecido ósseo.

Quando os tecidos moles já desapareceram, e isso pode ocorrer cerca de dois anos após a morte, o tecido que permanece é o osso. O osso se constitui em um depósito natural de ácidos nucléicos protegidos do meio ambiente e a extração de DNA a partir desse tecido pode oferecer resultados mais satisfatórios.

2.8 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE OSSOS

Segundo Mitchell (2003), historicamente restos de esqueletos têm sido uma das amostras biológicas mais desafiadoras no que se refere à extração de DNA. Isto se deve a uma série de fatores, incluindo a dificuldade de preparo do osso que antecede a extração e as dificuldades na remoção dos inibidores da amplificação através da PCR. Os métodos utilizados pelas comunidades forenses para a preparação da amostra óssea empregam métodos como lixamento e corte destas amostras, ou a utilização de nitrogênio líquido e moinhos de pulverização para transformar esse osso em pó.

Para Mitchell (2003) a extração de DNA deste tipo de amostra, atualmente, envolve o uso de solventes orgânicos, ou métodos utilizando sílica, baseados em rotinas forenses em casuística de identificação. Em alguns casos, versões modificadas desses protocolos, ou passos adicionais foram necessários para obter um resultado satisfatório. No enquanto, esses procedimentos de preparo e extração são métodos robustos para a obtenção de DNA a partir de ossos. São extremamente demorados e trabalhosos, e, portanto, são antagônicos à necessidade de utilização em casos extremos, como identificação de cadáveres em grandes desastres.

Portanto, para Sutiovic, Gojanovic e Andelinovic (2007), para elaborar um processo para este fim, deve-se considerar que existem inibidores próprios do meio ambiente onde a amostra em questão foi encontrada. Se os corpos, objetos de identificação, foram deixados em valas, contaminadas por fungos, bactérias, ou mesmo enumerados, onde entram em contato com ácidos húmicos e fúlvicos, que são elementos próprios do solo, muitas vezes a extração de DNA resta impraticável. Holland et al. (2003) explicam que alguns inibidores são inerente aos ossos, tais como o colágeno e derivados e íons de cálcio. Tradicionalmente, segundo Mitchell (2003) é usado ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), em lavagens para remover os íons de cálcio, e uma variedade de filtrações para remover outros inibidores.

2.9 MOVIMENTO DE PRECESSÃO

Tarcia (1999) explica que um movimento de precessão consiste em uma forma de movimento que ocorre quando se aplica um momento a um corpo em rotação, de tal modo que tende a mudar a direção do seu eixo de rotação. Isto acontece porque a resultante da velocidade angular de rotação, e o aumento da velocidade angular produzido pelo momento, é uma velocidade angular em torno de uma nova direção.

Geralmente, segundo a autora, esta faz variar o eixo do momento aplicado e tem como resultado manter a rotação em torno do eixo inicial. Em um pião em rotação, o seu eixo não é exatamente vertical, tem um momento que atua nele como resultado da força gravítica. Ao invés de cair, o pião tem um movimento de precessão em torno de uma linha vertical, que passa através do espigão. A Terra também experimenta a ação de um momento, e possui um movimento de precessão lento, principalmente como resultado da atração gravitacional do Sol e da Lua.

2.9.1 PRECESSÃO DOS EQUINÓCIOS

Segundo Oliveira Filho e Saraiva (2007) Precessão dos Equinócios é o deslocamento que existe no eixo da Terra. Pode ser considerado um giro retrógrado (de Leste para Oeste) do eixo da Terra. Dura aproximadamente 25.000 anos para completar.

Esse movimento ocorre, porque a Terra não é perfeitamente esférica, mas achatada nos pólos e bojuda no equador. Seu diâmetro equatorial é cerca de 40 km maior do que o diâmetro polar. Além disso, o plano do equador terrestre e, portanto, o plano do bojo equatorial, está inclinado $23^{\circ} 26' 21,418''$ em relação ao plano da elíptica, que por sua vez está inclinado $5^{\circ} 8'$ em relação ao plano da órbita da Lua. A Figura 10 exemplifica o movimento de precessão dos equinócios da Terra. A figura 11 faz uma representação esquemática do movimento de precessão.

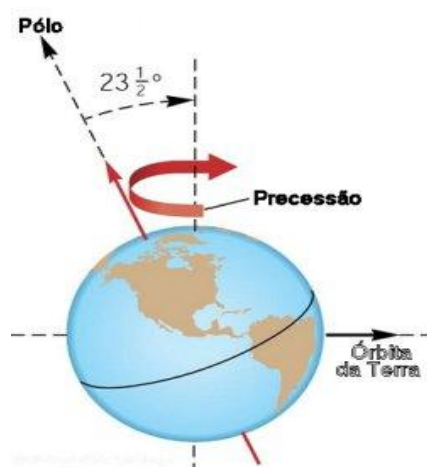


Figura 10 - Movimento de precessão
Fonte: <http://astro.if.ufrgs.br/fordif/node8.htm>.

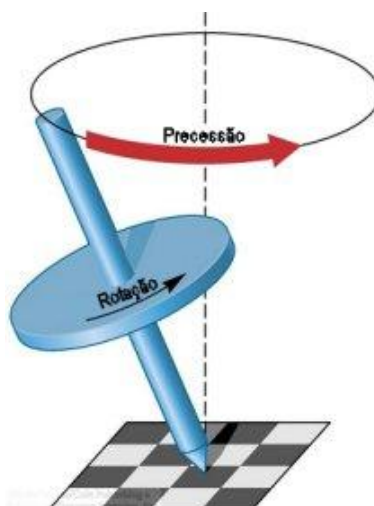


Figura 11- Movimento de precessão dos equinócios
Fonte: <http://astro.if.ufrgs.br/fordif/node8.htm>.

2.9.2 AUTOMAÇÃO DO MOVIMENTO DE PRECESSÃO

O equipamento Precellys ® 24, de fabricação francesa, Bertin Technologies, está representado na Figura 12.



Figura 12 – Equipamento Precellys ® 24

Fonte: <http://www.precellys.com/precellys-24.aspx> (2013).

Esse equipamento permite a homogeneização de uma gama de amostras biológicas, variando o tipo de esferas no interior do recipiente de acordo com a textura da amostra. Com um movimento chamado de precessão, que representa um “8”, as esferas são agitadas dentro dos tubos, promovendo a moagem das amostras. Como essas amostras estão em tubos individuais e selados, a contaminação é evitada. O tempo padrão de homogeneização é de 30 segundos, para a grande maioria das amostras e o equipamento comporta de um a vinte e quatro tubos de uma só vez. A Figura 13 mostra em detalhe a mesa de suporte dos recipientes que acondicionarão as amostras (Precellys, User Manual, 2013).



Figura 13 – Suporte para amostras

Fonte: <http://www.precellys.com/precellys-24.aspx> (2013).

O DNA é separado da matriz do tecido, transferidos para outros tubos, após um passo de centrifugação que irá sedimentar os detritos. Os protocolos devem ser ajustados de modo que o tecido seja homogeneizado sem qualquer degradação ou desnaturação das moléculas alvo. Esferas de material cerâmico são utilizadas em amostras cuja textura seja mais macia ou em ou tecido vegetal. As esferas de metal são utilizadas em amostras mais duras como ossos, dentes e cabelo. Esferas de vidro são adaptadas para quebra mecânica de células ou bactérias. Uma nova referência com uma mistura de esferas torna possível moer amostras heterogêneas para extração genômica de bactérias a partir de um tecido (Precellys, User Manual, 2013).

2.10 CONCLUSÃO

A identificação humana não se encerra na constatação da origem de um corpo. É uma questão social e jurídica, movimentando a vida de um núcleo familiar e social.

A sociedade científica tem desenvolvido métodos desde a antropologia forense, quando se utilizava um processo de observação, passando pela identificação papiloscópica e odontologia legal, quando é necessário que se estabeleçam comparações com arquivos prévios e mais recentemente a identificação através da pesquisa de DNA, um método totalmente automatizado.

Para a análise do DNA são utilizadas regiões repetidas em tandem no genoma humano que são bastante polimórficas, e apresentam uma variedade de tamanhos na população e, assim, a análise permite discriminar pessoas ou

linhagens de pessoas. A análise de STRs é feita por meio da amplificação do material genético extraído das amostras de interesse.

Porém, para obtenção destas áreas é necessário um fragmento de DNA viável, que é obtido do núcleo da célula.

Os Laboratórios Forenses, para identificação de cadáveres encontrados em adiantado estado de decomposição, se deparam com DNA também degradado e na totalidade dos casos, de difícil análise.

O osso, muitas vezes o único material restante para análise, mantém enclausurado em sua estrutura mineral, as células que poderão conter poucos, mas preciosos resquícios de material genético, necessário para a identificação deste corpo.

O objetivo, então é fragmentar e pulverizar o osso de forma a liberar a maior quantidade destas células contidas no trabeculado ósseo mais profundo.

O movimento de precessão exercido sobre a amostra, com o auxílio das esferas contidas no interior dos tubos, irá provocar uma total desorganização da estrutura mineral do osso objeto de análise, liberando, então maior quantidade de células.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras da rotina do Laboratório de Genética Molecular Forense (LGMF), da Polícia Científica do Estado do Paraná. Dos 817 casos de identificação de cadáver, feitos neste laboratório do ano de 1998 até o ano de 2013, 529 foram encaminhados com resultados conclusivos, dos quais, 463 inclusões e 64 exclusões. Restaram 85 casos cujo resultado foi inconclusivo, frente à impossibilidade técnica de obtenção de perfil genético.

Os 205 casos de identificação restantes, foram catalogados no laboratório como: arquivados; falta de material para confronto; sem designação; não tem laudo; cancelados; em andamento; dentes, sangue; somente tipados; dúvida quanto à matéria; tecidos diversos; unhas e pêlo, termos estes utilizados no Laboratório em questão e cujas amostras não guardavam as características necessárias para este trabalho. O Gráfico 1 demonstra em números os resultados obtidos nas amostras referidas, quantidade de inclusões, exclusões, casos inconclusivos e outros do Laboratório de Genética Molecular Forense.

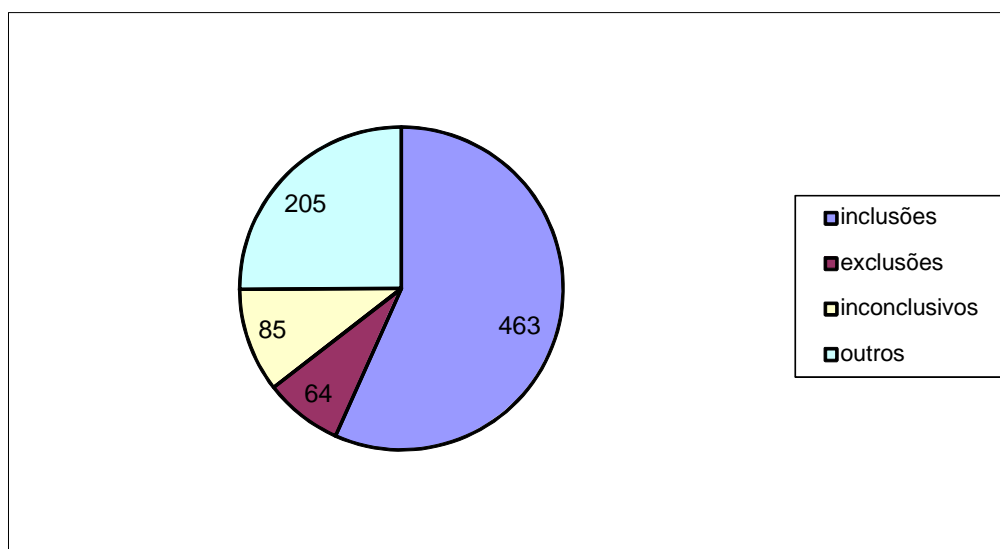


Gráfico 1- Resultados obtidos nas amostras

Fonte: Laboratório de Genética Molecular Forense (2013).

Destes 85 casos inconclusivos, cujo material encaminhado é osso esqueletizado, decomposto ou carbonizado, foram utilizadas 45 amostras já extraídas que, neste trabalho, serão nominados de 01 a 45. As outras 40 amostras não foram utilizadas neste trabalho, para não prejudicar o arquivo do laboratório, pois 10 casos apresentavam pouca amostra extraída armazenada e 30 dos casos as amostras não foram encontradas.

Dos 45 casos que foram utilizados, 83% se constitui de ossos em decomposição, 9% ossos esqueletizados, 4% ossos conservados em formol, 2% ossos carbonizados e 2% ossos submersos, demonstrado no Gráfico 2. Os dados referentes ao tempo em que o material biológico permaneceu neste estado não pode ser verificado.

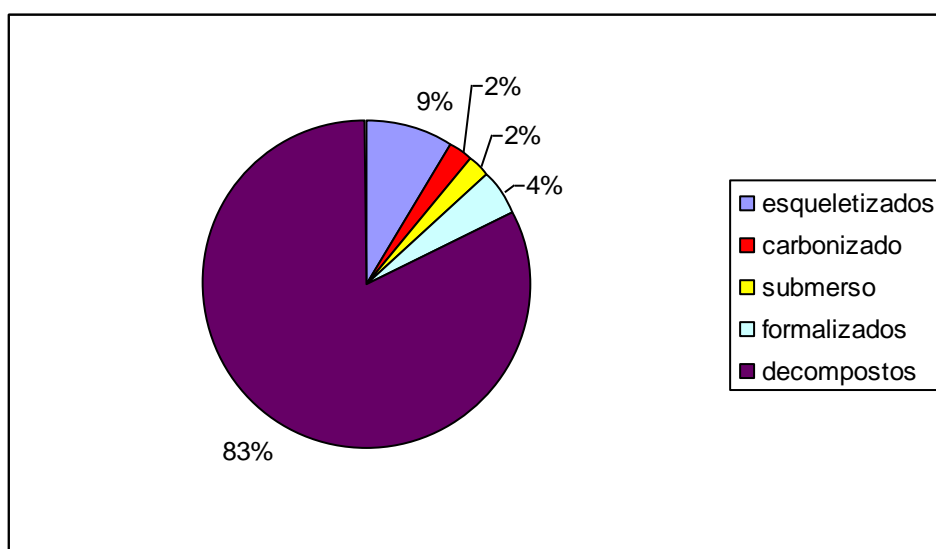


Gráfico 2– Tecidos usados e seu estado

Fonte: Laboratório de Genética Molecular Forense (2013).

3.2 MATERIAIS

Os materiais e equipamentos utilizados para o processamento das amostras são usualmente manipulados em laboratórios de biologia molecular, da forma como segue:

Pinças metálicas, martelo, facas e facões, foram utilizados para picar os ossos em fragmentos menores, para possibilitar a pulverização. Tubos falcon de 15ml, da marca FRP®, vial de processamento, onde o osso picado foi colocado para

ser processado no Moinho Criogênico de modelo Freezer 1000 6750 da marca Spex Certprep®, que foi preenchido com nitrogênio líquido e através da agitação do vial, com um pistilo de aço em seu interior, pulverizando o osso.

Este osso pulverizado foi transferido para os tubos próprios de uso no equipamento que produz o movimento de precessão, o Precellys24®. As Pipetas Gilson Pipetiman – P10, P20, P100, P200, P1000, foram utilizadas para alicotar os reagentes nos tubos e o Agitador Vortex de marca Biometrix®, para fazer a mistura destes reagentes ao osso. A coluna Concentradora Microcon de marca Amicon Bioseparations® foi utilizada para concentrar o DNA. O equipamento 75lf00 Real Time PCR Systems, do fabricante Applied Biosystems® foi utilizado para a quantificação de DNA nas amostras. O termociclador 96 – Well GeneAmp –PCR System 9700, de marca Applied Biosystems®, amplificou o DNA já quantificado. Foi utilizado o Sequenciador ABI3130 Genetic Analyzer, de fabricação de Applied Biosystems® que vai executar a análise de fragmentos.

3.3 REAGENTES

Os reagentes utilizados são utilizados em laboratórios de Biologia nuclear:

- tampão de extração de ossos (NaCl 0,584g; Tris HCl 1M – 1ml; EDTA 0,5M – 10ml; SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 20% - 2,5ml; Água ultra pura – 100ml), que ajuda na lise de proteína;
- Fenol – Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1 v/v), que fará a desproteíntização da amostra e sendo hidrófobo se liga a porção interna apolar da proteína, precipitando-a;
- Água ultra pura, para a diluição e não contaminação da amostra;
- Kit Identifiler, AmpliTaq Gold 250Units – AmpFISTR Identifiler, PCR Amplification Kit, Users Manual, 2001);
- formamida Hi-Di, ILS-600 produto de PCR e Ladder, que irá evitar a formação de estruturas secundárias que afetem a velocidade no processo de capilaridade do DNA já amplificado;
- Kit quantifiler® Human DNA Quantification - Quantifiler Human DNA ou Standart; Quantifiler PCR Reaction Mix (Applied Biosystems).

3.4 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA ÓSSEO

Os ossos selecionados para processamento neste trabalho foram submetidos à extração de DNA através do método tradicional orgânico por digestão com proteinase K e posterior purificação com fenol-clorofórmio e com o método neste trabalho proposto, com movimento de precessão.

A diferença entre estes dois métodos reside no tempo utilizado por cada método, e a utilização de Proteinase K, que só será usada no método tradicional e não no método proposto, com movimento de precessão.

3.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO TRADICIONAL ORGÂNICO FENOL-CLOROFÓRMIO

A extração pelo método tradicional orgânico com fenol-clorofórmio será denominada neste trabalho de “método clássico”. Foram utilizadas amostras já extraídas de osso que tiveram resultado inconclusivo na sua análise primária, cujos extratos se encontram armazenado em freezer, com temperatura de -20°C . Estas amostras foram, na origem do caso, primeiramente trituradas com nitrogênio líquido utilizando o moinho criogênico Freezer/Mil 6750 (Spex CertPrep). Utilizou-se 200 mg de osso em pó, que ficou incubado por doze horas, à 56°C , com 400 μl de tampão de extração de ossos e 15 μl de Proteinase K.

Em seguida as amostras foram submetidas ao método de extração orgânico por fenol-clorofórmio, seguida de purificação com microconcentradores da marca microcon®, seguindo o protocolo do fabricante (Microcon® Centrifugal Filter Devices. Millipore Corporation – 2005 – User Guide).

A Figura 14 demonstra as fases da extração orgânica de DNA da célula, através do uso de Fenol Clorofórmio.

Extração Orgânica por Fenol Clorofórmio

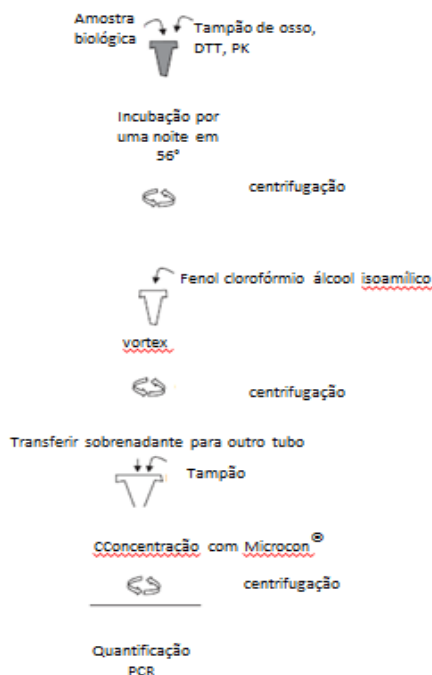


Figura 14– Extração Orgânica por Fenol Clorofórmio

Fonte: figura adaptada de BUTLER (2005, p. 43).

3.4.2 EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO COM MOVIMENTO DE PRECESSÃO

As amostras primárias foram trituradas com nitrogênio líquido, utilizando o moinho criogênico Freezer/ Mil 6750 (Spex CertPrep). Foi transferida a quantidade de 200mg desse osso triturado para tubos de 2ml, contendo esferas metálicas MK 28 próprias do equipamento utilizado. Nesses tubos foram colocados 400ul de tampão de extração de ossos e levados ao Precellys®24. Foi seguido o protocolo de homogeneização por meio de dois ciclos de 30 segundos a 5900 rpm, com intervalo de 15 segundos entre cada ciclo. As amostras foram, então, submetidas, de imediato, ao método de extração orgânico por fenol-clorofórmio, seguida de purificação com micro concentradores da marca microcon®, seguindo o protocolo do fabricante (Microcon® Centrifugal Filter Devices. Milipore Corporation – User Guide - 2005).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

As amostras foram quantificadas utilizando o sistema comercial Quantifiler Duo DNA kit® da Applied Biosystems, no equipamento 7500 Real Time PCR System® do mesmo fabricante. Este produto permite avaliar o DNA humano e o cromossomo masculino quantitativa e qualitativamente em uma única reação de PCR em tempo real.

Para isso é utilizada uma fonte de luz, que excita o fluorocromo da reação. A fluorescência que se produz pela amostra é detectada através do sistema, sendo que o número de ciclos da PCR para que essa detecção ocorra é denominado ciclo de linha de corte.

O IPC é um controle positivo interno que age como controle positivo da PCR. Trata-se de um fragmento de DNA sintetizado artificialmente e não encontrado na natureza. Desta forma, não interfere na quantidade de DNA humano. Caso esse não amplifique, ou um número maior de ciclos seja necessário para se chegar a um valor determinado, o IPC indica a presença de inibição na reação. Se os valores de IPC são maiores que 29, isso indica a presença de um inibidor que pode afetar a quantificação, o que não significa que não exista DNA para ser amplificado (LIFE TECHNOLOGIES, 2013).

3.6 AMPLIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

A amplificação, para multiplicar as sequências alvo do DNA, foi feita por reação em cadeia da Polimerase (PCR), com o emprego do sistema comercial Identifiler Plus™, Life, em termociclador, GeneAmp® PCR System 9700, programado de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante do sistema utilizado. Corrida eletroforética capilar seguida de detecção da fluorescência laser-induzida, executada no analisador automático de DNA ABI PRISM 3130 (AZYME, 2013).

3.7 ANÁLISE DE FRAGMENTOS

A análise de fragmentos foi feita no sequenciador capilar ABI 3130 Genetic Analyser® da Applied Biosystems que utiliza um sistema de migração diferencial que depende do tamanho do fragmento de DNA, por um polímero viscoso, feito por meio de um tubo capilar. (LIFE TECHNOLOGIES, 2013).

Butler (2005) explica que uma solução tampão preenche o recipiente de partida, o capilar e o recipiente de chegada. Este capilar é, então, inserido na solução contendo DNA, cujas moléculas são carregadas negativamente, e atraídas para dentro do capilar migrando em direção ao polo positivo, após aplicação de determinada tensão elétrica. Um feixe de laser incide em um ponto do capilar e excita os marcadores fluorescentes dos fragmentos, que emitem luz em um comprimento de onda determinado, dependendo do corante utilizado. Esta luz é detectada por um detector de fluorescência e os dados analisados através de um programa fornecido pelo fabricante.

3.8 CONCLUSÃO

Da pesquisa de todos dos casos já realizados no Laboratório de Genética Molecular Forense, verifica-se que um percentagem de casos de identificação de cadáver, através da análise de ossos, não obteve resultado conclusivo.

Concluiu-se que, toda tecnologia e automação utilizada até o momento, não foi suficiente para resolver muitos casos.

Um dos métodos utilizados para a extração de DNA de células nas condições descritas, é a extração de DNA pelo método tradicional orgânico com fenol-clorofórmio. Este método foi o utilizado em todos os casos do Laboratório referido, mesmo aqueles cujo resultado foi inconclusivo.

É proposto, então, um método com movimento de precessão, utilizando-se o equipamento Precellys®24, em uma das fases do processo.

4 RESULTADOS

4.1 QUANTIFICAÇÃO

Após a análise dos dados de quantificação foi verificado que, com exceção da amostra 38, todas as amostras apresentaram o IPC inferior a 29, o que significa a ausência de inibidores nestas amostras. A amostra de número 38 apresentou um IPC superior quando tratada com o método clássico, fato que se deve à presença de algum grau de inibidores, impedindo a futura amplificação. Já quando a mesma amostra foi tratada com o método com movimento de precessão este IPC foi mais baixo, chegando ao limite da ausência de inibidores, estipulado pelo fabricante do equipamento, isto indica que o método com movimento de precessão foi mais eficiente na minimização de inibidores que esta amostra apresentava primariamente.

Dos resultados obtidos a quantificação, observa-se que 14 amostras apresentaram um resultado com maior quantidade de DNA através do método clássico, porém quando estas foram submetidas à amplificação e análise de fragmentos, não foram obtidos resultados analisáveis frente à baixa qualidade deste DNA; em 25 amostras, o resultado com o método de precessão foi mais significativo e 5 das amostras apresentaram tão pouco DNA que não foi determinado no processo de quantificação.

4.2 ANÁLISE DE FRAGMENTOS

4.2.1 ALTURA DE PICOS DE DNA

Quando se processa a interpretação de resultados, na análise de fragmentos de DNA, para identificação humana, a experiência profissional será levada em conta. Em um laboratório forense a quantidade e variedade de amostras e suas particulares e complexidades, demanda o estabelecimento de regras próprias para a interpretação dos resultados obtidos.

O Laboratório deve, então, estabelecer parâmetro, baseado em literatura apropriada, para definir e protocolizar os métodos de interpretação analítica, permitindo um maior entendimento entre os analistas do laboratório em questão. (FBI Guideline 1994).

No Laboratório de Genética Molecular Forense, após a análise dos dados obtidos destes controles e de processamento de amostras diversas, foi estabelecido um pico mínimo de 50 RFU (unidade referência de fluorescência) como parâmetro de análise. Este parâmetro direciona o profissional que está analisando o fragmento, para a quantidade e qualidade do DNA em questão.

4.2.2. AMOSTRA AMPLIFICADA NOS DOIS MÉTODOS

A amostra de número 3 (três) revelou um resultado positivo em ambos os métodos, porém não havia sido marcada como controle. Quando da verificação desta amostra no sequenciador, em sua amplificação e análise primária, foi concluído que, desde sua primeira extração havia DNA suficiente para análise, porém, tratava-se de uma mistura, e a amostra padrão era referente a um irmão, inviabilizando a conclusão. Por esse motivo esta amostra teve na sua análise primária um resultado inconclusivo. Fica então a amostra 3 excluída dos resultados desta pesquisa.

4.2.3 ANÁLISE DOS ELETROFEROGRAMAS

Das 45 (quarenta e cinco) amostras utilizadas no início deste trabalho, restaram 44 (quarenta e quatro) amostras analisáveis, desconsiderando a amostra 3 (três), referida no item acima.

Foi considerado, então, um total de 44 (quarenta e quatro) amostras, que quando submetidas ao método clássico, apresentaram na sua totalidade, resultados não analisáveis, ou seja, não houve amplificação de DNA.

Quando estas 44 (quarenta e quatro) amostras foram submetidas ao método com movimento de precessão, 10 (dez) amostras apresentaram resultados analisáveis. Para se chegar a esse resultado foi estabelecido um parâmetro de 8 loci amplificados.

As amostras que apresentaram DNA amplificado no método com movimento de precessão são as demonstradas na Tabela 2 abaixo.

Tabela 1: característica das amostras utilizadas. LGMF, 2013

Amostra	Característica
14	fragmento ósseo em decomposição
19	fragmento ósseo em decomposição
23	fragmento ósseo em decomposição
25	fragmento ósseo em decomposição
31	fragmento ósseo em decomposição
32	fragmento ósseo em decomposição
34	fragmento ósseo em decomposição
41	fragmento ósseo em decomposição
43	fragmento ósseo em decomposição
44	fragmento ósseo em decomposição

Fonte: Laboratório de Genética Molecular Forense, 2013.

As 10 (dez) amostras que apresentaram amplificação analisável correspondem a 22,34% do total das amostras tratadas neste trabalho.

4.2.4 ANÁLISE DOS ALELOS PELA OBSERVAÇÃO DOS ELETROFEROGRAMAS

O eletroferograma é a forma de visualizar os alelos amplificados dentro de cada loci pretendido pelos marcadores utilizados. Portanto, quanto maior o pico em RFU, que é a unidade de referência de fluorescência, apresentado pelo alelo, maior a quantidade de DNA amplificado.

Nos eletroferogramas que se seguem, além da posição dos alelos que é dada em número, pode-se observar a um número que corresponde ao RFU.

As 10 amostras que restaram para análise são fragmentos ósseos em avançado grau de decomposição.

Pode ser observado, nos eletroferogramas, que representam o método clássico, que os picos estão mais baixos, e houve a amplificação de menor número de loci e, ainda de forma precária. Já no método com movimento de precessão, foram qualificadas as amostras com uma amplificação de no mínimo 8 loci, sendo que em todas as amostras os picos são também baixos, porém mais visíveis.

A Escala para visualização do eixo y, correspondente à RFU, foi alterada em cada amostra para melhor visualização dos picos, porém a unidade mínima para análise, estabelecida pelo Laboratório de Genética Molecular Forense em questão,

foi mantida em 50 RFUs. Os eletroferogramas demonstrados neste trabalho, representados para cada amostra apresentam o número do alelo e abaixo deste, o tamanho do pico em RFUs.

Todos os eletroferogramas que seguem, foram coletados no ano de 2013 no Sequenciador ABI 3130, de fabricação Applied Biosystems.

4.2.5 AMOSTRA NÚMERO 14

Os eletroferogramas, representando o método clássico e o método com movimento de precessão, desta amostra, tiveram a escala estabelecida em 250RFU.

No método clássico observam-se 3 loci e o tamanho dos picos em RFUs estão todos abaixo do mínimo estabelecido pelo Laboratório em questão.

No método com movimento de precessão foram amplificados 8 loci e todos os picos são mais visíveis e acima do mínimo estabelecido pelo Laboratório.

Os resultados podem ser observados nas Figuras 15 e 16.

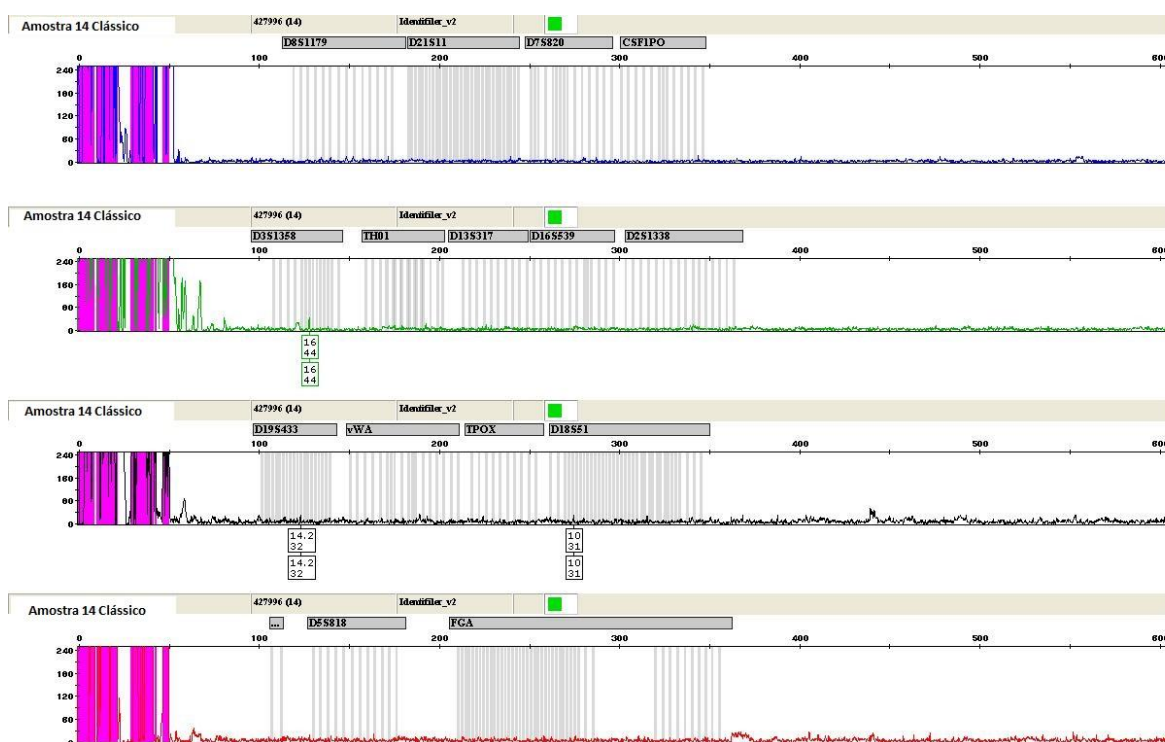


Figura 15 – Eletroferograma com os resultados pelo método clássico da amostra 14

Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

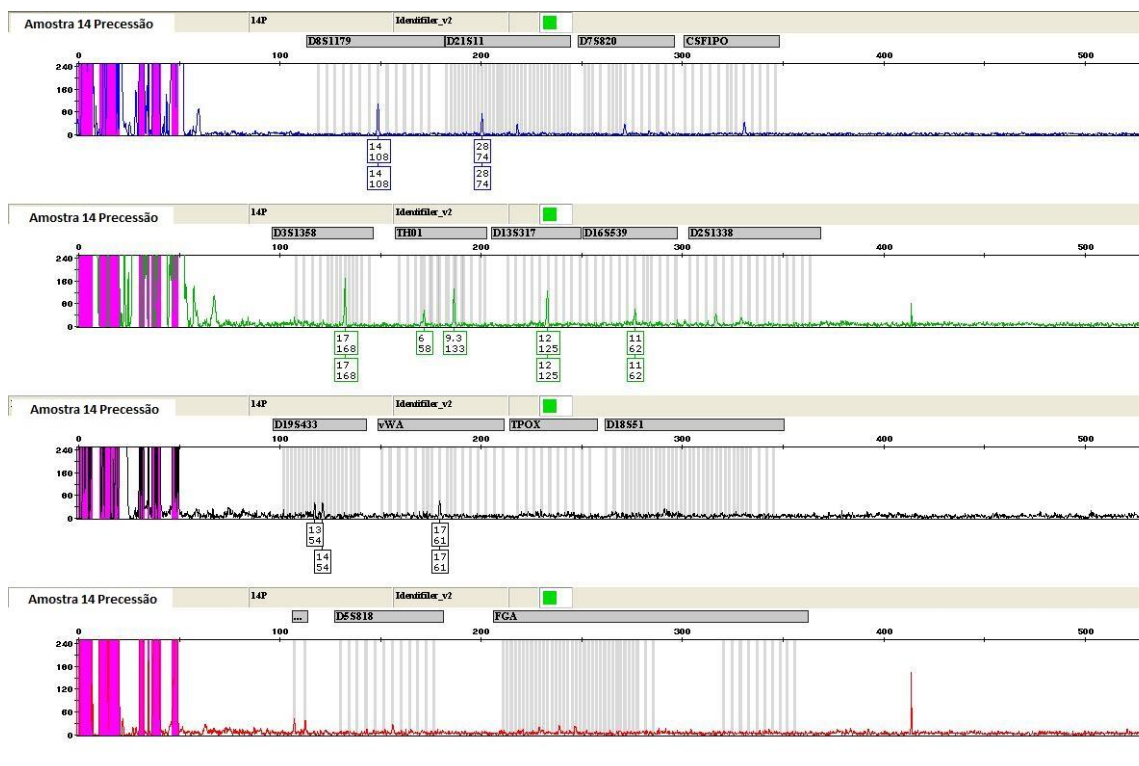


Figura 16 – Eletroferograma com os resultados pelo método com movimento de precessão da amostra 14

Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

4.2.6 AMOSTRA NÚMERO 19

Os eletroferogramas, representando o método clássico e o método com movimento de precessão, desta amostra, tiveram a escala estabelecida em 500RFUs.

No método clássico foi amplificado 1 locus, e o pico em RFU está abaixo do estabelecido pelo laboratório.

No método com movimento de precessão foram amplificados 15 loci e a amelogenina, os picos em RFU estão visíveis e acima do mínimo estabelecido no Laboratório.

Os resultados podem ser observados nas figuras 17 e 18.

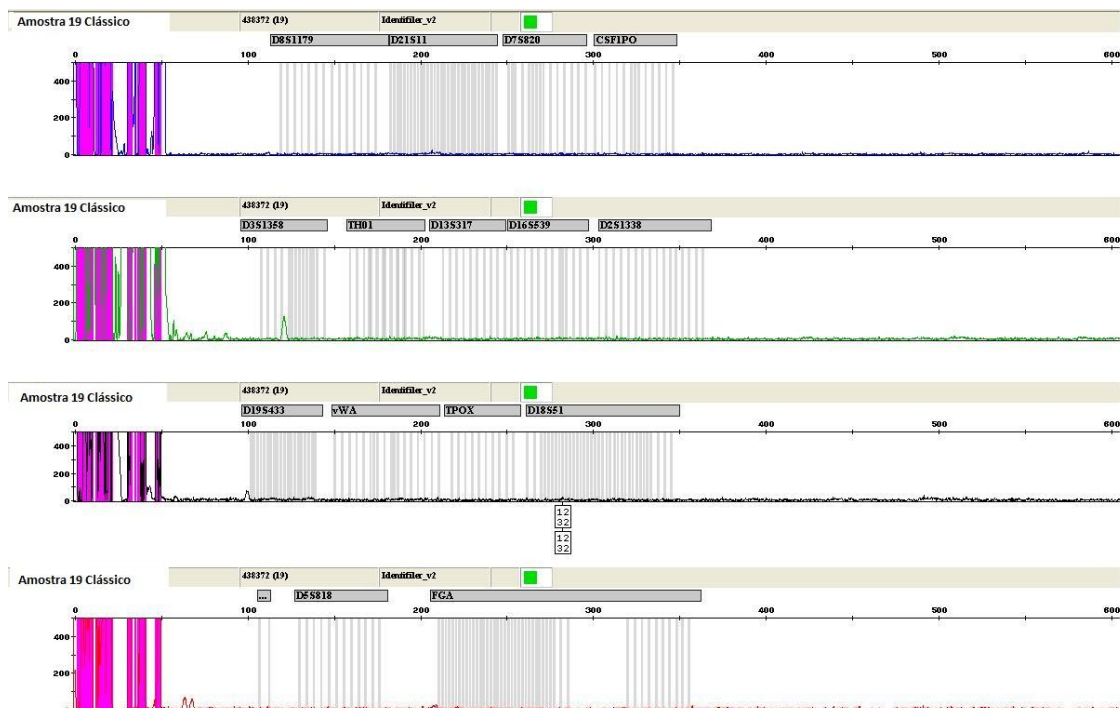


Figura 17 – Eletroferograma com os resultados pelo método clássico da amostra 19
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

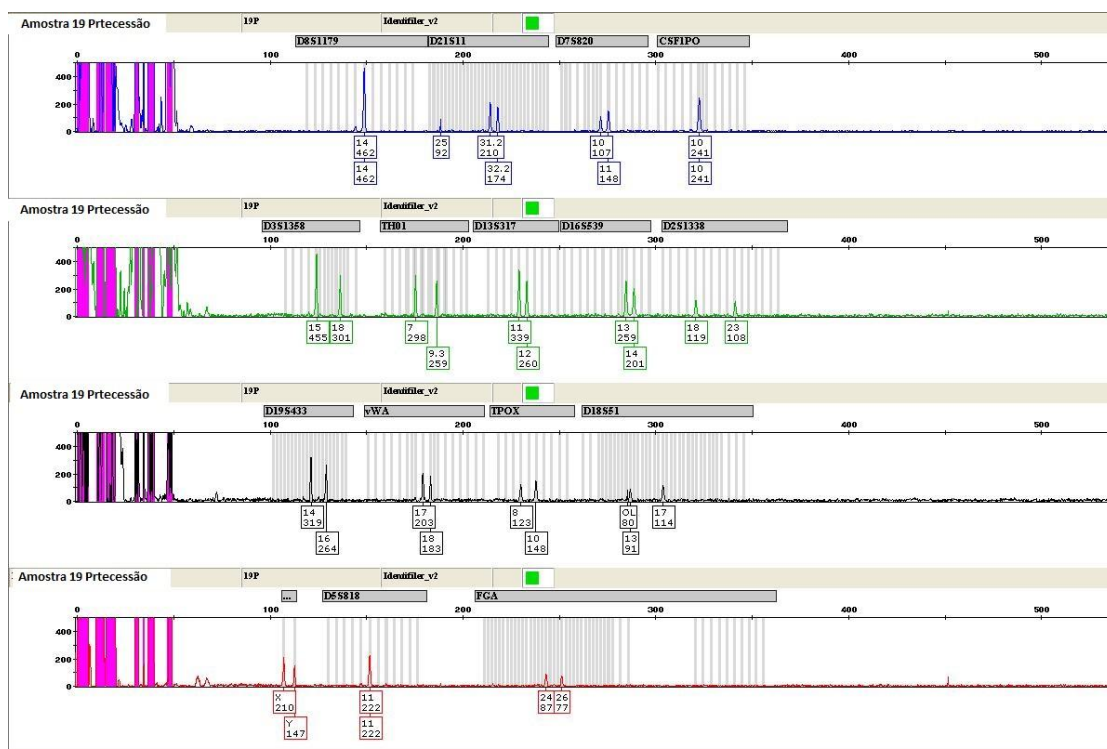


Figura 18 – Eletroferograma com os resultados pelo método com movimento de precessão da amostra 19
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

4.2.7 AMOSTRA NÚMERO 23

Os eletroferogramas, representando o método clássico e o método com movimento de precessão desta amostra, tiveram a escala estabelecida em 500RFUs.

No método clássico foram amplificados 3 loci, com picos abaixo do estabelecido pelo Laboratório com exceção do locus D16S539, que teve um pico de 54 RFUs.

No método com movimento de precessão foram amplificados 11 loci, todos com picos em RFU acima do estabelecido.

Os resultados podem ser observados nas Figuras 19 e 20.

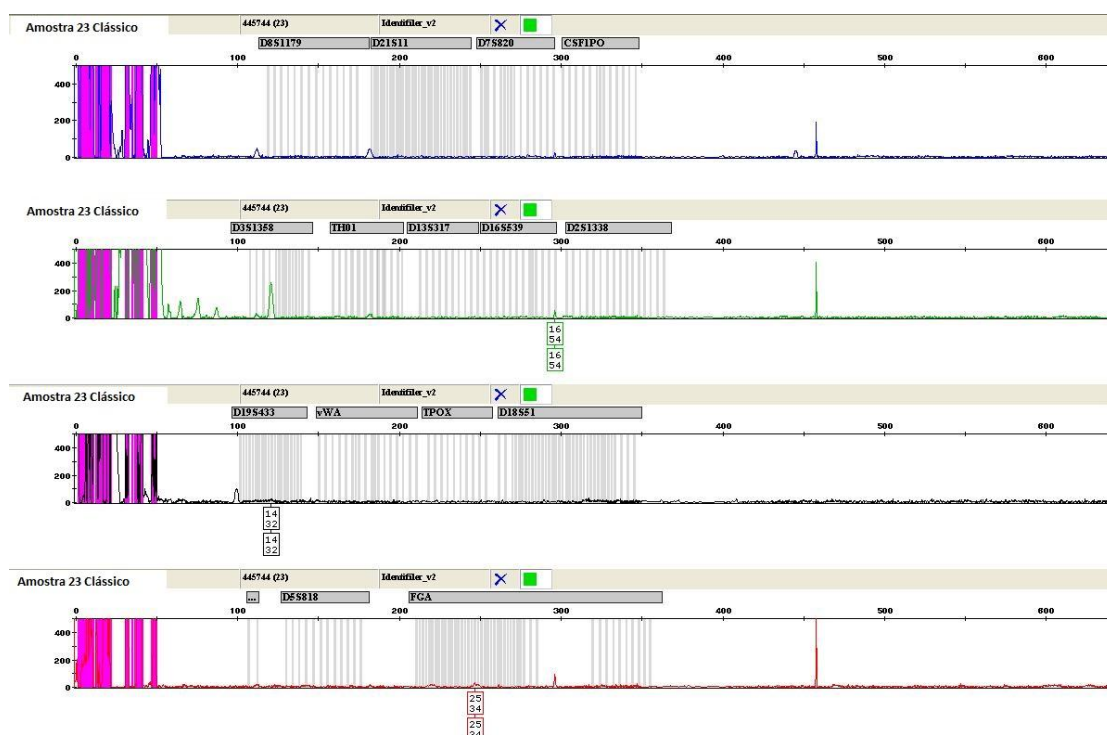


Figura 19- Eletroferograma com os resultados pelo método clássico da amostra 23

Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

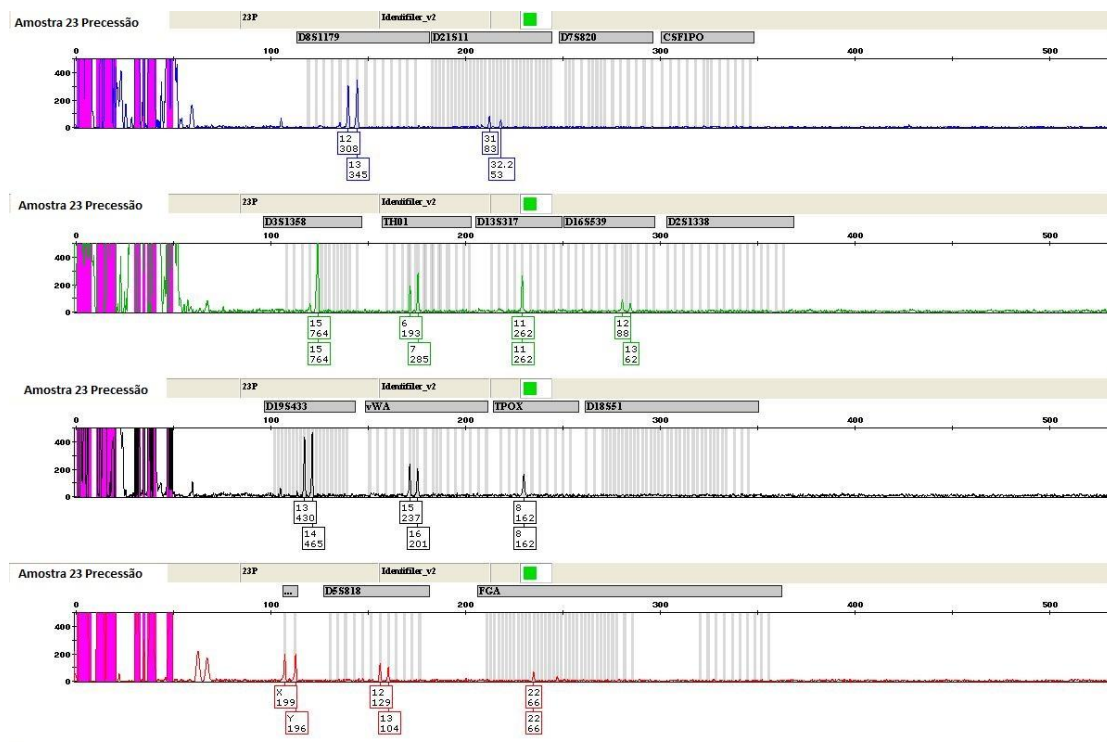


Figura 20 – Eletroferograma com os resultados pelo método precessão da amostra 23
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

4.2.8 AMOSTRA NÚMERO 25

Os eletroferogramas, representando o método clássico e o método com movimento de precessão, desta amostra, tiveram a escala estabelecida em 2000RFU.

No método clássico, demonstrado na Figura 22, foram amplificados 4 loci, todos com picos em RFU abaixo do estabelecido.

No método com movimento de precessão, demonstrado na Figura 23 foram amplificados 15 loci e a amelogenina, e, todos os picos estão acima do estabelecido pelo Laboratório.

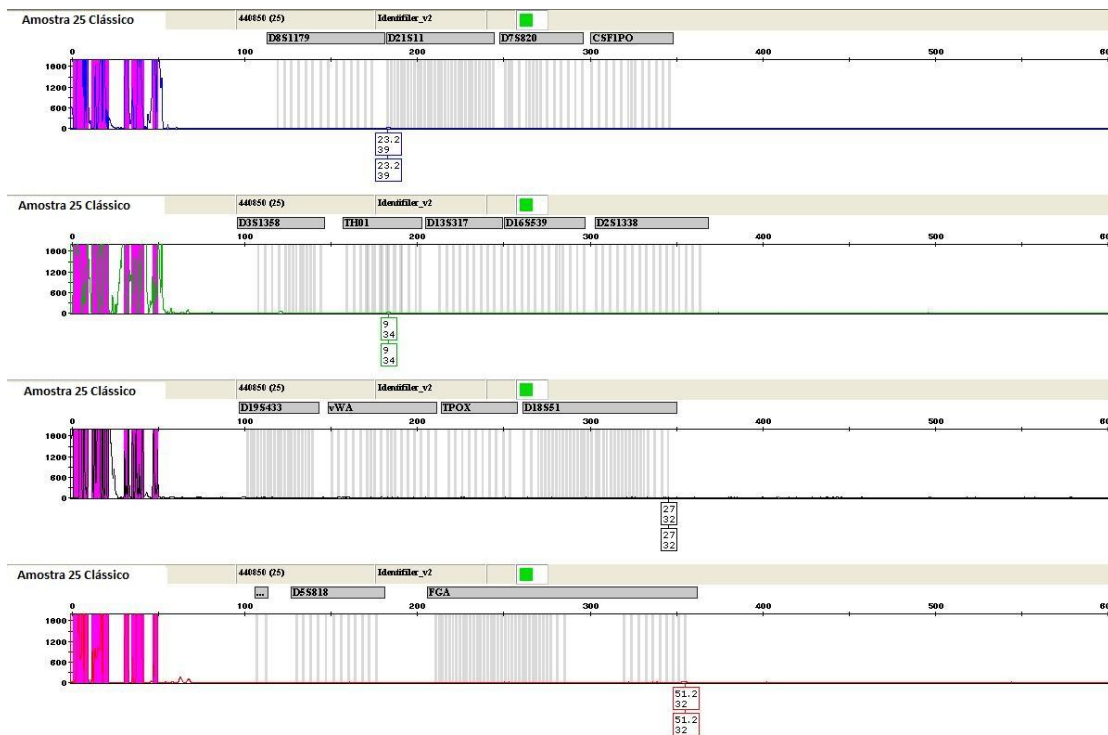


Figura 21 – Eletroferograma com os resultados pelo método clássico da amostra 25
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

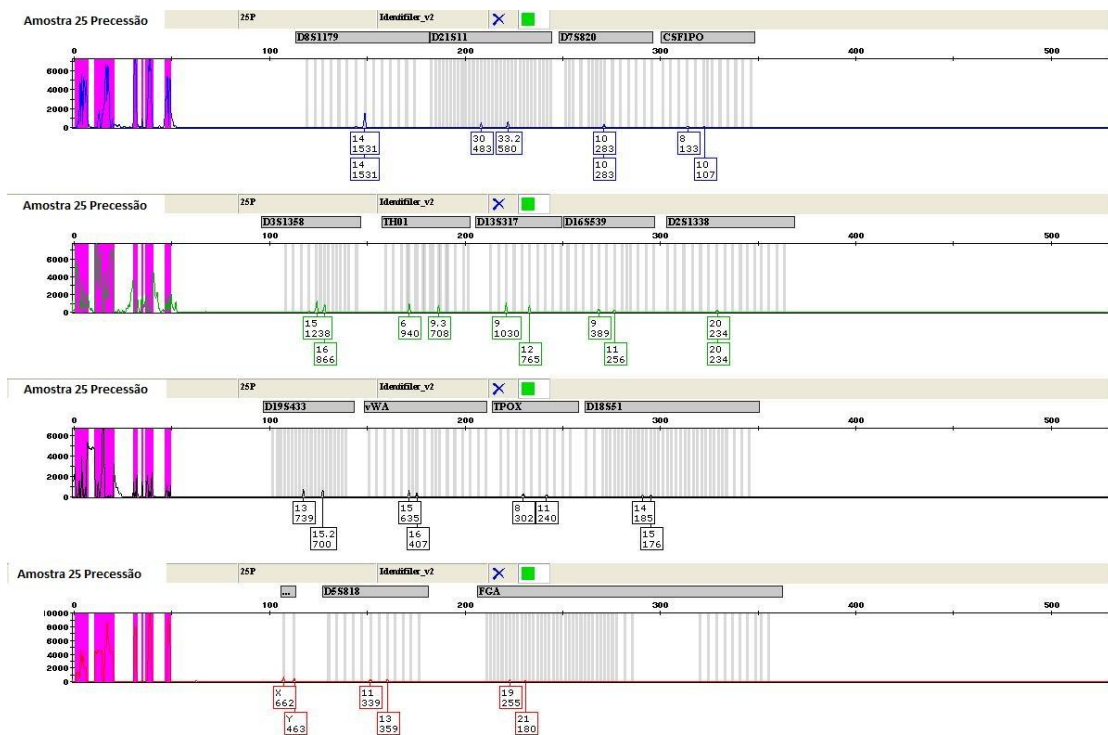


Figura 22 – Eletroferograma com os resultados pelo método precessão da amostra 25
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

4.2.9 AMOSTRA NÚMERO 31

Os eletroferogramas, representando o método clássico e o método com movimento de precessão, desta amostra tiveram a escala estabelecida em 3500RFU.

No método clássico foram amplificados quatro loci, todos com picos abaixo do estipulado pelo Laboratório.

No método com movimento de precessão foram amplificados quinze loci e a amelogenina, com todos os picos acima do estipulado pelo Laboratório.

Os resultados podem ser observados nas Figuras 23 e 24.



Figura 23 – Eletroferograma com os resultados pelo método clássico da amostra 31
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

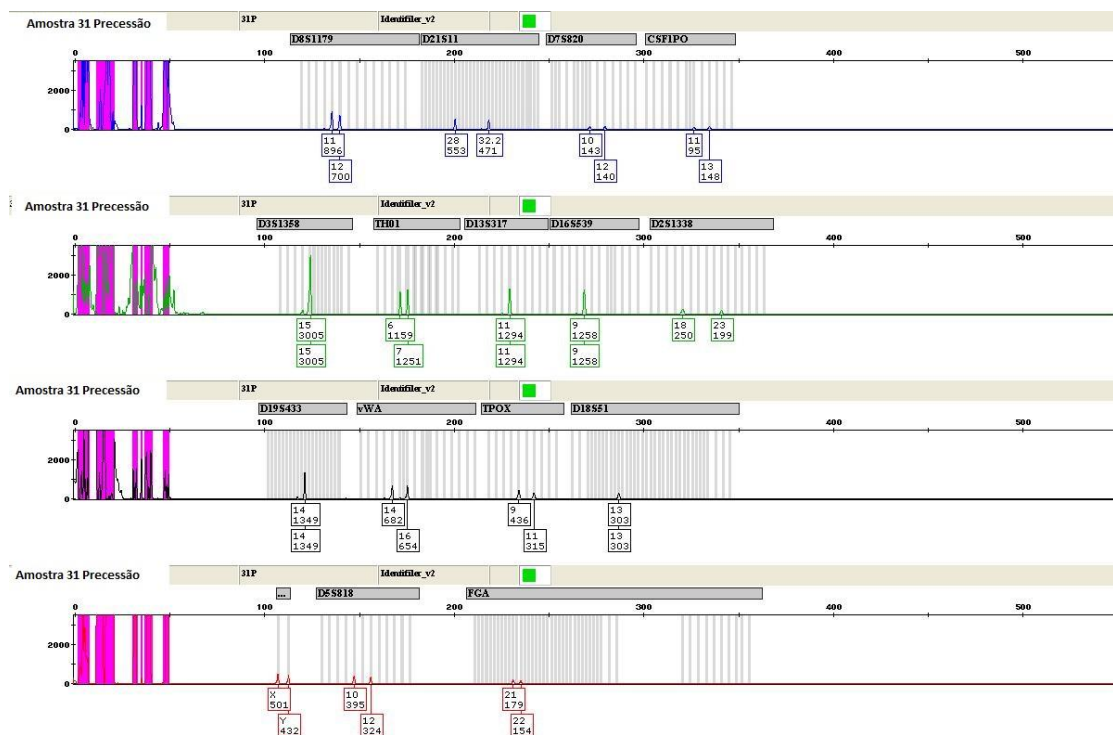


Figura 24 – Eletroferograma com os resultados pelo método precessão da amostra 31
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

4.2.10 AMOSTRA NÚMERO 32

Os eletroferogramas, representando o método clássico e o método com movimento de precessão, desta amostra tiveram a escala estabelecida em 300RFU.

No método clássico foram amplificadas 12 loci, porém, os picos em RFU dos alelos nos loci D2S1338, D19S433, TPOX, D18S51 e a amelogenina estão abaixo do estabelecido no Laboratório.

No método com movimento de precessão foram amplificadas 12 loci e a amelogenina, sendo que todos os picos apresentam valores em RFU superiores ao mínimo estipulado neste laboratório.

Os resultados podem ser observados nas Figuras 25 e 26.

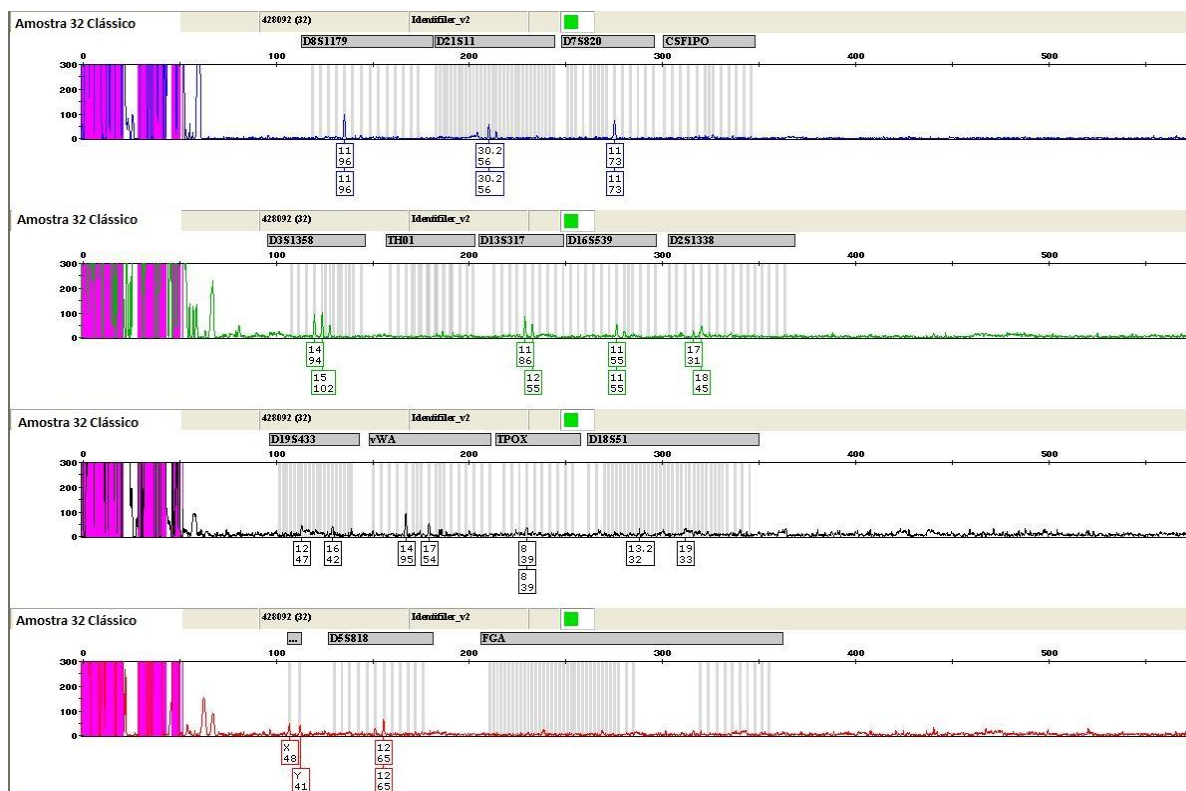


Figura 25 – Eletroferograma com os resultados pelo método clássico da amostra 32
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

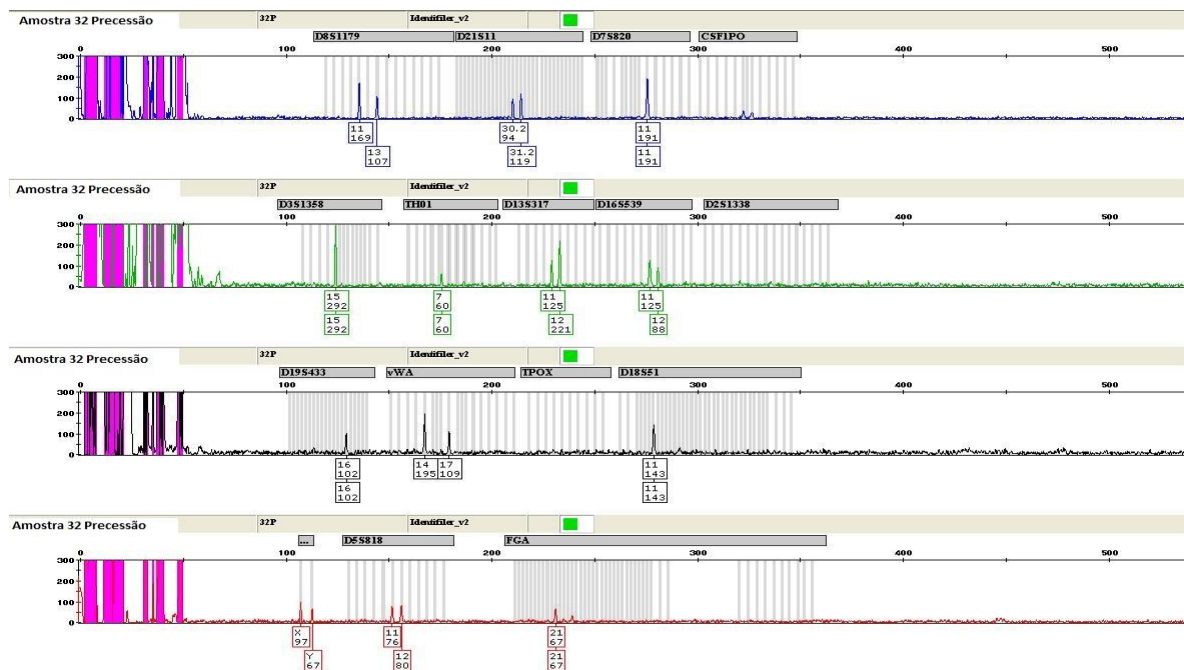


Figura 26 - Eletroferograma com os resultados pelo método precessão da amostra 32
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

4.2.11 AMOSTRA NÚMERO 34

Os eletroferogramas, representando o método clássico e o método com movimento de precessão, desta amostra tiveram a escala estabelecida em 2000RFU.

No método clássico foram amplificados 10 loci e a amelogenina, todos com picos acima do estabelecido pelo laboratório com exceção do loci D18S51, cujo pico apresenta valor de RFU abaixo do estabelecido.

No método com movimento de precessão, foram amplificados 15 loci e a amelogenina, todos com valores de RFU acima do estabelecido pelo Laboratório.

Os resultados podem ser observados nas Figuras 27 e 28.



Figura 27 – Eletroferograma com os resultados pelo método clássico da amostra 34

Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013

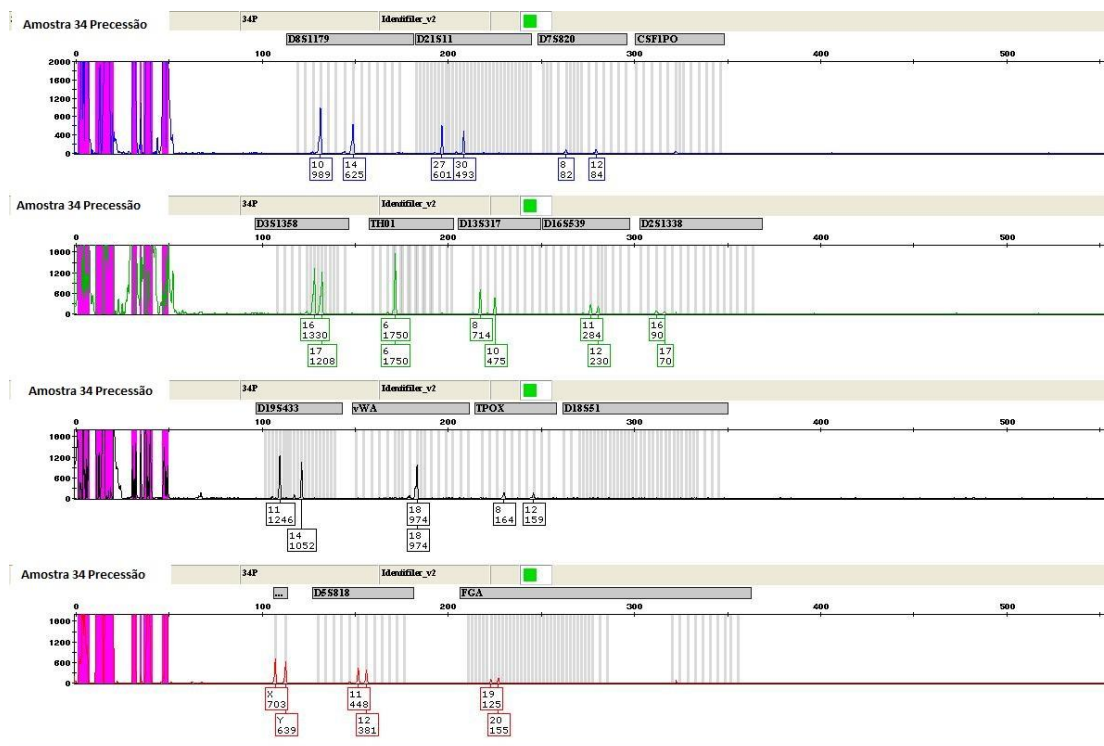


Figura 28 – Eletroferograma com os resultados pelo método com movimento de precessão da amostra 34

Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

4.2.12 AMOSTRA NÚMERO 41

Os eletroferogramas, representando o método clássico e o método com movimento de precessão, desta amostra tiveram a escala estabelecida em 500RFU.

No método clássico nenhum loci foi amplificado.

No método com movimento de precessão foram amplificados 10 loci e a amelogenina, todos com valores de RFU superiores aos estabelecidos pelo Laboratório.

Os resultados podem ser observados nas Figuras 29 e 30.



Figura 29 – Eletroferograma com os resultados do método clássico da amostra 41
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

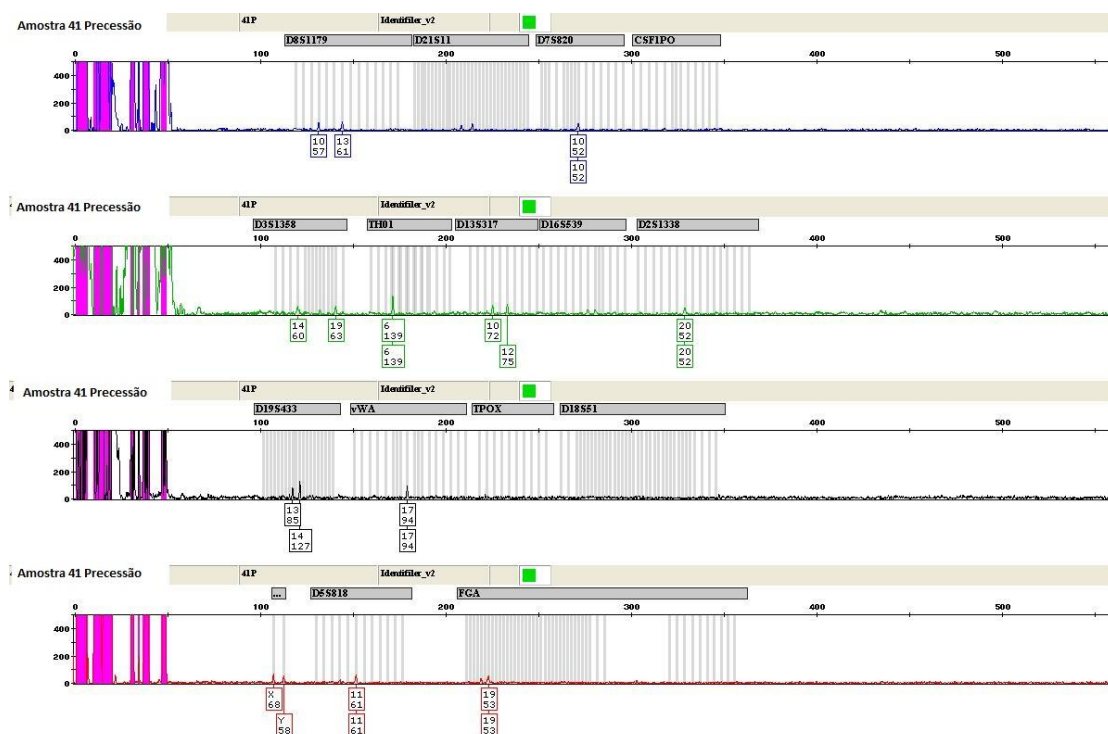


Figura 30 – Eletroferograma com os resultados do método com movimento de precessão da amostra 41

Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

4.2.13 AMOSTRA NÚMERO 43

Os eletroferogramas, representando o método clássico e o método com movimento de precessão, desta amostra tiveram a escala estabelecida em 1200RFU.

No método clássico foram amplificados 2 loci com os picos abaixo do estabelecido pelo Laboratório.

No método com movimento de precessão, foram amplificados 15 loci e a amelogenina todos com valores de pico em RFU superiores aos estabelecidos no Laboratório.

Os resultados podem ser observados nas Figuras 31 e 32 abaixo.



Figura 31- Eletroferograma com os resultados do método clássico da amostra 43

Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

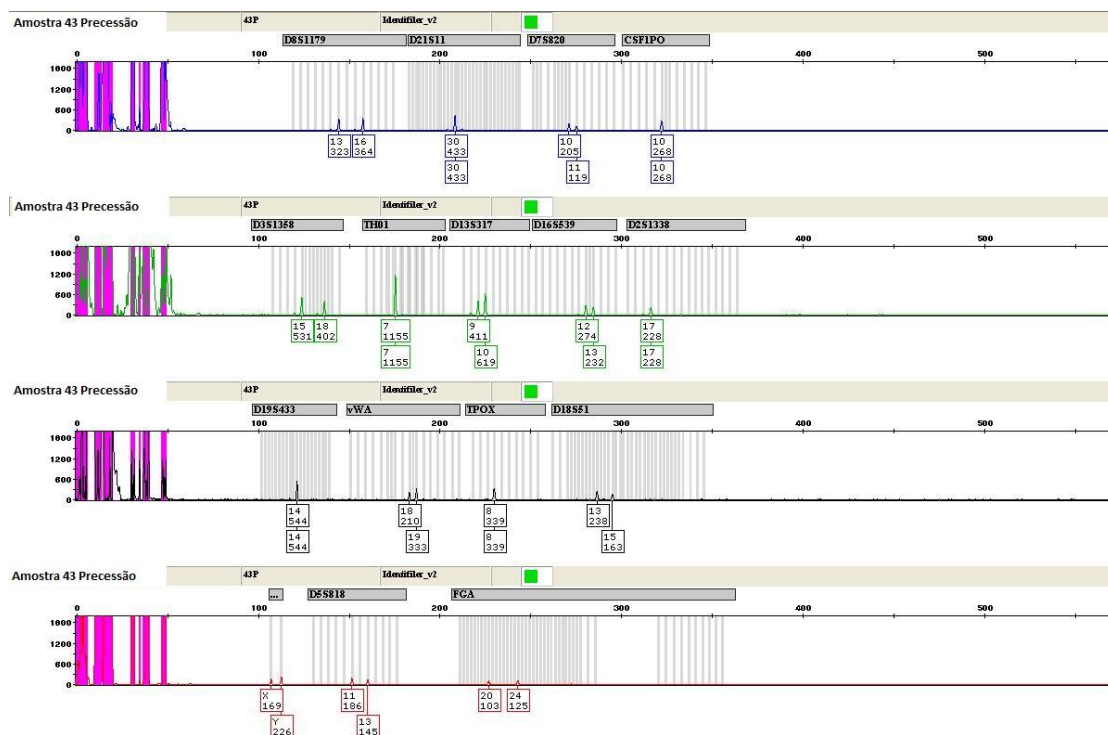


Figura 32 – Eletroferograma com os resultados do método com movimento de precessão da amostra 43

Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

4.2.14 AMOSTRA NÚMERO 44

Os eletroferogramas, representando o método clássico e o método com movimento de precessão desta amostra, tiveram a escala estabelecida em 500RFU.

No método clássico foram amplificados 7 loci, sendo que os loci D13S317, D16S539, vWA e FGA apresentaram valores de picos em RFU inferiores aos estabelecidos no Laboratório.

No método com movimento de precessão foram amplificados 15 loci e a amelogenina, todos os alelos apresentam valores em RFU maior do que o estabelecido no laboratório.

Os resultados podem ser observados nas Figuras 33 e 34 a seguir.

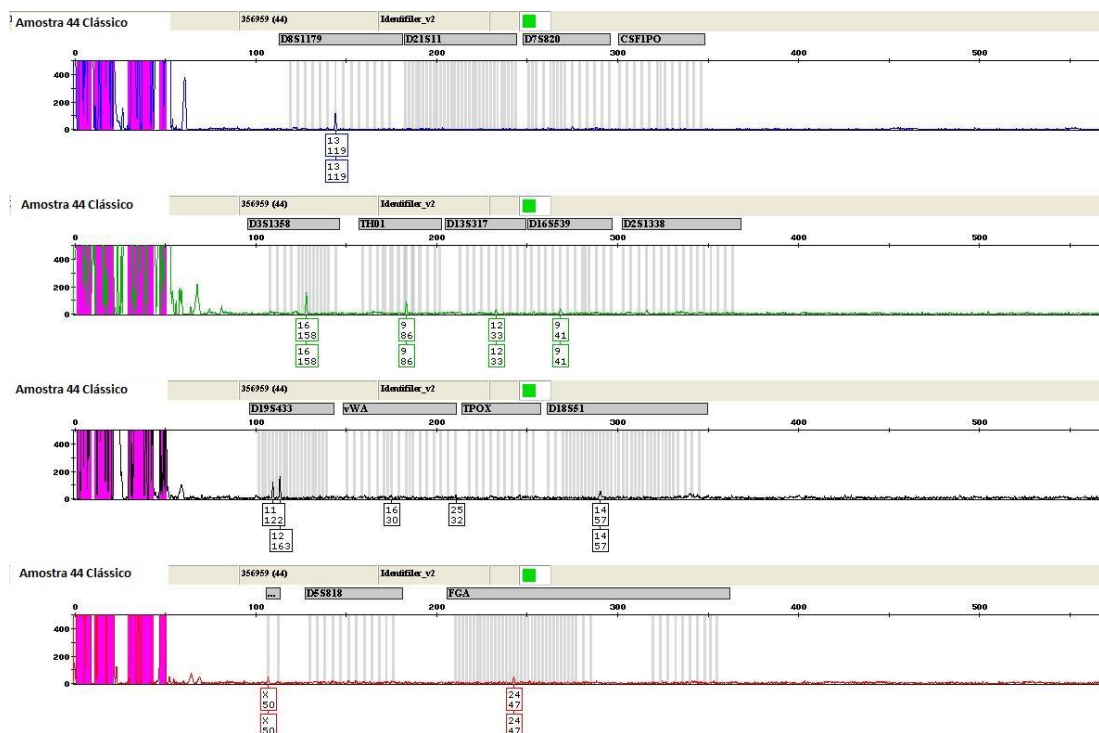


Figura 33 – Eletroferograma com os resultados do método clássico da amostra 44
 Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

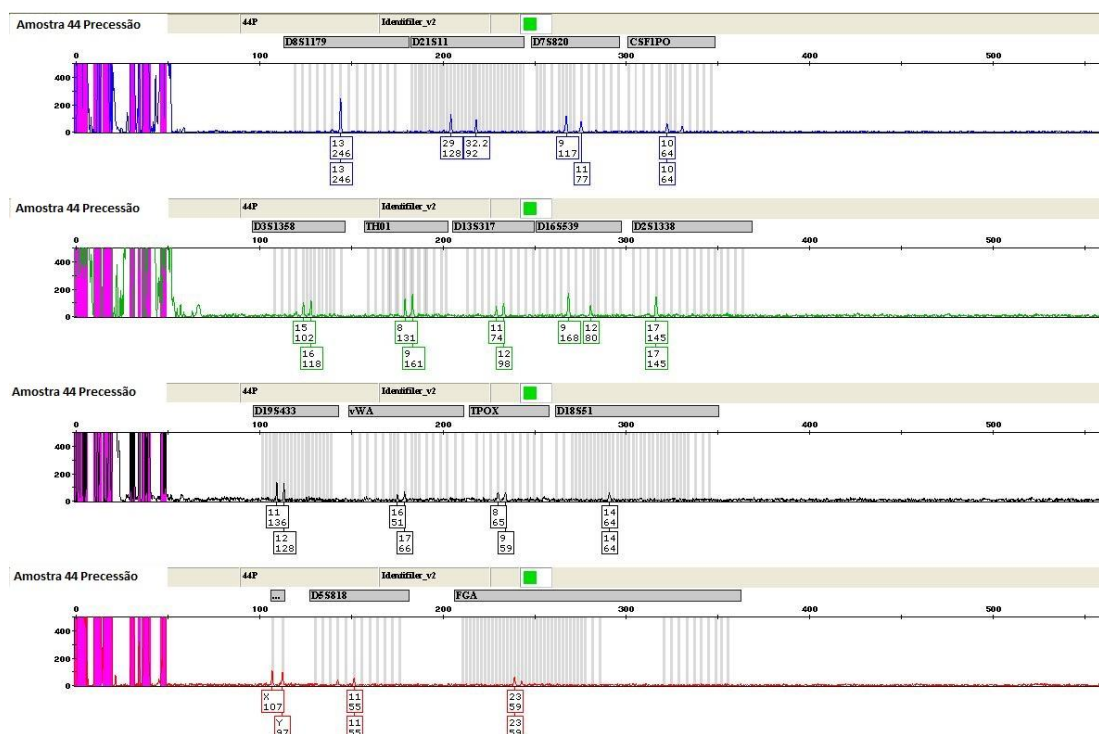


Figura 34 – Eletroferograma com os resultados do método com movimento de precessão da amostra 44.

Fonte: extraído do sequenciador 3130, do LGMF, 2013.

4.3 DISCUSSÕES FINAIS

A discussão deste trabalho tem seu início na proposição dos objetivos específicos e gerais, no início das análises.

Considera-se, inicialmente a capacidade de extração de DNA da célula, comparando o método clássico e o método com movimento de precessão, utilizando como parâmetros a eficiência de quantificação, amplificação de STRs autossômicos analisáveis no analisador automático de DNA ABI PRISM 3130, e a comparação do tempo de processamento dos dois métodos.

Analisando os resultados obtidos na quantificação do DNA por meio do equipamento 7500 Real Time PCR System® e com o conjunto Quantifiler Duo DNA, observa-se que de 45 amostras estudadas, 25 apresentaram quantidades de DNA superiores, em picogramas, em comparação com os resultados obtidos por meio do método clássico.

Observou-se, também, que, uma das amostras, (número 38), apresentou IPC superior a 29 ciclos quando tratada pelo método clássico, denotando presença de inibidores. Esta mesma amostra tratada pelo método com movimento de precessão apresentou IPC de 28,77pg, ou seja, os inibidores não interferiram quando o método de precessão foi utilizado e, portanto, houve amplificação do DNA.

Os relatos científicos oferecidos por Campos et al. (2011) permitem a conclusão que, grande parte do DNA no osso é recuperada da porção mineral da matriz. Esse DNA seria liberado de uma região que é preenchida durante a mineralização por cristais de hidroxiapatita.

Essa informação é corroborada por Salomon (2005), Hercules (2005) e França (2005), que em pesquisas onde utilizaram hipoclorito de sódio para degradar tecido ósseo, obtiveram sequências autênticas reproduzíveis a partir de ossos de animais novos e antigos, incluindo os seres humanos, a partir de extratos de DNA de agregados de cristal. Demonstrou que a presença de um nicho privilegiado dentro do osso fóssil contém osso mais preservado do que o DNA em outras regiões do osso.

Como pode ser observado da Figura 35, os osteócitos estão protegidos por camadas diversas de trabeculado ósseo. Como já mencionado neste trabalho, uma vez aprisionado na matriz dura, a célula original formadora de osso, agora chamada de osteócito, não tem oportunidade de se dividir embora continue a secretar mais matriz em pequenas quantidades em torno de si mesma, formando uma proteção.

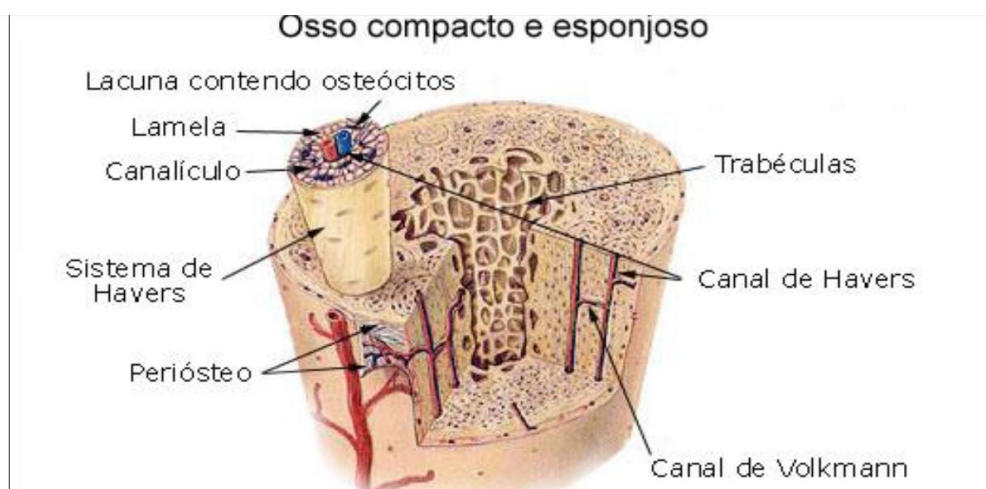


Figura 35 – Osso compacto e esponjoso

Fonte: Site National Institute of Health (2013).

Tendo esses conhecimentos já estudados em trabalhos confiáveis anteriores, observa-se que, a utilização da pulverização do osso para extração de DNA visa ter uma possibilidade maior de expor células incluídas neste trabeculado ósseo. Quanto mais pulverização maior a exposição de células. Desta forma utiliza-se a fragmentação e posterior pulverização, ou trituração com nitrogênio líquido, utilizando o moinho criogênico Freezer/Mil 6750 (Spex CertPrep), como já descrito no corpo deste trabalho.

Sendo assim processado, o osso irá se transformar em uma massa ou um pó, dependendo do grau de decomposição do mesmo.

Segundo informações obtidas na página eletrônica do fabricante do equipamento que reproduz esse movimento, a precessão associada às esferas metálicas misturadas a amostra, promovem um movimento caotrópico, nesta amostra, produzindo uma fragmentação ainda maior da estrutura óssea que já passou pela pulverização através de nitrogênio líquido, utilizando o moinho criogênico Freezer/Mil 6750 (Spex CertPrep).

Não é apenas uma agitação, o que seria indicado na dissolução e mistura de substâncias sólidas e líquidas, como o equipamento da Figura 36, que faz um movimento de gangorra em uma plataforma onde os tubos se fixarão.



Figura 36 – Agitador para frascos
Fonte: Site Global TradeTechnology (2013).

O movimento de precessão irá mudar a direção do eixo vertical dos tubos, impedindo que o movimento das esferas metálicas do seu interior, se dê em uma só direção, atingindo, assim, todo o conteúdo desta amostra. Desta forma, haveria maior fragmentação e maior liberação de células, de onde se podem obter DNA.

A proposta deste trabalho é a comparação dos resultados obtidos por meio do método clássico de digestão com proteinase K e um método onde se utiliza um sistema de automação que imprime na amostra um movimento de precessão e se vale de esferas metálicas no interior do tubo.

Comparando os resultados obtidos após a análise de fragmentos das amostras em questão, verificou-se que, das 45 amostras cujo resultado primário e anterior a esta pesquisa, foi inconclusivo, uma delas apresentou amplificação de quinze loci em ambos os métodos. Quando da análise desta amostra no sequenciador, verificou-se que, desde a análise primária havia DNA suficiente para a análise, porém como se tratava de uma mistura e a amostra padrão correspondia a um irmão da vítima, não foi possível um resultado conclusivo. Logo esta amostra foi excluída da pesquisa.

Portanto, das 44 amostras analisadas, no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyser® da Applied Biosystems, quando tratadas pelo método clássico, todas apresentaram resultados não analisáveis, o que significa que não houve amplificação de DNA destas amostras.

Já, das amostras tratadas pelo método com movimento de precessão, dez apresentaram resultados analisáveis, pelos padrões estabelecidos no início do presente trabalho, ou seja, oito loci amplificados e com picos superiores a 50RFUs.

Estes números devem ser analisados, considerando-se que todos os ossos utilizados encontravam-se em adiantado grau de decomposição e apresentaram em sua análise primária resultados inconclusivos.

A confirmação dos resultados obtidos neste trabalho vem encontrar os resultados obtidos em pesquisas anteriores de Müller et al.(2013), que testou o uso do movimento de processão para extrair DNA de células de glândulas sexuais de coelhos. A produção quantitativa de proteína por mg de tecido foi essencialmente maior e as quantidades de lipídios relacionada com a proteína também foram mais elevados em muitas das amostras submetidas ao movimento de processão, indicando a destruição das membranas celulares, pois é conhecido que a composição química das membranas celulares oscila em torno dos valores médios de 60% de proteínas globulares e 40% de lipídios. Associados a estes componentes maioritários, identificam-se ainda glucídios, quase sempre em quantidades muito menores e associados às proteínas e aos lipídios, constituindo glicoproteínas e glicolipídios. O modelo da Figura 39 foi proposto por Gorder e Grendel, desenvolvido por Danielli, Davson e outros, ficou conhecido como modelo sanduiche. A membrana seria constituída por uma bicamada de moléculas lipídicas, à qual se associava proteínas nas duas faces.

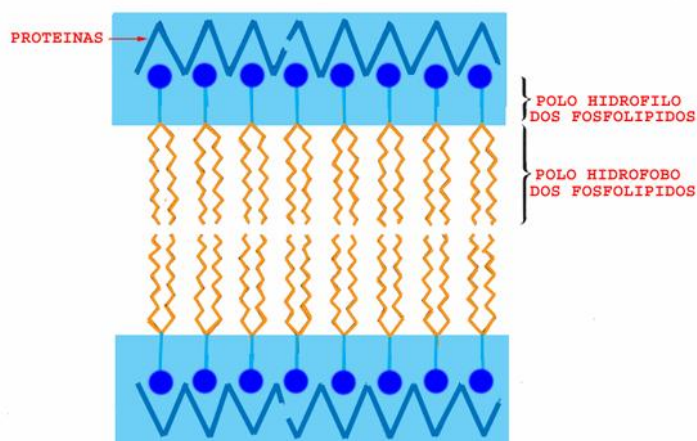


Figura 37 – O modelo de Gorder e Grendel da membrana celular.

Fonte: <http://www.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/ordem.membrana.htm> (2013).

Logo, o método com movimento de processão proporcionou, além de uma maior trituração do tecido ósseo e consequente liberação da célula confinada nesta

estrutura mineral, proporcionou, também, o rompimento, com maior eficiência, da membrana celular e nuclear das células, para maior liberação do DNA.

Quando é comparada a velocidade de execução dos dois métodos aqui expostos, verifica-se que o método clássico necessita de no mínimo 2 horas e no máximo 24 de incubação, em banho de 56°C e com Proteinase K para que ocorra a digestão dos tecidos, segundo os protocolos do Laboratório do FBI e que são utilizados na totalidade nos Laboratórios de Genética Molecular Forense no mundo todo (FBI Laboratory, 1994).

Já o método com movimento de precessão utilizou dois ciclos de 30 segundos a 5900rpm, com intervalo de 15 segundos cada ciclo. Logo, é necessário um tempo de 1,5 minutos para que a amostra esteja pronta para a purificação com fenol clorofórmio álcool isoamílico.

O fulcro desta pesquisa, ou seja, o objetivo geral é verificar se existe a possibilidade de se estabelecer um protocolo de extração de DNA humano, ainda não utilizado rotineiramente na esfera forense, por meio de um equipamento que imprime nas amostras um movimento de precessão e que seja mais eficiente e rápido que o método clássico já protocolizado nesta esfera.

De todos os experimentos e análises aqui realizados, sempre baseados em métodos e discussões científicos já estabelecidos, pode-se afirmar que o método neste trabalho proposto é viável, eficiente e rápido, podendo ser de extrema utilidade nos casos de maior dificuldade em relação a ossos degradados, na identificação humana.

5. CONCLUSÃO FINAL

Ao final desta pesquisa, e considerando um total de 44 amostras estudadas, verificou-se que o método de extração de DNA por meio de movimento de precessão, quando de sua quantificação, apresentou 25 amostras com maior quantidade de DNA, comparado ao método clássico.

A quantidade de DNA, sem a análise de fragmentos, só demonstra que existe uma quantidade de DNA maior ou menor, mas não oferece elementos, ainda, para constatação de um DNA degradado ou não.

Um DNA degradado pode inviabilizar a análise e a conclusão segura de um resultado, portanto, faz-se necessária a análise de fragmentos, que é outro processo, com outros tipos de reagentes, equipamentos e automação.

Assim, o processo continuou com a análise de fragmentos através do Sequenciador ABI3130 Genetic Analyzer, de fabricação de Applied Biosystems®.

Da análise de fragmentos das amostras, através do método com movimento de precessão, foi constatado resultado conclusivo em 10 amostras, segundo os parâmetros estabelecidos anteriormente, enquanto todas as 44 amostras apresentaram resultados inconclusivos por meio do método clássico.

Ainda, a velocidade de extração por meio do método clássico exige de 2 a 24 horas de incubação para extração do DNA do tecido; ao passo que, o método com movimento de precessão necessita de 1,5 minutos para que a amostra tenha o DNA extraído e esteja pronta para purificação.

Logo, o método de extração com movimento de precessão é mais eficiente que o método clássico, tanto na quantidade e qualidade do DNA extraído, quanto na velocidade de execução de seu processamento.

É, ainda, viável sua utilização, na rotina dos laboratórios de Genética Molecular Forense, na extração de ossos em decomposição nos casos de identificação humana.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Marcos Elias; PASQUALI, Luiz. **Histórico dos processos de identificação.** (Apostila). Disponível em: <http://www.institutodeidentificacao.pr.gov.br/arquivos/File/forum/historico_processos.pdf>. Acesso em: 5 maio 2013.

AZYME. Disponível em: <http://www.azyme.fr/_prod/gammes/bertin/precellys.html> Acesso em: 7 out. 2013.

BAUBLIENÉ, Jurgita; DAUGNORA, Linas; MICEIKIENÉ, Ilona. Evaluation of the DNA extraction method from ancient animal bones. **Ekologija**, n. 1, p. 8-11, 2003.

BEIGUELMAN, B. A. **Interpretação genética da variabilidade humana.** Ribeirão Preto: SBG, 2008.

BESSETTI, Joseph. An introduction to PCR inhibitors. **Profiles in DNA**, v. 10, n. 1, p. 9-10, 2007.

BRASIL. Lei nº 10.406, de 10 de janeiro de 2002. Institui o Código Civil. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2002/L10406.htm>. Acesso em: 3 abr. 2013.

BUTLER, John Marshall. **Forensic DNA typing** – biology, technology and genetic of STR markers. Elsevier Academic Press: New York, 2005.

BUTLER, John Marshall. **Forensic DNA typing: biology and technology behind STR markers.** 2. ed. Portland: Academic Press: New York, 2005.

CAMPOS, P. F. et. al. DNA in ancient bone - Where is it located and how should we extract it? **Ann Anat.** 2011.

CHAMBERS, Geoffrey K.; MACAVOY, Elizabeth S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, New Zealand, v. 126, p. 455-476, aug. 2000.

COOPER, Alan. Reply to stoneking: ancient DNA: how do you really know when you have it? **The American Journal of Human Genetics**, n. 60, p. 1001-1002, 1997.

DAUGMAN, J. **Recognising persons by their iris patterns.** IET Meeting: Paris, 2007.

FRANÇA, G. V. **Fundamentos de Medicina Legal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

GALANTE FILHO, H. et al. **Identificação Humana.** Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1999.

GARCIA. **Introdução ao estudo dos ossos, osteogênese e esqueleto**. Disponível em: < <http://www.anato.ufrj.br/material/GarciaOsteologia1.pdf>>. Acesso em: 05 set. 2013.

GARRIDO, Rodrigo Grazinoli. Evolução dos processos de identificação humana: das características antropométricas ao DNA. **Genética na Escola**. Disponível em: <<http://geneticanaescola.com.br/wp-home/wp-content/uploads/2012/10/Genetica-na-Escola-42-Artigo-08.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2013.

GARRIDO, R. G.; GIOVANELLI, A. Criminalística – origem, evolução e descaminhos. **Cadernos de Ciências Sociais Aplicadas**, Vitória da Conquista, v. 5/6, p. 43-60, 2009. Disponível: <http://periodicos.uesb.br/index.php/cadernosdeciencias/article/viewFile/850/856>. Acesso em: 10 jan. 2013.

GOODWIN, William; LINACRE, Adrian; HADI, Sibte. **An introduction to forensic genetics**. Wiltshire: John Wiley & Sons, 2007.

GRAW Matthias; WEISSER, Hans-Joachim; LUTZ, Sabine. DNA typing of human remains found in damp environments. **Forensic science international**, v. 113, p. 91-95, 2000.

HERCULES, H. C. **Medicina legal**: texto e atlas. São Paulo: Atheneu, 2005.

HOLLAND, Mitchell M. et al. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. **Croatian Medical Journal: Forensic Sciences**, v. 44, n. 3, p. 264-272, 2003.

HUMMEL, Susanne. **Ancient DNA typing**: methods, strategies and applications. Berlin: Springer-Verlag, 2003.

IWAMURA, Edna Sadayo Miazato; SOARES-VIEIRA, José Arnaldo; MUÑOZ, Daniel Romero. Human identification and analysis of DNA in bones. **Rev. Hosp. Clin**, São Paulo, vol. 59, n. 6, 2004.

JORDÃO, Nathalie de Queiroz, SANTIAGO, Adriana Paula de Andrade da Costa e Silva; MONTENEGRO, João Batista. Identificação de corpos carbonizados no IML-PE. **Derecho y Cambio Social**, Peru, v. 3, 2011. Disponível em: < http://www.derechoycambiosocial.com/revista031/IDENTIFICA%C3%87%C3%83O_DE_CORPOS_CARBOINIZADOS.pdf>.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KLUGLIAK, L.; NICKERSON D. Variation is the spice of life. **Nature Genetics**, v. 27, p. 234-236, mar. 2001.

LIFE TECHNOLOGIES. Disponível em: <<http://www.lifetechnologies.com/search/global/searchAction.action?query=7500+real+time+pcr+system&resultPage=1&resultsPerPage=15&autocomplete=true>> Acesso em: 10 out. 2013.

MAROTA, Isolina; ROLLO, Franco. Molecular paleontology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 59, p. 97-111, 2002.

MISNER, L. M. et al., The correlation between skeletal weathering and DNA quality and quantity. *J Forensic Sci*, v. 54, n. 4, p. 822-8, 2009.

MOVIMENTO DE PRECESSÃO. Disponível em: <[http://www.infopedia.pt/\\$movimento-de-precessao](http://www.infopedia.pt/$movimento-de-precessao)>. Acesso em: 3 jun. 2013.

MÜLLER, K. et al. **Extraction and analysis of lipids and proteins from accessory sex glands.** Disponível em: <http://www.precellys.com/resources/fichiers/precellys/posters/poster_extraction_and_analysis_of_lipids_and_proteins_from_accessory_sex_glands.pdf>. Acesso em: 17 out. 2013.

OLIVEIRA, Rogério Nogueira et al. **Contribuição da odontologia legal a identificação post-mortem.** Disponível em: <http://www.malthus.com.br/artigos_print.asp?thus=s&id=71>. Acesso em: 10 maio 2013.

O'ROURKE, Dennis H.; HAYES, M. Geoffrey; CARLYLE, Shawn W. Ancient DNA studies in physical anthropology. *Annual Reviews Anthropology*, v. 29, p. 217-242, 2000.

PRECESSÃO. Disponível em: <[http:// astro.if.ufrgs.br/fordif/node8.dtm](http://astro.if.ufrgs.br/fordif/node8.dtm)> Acesso em: 10 jul 2013.

PINHEIRO, Maria de Fátima. Genética e biologia forense, e criminalística. In: FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO. **Noções gerais sobre outras ciências forenses medicina legal.** Porto, 2004. (Apostila).

PRECELLYS. Disponível em: <http://www.precellys.com/resources/fichiers/precellys/posters/poster_extraction_and_analysis_of_lipids_and_proteins_from_accessory_sex_glands.pdf>. Acesso em: 17 out. 2013.

SALAMON, Michal et al. Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *PNAS*, v. 102, n. 39, p.13783-13788, 2005.

SAMUELS, Julie E.; ASPLEN, Christopher (orgs.). **The future of forensic DNA testing:** predictions of the research and development working group. Washington: NIJ, 2000.

SHUTLER, Gary. An overview of historical developments in forensic DNA analysis. In: COYLE, Heather Miller (ed.). **Forensic Botany:** principles and applications to criminal casework. New York: CRC Press, 2004.

SOLER, Mirella Rerruccio. **Estudo Histopatológico e Viabilidade de Análise do DNA em Ossadas Humanas Expostas a condições Tafonômicas**: aplicações na identificação forense. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina - Programa de Pós-graduação em Patologia, São Paulo, 2012.

SWGDM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). Disponível em: < <http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/swgdam.pdf>> Acesso em> 3 abr. 2014.

TARCIA, Rodrigo Dias. O Movimento de Precessão da Terra. **Revista Brasileira de Ensino da Física**, v. 21, n. 4, 1998.

TRUEMAN, C. N.; MARTILL, D. M. The long-term survival of bone: The role of bioerosion. **Archaeometry**, Washington, v. 44, n. 3, p. 371-382, 2002.

USER MANUAL Precellys 24& Precellys 24-Dua. Disponível em: <<http://www.precellys.com/precellys-24.aspx>> Acesso em: 2 nov. 2013.

UTFPR PPGEB	MARIA CHRISTINA MARINI	2014
----------------	------------------------	------

UTFPR PPGEB	COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDO ÓSSEO - MÉTODO ORGÂNICO COM DIGESTÃO PELA PROTEINASE K E MÉTODO COM MOVIMENTO DE PRECESSÃO - UTILIZANDO COMO PARÂMETROS A EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DE STRs AUTOSSÔMICOS	2014
----------------	--	------