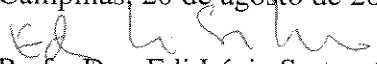


WELBE OLIVEIRA BRAGANÇA

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da
Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP,
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, área de Ciências Biomédicas do aluno

Welbe Oliveira Bragança

Campinas, 20 de agosto de 2002.

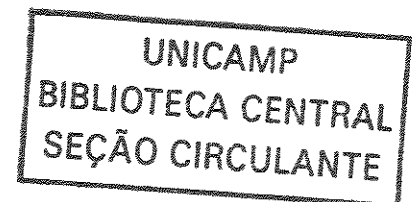

Prof. Dra. Edi Lúcia Sartorato
Orientadora

**INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE E
IDENTIFICAÇÃO HUMANA
UMA PROPOSTA METODOLÓGICA**

200305902

CAMPINAS

2002



i

UNICAMP
BIBLIOTECA

WELBE OLIVEIRA BRAGANÇA

***INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE E
IDENTIFICAÇÃO HUMANA
UMA PROPOSTA METODOLÓGICA***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. EDI LUCIA SARTORATO

CAMPINAS

2002

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Edi Lúcia Sartorato

Membros:

1. Profa. Dra. Marta Fonseca Martins

2. Prof. Dr. Roberto Mauro Gil de Lima

3. Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/08/2002

A **Deus**, o autor da dupla hélice, de toda a sua fascinante complexidade, e das leis que regem a evolução que a tem transformado; obrigado pela oportunidade de conhecer um pouco mais da sua criação.

Aos meus queridos Pais **Emídio** e **Eni**, por todo o apoio, amor e abnegação que tornaram minha vida e estudos possíveis.

À minha querida esposa **Adriana** que de maneira singular apoiou todo o trabalho digitando, corrigindo, acompanhando, e por tantas vezes ouvindo, sem reclamar, a frase: “tenho que trabalhar na tese”.

Aos eternos amigos **Hamilton** e **Fabio**. É impossível relatar todo o tempo gasto, nem mesmo listar toda a ajuda empregada por vocês para que esse trabalho chegasse ao fim. Certamente vocês merecem o nome em todas as publicações!

Ao amigo **Fernando Leite** por todo o apoio e orientação em como agir e sobressair nas situações de crise.

Ao amigo **Elias Drumond** por todo o trabalho de tradução especialmente o capítulo 5!

Aos amigos **Eliézer**, por todo o socorro nos computadores que sempre travaram em momentos cruciais, SEMPRE! **Heloísa**, pela revisão de português; **Terezinha** pela revisão técnica; **Alexandre (Dízima)** pelo apoio científico; **Cátia Lopes** por toda a cobertura; **Franchesco**, **Roberto** e **Marta** pela pré e banca; e a todos que de alguma forma contribuíram neste trabalho, minha gratidão.

Ao **CBMEG – Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética**, e a todos os seus integrantes, em especial à querida **Madalena (Madá)**, por toda a contribuição em minha formação desde a graduação e por toda a amizade.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro aos meus trabalhos desde a iniciação científica até o primeiro trabalho do mestrado.

À **EXACTGENE** representados por **José Marcos Santana** e **Maria Amélia** pelo suporte financeiro neste trabalho.

À **Dra Cristiane do Nascimento** da Universidade Federal da Bahia e **Dra Kátia Torres de Souza** do laboratório Biocodis de Belo Horizonte e **Dr. Gismar** por toda a contribuição nas análises de STR por PCR.

À **Dra Edi Lúcia Sartorato** pelos 7 anos de orientação desde o trabalho de iniciação científica com “Infertilidade” até o primeiro trabalho de mestrado com deficiência auditiva, e pela contribuição no desenvolvimento desta tese e em minha formação como pesquisador.

“Pedi uma vez a um grande biólogo que me explicasse a famosa espiral dupla que diferencia um ser de outro. Ele disse que era a prova da existência de Deus, porque comandava todo o organismo como se fosse uma molécula inteligente, era engenhosamente arquitetada, perfeita em seu funcionamento e como uma marca divina, nunca poderia ser apagada”.

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xxvii</i>
ABSTRACT	<i>xxxix</i>
INTRODUÇÃO	35
Conceitos Genéticos Básicos.....	37
Organização do Genoma Humano.....	39
Investigação de Paternidade e Identificação Humana – Histórico.....	41
Identificação Usando Tipos Sanguíneos.....	41
Exame de Tipagem pelo DNA.....	45
Seqüências Repetitivas.....	46
OBJETIVOS	51
MATERIAL E MÉTODOS	55
Casuística.....	57
Amostras.....	57
Estratégias de análise.....	57
Material e Métodos.....	58
Protocolos Desenvolvidos ou Testados e Adaptados.....	58
Coleta, Armazenamento e Transporte das Amostras.....	58
Coleta de Sangue em Tubos com EDTA.....	58
Coleta e Armazenamento em Papel FTA.....	60
Coleta de Células Bucais.....	62
Métodos de Extração.....	63

Extração de DNA - fenol (padrão).....	63
Extração de DNA a partir de amostras de sangue não coagulado.....	65
Extração de DNA a partir de amostras de cabelo.....	66
Extração de DNA a partir de amostras de selo ou envelopes.....	67
Extração de DNA a partir de amostras de escova de dentes (cerdas).....	68
Extração de DNA a partir de amostras coletadas de barbeadores.....	69
Extração de DNA a partir de amostras de sangue coagulado.....	70
Extração do papel FTA para manchas de sangue ou saliva.....	71
Protocolo para extração a partir de swab bucal.....	72
Isolamento do DNA a partir de manchas de fluidos corpóreos.....	73
Isolamento do DNA a partir de fluidos corpóreos.....	74
Extração e separação de DNA de células espermáticas e células vaginais.....	75
Extração de DNA a partir de filtros de cigarro.....	76
Extração de DNA a partir de amostras de osso.....	77
Procedimento alternativo para extração de DNA de osso.....	78
Extração de DNA a partir de amostras de sangue coagulado.....	79
Extração de DNA a partir de amostras de dente.....	80
Extração de DNA a partir de amostras de dentes (fenol).....	80
Extração de DNA a partir de amostras de dentes (alternativo).....	81
Extração Chelex de DNA a partir de sangue ou manchas de sangue.....	82
Extração Chelex de DNA a partir de manchas contendo sêmen.....	83
Extração Chelex de DNA a partir de saliva de swabs oral, papel de filtro ou gaze.....	84

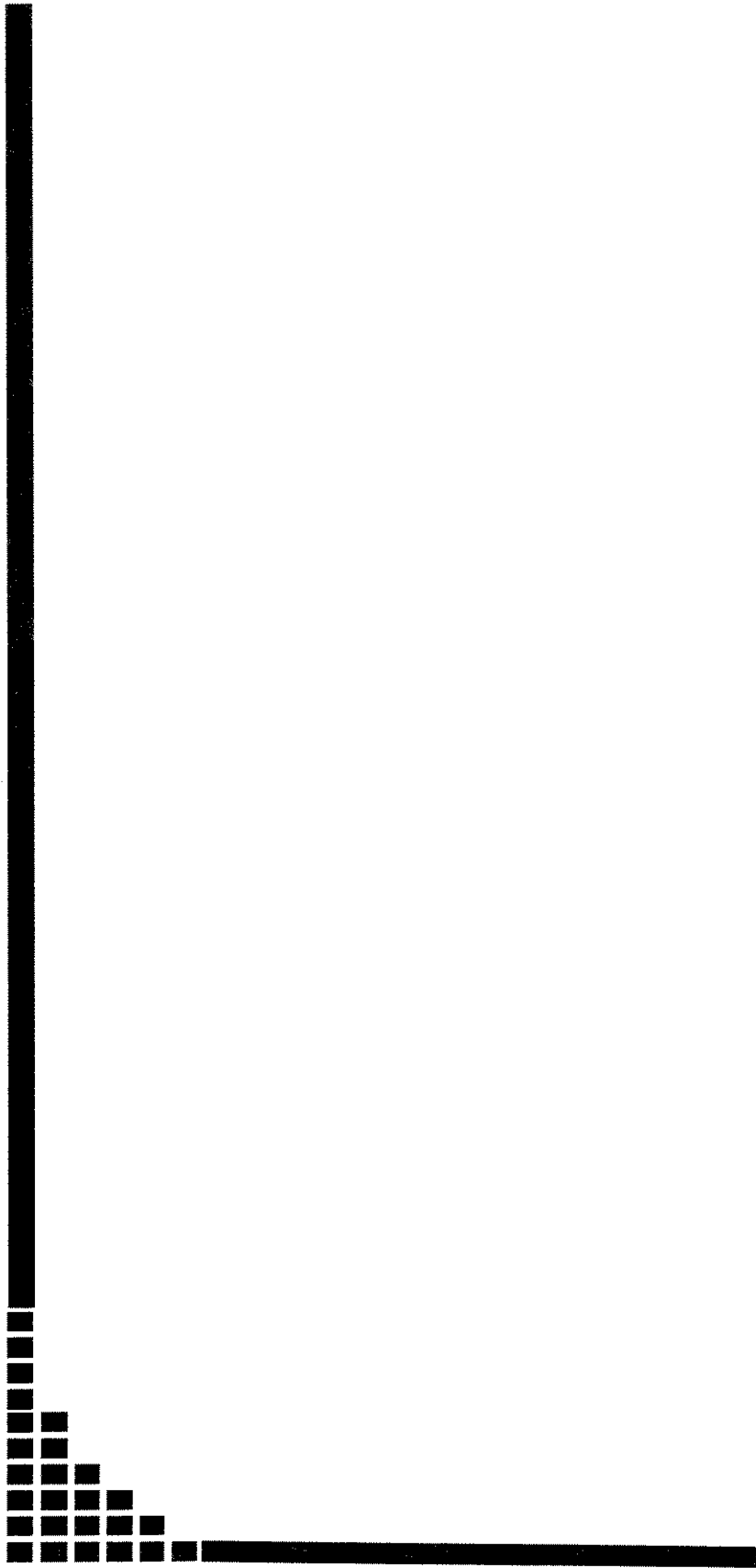
Extração Chelex de DNA a partir de bordas de envelopes e selos.....	85
Extração Chelex de DNA a partir de filtros de cigarro.....	86
Extração inorgânica de DNA a partir de sangue – método da dessalinização.....	87
Protocolos de tipagem de DNA para identificação humana e paternidade.....	88
Tipagem de DNA pelo método de RFLP.....	88
PCR de Loci de STR.....	94
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
Coleta, Armazenamento e Transporte das Amostras.....	99
Coleta de Sangue em Tubos com EDTA.....	99
Coleta e Armazenamento em Papel FTA.....	100
Coleta de Células Bucais.....	102
Discussão sobre a Coleta, Armazenamento e Transporte das Amostras....	102
Métodos de Extração.....	105
Extração de DNA - fenol (padrão).....	107
Extração de DNA a partir de amostras de sangue líquido (kits comerciais).....	108
Extração de DNA a partir de amostras de cabelo.....	109
Extração de DNA a partir de amostras de selo e/ou envelopes.....	110
Extração de DNA a partir de amostras de escova de dentes (cerdas).....	110
Extração de DNA a partir de amostras coletadas de barbeadores.....	
Extração de DNA a partir de amostras de sangue coagulado.....	110
Extração do papel FTA para manchas de sangue ou saliva.....	112
Protocolo para extração a partir de swab bucal.....	113
Isolamento do DNA a partir de manchas de fluidos corpóreos.....	114

Isolamento do DNA a partir de fluidos corpóreos.....	114
Extração e separação de DNA de células espermáticas e células vaginais.....	114
Extração de DNA a partir de filtros de cigarro.....	116
Extração de DNA a partir de amostras de osso.....	117
Procedimento alternativo para extração de DNA do osso.....	117
Extração de DNA a partir de amostras de sangue coagulado.....	118
Extração de DNA a partir de amostras de dente.....	118
Extração de DNA a partir de amostras de dentes (feno).....	120
Extração de DNA a partir de amostras de dentes (alternativo).....	120
Extração Chelex de DNA a partir de sangue ou manchas de sangue.....	120
Extração Chelex de DNA a partir de manchas contendo sêmen.....	121
Extração Chelex de DNA a partir de saliva de Swab oral, papel de filtro ou gaze, bordas de envelopes e selos e filtros de cigarro.....	122
Extração inorgânica de DNA a partir de sangue – método da dessalinização.....	122
Protocolos de tipagem de DNA para identificação humana e paternidade.....	122
Tipagem de DNA pelo método de RFLP.....	122
Quantificação do DNA.....	126
CONCLUSÃO.....	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
ANEXOS.....	139

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1: Características de Loci de VNTR comumente usados e compatíveis com HaeIII.....	93
Tabela 2: Métodos de extração de DNA para diferentes tecidos biológicos e indicação do método de tipagem ideal para cada tipo de DNA extraído.....	106
Tabela 3: Ordem de preferência para se escolher o dente para a tentativa de extração.....	119
Tabela 4: Avaliação do DNA extraído quanto ao método de tipagem.....	132

		<i>PÁG.</i>
Figura 1:	Envelope de segurança para coleta de amostras.....	59
Figura 2:	Envelope de segurança e papel FTA para coleta de sangue.....	61
Figura 3:	1) swab com cerdas para coleta de amostras vaginais; 2) swab tipo cotonete para coleta de células bucais.....	62
Figura 4:	Amostra de osso humano utilizada para os testes de extração.....	77
Figura 5:	Amostra de papel com manchas de sangue utilizadas nos testes de extração.....	82
Figura 6:	Dimensões do papel 3MM para RFLP.....	90
Figura 7:	Cuba com ponte salina para RFLP.....	90
Figura 8:	Corte na membrana ao desmontar o transfer.....	91
Figura 9:	RFLP de DNA extraído de sangue colhido em tubos com EDTA e em papel FTA, demonstrando que as amostras coletadas com FTA (amostra F) mantém o mesmo padrão das amostras coletadas com EDTA. M – Marcador. !, 2, 3 – Amostras de 3 indivíduos diferentes coletados com EDTA.....	103
Figura 10:	PCR de DNA extraído de células da mucosa bucal. 1-Lader. 2- Produto de PCR controle.....	104
Figura 11:	RFLP de DNA extraído de amostras de sangue de 3 indivíduos diferentes.....	109
Figura 12:	RFLP de DNA extraído de amostras de sangue coagulado de 3 indivíduos diferentes.....	111

Figura 13:	RFLP de DNA extraído de sangue colhido em tubos com EDTA de 3 indivíduos diferente (1, 2, 3) e a comparação com a mistura das amostras dos indivíduos 2 e 3 (F) de DNA extraído de papel FTA. M – marcador.....	113
Figura 14:	PCR de DNA extraído de células de mucosa bucal. M – Marcador. 1 – Produto de PCR.....	113
Figura 15:	Produto de amplificação de DNA extraído de células espermáticas e células vaginais comparadas com amostra de suposto estuprador.....	116
Figura 16:	Amostras amplificadas de DNA extraído de amostra de fêmur: 1 osso 2 – Repetição da extração.....	117
Figura 17:	Local de onde é retirada a amostra de DNA, preservada pela proteção do envoltório do dente.....	119
Figura 18:	Amostras amplificadas de DNA extraído de mancha de sangue em papel (3); as amostras 1 e 2 correspondem a repetições de extração de DNA de osso. M – Marcador.....	121
Figura 19:	Resultados de uma tipagem completa de dois <i>loci</i> , D4S139 e D5S110 feitas pelo método de RFLP. M – Mãe; C – Filho; AP – Suposto Pai.....	126



RESUMO

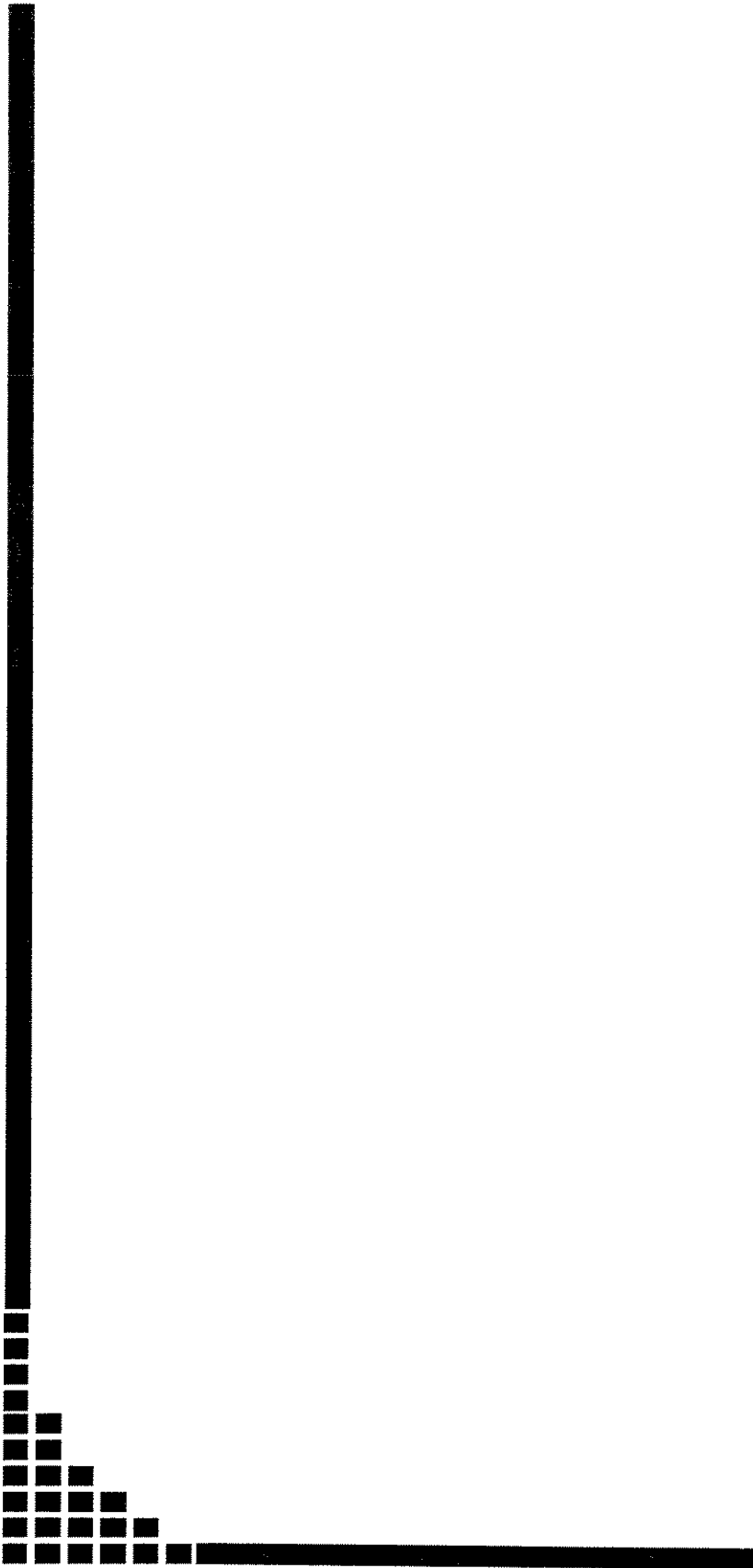
Mendel, pelo pioneirismo em oito anos de pesquisa com cruzamentos de ervilhas, é considerado o pai da Genética, porém, quando foi eleito abade, em 1868, encerrou precocemente sua carreira. Seus excepcionais manuscritos permaneceram esquecidos por mais de 30 anos. Quando William Sutton e Theodor Boveri estabeleceram a localização dos genes nos cromossomos, as conclusões póstumas de Mendel receberam a devida relevância científica (HAUSMANN, 2000), derrubando conceitos arcaicos, os quais preconizavam que a transmissão hereditária se dava pela mistura de humores, mais precisamente pelo sangue (MIYAJIMA, 2001).

A análise do DNA revolucionou o campo da Biologia da identificação. A necessidade de pequenas quantidades de tecido, a estabilidade do DNA e o alto grau de precisão das análises químicas contribuíram para a evolução da tipagem do DNA. O uso das análises do DNA está alterando rapidamente a maneira como a tipagem genética é conduzida em casos de paternidade, estupro e homicídios, na avaliação de desastres em massa, no estudo de caça, reprodução e população de animais, nas análises médicas e na disputa de patentes (Budowle, 2000).

Para serem efetivas, as técnicas desenvolvidas por laboratórios especializados devem ser padronizadas para serem prontamente usadas. A quantidade e a qualidade limitada das amostras biológicas forenses exigem que os métodos de tipagem do DNA sejam sensíveis. Os protocolos tendem a ser poupados de passos desnecessários e otimizados. O tempo e os custos devem ser reduzidos, e a confiabilidade e sensibilidade maximizadas (Budowle, 2000).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver, otimizar procedimentos e correlacionar técnicas encontradas na literatura que puderam ser adaptadas e se mostraram úteis para tipar amostras referenciais, estando em boas condições para os testes de paternidade, bem como amostras achadas nas cenas dos crimes que foram expostas ao meio ambiente. Devido à demanda por técnicas de análise confiáveis, as práticas e os procedimentos usados nos estudos forenses podem guiar os cientistas em outras disciplinas no desenvolvimento e emprego de metodologias válidas e confiáveis. Buscamos também nesse trabalho, avaliar e comparar os diferentes métodos para verificação de paternidade e sua validade para cada tipo de material biológico estudado, propondo uma metodologia padrão para testes de

paternidade em cada tipo específico de tecido, avaliando os diferentes métodos de extração de DNA propostos na literatura, procurando adaptá-los e otimizá-los, além de desenvolver novos métodos, fornecendo importantes ferramentas para a crescente área científica da biologia forense.



ABSTRACT

Mendel, for his pioneer work in eight years of research with crossings of peas, is considered the father of Genetic, however, when elected abbot, in 1868, he contained his early career. His exceptional manuscripts were forgotten for more than 30 years. When William Sutton and Theodor Boveri established the location of the genes in the chromosomes, the posthumous conclusions of Mendel received the due scientific relevance, overthrowing archaic concepts, which extolled that the hereditary transmission occurred for the mixture of humors, more precisely for the blood.

The analysis of DNA revolutionized the field of Biology of identification. The need of small amounts of biological samples, the stability of DNA and the high degree of precision of the chemical analyses contributed to the evolution of the typing of DNA. The use of the analyses of DNA is altering the way quickly as the genetic typing is driven in cases of paternity, rape and homicides, in the evaluation of disasters in mass, in the hunting studies, reproduction and population of animals, in the medical analyses and in the dispute of patents.

To be effective, the techniques developed by specialized laboratories should be standardized to be used. The limited amount and quality of the forensic biological samples demand that the methods of typing of DNA to be sensitive. The protocols tend to be saved of unnecessary steps and optimized. The time and the costs should be reduced, and the reliability and sensibility maximized.

This work had as objective develop, optimize procedures and to correlate techniques found in the literature that could be adapted and were shown useful for typing referential samples, being in good conditions for the tests of paternity, as well as samples found in the scenes of the crimes that were exposed to the environment. Due to the demand for reliable analysis techniques, the practices and the procedures used in the forensic studies can guide the scientists in other disciplines in the development and use of valid and reliable methodologies. We also looked for in this work, to evaluate and to compare the different methods for verification of paternity and its validity for each type of studied biological material, proposing a methodology pattern for tests of paternity in each specific type of fabric, evaluating the different methods of extraction of DNA proposed in the literature,

trying to adapt them and to optimize them, besides developing new methods, supplying important tools for to the growing scientific area of the forensic biology.



INTRODUÇÃO

CONCEITOS GENÉTICOS BÁSICOS

O material genético dos seres humanos (DNA – ácido desoxirribonucléico), presente no núcleo de todas as células nucleadas do organismo, define a constituição genética de cada pessoa e especifica, nos mínimos detalhes, a função a ser realizada por cada uma das células que constituem o organismo. Na constituição genética estão determinadas todas as características do indivíduo, as quais podem ou não se manifestar ao longo de sua vida.

O DNA de uma célula humana apresenta um comprimento total de quase dois metros e, provavelmente, para facilitar sua organização dentro do núcleo de cada célula, é dividido em vários elementos distintos chamados cromossomos. Existem 46 cromossomos na espécie humana, formando 23 pares; destes, 44 são chamados autossomos e dois de cromossomos sexuais, por estarem envolvidos na determinação do sexo. Na mulher, o par sexual é formado por dois cromossomos iguais, os cromossomos X; no homem, esse par é constituído por um cromossomo X e um cromossomo menor, denominado Y. Os dois cromossomos X da mulher e os 44 não sexuais formam, nos dois sexos, pares de homólogos, e provêm um do pai e outro da mãe. No caso de um indivíduo de sexo masculino, o X foi herdado da mãe e o Y, do pai.

Em cada cromossomo existem regiões específicas contendo seqüências de nucleotídeos denominadas *locus*(singular) ou *loci*(plural). Em cada *locus* pode ser encontrado um gene ou uma seqüência de nucleotídeos não codificadora. Posições ou *locus* correspondentes em cromossomos homólogos contêm genes responsáveis pela mesma característica genética, embora muitas vezes as seqüências de bases que os constituem não sejam necessariamente idênticas. Estes genes são considerados genes alelos ou simplesmente alelos. Também são denominados alelos as seqüências não codificadoras que ocupam *loci* correspondentes nos cromossomos homólogos. Quando um indivíduo possui alelos diferentes para um dado *locus*, dizemos que ele é heterozigoto em relação àquela característica genética ou àquele gene em particular. Se tais alelos são idênticos, dizemos que ele é homozigoto (DELGADO, 1998).

Como exemplo, pode-se citar o sistema ABO de grupos sanguíneos. As pessoas podem pertencer ao grupo sanguíneo A, B, AB ou O. Dessa maneira, pode-se observar que, embora apresentem uma estrutura de DNA semelhante, elas podem ter características diferentes, de acordo com a variabilidade das seqüências em seus genes (JOBIM, 1999).

Nos cromossomos homólogos, os alelos presentes em um determinado loco são o genótipo desse loco. O termo genótipo é também utilizado para designar o conjunto de todos os alelos presentes em um conjunto de *loci* de um mesmo indivíduo. A manifestação morfológica ou bioquímica de qualquer genótipo é denominada fenótipo (DELGADO, 1998 e FARAH, 1997).

Como nosso sistema de reprodução é sexuado, a formação de um indivíduo provém da fusão de um gameta feminino (óvulo) com um gameta masculino (espermatozóide). Para manter o número cromossômico da espécie humana, cada um dos gametas deve contribuir com a metade do número de cromossomos presentes nas outras células. Por esta razão, os gametas são células haplóides – isto é, células que possuem somente um cromossomo de cada par de cromossomos homólogos e apresentam apenas um alelo em cada *locus*. Esse *locus* é denominado monomórfico. O conjunto formado pelos alelos de um ou mais *loci*, transferidos a um indivíduo por um de seus pais, é chamado de haplótipo. As outras células do nosso corpo são as chamadas células somáticas, sendo todas elas diplóides por possuírem dois conjuntos dos cromossomos presentes nos gametas (DELGADO, 1998 e FARAH, 1997).

Assim, em cada par cromossômico encontrado em um indivíduo adulto, cada genótipo de cada *locus* é formado por um alelo proveniente da mãe e outro do pai. Constituído desta maneira, o DNA representa todo o material genético que um indivíduo herda de seus pais, sendo por essa razão chamado de material genético ou hereditário da célula (DELGADO, 1998 e FARAH, 1997).

ORGANIZAÇÃO DO GENOMA HUMANO

A palavra genoma é usada para designar o conjunto de genes ou seqüências de nucleotídeos não codificadoras presentes em uma célula, em um indivíduo ou em uma espécie. A informação genética nas células humanas está organizada em dois grandes genomas: mitocondrial e nuclear.

O genoma mitocondrial é constituído por alguns genes extranucleares e tem herança exclusivamente materna. Esse tipo de genoma é, em geral, idêntico, e algumas vezes é usado na identificação de indivíduos – por exemplo, quando somente é possível obter um perfil de DNA da mãe da pessoa que se deseja identificar. Algumas doenças genéticas transmitidas somente pela mãe podem ocorrer devido à mutações nos genes mitocondriais (DELGADO, 1998 e FARAH, 1997).

O genoma nuclear de uma célula humana haplóide contém um total de 3×10^9 pares de bases (pb), que aparecem distribuídos nos 23 cromossomos, sendo que cada cromossomo consiste de uma única molécula de DNA de tamanho variado. Aproximadamente 75% do genoma nuclear é constituído por seqüências de nucleotídeos que não se repetem ou que aparecem poucas vezes no genoma humano, as quais são chamadas de seqüências simples de DNA. O DNA restante é composto de seqüências que se repetem de centenas a milhões de vezes no genoma, compondo o DNA repetido. O total de DNA codificador compõe somente cerca de 3% do genoma humano e é encontrado principalmente entre as seqüências de nucleotídeos que não se repetem na molécula de DNA.

O DNA simples não codificador pode ser encontrado nos genes formando os íntrons, ou como genes que, se supõe, terem sido um dia ativos, mas que perderam sua atividade ao longo da evolução, ou ainda como seqüências dispersas entre os genes (DELGADO, 1998 e FARAH, 1997).

O DNA repetido, que compõe aproximadamente 25% do genoma nuclear, pode ser classificado em DNA codificador, formador das famílias de multigenes, e em DNA não codificador, que compõe o DNA extragênico. Este último tipo de DNA não inclui genes

funcionais, e é composto, em parte, por seqüências que se repetem em *tandem* (ou seja, uma após a outra) e por seqüências dispersas no genoma, que se repetem individualmente. As seqüências que se repetem em *tandem* são classificadas de acordo com o tamanho médio das unidades de repetição. Segundo este critério, podem ser classificadas como DNA satélite, minissatélite ou microssatélite (DELGADO, 1998 e FARAH, 1997).

O termo DNA satélite passou a ser designado para denominar as seqüências repetitivas em *tandem*, uma vez que estas formam frações ou picos diferenciados (satélites) em relação aos do DNA genômico remanescente, quando submetidas à centrifugação de alta densidade com cloreto de cézio (HERMANN e HUMMEL, 1994). Estas seqüências possuem densidades próprias, devido a uma proporção de bases G-C diferente do resto do genoma. (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; LEWIN, 2000).

O DNA satélite é o principal elemento obtido na separação por gradiente de cloreto de cézio, sendo representado por seqüências maiores de unidades de repetições de mais de 100 pb. Um bom exemplo de DNA satélite são as seqüências alfa, caracterizadas por unidades de repetições de 171 pb, que se repetem em *tandem* e encontradas nos centrômeros de todos os cromossomos humanos (THOMPSON, 1993). Outras seqüências de DNA satélite formam blocos de heterocromatina nos braços longos dos cromossomos 1, 9, 16 e Y, sem nenhuma atividade aparente de transcrição (FARAH, 1997).

Nesse trabalho, nosso maior interesse se concentra nas seqüências minissatélites e microssatélites. Através do estudo destas seqüências, algumas áreas da genética como a localização de genes, o diagnóstico de doenças genéticas, a identificação de indivíduos e a determinação do vínculo genético, têm sido beneficiadas enormemente já que torna possível identificar o perfil ou *fingerprinting* molecular de cada indivíduo utilizando uma amostra de qualquer tecido. Esta identificação somente é possível porque, salvo em casos de gêmeos idênticos, não existem dois indivíduos com o mesmo genótipo, e também porque o DNA de um indivíduo é o mesmo em qualquer célula de seu organismo (DELGADO, 1998).

Existem diversas famílias de minissatélites já caracterizadas para a individualização humana, constituindo-se em excelentes marcadores genéticos para RFLP ou ainda para PCR (JOBIM, 1999).

INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE E IDENTIFICAÇÃO HUMANA – HISTÓRICO

A técnica de identificação pelo DNA foi desenvolvida há pouco mais de 10 anos pelo Prof. Alec Jeffreys, que publicou essa descoberta descrevendo certas regiões do genoma humano que apresentavam um padrão único para cada indivíduo, podendo ser utilizadas como “impressões digitais” do DNA desse indivíduo (Jeffreys, 1985a). O estudo dessas regiões, os minissatélites, possibilitavam informações sobre a individualidade humana, iluminando a ciência da investigação de paternidade e da investigação de casos criminais. O estudo do polimorfismo do DNA substituiu, em curto espaço de tempo, as análises sorológicas dos polimorfismos de proteínas e grupos sanguíneos, marcadores genéticos, até então, apenas de importância forense (JOBIM, 1999).

Esses testes analisam regiões da molécula do DNA humano, que permitem a diferenciação de indivíduos, desde que não sejam gêmeos idênticos. Essas regiões ou *loci* podem ser identificadas por intermédio de sondas sintéticas complementares às seqüências de bases dos fragmentos dessa porção de DNA. Existem sondas unilocais que estudam cada *locus* individualmente e sondas multilocais que avaliam muitos *loci* ao mesmo tempo, conhecidas como *impressões digitais* do DNA (Jeffreys, 1985a e JOBIM, 1999).

IDENTIFICAÇÃO USANDO TIPOS SANGUÍNEOS

Em 1900, um médico alemão, Karl Landsteiner, inaugurou a utilização da genética nas ciências forenses, ao descobrir que existiam certas substâncias (antígenos) nos glóbulos vermelhos humanos, que eram transmitidas a seus descendentes. A esse sistema, ele deu o nome de ABO, o que lhe rendeu o prêmio Nobel, em 1930 (HAUSMANN, 1997).

No Brasil, o exame de sangue pelo sistema ABO foi realizado pela primeira vez em 1927, São Paulo (MARTINEZ, 1998). No mesmo ano, Landsteiner e Levine ampliaram o leque de opções dos exames sangüíneos, ao descobrirem outro sistema: o MN (BEIGUELMAN, 1995). Em 1941, Landsteiner e Wiener injetaram hemácias obtidas do sangue de *Macacus rhesus* em coelhos e cobaias e constataram a formação de um soro que aglutinava as hemácias desses animais. Essa substância, responsável pela aglutinação, recebeu o nome de fator Rh. Landsteiner descobria com isso mais um sistema e a possível causa da eritroblastose fetal. Quando a hereditariedade dos tipos sangüíneos foi estabelecida como verdade científica, logo a sua aplicação prática foi reconhecida, pois a análise e determinação dos tipos sangüíneos podiam discriminar com certeza, quem não podia ser o pai da criança. Entretanto, somente na década de 60, isto é, mais de 60 anos após a descoberta original, os grupos sangüíneos foram aceitos como evidência legal nos Estados Unidos (SIMAS FILHO, 1999).

A partir da descoberta dos sistemas ABO, muitos outros sistemas eritrocitários foram paulatinamente se incorporando à literatura científica, tais como: Kell, Duff e Kidd, boa parte deles descobertos pelo próprio Landsteiner, e todos baseados nas proteínas das células vermelhas do sangue, as hemácias. Posteriormente, descobriu-se uma nova diversidade de indicadores genéticos, representados pelos sistemas enzimáticos eritrocitários, ou grupos séricos, presentes na parte líquida do sangue, o soro, sendo as mais utilizadas as determinações de haptoglobinas (Hp) e fosfoglicomutase (PGM) (SIMAS FILHO, 1999).

A descoberta de mais um sistema, o dos antígenos leucocitários, tornou-se um dos principais coadjuvantes para uma maior aceitação dos marcadores genéticos perante os tribunais. (MIYAJIMA, 2001).

De todos os exames científicos, os que gozam de maior credibilidade em suas diversas espécies, são os exames feitos no sangue. As conclusões desse tipo de exame baseiam-se no fato científico de que o tipo sanguíneo de um indivíduo provém dos caracteres existentes no sangue de seus pais. Essas conclusões surgiram porque antes de 1900, pensava-se que a hereditariedade era transmitida pelo sangue e que cada criança recebia uma mistura dos “sangues” dos pais. De tal maneira arraigou-se essa idéia, que

acabou trazendo à linguagem corrente, certas expressões como: “Eles têm o mesmo sangue”; “príncipe de sangue real”; “égua de puro sangue”; “o sangue o revelará”; “são ambos de sangue azul”, entre outras (SIMAS FILHO, 1999).

O estudo pormenorizado da descrição e determinação dos tipos sanguíneos eritrocitários (existentes nas células vermelhas), leucocitários (existentes nas células brancas), e dos grupos séricos (existentes no soro) é feito pela Sorologia. Os glóbulos do sangue além do soro sanguíneo possuem em sua constituição, substâncias transmitidas hereditariamente; além disso, o sangue de um indivíduo é material de fácil coleta, pois, através de um simples exame de sangue, podemos obter enorme quantidade de resultados (SIMAS FILHO, 1999).

Em estudos subseqüentes, verificou-se que na população brasileira o tipo sanguíneo O ocorre em 45% da raça branca, 48% da raça negra e 36% dos amarelos. O Tipo A ocorre em 41% dos brancos e 28% dos negros; o Tipo B, em 10% de brancos, 21% dos negros e 23% dos amarelos; e o tipo AB, em 4% da raça branca, 4% da negra, e 13% da amarela (SIMAS FILHO, 1999).

Outros sistemas foram sendo descobertos, tais como: Sistema MNSs; Sistema P; Sistema Rh; Sistema Lutheran; Sistema Lewis; Sistema KELL/CELLANO; Sistema DUFFY; Sistema KIDD; Sistema DIEGO; Sistema I; Sistema Auberger; Sistema Xg; Sistema Dombrock; Sistema Vel e Yt (a) e outros como os Sistemas Séricos; Sistema Gm; Sistema Gc; Sistema Hp e Sistema Cp. A utilização desses sistemas nos estudos de paternidade permitiram que os resultados desses testes fossem progredindo e melhorando (SIMAS FILHO, 1999). De todos os sistemas sanguíneos descobertos, um dos que mais contribuiu para o estudo da paternidade foi o Sistema de Antígenos Leucocitários, o HLA.

O sistema HLA é constituído por numerosa série de alelos, em quatro *loci* interligados (A – B – C – DR – DP – DQ) localizados no cromossomo 6 do cariótipo humano, compondo uma região denominada de complexo maior de histocompatibilidade humana (MHC) (SIMAS FILHO, 1999).

O número de alelos no sistema HLA, faz dele o sistema genético mais polimórfico dentre todos os descritos anteriormente. Os *loci* são tão polimórficos, que a maioria das pessoas possui oito especificidades detectáveis num *locus*.

Desde 1972, o Sistema HLA era considerado a melhor bateria para exclusões e determinações. Utilizado parcialmente, isto é, com determinação dos haplótipos referentes aos *loci* A e B, confere uma probabilidade de exclusão *a priori*, da ordem de 86%; se, entretanto, forem utilizados os demais *loci* (C – D – DR), o índice de exclusão sobe para 97% se a pessoa investigada não for excluída, a probabilidade relativa de paternidade será de 94% (SIMAS FILHO, 1999).

No entanto, com as novas tecnologias para tipagem do DNA esses exames vêm sendo substituídos quase totalmente pelos laboratórios, pois o exame do DNA tem se tornado padrão para os testes de paternidade e identificação.

Utilizando-se a nova geração de testes em DNA, a possibilidade de encontrar duas pessoas iguais em diversos pontos do material genético analisado é menor do que a população atual do planeta (cerca de 6 bilhões de indivíduos), ficando a única exceção a cargo dos gêmeos univitelinos, que possuem, a princípio, 100% de seu DNA igual (RASKIN, 1998).

Atualmente, nos Estados Unidos, mais de 95% dos testes de paternidade são feitos unicamente pelo DNA. O próprio custo do exame de DNA já é igual ao do exame de HLA em vários laboratórios. O uso do sistema HLA em testes de paternidade incorre em duas limitações: a primeira refere-se ao seu baixo poder de exclusão quando comparado ao exame de DNA. Por exemplo, entre cada 100 homens que estejam sendo falsamente acusados de determinada paternidade, o exame por HLA só poderá inocentar 95. Desse modo, cinco homens permanecerão sendo acusados após o teste por HLA embora nenhum deles seja o pai biológico. O exame de DNA descartaria os 100 homens falsamente acusados. A segunda limitação é que o HLA, nos casos em que este exame não demonstra exclusão de paternidade, não consegue atribuir a paternidade, ou seja, afirmar que aquele indivíduo é o pai biológico, e nenhum outro (RASKIN, 1998).

EXAME DE TIPAGEM PELO DNA

Diferenças de seqüências entre regiões do DNA encontradas nos indivíduos são muito comuns. Por exemplo, se analisarmos as regiões não codificadoras de 10 cromossomos diferentes, para cada 200 bp de uma dessas regiões de DNA de um indivíduo qualquer, será encontrado, em média, um nucleotídeo diferente em relação a outro indivíduo, tomado ao acaso. Estas variações, que consistem, geralmente em uma simples troca de bases, são chamadas polimorfismos de DNA, e se caracterizam pelas diferenças na seqüência de bases resultantes de mutações de ponto, deleções ou inserções casuais, ou ainda na presença de números variáveis de cópias repetidas de um determinado segmento de DNA (repetições consecutivas ou “em tanden”). Chamamos de polimorfismo quando duas ou mais seqüências variantes ocorrem em determinado *locus* de um cromossomo (OTTO, 1998).

Cada um de nós apresenta metade dos cromossomos de origem materna e metade de origem paterna; a segregação dessas estruturas repetitivas segue a lei de Mendel, em que um alelo é de origem materna e outro paterna, para cada *locus*. Os DNAs da mãe e do filho são analisados primeiro. Como o filho herda apenas metade do material genético de sua mãe, a comparação deve mostrar uma igualdade entre mãe e filho para apenas um dos segmentos. Sabendo-se qual alelo da criança veio da mãe, isso, indica automaticamente que o outro alelo da criança, deve ter, obrigatoriamente, vindo do pai biológico. Esse alelo é chamado “alelo paterno obrigatório”, porque o pai biológico é obrigado a ter o mesmo comprimento do DNA naquele ponto (*locus*) específico do material genético (JOBIM, 1999 e RASKIN, 1998).

O DNA do suposto pai é comparado com o alelo paterno obrigatório do filho. Havendo paridade em diversos segmentos do material genético, não restará dúvidas. Se possuir esta semelhança em uma das localizações específicas, o indivíduo será considerado pai biológico em potencial. Se tiver esta semelhança em todas as localizações específicas estudadas, será considerado, com certeza, o pai biológico. Para excluir um indivíduo de ser o pai biológico, é preciso demonstrar que ele não tem o alelo paterno obrigatório em um mínimo de 3 pontos, situados em cromossomos diferentes. Se em pelo menos três das diversas regiões analisadas o alelo paterno obrigatório do filho não coincidir com nenhum dos alelos do suposto pai, este certamente não é o pai biológico.

As aplicações médico-legais do uso da análise do DNA estão voltadas para a investigação da paternidade e maternidade, mesmo após a morte dos envolvidos, desde que se possa reconstruir o padrão genético do falecido através de amostras do DNA dos parentes próximos. A amostra de sangue dos irmãos e/ou pais biológicos do falecido pode facilitar uma identificação tão precisa quanto se o indivíduo estivesse vivo. Pode-se também determinar se existe relação de parentesco entre duas pessoas, quando, por exemplo, irmãos e pais do falecido não estão disponíveis para o exame (JOBIM, 1999 e RASKIN, 1998).

SEQÜÊNCIAS REPETITIVAS

As seqüências de nucleotídeos que se repetem, são denominadas minissatélites e microssatélites. Os minissatélites no DNA são formados por seqüências de vários nucleotídeos, por exemplo: (AATGCGGTACTGAGCC) n , repetidas em números diferentes em cada indivíduo, dando-lhe uma característica única. Um local de minissatélite pode ter muitos alelos em função do número de vezes (n) em que essa estrutura é repetida ao longo do DNA, deixando a população polimórfica em relação ao *locus*. Os loci de minissatélites são conhecidos também como VNTRs (variable number of tandem repeats) ou número variável de repetições consecutivas (JOBIM, 1999 e RASKIN, 1998).

Os *loci* de microssatélites ou STRs (short tandem repeats: Repetições curtas consecutivas), são parecidos com os minissatélites, mas com estrutura repetida menor, como por exemplo (GATACA) n . Os STRs são valiosos no estudo de casos onde há necessidade de análise de ossos, dentes, fios de cabelo, manchas de sangue, entre outros (JOBIM, 1999). Cerca de 40 STRs, dentre os milhares existentes, são utilizados na prática forense.

As sondas unilocais analisam cada *locus* de minissatélites do DNA (VNTRs) individualmente, pelo método de RFLP(restriction fragment length polymorphism) ou polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (JOBIM, 1999).

Para a identificação humana, a tipagem de DNA através da análise por RFLP é aplicada predominantemente para a caracterização de manchas de fluidos corporais encontrados em cenas de crimes, para determinação de paternidade e nos casos de imigração (Budowle, 2000; Jeffreys et. al. 1985b e JOBIM, 1999).

Os *loci* de VNTR são altamente polimórficos e possuem um alto grau de sensibilidade de detecção pela utilização de sondas complementares (Budowle, 2000). Muitos *loci* de VNTR usados para teste de identidade humana exibem mais de 100 tipos em uma população. Os *loci* mais tipados são D1S7, D2S44, D4S139, D5S110, D10S28 e D17S79 (D1S7: D de DNA; 1 de cromossomo número 1; S7 da região do cromossomo onde está a seqüência correspondente).

A reação em cadeia da polimerase, ou PCR (polimerase chain reaction), é uma técnica que permite a amplificação de seqüências-alvo específicas. O PCR é uma estratégia alternativa à tipagem por RFLP para tipagem de DNA forense. A característica preponderante do PCR é a habilidade de obter quantias relativamente grandes de seqüências específicas de DNA de quantidades relativamente pequenas (picogramas ou nanogramas) de DNA genômico. Os *loci de STR* podem ser estudados pela técnica de PCR.

Quando uma análise química exige a mais alta qualidade do DNA, o método escolhido para a extração do DNA é o método orgânico (Budowle, 2000). Através de extrações orgânicas as evidências de casos de estupros, como swabs vaginais e roupas manchadas, na maioria das vezes podem fornecer DNA suficiente para a elucidação dos perfis individuais dos contribuidores, permitindo a solução de tais casos. Células epiteliais da parte interna da bochecha (células bucais) também têm sido usadas como fonte de DNA para investigações.

A quantidade do DNA é estimada tipicamente por espectrofotometria ou por análises em gel de agarose corado com brometo de etídio. Outro método simples para a quantificação do DNA genômico, especificamente humano, foi desenvolvido com base em "slot blot", uma técnica também baseada na hibridização com sondas de DNA (Budowle, 2000).

A análise por RFLP foi o primeiro método de tipagem de DNA usado no teste de identificação humana, gerando fragmentos de restrição endonucleica de DNA de diferentes tamanhos. A técnica RFLP engloba: (a) extração do DNA; (b) digestão do DNA em pequenos fragmentos, utilizando uma endonuclease de restrição específica; (c) separação eletroforética dos fragmentos, baseada no tamanho, em gel de agarose; (d) desnaturação de fragmentos de DNA fita dupla em um ambiente de alto pH; (e) transferência de moléculas fita simples do gel, por uma ação capilar, em uma membrana suporte; (f) hibridização de fragmentos de DNA imobilizados com sondas de DNA especificamente marcadas; e (g) detecção dos produtos híbridos por auto-radiografia ou quimiluminescência (Budowle, 2000).

Originalmente, a análise por RFLP era usada especificamente para detectar a presença ou ausência de pequenas seqüências de DNA chamadas sítios de restrição. Uma enzima de restrição reconhece estas seqüências curtas através do DNA fita dupla e corta o DNA onde quer que o sítio específico resida. Por exemplo, a enzima de restrição *HaeIII* reconhece e corta o DNA na seqüência GGCC. Desta forma, o DNA de um indivíduo é cortado em muitos fragmentos. Devido às diferenças de seqüências, os indivíduos podem apresentar fragmentos de restrição de tamanhos diferentes, que podem ser usados para comparação (Budowle, 2000).

A maior parte do DNA humano presente nas células está nos 46 cromossomos, dentro do núcleo. Fora do núcleo, no citoplasma, estão as mitocôndrias, que são organelas celulares que contém um genoma extra-cromossômico separado e distinto do genoma nuclear. O DNA mitocondrial humano (mtDNA) difere do DNA nuclear pelas seguintes características: (a) ele existe como um genoma circular, e não linear; (b) o genoma mtDNA é menor, consistindo de aproximadamente 16.5 kb; (c) é mais compacto, contendo seqüências codificantes apenas para 2 RNAs ribossômicos, 22 RNAs transportadores, 13 proteínas, e uma região não codificante, com comprimento de aproximadamente 1100 bp, chamada D-loop (displacement loop ou região controle); (d) todo o mtDNA é herdado da mãe; (e) o mtDNA não sofre recombinação; (f) está presente com um alto número de cópias em uma célula. Diferentemente do DNA nuclear, o mtDNA é herdado da mãe. Excetuando mutações, a seqüência de mtDNA é idêntica nos irmãos e em todos os seus parentes

maternos. Esta característica pode ser útil em questões forenses, como no caso de restos mortais de uma pessoa desaparecida, onde parentes maternos conhecidos podem fornecer amostras de referência para comparação direta com o tipo de mtDNA questionado (Budowle, 2000).

Atualmente, a maneira mais efetiva de resolver diferenças de alelos de VNTR e STR é por eletroforese. A eletroforese é considerada a pedra angular na tipagem de variantes de DNA (Budowle, 2000).

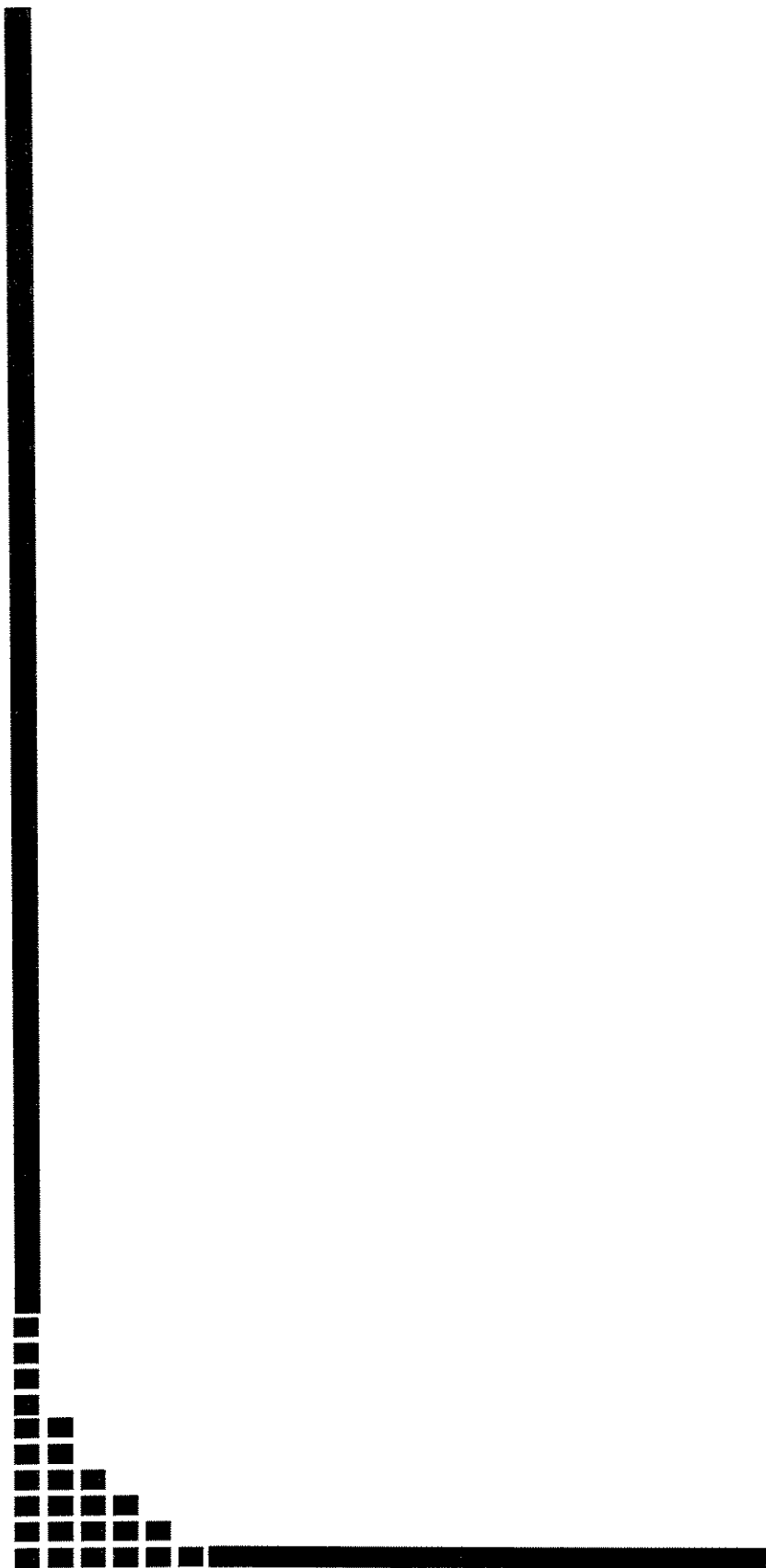
O DNA genômico não parecia ser uma fonte provável de caracterização individual ou identificação, pois a maioria das regiões codificantes do DNA entre os humanos são similares. Entretanto, a análise desses polimorfismos genéticos existentes no genoma humano descritos acima, que não codificam proteínas e são altamente polimórficos, pode ser considerado o maior avanço na ciência da identificação humana, revolucionando não só o meio científico mas também toda a sociedade, trazendo certezas onde antes só existiam evidências. O estudo exaustivo desses fatores é extremamente importante para o progresso dessa nova área, que tem se tornado parte do cotidiano da população. Dessa forma, este trabalho procurou avaliar, adaptar e desenvolver métodos de extração de DNA, otimizados para identificação humana e investigação de paternidade, bem como diferentes métodos de análise de seqüências repetitivas (mini e microssatélites) que permitem a identificação humana e a investigação de paternidade, propondo uma metodologia padrão e ideal para cada tipo de material a ser analisado. Também teve como objetivo a diminuição dos custos e do tempo de execução dos exames.



OBJETIVOS

Avaliação, adaptação e desenvolvimento de métodos de extração de DNA otimizados para a identificação humana e investigação de paternidade.

- Avaliação, adaptação, desenvolvimento e otimização de diferentes métodos de análise de seqüências repetitivas (mini e microssatélites) para a identificação humana e investigação de paternidade, propondo uma metodologia padrão e ideal para cada tipo de material a ser analisado.
- Otimização de processos objetivando a diminuição dos custos do exame para a investigação de paternidade.
- Otimização de processos objetivando a diminuição do tempo de execução do exame de paternidade.



***MATERIAL E
MÉTODOS***

CASUÍSTICA

Amostras

As amostras de DNA utilizadas foram selecionadas de indivíduos atendidos no Laboratório de Genética Molecular – Exactgene.

Os indivíduos que se submeteram aos testes foram instruídos quanto ao conteúdo da pesquisa, e assinaram termo de consentimento pós-informação. Todos os indivíduos tiveram a garantia de que suas identidades seriam mantidas em sigilo absoluto. Foi utilizado o DNA de 400 indivíduos não associados geneticamente por vínculo familiar, para os estudos em RFLP e em PCR.

Estratégias de análise

As extrações do DNA para a avaliação das técnicas de RFLP e PCR foram feitas seguindo-se os protocolos-padrão adotados pelo laboratório Exactgene. Todos os testes de novos protocolos e de materiais diferentes de sangue foram primeiramente realizados em amostras-teste até que fossem validados, antes de serem utilizados nos exames.

Foram feitos vários testes utilizando-se os diversos protocolos de extração e tipagem disponíveis na literatura, para avaliar a partir de quais seria possível obter o DNA nas condições necessárias para se realizar o exame de acordo com cada metodologia (RFLP ou PCR). Esses protocolos foram modificados conforme a necessidade de cada método, afim de se obter os melhores resultados nos exames em relação ao tempo e à qualidade dos resultados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram padronizados e adaptados novos protocolos para extração de diferentes materiais biológicos não disponíveis ainda na literatura.

Concluídos os testes de extração, realizou-se um estudo dos materiais em cada método de tipagem, RFLP e PCR, propondo-se uma metodologia-padrão para cada tipo de material.

Foram avaliados diferentes métodos de extração de DNA; alguns foram desenvolvidos. Os protocolos estão descritos abaixo e a qualidade da amostra de DNA obtida foi avaliada para se determinar qual método de tipagem seria o mais indicado para aquele protocolo de extração. Ainda foram propostos protocolos para a tipagem de DNA por RFLP (VNTR) e por PCR (STR). O preparo e armazenamento de amostras referenciais são parte importante de um processo analítico e por isso foram propostos protocolos referenciais de coleta e armazenamento de diversos materiais biológicos.

PROTOCOLOS DESENVOLVIDOS OU TESTADOS E ADAPTADOS:

Coleta, armazenamento e transporte das amostras

Coleta de Sangue em tubos com EDTA

Protocolo:

A coleta foi feita na seguinte ordem: Suposto Pai, Mãe e Filho(a).

Todo material foi devidamente identificado com o código do exame que corresponde a um número aleatório seguido das identificações: Mãe, Suposto Pai e Filho(a).

Tanto a caixa como o envelope de segurança contendo três tubos vacuette em cada um foram abertos em ambiente adequadamente limpo.

Coletou-se 5mL de sangue de todos os indivíduos, colocando-se cerca de 2,5mL no tubo que acompanhou a caixa e 2,5mL no tubo correspondente que acompanhou o envelope (contraprova).

Os tubos foram guardados na caixa e num envelope lacrado, coletando-se as assinaturas dos envolvidos e do responsável do laboratório (figura 1)

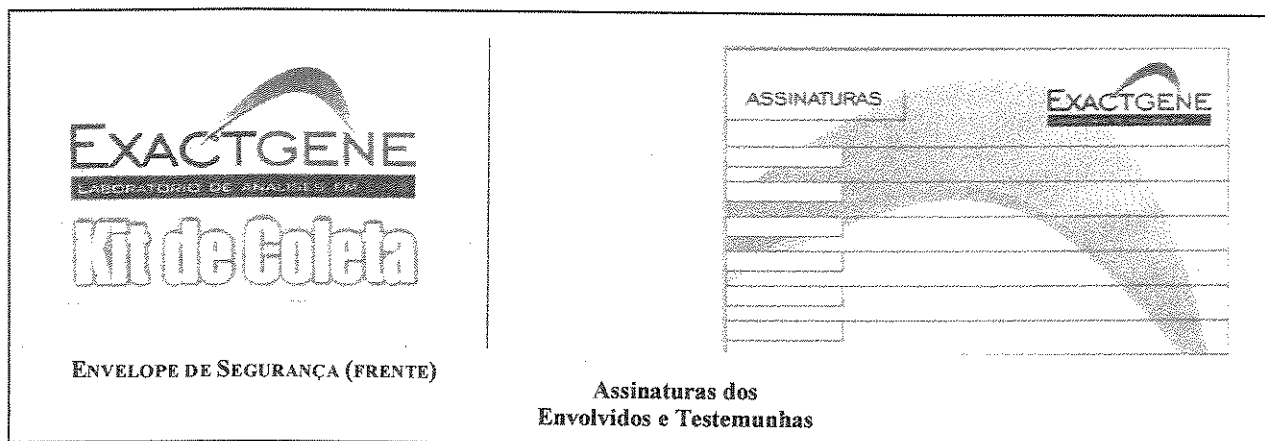


Figura 1 – Envelope de segurança para coleta de amostras

Coleta e armazenamento em papel FTA

Protocolo:

Para cada caso de investigação de paternidade foi utilizada uma caixa com três tubos vacuette e um envelope de segurança com três cartões FTA. Todo material foi devidamente identificado com o código do exame e com as identificações Mãe, Suposto Pai e Filho.

A coleta foi previamente agendada para que todos os envolvidos estivessem presentes em conjunto com suas testemunhas.

Foram utilizadas luvas e seringas descartáveis, evitando-se contato da mão desprotegida na parte interna do cartão FTA.

A caixa contendo os três tubos vacuette e o envelope de segurança com os três cartões FTA foi aberta em ambiente adequadamente limpo.

Coletou-se 5mL de sangue de cada indivíduo, sendo 4,5mL colocados no tubo. Com o sangue residual na seringa, pingaram-se algumas gotas na área circular do cartão FTA(figura 2).

Os cartões foram deixados para secar à temperatura ambiente.

Nos cartões FTA existem três linhas na parte inferior (vide figura 2), onde foram colhidas as assinaturas dos envolvidos na seguinte ordem:

- ✓ Cartão do Filho – Na primeira linha escreveu-se, em letra de forma, o nome da criança a ser analisada. Após a coleta do sangue da criança, a mãe assinou na segunda linha e o Suposto Pai na terceira.
- ✓ Cartão do Suposto Pai – Escreveu-se o nome do suposto pai na primeira linha, em letra de forma. O pai assinou na segunda linha e a mãe na terceira linha.
- ✓ Cartão da Mãe – Escreveu-se o nome da mãe na primeira linha, em letra de forma. A mãe assinou na segunda linha e o suposto pai na terceira.

Os tubos foram guardados na caixa e os três cartões foram fechados e colocados no envelope de segurança, lacrado a seguir.

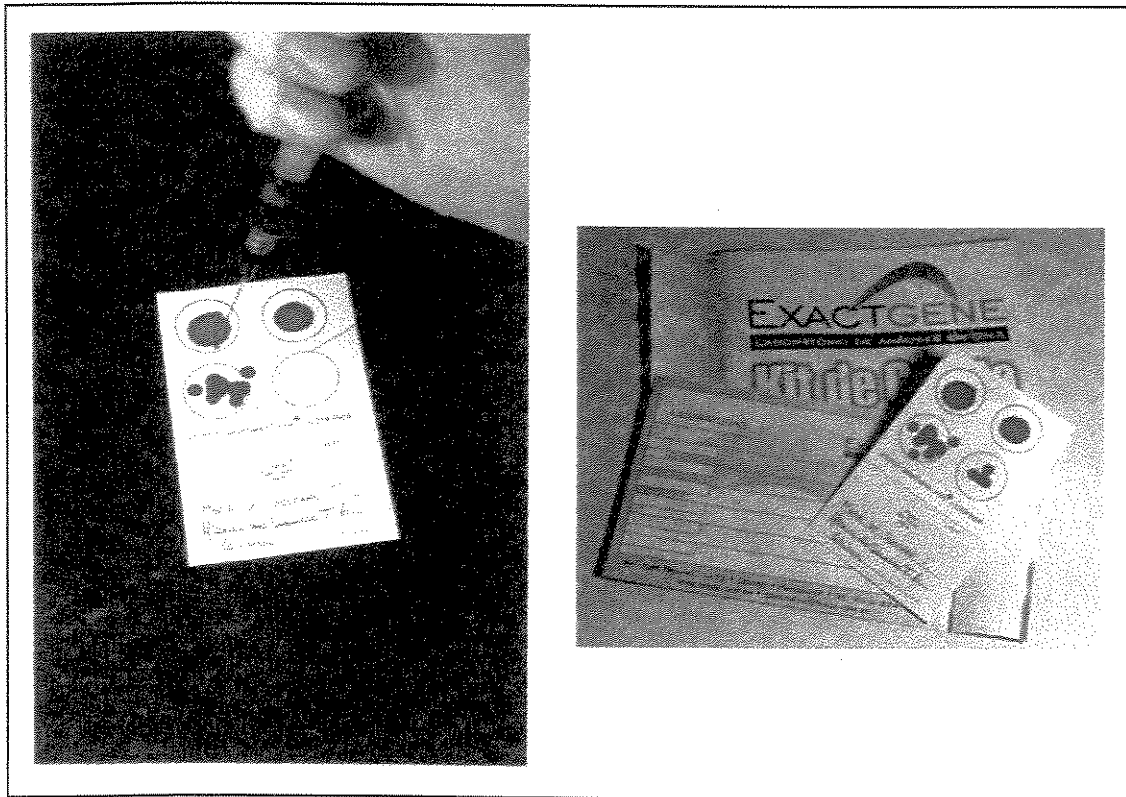


Figura 2 – Envelope de segurança e papel FTA para coleta de sangue

Coleta de células bucais

Protocolo:

Para cada caso de investigação de paternidade, utilizou-se dois envelopes plásticos, contendo três tubos e três swabs (cotonetes) cada. Antes da coleta, enxaguou-se a boca com água. Cada indivíduo escovou a parte interna das bochechas com um dos swabs.

Em seguida o swab foi guardado no tubo correspondente, contendo solução tampão fosfato ou EDTA. A haste do swab foi quebrada, deixando-se apenas a ponta com algodão dentro do tubo. Fechou-se a tampa do tubo e agitou-se um pouco para misturar a solução, que ficou turva por alguns segundos (figura 3).

Esse mesmo procedimento então foi repetido com o segundo e terceiro tubos.

Após a coleta, os tubos foram fechados e guardados novamente em seus envelopes.

Para as coletas feitas à distância foram enviadas as fichas, as fotocópias dos documentos e os envelopes contendo as amostras (à temperatura ambiente) para o laboratório. As amostras das coletas feitas no próprio laboratório foram armazenadas em geladeira.

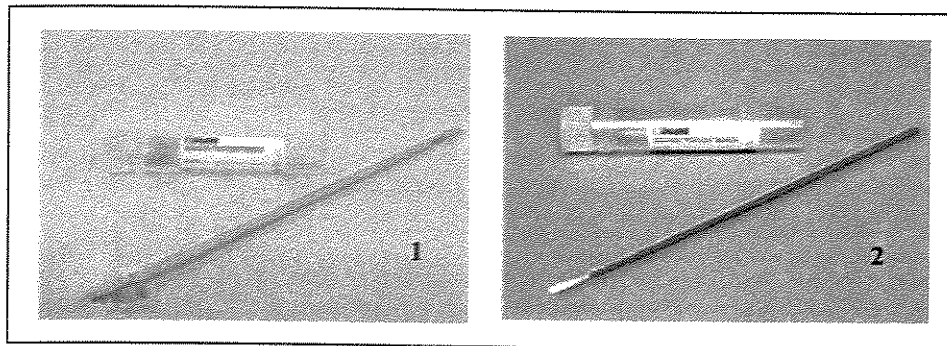


Figura 3 – 1) swab com cerdas para coleta de amostras vaginais;
2) swab tipo cotonete para coleta de células bucais.

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO:

Extração de DNA - fenol (padrão).

A extração do DNA Genômico foi feita a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15mL de sangue periférico, coletado com 1mL de EDTA 10%.

Protocolo:

Coletou-se de 10 a 15mL de sangue periférico em EDTA 10%, ao qual adicionou-se 35mL de solução A para promover a lise das hemácias. A mistura foi homogenizada e mantida em gelo por 30 minutos. A seguir, centrifugou-se a mistura a 2500rpm por 20 minutos, a 4°C. Ressuspendeu-se o “pellet” (aglomerado de células e restos celulares formado com o processo de centrifugação) em 20mL da solução A. Após agitação por inversão, centrifugou-se novamente o tubo a 2500rpm por 15 minutos em temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi desprezado.

Esta etapa foi repetida quantas vezes foram necessárias para que o “pellet” ficasse limpo (livre dos restos de hemácias lisadas).

Ressuspendeu-se o “pellet” limpo em 1mL de solução B e 250µl de solução C. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C, durante a noite.

Após a incubação, acrescentou-se à amostra a mesma proporção (volume:volume) de fenol (70% Phenol/Water/Chloroform), pois este permite a remoção de peptídeos e proteínas de soluções aquosas. Após homogeneização por inversão lenta dos tubos, centrifugou-se a 2500rpm por 20 minutos em TA. O sobrenadante foi coletado num novo tubo, descartando-se o precipitado. Esta etapa de extração com fenol foi repetida mais uma vez.

A partir do sobrenadante colhido, precipitou-se o DNA, adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 3M em pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto, invertendo-se o tubo lentamente. O DNA foi coletado com o auxílio de um bastão e em seguida, lavado com etanol 70% para a retirada do excesso de sal.

Para ressuspender o DNA, dependendo do volume, foram utilizados cerca de 200 a 500µl de solução tampão Tris-EDTA (ou TE) 1x.

Manteve-se os tubos à temperatura ambiente durante toda a noite para que o DNA entrasse em solução.

A concentração final de DNA foi estimada, por leitura de absorção óptica, a 260nm em espectrofotômetro.

A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% após eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA (ou TBE), 1x. e intercalação do DNA com brometo de etídio para a visualização em transluminador sob luz ultravioleta.

EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE NÃO COAGULADO (KITS COMERCIAIS)

Extração de DNA Genômico a partir dos Kits GENTRA e WIZARD

Protocolo:

Os tubos de extração foram preparados, e o número das famílias anotado em cada tubo.

Foi adicionado em cada tubo 300µl de sangue e 900µl de RBC Lysis Solution. Incubou-se por 30 minutos em temperatura ambiente.

Centrifugou-se por 4 minutos, a 14000rpm. O sobrenadante foi removido com uma pipeta, deixando de 10 a 20µl de líquido residual.

Adicionou-se em cada tubo 300µl de “Cell Lysis Solution”. Agitou-se o tubo vigorosamente para ressuspender as células, mexendo o fundo do tubo com uma ponteira. Incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 100µl de “Protein Precipitation Solution”. Agitou-se em vortex, vigorosamente, por mais de 1 minuto. Centrifugou-se por 4 minutos, a 14000rpm.

O sobrenadante contendo o DNA foi despejado para dentro de um novo tubo contendo 300µl de isopropanol 100%(Merck). Agitou-se, observando a ppt de DNA, centrifugou-se por 2 minutos, a 14000rpm, desprezando-se o sobrenadante, e lavou-se o DNA com 300µl de etanol 70%. A seguir, centrifugou-se por 2 minutos, a 14000rpm, descartando-se o sobrenadante com muito cuidado. Deixou-se secar, ressuspendeu-se o DNA em 100µl de DNA Hidratation Solution, e esperou-se entrar em solução.

Extração de DNA a partir de amostras de cabelo

Protocolo:

A amostra capilar ficou presa por um fórceps, lavado totalmente em etanol 100%. Após a lavagem no etanol, foi feita uma lavagem total em água deionizada e esterilizada. Secou-se à temperatura ambiente. Colocou-se no mínimo 20 fios de cabelo, 1cm da raiz do cabelo, em um tubo de microcentrifuga de 2.2mL.

Foi adicionado 400µl de TE e 10 µl de proteinase K, agitou-se em vortex por alguns segundos e centrifugou-se por 5 segundos para que todo o material ficasse submerso dentro da solução de extração. Incubou-se a 56°C durante a noite.

Adicionou-se 500µl de PCIA (em capela de fluxo laminar), agitando-se em vortex por pelo menos 30 segundos. Centrifugou-se o tubo a 14.000rpm por 2 minutos.

Formou-se uma fase líquida na parte superior do tubo. Transferiu-se a porção superior para outro tubo (1.5mL), removendo-se o sobrenadante. Descartou-se o primeiro tubo.

Acrescentou-se 1mL de Etanol absoluto gelado. Agitou-se o tubo levemente com a mão, e colocou-se no freezer (-20°C) por no mínimo 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, descartou-se o álcool e lavou-se o pellet com etanol 70%. A seguir, centrifugou-se novamente por 5 minutos. Descartou-se o álcool e removeu-se o máximo possível de álcool excedente com uma micropipeta. O tubo foi deixado virado para baixo por pelo menos 1 hora, para secar o restante de álcool. Adicionou-se 36µl de TE e incubou-se por pelo menos 2 horas, a 56°C, em banho-maria.

Extração de DNA a partir de amostras de selo e/ou envelopes (saliva impregnada no selo ou na borda de envelopes)

Protocolo:

Cuidadosamente, abriu-se a borda do envelope ou removeu-se o selo usando vapor e um fórceps limpo. Usando um swab de algodão esterilizado, umedecido em água deionizada esterilizada, esfregou-se a borda do envelope ou do selo. O swab de algodão foi cortado da haste e transferido o algodão para um tubo de microcentrifuga de 2.2 mL. Picotou-se toda a amostra dentro do tubo, sempre com escalpe estéril. Acrescentou-se 400µl de TE e 10 µl de proteinase K. Agitou-se em vortex por alguns segundos e centrifugou-se por 5 segundos para que todo o material ficasse submerso dentro da solução de extração. Incubou-se a 56°C durante a noite.

Adicionou-se 500µl de PCIA (em capela de fluxo laminar) e agitou-se em vortex por pelo menos 30 segundos. Centrifugou-se o tubo a 14.000 rpm por 2 minutos.

Formou-se uma fase líquida na parte superior do tubo, que foi transferida para outro tubo (1.5mL), removendo-se o sobrenadante. Descartou-se o primeiro tubo. Acrescentou-se 1mL de Etanol absoluto gelado. Agitou-se o tubo levemente com a mão colocando-o em freezer (-20°C) por no mínimo 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, descartou-se o álcool e lavou-se o pellet com etanol 70%. Centrifugou-se novamente por 5 minutos. Descartou-se o álcool, removendo o máximo possível do excedente com uma micropipeta. Deixou-se o tubo virado para baixo por pelo menos 1 hora, para secar o álcool restante. Adicionou-se 36µl de TE e incubou-se por pelo menos 2 horas, a 56°C, em banho-maria.

Extração de DNA a partir de amostras de escova de dentes (cerdas)

Protocolo:

Utilizando um escalpe estéril, cortou-se cuidadosamente pequenos pedaços das cerdas (cerca de 0.5cm das pontas das cerdas de toda a escova) da escova de dente dentro de um tubo de microcentrífuga de 2.2 mL, até que toda a amostra ficasse dentro do tubo. Adicionou-se 400µl de TE e 10 µl de proteinase K. Agitou-se em vortex por alguns segundos e centrifugou-se por 5 segundos para que todo o material ficasse submerso na solução de extração. Incubou-se a 56°C durante a noite.

Acrescentou-se 500µl de PCIA(Fenol clorofórmio e álcool isoamílico), em capela de fluxo laminar, e agitou-se em vortex por pelo menos 30 segundos. O tubo foi centrifugado a 14.000rpm por 2 minutos.

Formou-se uma fase líquida na parte superior do tubo. A porção superior foi transferida para outro tubo (1.5mL), removendo-se o sobrenadante e descartando-se o primeiro tubo. Adicionou-se 1mL de Etanol absoluto gelado. Agitou-se o tubo levemente com a mão, colocando-se em geladeira (-20°C) por no mínimo 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, descartou-se o álcool e lavou-se o pellet com etanol 70%. Centrifugou-se novamente por 5 minutos. Descartou-se o álcool, removendo o máximo possível do excedente com uma micropipeta. O tubo foi deixado virado para baixo por pelo menos 1 hora, para secar o restante de álcool. Adicionou-se 36µl de TE e incubou-se por pelo menos 2 horas, a 56°C, em banho-maria.

Extração de DNA a partir de amostras coletadas de barbeadores

Protocolo:

Utilizando cuidadosamente um escalpe estéril, raspou-se toda a quantidade de amostra disponível nas lâminas do barbeador dentro de um tubo de microcentrífuga de 2.2 mL. Adicionou-se 400µl de TE e 10 µl de proteinase K. vortex por alguns segundos e centrifugou-se por 5 segundos, para que todo o material ficasse submerso na solução de extração. Incubou-se a 56°C durante a noite.

Acrescentou-se 500µl de PCIA (em capela de fluxo laminar) e agitou-se em vortex por pelo menos 30 segundos. Centrifugou-se o tubo a 14.000rpm por 2 minutos.

Formou-se uma fase líquida na parte superior do tubo. Transferiu-se a porção superior para outro tubo (1.5mL), removendo-se o sobrenadante. Descartou-se o primeiro tubo. Adicionou-se 1mL de Etanol absoluto gelado. Agitou-se o tubo levemente com a mão e colocou-se em geladeira (-20°C) por no mínimo 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, descartou-se o álcool e lavou-se o pellet com etanol 70%. Centrifugou-se novamente por 5 minutos. Descartou-se o álcool. Removeu-se o máximo possível do álcool excedente com uma micropipeta. O tubo foi deixado virado para baixo por pelo menos 1 hora, para secar o álcool restante. Adicionou-se 36µl de TE e incubou-se por pelo menos 2 horas a 56°C, em banho-maria.

Extração de DNA a partir de amostras de sangue coagulado (kit comercial – GENTRA ou WIZARD)

Protocolo:

Os tubos de extração foram preparados, anotando-se o número das famílias em cada tubo. Adicionou-se em cada deles um volume de sangue coagulado correspondente a um intervalo de 300µl a 500µl de sangue líquido, e 900µl de RBC Lysis Solution. Agitou-se com intensidade no vortex. Incubou-se por 1 hora em temperatura ambiente. Durante a incubação, a cada 10 minutos, aproximadamente, agitou-se intensamente no vortex. Centrifugou-se por 4 minutos. a 14000rpm. Removeu-se o sobrenadante líquido com uma pipeta, deixando-se os “grumos de sangue” no tubo. Acrescentou-se, em cada tudo, 300µl de “Cell Lysis Solution”. O tubo foi agitado vigorosamente para ressuspender as células, mexendo-se a solução com uma ponteira. Colocou-se 5µl de proteinase. Incubou-se durante a noite a 37°C. Adicionou-se 100µl de “Protein Precipitation Solution”. Agitou-se em vortex vigorosamente por mais de 1 minuto ou até que se formassem “grumos” escuros. Centrifugou-se por 4 minutos. a 14000rpm. A precipitação produziu um *pellet* marrom escuro e compacto. Despejou-se o sobrenadante contendo o DNA dentro de um novo tubo contendo 300µl de isopropanol Merck 100%. Agitou-se observando a ppt de DNA. Centrifugou-se por 2 minutos. a 14000rpm. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se o DNA com 300µl de etanol 70%. Centrifugou-se por 2 minutos. a 14000rpm, descartando-se o sobrenadante com muito cuidado. Deixou-se secar. Ressuspendeu-se o DNA em 100µl de “Hidratation DNA Solution”, esperando entrar em solução (aproximadamente 4h ou durante a noite a temperatura ambiente).

Foi preparado MIX para digestão:

Em cada tubo foi adicionado:

1. 50 unidades de enzima de restrição (*HaeIII*);
2. 15µl de Reaction Buffer 10X;
3. 6µl de espermidina.

Adicionou-se a quantidade de DNA. Completou-se para 150µl de água Milli-Q. Incubou-se a 37°C durante a noite. No dia seguinte, centrifugou-se por 3s (spin). A solução contendo o DNA digerido foi guardada na geladeira.

Extração do papel FTA para manchas de sangue ou saliva

Protocolo:

As cestinhas foram colocadas dentro dos tubos de extração (*spinease*), anotando-se o número das famílias na tampa de cada tubo. As amostras de cartão FTA foram cortadas em pequenos pedaços de aproximadamente 2mm² e colocadas em cada tubo até o meio da cestinha, vedando-se o fundo da cestinha com *parafilm*. Acrescentou-se em cada tubo 700µl de “FTA purification reagent”, deixando-o por aproximadamente 30 minutos. O *parafilm* do fundo da cestinha foi retirado e descartado; a cestinha foi mantida dentro do tubo, e centrifugou-se por 4 minutos a 2500rpm. O líquido depositado no tubo coletor foi descartado; repetiu-se o procedimento a partir da adição de 700µl de “FTA purification reagent”, até que o papel ficasse limpo. Vedou-se novamente o fundo da cestinha do *spinease* com *parafilm*; adicionou-se 600µl de FTA purification reagent. e 10µl de proteinase K; incubou-se em banho-maria por 1 hora, a 60°C; centrifugou-se por 4 minutos a 2500rpm. Foram preparados novos tubos de extração *spinease* (como no primeiro item do protocolo). O papel (após o tratamento com proteinase K) foi transferido com uma pinça para o conjunto *spinease* preparado anteriormente, lavado com 700µl de TE e centrifugado por 3 minutos. a 2500rpm. O procedimento de lavagem foi repetido por mais 2 vezes.

Preparou-se o MIX para digestão:

Por tubo:

1. 50 unidades de enzima de restrição (*HaeIII*);
2. 15µl de Reaction Buffer 10X;
3. 6µl de espermidina 0,5M;
4. Completou-se o volume para 50µl com água *Milli-Q*.

Incubou-se em banho-maria a 37°C *durante a noite*;

No dia seguinte centrifugou-se por 3 minutos. a 14000rpm. A cestinha com papel foi descartada e a solução contendo o DNA digerido (no tubo coletor) foi guardada na geladeira (4°).

Protocolo para extração a partir de swab bucal.

Protocolo:

Para a lavagem da boca, tomou-se um copo de água fazendo-se em seguida o bochecho. Esfregou-se o cotonete ou escovinha de coleta durante 1 minuto, nas bochechas. A haste do cotonete foi cortada, deixando a parte de algodão ou papel de filtro cair dentro do tubo, com 1 mL de TE ou PBS. Colocou-se 600µl NaOH 50mM, agitou-se em vortex com baixa *velocidade* por 5 minutos. Incubou-se a 95°C por 5 minutos. O swab foi retirado com uma pinça. Agitou-se em vortex em baixa *velocidade* por 3 minutos. Neutralizou-se com 60µl de TrisHCl pH8,0. Agitou-se em vortex em baixa *velocidade* por 2 minutos. Aliqüotou-se 50 µl da solução para a amplificação. A amostra foi armazenada à temperatura de -20°C.

Isolamento do DNA a partir de manchas de fluidos corpóreos tais como líquido amniótico e urina.

Protocolo:

O tecido ou material onde se encontra a mancha foi cortado em pequenos pedaços. Com um escalpe estéril, picotou-se todo o material dentro de um tubo de 1.5mL. Adicionou-se 400µl de TE e 10 µl de proteinase K. Agitou-se em vortex por alguns segundos e centrifugou-se por 5 segundos para que todo o material ficasse submerso dentro da solução de extração. Incubou-se a 56°C durante a noite. Adicionou-se 500µl de PCIA (em capela de fluxo laminar) e agitou-se em vortex por pelo menos 30 segundos. Centrifugou-se o tubo a 14.000rpm por 2 minutos. Formou-se uma fase líquida na parte superior do tubo, que foi transferida para outro tubo (1.5mL). Removeu-se o sobrenadante. Descartou-se o primeiro tubo. Adicionou-se 1mL de etanol absoluto gelado. O tubo foi agitado levemente com a mão e colocado em geladeira (-20°C) por no mínimo 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, descartou-se o álcool e lavou-se o *pellet* com etanol 70%. Centrifugou-se por 5 minutos, descartando-se o álcool. Removeu-se o máximo possível do álcool excedente com uma micropipeta. O tubo foi virado para baixo por pelo menos 1 hora para secar o álcool restante. Adicionou-se 36µl de TE e incubou-se por pelo menos 2 horas a 56°C em banho-maria.

Isolamento do DNA a partir de fluidos corpóreos tais como líquido amniótico e urina.

Protocolo:

Em um tubo de 2.2mL adicionou-se 300µl de urina, líquido amniótico ou outro fluido corpóreo. Adicionou-se 10 µl de proteinase K. Agitou-se em vortex. Incubou-se a 56°C durante a noite. Adicionou-se 500µl de PCIA (em capela de fluxo laminar) e agitou-se em vortex por pelo menos 30 segundos. Centrifugou-se o tubo a 14.000rpm por 2 minutos. Formou-se uma fase líquida na parte superior do tubo, que foi transferida para outro tubo (1.5mL). removeu-se o sobrenadante. Descartou-se o primeiro tubo. Adicionou-se 1mL de Etanol absoluto gelado. O tubo foi agitado, levemente, com a mão e colocado em geladeira (-20°C) por no mínimo 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, descartou-se o álcool e lavou-se o *pellet* com etanol 70%. Centrifugou-se por 5 minutos, descartando-se o álcool. Removeu-se o máximo possível do álcool excedente com uma micropipeta. O tubo foi deixado virado para baixo por pelo menos 1 hora para secar o álcool restante. Adicionou-se 36µl de TE e incubou-se por pelo menos 2 horas a 56°C em banho-maria.

Extração e separação de DNA de células espermáticas e células vaginais.

Protocolo:

O material contendo sêmen (tecido, swab ou outro) foi colocado em um tubo de 1.5mL. Adicionou-se 400µl de TNE (Tris/EDTA/NaCl), 25µl de sarcosil 20%, 75µl de água e 5µl de proteinase K(20mg/mL). Agitou-se em vortex e incubou-se a 37°C por 2 horas. Centrifugou-se por 5 minutos. Removeu-se o sobrenadante, e colocou-se em outro tubo de 1.5mL. Essa é a porção correspondente ao DNA de células não espermáticas (predominantemente células femininas). Cuidadosamente, retirou-se os restos de tecido ou outro material de dentro do tubo. Formou-se um *pellet* no fundo do tubo. Adicionou-se ao *pellet* 150µl de TNE, 50µl de sarcosil 20%, 40µl de DTT(ditiotreitol) 0.39M, 150µl de água e 10µl de proteinase K. Gentilmente, agitou-se o tubo e incubou-se a 37°C por 2h. Acrescentou-se 500µl de PCIA aos 2 tubos. Agitou-se em vortex por 20s ou até que a solução estivesse esbranquiçada. Centrifugou-se a 14.000rpm, por 2 minutos. Cuidadosamente, retirou-se a primeira camada, que foi colocada em um novo tubo de 1.5mL, correspondendo à porção de DNA extraído. Descartou-se o tubo com PCIA. Adicionou-se 1mL de Etanol absoluto gelado ao novo tubo com o DNA extraído. Agitou-se com a mão, colocando-se o tubo a -20°C por 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, descartou-se o álcool e lavou-se o *pellet* em 1mL de etanol 70%. (temp. ambiente). Centrifugou-se por 5 minutos e descartou-se o álcool com uma micropipeta. Deixou-se o álcool secar com os tubos virados para baixo. Ressuspendeu-se o DNA em 36µl de TE a 56°C por pelo menos 2h.

Extração de DNA a partir de filtros de cigarro

Protocolo:

Coletou-se uma porção do filtro e/ou papel da ponta do cigarro região que esteve em contato com a boca. Cortou-se em partes menores e colocou-se em um tubo de microcentrífuga de 2.2 mL. Os tecidos foram armazenados a -20°C até serem usados. Colocou-se uma porção do tecido em uma superfície limpa. Removeu-se uma parte de tecido com aproximadamente 1 cm^2 . Cortou-se o tecido em pequenos pedaços que foram colocados em um tubo de microcentrífuga com 2.2 ou 1.5 mL. Adicionou-se $400\mu\text{l}$ de TE e $10\mu\text{l}$ de proteinase K. Agitou-se em vortex por alguns segundos, centrifugando-se por 5 segundos para que todo o material ficasse submerso dentro da solução de extração. Incubou-se a 56°C durante a noite. Adicionou-se $500\mu\text{l}$ de PCIA (em capela de fluxo laminar) e agitou-se em vortex por pelo menos 30 segundos. O tubo foi centrifugado a 14.000rpm por 2 minutos. Formou-se uma fase líquida na parte superior do tubo, que foi transferida para outro tubo (1.5mL). Removeu-se o sobrenadante, descartando-se o primeiro tubo. Adicionou-se 1mL de Etanol absoluto gelado. O tubo foi agitado levemente com a mão e colocado em geladeira (-20°C) por no mínimo 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, descartou-se o álcool e lavou-se o pellet com etanol 70%. Centrifugou-se por 5 minutos e descartou-se o álcool. Removeu-se o máximo possível de álcool excedente com uma micropipeta. O tubo foi deixado virado para baixo por pelo menos 1 hora para secar o álcool restante. Adicionou-se $36\mu\text{l}$ de TE e incubou-se por pelo menos 2 horas a 56°C em banho-maria.

Extração de DNA a partir de amostras de osso

Protocolo:

Foi retirada (figura 4) uma pequena amostra de osso (2 a 5 cm³) e macerada em um almofariz com nitrogênio líquido. Colocou-se a amostra já triturada em um tubo de 1.5mL. Adicionou-se 600µl de solução B e 10µl de proteinase K (20mg/mL). Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C, durante a noite. Purificou-se a amostra adicionando fenol para a remoção de peptídeos e proteínas. Acrescentou-se às amostras a mesma proporção (volume:volume) de fenol. Homogeneizou-se por inversão lenta dos tubos. Centrifugou-se a 2500rpm por 20 minutos em TA. O sobrenadante foi coletado num novo tubo, descartando-se o precipitado. Repetiu-se mais uma vez essa etapa, com o fenol. Precipitou-se adicionando 0,1 volume de acetato de sódio 3M em pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto. Os tubos foram invertidos lentamente. Com o auxílio de um bastão, coletou-se o DNA e em seguida, lavou-se com etanol 70% para a retirada do excesso de sal. Ressuspendeu-se em 20 a 50µl de solução tampão Tris-EDTA (ou TE) 1x. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante a noite, para que o DNA entrasse em solução.

A concentração final de DNA foi estimada, por leitura de absorção óptica, a 260nm em espectrofotômetro. A integridade foi verificada em gel de agarose 0,8% após eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA (ou TBE), 1x e intercalação do DNA com brometo de etídio para a visualização em transluminador sob luz ultravioleta.

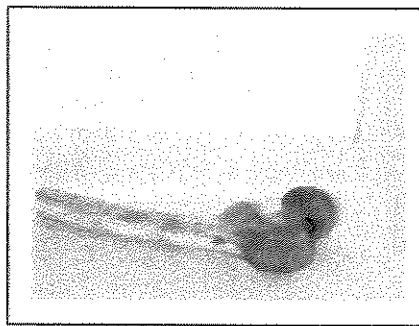


Figura 4 - Amostra de osso humano utilizada para os testes de extração.

Procedimento alternativo para extração de DNA de osso

Protocolo:

Cortou-se cerca de 5g de osso em pequenos pedaços, que foram triturados em nitrogênio líquido. Adicionou-se 40mL de EDTA 0.5M pH 7.5 para descalcificação. O tubo foi agitado suavemente por 24h a 4°C. Centrifugou-se por 15 minutos, a aproximadamente 5.000rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se mais 40mL de EDTA. Repetiu-se esse processo diariamente por um período de 3 a 5 dias. Adicionou-se 40mL de água destilada e deionizada estéril, agitou-se e centrifugou-se por 15 minutos, a 5.000rpm. Repetiu-se esse último procedimento por 3 vezes. Acrescentou-se 2mL de tampão de extração (previamente aquecido a 56°C) ao pellet e incubou-se a 56°C por 2 horas com leve agitação manual a cada 10 minutos. A incubação foi mantida por mais 10 horas, não havendo necessidade de agitar. Adicionou-se 100µl de proteinase K e incubou-se a 56°C por 3 horas, com agitação manual a cada 10 minutos. O DNA foi extraído com fenol clorofórmio (mesmo volume) seguindo o mesmo protocolo que o da extração de sangue. Concentrou-se o DNA com Centricon30. Lavou-se o pellet 3 vezes com TE. Armazenou-se o DNA a 4°C.

Extração de DNA a partir de amostras de sangue coagulado (protocolo alternativo - fenol)

Protocolo:

Colocou-se, em cada tubo, um volume de sangue coagulado correspondente a um intervalo de 300µl a 500µl de sangue líquido. A esse sangue, adicionou-se 900µl de solução A, que promove a lise das hemácias. Após homogeneização, foi mantido em gelo por 1 hora. Em seguida, centrifugou-se a mistura a 2500rpm por 20 minutos, a 4°C. O “*pellet*” foi ressuspensionado em 600µl da solução A. Após agitação por inversão, centrifugou-se o tubo novamente a 2500rpm, por 15 minutos, em temperatura ambiente (TA), desprezando-se o sobrenadante. Dando seqüência à extração, o “*pellet*” limpo foi ressuspensionado em 600µl de solução B e 5µl de proteinase K (20mg/mL). Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante a noite ou até que os “grumos de sangue” estivessem liquefeitos. Após o período de incubação, procedeu-se a purificação do DNA genômico com o reagente “70% *Phenol/Water/Chloroform*”, da Applied Biosystems. Acrescentou-se às amostras a mesma proporção (volume:volume) de fenol, após homogeneização por inversão lenta dos tubos e centrifugação a 2500rpm por 20 minutos em TA. Coletou-se o sobrenadante num novo tubo, descartando-se o precipitado. A etapa de extração com fenol foi repetida mais uma vez. Depois de colhido o sobrenadante, precipitou-se o DNA, adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 3M em pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto. Os tubos foram invertidos lentamente. Com o auxílio de um bastão, coletou-se o DNA, e em seguida, lavou-se com etanol 70% para a retirada do excesso de sal. Dependendo do volume de DNA precipitado, ressuspender em 20 a 50µl de solução tampão Tris-EDTA (ou TE) 1x. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante a noite para que o DNA entrasse em solução. A concentração final de DNA foi estimada por leitura de absorção óptica, a 260nm em espectrofotômetro e sua integridade foi verificada em gel de agarose 0,8% após eletroforese e intercalação do DNA com brometo de etídio para visualização em transluminador, sob luz ultravioleta.

EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE DENTE:

Extração de DNA a partir de amostras de Dentes (fenol)

Protocolo:

A amostra de dente foi partida em pequenos pedaços, e macerada em um almofariz com nitrogênio líquido. Colocou-se o pó, já triturado, em um tubo de 1.5mL. Dando seqüência à extração, adicionou-se 600µl de solução B e 10µl de proteinase K (20mg/mL), incubando-se os tubos em banho-maria, a 37°C, durante a noite. Após o período de incubação, o DNA genômico foi purificado com fenol para a remoção de peptídeos e proteínas. Acrescentou-se às amostras a mesma proporção (volume : volume) de fenol Os tubos foram homogeneizados por inversão lenta. Centrifugou-se a 2500rpm por 20 minutos, em TA. O sobrenadante foi coletado num novo tubo, descartando-se o precipitado. Repetiu-se essa etapa com fenol mais uma vez. Precipitou-se o DNA adicionando 0,1 volume de acetato de sódio 3M em pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado de DNA foi obtido após inversão lenta dos tubos. Com o auxílio de um bastão, coletou-se o DNA e em seguida, lavou-se com etanol 70% para a retirada do excesso de sal. Dependendo do volume de DNA precipitado, ressuspender em 20 a 50µl de solução tampão Tris-EDTA (ou TE) 1x. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante a noite para que o DNA entrasse em solução. A concentração final de DNA foi estimada por leitura de absorção óptica a 260nm em espectofotômetro e sua integridade verificada em gel de agarose 0,8% após eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA (ou TBE) 1x e intercalação do DNA com brometo de etídio para a visualização em transluminador, sob luz ultravioleta.

Extração de DNA a partir de amostras de Dentes (alternativo).

Protocolo:

A amostra de dente foi partida em pequenos pedaços, e macerada em um almofariz com nitrogênio líquido. Colocou-se o pó, já triturado, em um tubo de 1.5mL. Adicionou-se 300µl de TE e 10µl de proteinase K. Agitou-se em vortex. Incubou-se a 56°C por 24 horas. Centrifugou-se. Acrescentou-se 300µl de PCIA. Agitou-se em vortex por 30s até que a solução apresentasse uma aparência leitosa. Centrifugou-se por 3 minutos a 14.000rpm. Removeu-se o sobrenadante e colocou-se em outro tubo, novo. Concentrou-se a amostra com “Microcom 100”, de acordo com o protocolo do produto.

Extração Chelex de DNA a partir de sangue ou manchas de sangue

Protocolo:

A amostra utilizada foi de mancha de sangue seco em papel (figura 5). Adicionou-se 5 μ l de sangue líquido ou amostra de sangue seco (cerca de 5x5mm) a um tubo de 1.5mL. Acrescentou-se 1mL de PBS estéril. Agitou-se em vortex por 3s. Incubou-se à temperatura ambiente por 45 minutos. Agitou-se em vortex por 5 s. Centrifugou-se a 14.000rpm por 1.5 minutos. O sobrenadante foi descartado sem deixar o pellet se desprender. Acrescentou-se 200 μ l de Chelex 5%. Agitou-se em Vortex por 10s. Incubou-se a 56°C por 1 hora. Agitou-se em vortex por 10s. Incubou-se em banho-maria a 100°C por 8 minutos. Agitou-se em vortex por 10s. Centrifugou-se a 14.000rpm por 4 minutos. Para remover os inibidores de PCR, transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante do Chelex (porção contendo o DNA) para a parte superior de um microcon 100. A parte superior do centricon foi coberta com parafilme, fazendo-se um pequeno furo no parafilme. Centrifugou-se o tubo a 1.000xg por 20 minutos. Inverteu-se a parte superior do centricon na parte cônica do tubo coletor e centrifugou-se a 500xg por 5 minutos para coletar a amostra retida. Estocou-se em freezer.

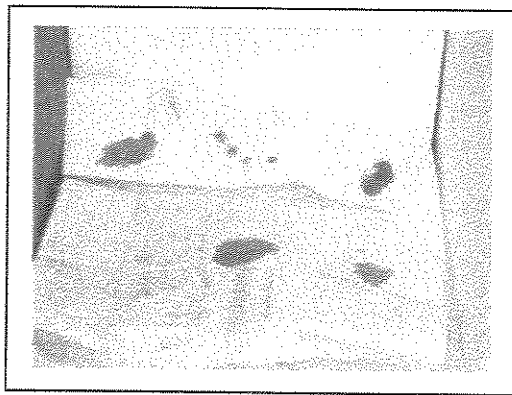


Figura 5 - Amostra de papel com manchas de sangue utilizadas nos testes de extração.

Extração Chelex de DNA a partir de manchas contendo sêmen

Protocolo:

A amostra foi depositada em um tubo de 1.5mL Adicionou-se 1mL de PBS. Agitou se em vortex por 2s, incubando-se à temperatura ambiente por 1 hora. Agitou-se em vortex por 10s. O material (swab ou tecido) foi removido com uma pipeta estéril. Centrifugou-se a amostra por 2 minutos a 14.000rpm. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, sem desprender o pellet. Acrescentou-se 150µl de água destilada, deionizada e esterilizada ao pellet. Adicionou-se 1µl de proteinase K. Agitou-se em vortex por 1s. Incubou-se a 56°C por 1 hora para lisar as células não espermáticas. Centrifugou-se a 14.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante (cerca de 150µl) foi retirado e colocado em outro tubo, acrescentando-se a esse novo tubo 50µl de Chelex 20%. Ao pellet no tubo anterior, adicionou-se 0.5mL de “sperm wash buffer” e agitou-se em vortex rapidamente. Centrifugou-se a 14.000rpm por 5 minutos. Removeu-se 450µl do sobrenadante e descartou-se. O pellet foi ressuscendido em 1mL de água destilada, deionizada e esterilizada. Agitou-se em vortex. Centrifugou-se a 14.000rpm por 5 minutos. Removeu-se e descartou-se 950µl do sobrenadante. Adicionou-se 150µl de Chelex 5% aos 50µl restantes.

Colocou-se 1µl de proteinase K e 7µl de DTT 1.0 M. Agitou-se por 10s, em vortex, os dois tubos com as frações masculina e feminina de células. Centrifugou-se por 3 s. Incubou-se a 56°C por 1 hora. Agitou-se em vortex, os dois tubos, por 10 s. Incubou-se as amostras em banho-maria a 100°C por 8 minutos. Agitou-se em vortex por 10 s. Centrifugou-se por 3 minutos.

Extração Chelex de DNA a partir de saliva de Swabs orais, papel de filtro ou gaze.

Protocolo:

Cortou-se a amostra de gaze, papel de filtro ou swab (cerca de 3x3 mm) em um tubo de 1.5mL. Adicionou-se 200µl de Chelex 5%. Agitou-se em vortex por 10s. Incubou-se a 56°C por 1 hora. Agitou-se em vortex por 10s. Incubou-se em banho-maria, a 100°C, por 8 minutos. Agitou-se em vortex por 10s. Centrifugou-se a 14.000rpm por 4 minutos. Para remover os inibidores de PCR transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante do Chelex (porção contendo o DNA) para a parte superior de um microcon 100. Cobriu-se a parte superior do centricon com parafilme, fazendo-se um pequeno furo no parafilme. Centrifugou-se o tubo a 1.000xg por 20 minutos. A parte superior do centricon foi invertida na parte cônica do tubo coletor e centrifugou-se a 500xg por 5 minutos para coletar a amostra retida. Estocou-se em freezer.

Extração Chelex de DNA a partir de bordas de envelopes e selos.

Protocolo:

O envelope ou selo foi aberto, e com um swab (umedecido em água destilada, deionizada e esterilizada) retirou-se a parte onde há possibilidade de existir DNA. O swab foi cortado em um tubo de 1.5mL, ao qual adicionou-se 450µl de Chelex 5%. Acrescentou-se 15µl de proteinase K(20mg/mL). Agitou-se em vortex por 2s. Incubou-se a 56°C, por 90 minutos. Colocou-se 200µl de Chelex 5%. Agitou-se em vortex por 10s. Incubou-se a 56°C por 1 hora. Agitou-se em vortex por 10s. Incubou-se em banho-maria a 100°C por 8 minutos. Agitou-se em vortex por 10s. Centrifugou-se a 14.000rpm por 4 minutos. Para remover os inibidores de PCR, transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante do Chelex (porção contendo o DNA) para a parte superior de um microcon 100. A parte superior do centricon foi coberta com parafilme, fazendo-se um pequeno furo no parafilme. Centrifugou-se o tubo a 1.000xg por 20 minutos. Inverteu-se a parte superior do centricon na parte cônica do tubo coletor e centrifugou-se a 500xg por 5 minutos para coletar a amostra retida. Estocou-se em freezer.

Extração Chelex de DNA a partir de filtros de cigarro

Protocolo:

Removeu-se, aproximadamente, 5mm da parte de papel do cigarro que esteve em contato com a boca. Cortou-se, em pequenos pedaços, em um tubo de 1.5mL. Adicionou-se 1mL de Chelex 5% ao tubo. Agitou-se em vortex por 30 s. Incubou-se a 56°C por 1 hora. Agitou-se em vortex por 10s. Incubou-se em banho-maria a 100°C por 8 minutos. Agitou-se em vortex por 10s. Centrifugou-se a 14.000rpm por 4 minutos. Para remover os inibidores de PCR transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante do Chelex (porção contendo o DNA) para a parte superior de um microcon 100. A parte superior do centricon foi coberta com parafilme e faz-se um pequeno furo no parafilme. Centrifugou-se o tubo a 1.000xg por 20 minutos. A parte superior do centricon foi invertida na parte cônica do tubo coletor e centrifugou-se a 500xg por 5 minutos para coletar a amostra retida. Estocou-se em freezer.

Extração inorgânica de DNA a partir de sangue – método da dessalinização

Protocolo:

O sangue foi coletado em tubo contendo EDTA e guardado a 4°C. Colocou-se 500µl do sangue em um tubo de 1.5mL. Adicionou-se 1mL de “cell lysis buffer” e agitou-se em vortex. Centrifugou-se a 4000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Acrescentou-se 1mL de “cell lysis buffer” e agitou-se em vortex. Centrifugou-se o tubo a 4000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1mL de “protein digestion buffer” e agitou-se em vortex. Centrifugou se o tubo a 4000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Colocou-se o tubo com o pellet no gelo. Adicionou-se 225µl “protein digestion buffer” e 25µl de proteinase K. Colocou-se o tubo em um bloco de aquecimento a 65°C por 2 horas. Após 20 minutos de aquecimento, o tubo foi agitado em vortex e colocado de volta no bloco a 65°C. O tubo do bloco foi removido e agitado em vortex por 30s. Centrifugou-se por 2 minutos a 14.000rpm. Estocou-se a amostra a 4°C.

PROCOLOS DE TIPAGEM DE DNA PARA IDENTIFICAÇÃO HUMANA E PATERNIDADE:

Tipagem de DNA pelo método de RFLP

RFLP de *Loci* de VNTR

Digestão e re-precipitação do DNA isolado a partir de sangue líquido.

Digestão e precipitação do DNA

Protocolo:

Num tubo de 1.5ml adicionou-se 24µl de água, 6µl de espermidina, 15µl do tampão da enzima e 5µl *HaeIII*. Manteve-se em banho-maria a 37°C, durante a noite. A precipitação do DNA foi feita com 30µl de Acetato de Sódio 0.5M, 120µl de água e 700µl de etanol absoluto gelado. Deixou-se no freezer (-20°C) por pelo menos 6 horas.

Corrida em gel de Eletroforese

Protocolo:

O berço e os pentes foram limpos com lenço de papel. O berço foi vedado com fita nas laterais. Preparou-se 400 mL de agarose, 1% em TBE 1X; O gel foi derretido até que ficasse totalmente transparente, logo depois foi resfriado em água de torneira, tomando cuidado para que não se solidificasse. Assim que o gel foi colocado no berço, as bolhas estouraram. Aguardou-se até que solidificasse totalmente, colocou-se na cuba e adicionou-se TBE 1X até cobrir a superfície do gel. Aplicaram-se as amostras na seguinte ordem:

- ✓ Ladder1Kb: 12 µl;
- ✓ Dois espaços sem aplicar.
- ✓ Marcador (M): 2µlA + 5µlB;
- ✓ Amostras da mãe, da criança e do pai (*M C P*) (20µl DNA digerido + 4µl azul de bromofenol);
- ✓ K562: 15µl;

Sequência de aplicação:

Ladder1Kb ___ M MCP M MCP M MCP M K562 ___ Ladder1Kb

Correu-se o gel, a 50 volts, durante 19 horas. Terminado o tempo de corrida, foi feito um corte na porção inferior direita do gel. Corou-se o gel com brometo de etídio (40µl de brometo de etídio em 700 mL de água deionizada, não estéril), durante 10-15 minutos. Observou-se em transluminador UV e fotografou-se. Retirou-se o brometo, que foi rapidamente lavado com água deionizada. Deixou-se o gel numa bandeja com 700mL de solução de desnaturação durante 30 minutos. A solução foi desprezada, e enxaguando-se o gel com água deionizada. O gel foi deixado na bandeja com 700mL de solução de neutralização, durante 50-60 minutos. Desprezou-se a solução, enxaguando-se o gel com água deionizada.

Southern Blotting

Protocolo:

Montagem do transfer:

Duas folhas de papel 3MM para fazer a ponte cortados no tamanho: 35cm x 21cm (figura 6).

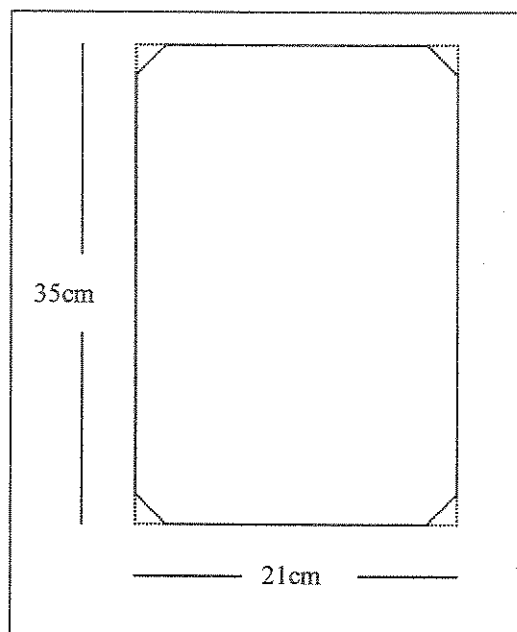


Figura 6 – Dimensões do papel 3MM para RFLP.

Obs.: Os cantos do papel 3MM foram cortados.

Umedeceu-se a ponte sobre a cuba com SSC 10X (figura 7), retirando-se as bolhas com um bastão de vidro.

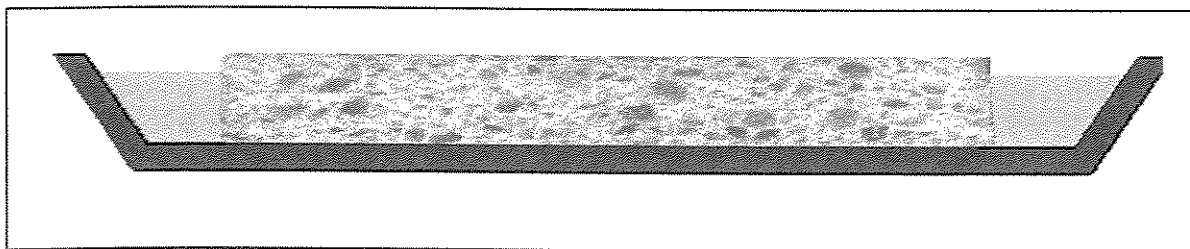


Figura 7 – Cuba com ponte salina para RFLP.

O gel foi colocado sobre a ponte, retirando-se novamente as bolhas.

A membrana de náilon foi cortada no tamanho adequado, escrevendo-se a lápis na membrana, o número do gel;

A membrana foi umedecida com água Milli-Q estéril e colocada em cima do gel (exatamente na posição em que as amostras serão transferidas). As bolhas foram retiradas;

Cortou-se 3 folhas de papel 3MM do mesmo tamanho da membrana; umedeceu-se com SSC 10 X, colocando-as sobre a membrana, isolando as laterais com *parafilm* (o parafilm deve ficar cerca de 0,5cm dos papéis 3MM);

Colocou-se aproximadamente 15cm de papel absorvente, sobre o qual foi colocado o berço da cuba de eletroforese, para tornar plana a superfície

Deixou-se *durante a noite*; no dia seguinte, desmontou-se o transfer e cortou-se a membrana na porção inferior direita (figura 8).

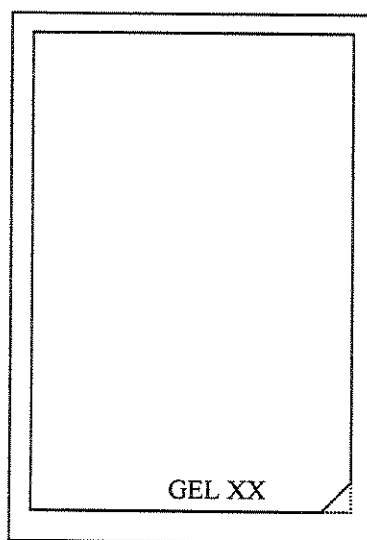


Figura 8 – Corte na membrana ao desmontar o transfer.

Em uma bandeja, colocou-se transfer wash solution para retirar os resíduos de gel.

Levou-se à estufa por 1 hora, a 80°C.

Foi feito crosslink a 200x100uJ/cm.

Guardou-se a membrana seca.

Hibridização

Protocolo:

A solução de pré-hibridização foi retirada da geladeira, aquecida em banho-maria a 55°C, centrifugada por 5 minutos. e colocada no banho-maria por mais 5 minutos. antes de ser usada;

Colocou-se a membrana no tudo de hibridização, umedecendo-se com SSC 2X e retirando-se as bolhas (para isso bastou agitar o tubo lentamente, por inversão). Colocou-se a solução de pré-hibridização. Deixou-se pré-hibridizando por 1 hora.

Retirou-se a solução de pré-hibridização, colocou-se a solução de hibridização com a sonda previamente aquecida a 55°C e centrifugou-se, deixando por 2 horas.

A sonda foi retirada e os tubos lavados na seguinte ordem:

80mL WASH BUFFER 1X (20 min/55°C)

80mL WASH BUFFER 1X (20 min/55°C)

80mL WASH BUFFER 0,5X (20 min/55°C)

80mL WASH BUFFER 0,5X (20 min/55°C)

150mL FINAL WASH 1X (em temperatura ambiente, com agitação na bandeja).

Após a última lavagem com FINAL WASH 1X, retirou-se a membrana da bandeja e colocou-se dentro do plástico. Retirou-se o excesso de FINAL WASH 1X, colocou-se 1mL de LUMI-PHOS PLUS, espalhando bem e retirando-se o excesso.

Colocou-se a membrana selada dentro do cassete e expôs-se com filme de raio-x. Deixou-se *durante a noite*.

Strip:

Preparou-se 500 mL de solução de strip. Para a preparação, colocou-se 1mL de EDTA 0,5M pH 8, 2,5mL de Tris-HCl 2M pH 7,5, 2,5mL de Tween 20 e completou-se com 500mL de água destilada.

Aqueceu-se em forno de microondas a 100 °C;

Colocou-se a metade da solução em uma bandeja, juntamente com as membranas.

As regiões estudadas por RFLP estão descritas na tabela 1:

Tabela 1 - Características de Loci de VNTR comumente usados e compatíveis com HaeIII

Características de Loci de VNTR comumente usados compatíveis com HaeIII			
Locus	Sonda	Localização no cromossomo	Tamanho de fragmentos de K562 em pares de bases
D1S7	MS1	1p33-35	4585, 4237
D2S44	YNH24	2q21.3-q22	2905, 1788
D4S139	PH30	4q35	6474, 3400
D5S110	LH1	5	3700, 2926
D10S28	TBQ7	10petr-p15	1754, 1180
D17S79	V1	17	1979, 1514

Valores significativos do material referência padrão 2390 do National Institute of Standard and Technology.

PCR DE LOCI DE STR

Amplificação

Foi utilizado para amplificação o termociclador PTC-100 da MJ; o protocolo utilizado foi o descrito pela “Promega coporation” para o uso do Kit PowerPlex 16 Sistem e todos os seus reagentes.

1- Foi preparado o “master mix” adicionando em um tubo de 1,5mL o volume necessário para o mix de acordo com o numero de amostras processadas.

Para cada amostra foi adicionado:

Água Deionizada	7,1µl
Tampão	1,25µl
Primers	1,25µl
Taq. DNA Pol.	0,4µl

2- Homogeinizou-se o mix usando vortex por 5s.

3- Colocou-se 10µl do mix/por amostra nos tubos de 0,2ml.

Adicionou-se 2,5µl da amostra de DNA.

Controle positivo: 4µl + 996µl de água deionizada.

Controle negativo água deionizada.

Homogeinizou-se sem fazer bolhas.

Processou-se a amplificação seguindo o ciclo abaixo. Após esse processo armazenou-se as amostras a -20°C .

Ciclo:

95°C 11 min.

96°C 1 min.

94°C 30s.

60°C 30s.

70°C 45s.

Esses 3 últimos itens fazer 10 ciclos.

90°C 30s.

60°C 30s.

70°C 45s.

Esses 3 últimos itens fazer 25 ciclos.

60°C 30min.

4°C Indeterminado.

Antes da corrida aquecer as amostras à 95°C por 5 minutos para desnaturar.



***RESULTADOS E
DISCUSSÃO***

COLETA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

Coleta de Sangue em tubos com EDTA

Levando-se em conta a situação da maioria das pessoas envolvidas na coleta, esta deve ser feita na seguinte ordem: Suposto Pai, Mãe e Filho(a). Nos casos onde o casal não é casado, normalmente o Suposto Pai está realizando o exame contra a vontade, e qualquer demora ou dificuldade em se coletar o sangue, será usada como argumento para que ele se recuse a fazê-lo. Sendo assim, o primeiro sangue coletado deve ser o dele. Nos casos onde o casal é casado, é normalmente a mãe que está fazendo o exame contra a vontade, e qualquer demora ou dificuldade em se coletar o sangue, principalmente da criança, poderá ser usada como argumento para ela não mais fazer o exame. Sendo assim, deve-se retirar primeiro o sangue da criança e em seguida o da mãe, pois caso ela não mais aceite fazer a coleta, ainda assim é possível realizar o exame somente com o sangue do pai e da criança. Em último lugar deve-se coletar o sangue da mãe, para que ela possa se retirar logo após a coleta. Todas as fichas e documentos devem ser checados antes desse momento. A coleta deve ser o último ato de todo o processo.

Para que as assinaturas não sejam prejudicadas, deve-se procurar coletar o sangue no braço esquerdo para os destros e no braço direito para os não-destros.

Todo o material deve ser devidamente identificado com o código do exame e a classificação dos envolvidos: Mãe, Suposto Pai e Filho(a). É preciso muito cuidado para que não haja troca de amostras. Deve-se etiquetar cada tubo imediatamente antes ou após ter sido feita a coleta de cada indivíduo. Só depois de conferir e guardar os tubos da coleta anterior é que se deve pegar os tubos para a próxima coleta.

A caixa e o envelope de segurança contendo os três tubos vacuette devem ser abertos em ambiente adequadamente limpo. Se a coleta for feita para RFLP, os tubos devem ser abertos e o sangue depositado dentro, sem utilizar vácuo; esse procedimento permite que se obtenha uma maior quantidade de DNA sem comprometimento da qualidade, uma vez que o RFLP não é sensível a pequenas amostras de DNA contaminante. O cuidado em relação à contaminação deve ser grande na coleta de sangue para PCR, sendo recomendável que se utilize o vácuo do tubo para que isso não aconteça.

Em crianças de até 5 anos de idade é possível que haja dificuldade para coletar os 5mL de sangue. Nesses casos, é recomendável que se colete no mínimo 2mL de sangue, dividindo o volume em duas partes iguais: uma no tubo que acompanha a caixa e outra no tubo que acompanha o envelope (contraprova). Nos casos em que a amostra de sangue é menor, não se deve utilizar o vácuo para transferir o sangue da seringa para o tubo, pois esse procedimento prejudica uma boa extração de DNA devido à ocorrência de hemólise, obtendo-se menor quantidade de DNA.

Coleta e armazenamento em papel FTA

Para o procedimento do papel FTA recomenda-se a coleta de 2 amostras, uma em tubo com EDTA e outra no FTA, como contraprova. Isso é necessário porque o sangue coletado no tubo fornece maior quantidade de DNA, sendo importante ter uma segunda amostra a que se possa recorrer.

Para cada caso de investigação de paternidade utiliza-se uma caixa com três tubos vacuette e um envelope de segurança com três cartões FTA. A contraprova é necessária para garantir que não haja erro técnico nem troca de amostras. Sendo a contraprova o FTA ou um segundo tubo, deve ser processada separadamente da amostra principal, como se fosse um segundo exame. Com isso, no final tem-se duas determinações de paternidade independentes, uma confirmando o resultado da outra.

A coleta deve ser previamente agendada, para que todos os envolvidos compareçam em conjunto com suas testemunhas. A coleta não deve ser feita no caso da falta de qualquer um dos envolvidos. Caso uma das partes não apresente testemunhas, na ficha de coleta deve constar uma observação a esse respeito. Esses cuidados são necessários pois a maioria dos casos acabam se tornando exames judiciais, assim qualquer falha na identificação das pessoas testadas, na coleta dos documentos, e nas suas assinaturas, ou das testemunhas poderá ser usada para anular o exame.

Deve-se usar luvas e seringas descartáveis e nunca colocar a mão desprotegida na parte interna do cartão FTA, como garantia de não haver contaminação, se o exame for feito por PCR.

É importante que se faça a coleta primeiro da criança e por último da mãe, pelos motivos já descritos nos procedimentos de coleta com EDTA. Deve-se coletar o sangue do braço esquerdo para destros e do braço direito para não-destros para não prejudicar as assinaturas.

O vácuo não deve ser utilizado para transferir o sangue da seringa para o tubo pois há possibilidade de ocorrer hemólise, prejudicando a extração do DNA.

Não é necessário encharcar de sangue o papel FTA; o importante é que haja pelo menos dois círculos preenchidos por inteiro.

É importante deixar secar os cartões antes de serem guardados no envelope de segurança. Se o cartão não estiver seco, a extração do DNA será prejudicada, impossibilitando a realização do RFLP, (o PCR ainda será possível). Para acelerar a secagem dos cartões pode-se utilizar uma estufa a 37°C durante 60 minutos.

Deve-se dedicar atenção às identificações nos tubos e cartões, evitando a possibilidade de troca de amostras.

A ordem das assinaturas no cartão FTA é para garantir que cada cartão tenha a assinatura da pessoa da qual se coletou o sangue ou de seu responsável, e ainda a assinatura de uma testemunha de cada parte, confirmando que aquele sangue realmente é do indivíduo que assinou na primeira linha do cartão.

Nos casos em que a quantidade de sangue for insuficiente para tubo e cartão, deve-se dar preferência sempre para a coleta no tubo vacuette, pois a extração de sangue líquido proporciona uma maior quantidade de DNA.

Caso o laboratório coletor faça a análise, as amostras dos tubos e dos cartões devem ser armazenadas em geladeira à temperatura ambiente. Caso as amostras sejam coletadas num local distante de onde serão realizados os exames, devem permanecer na temperatura ambiente durante o transporte.

Coleta de células bucais

O DNA extraído de saliva mostrou-se adequado somente para o exame por PCR. Portanto é preciso cuidado para não haver contaminação. Os tubos não devem ser manipulados sem a utilização de luvas, assim como deve-se lavar a boca com água antes da coleta.

O procedimento de coleta é bastante simples e, no caso de adultos, pode ser realizado pela própria pessoa. Quando se trata de crianças, a coleta deve ser necessariamente realizada por um adulto responsável. Cada indivíduo deve escovar a parte interna das bochechas com um dos swabs.

Para essa escovação os movimentos devem ser firmes, girando-o em toda a extensão da bochecha por pelo menos 1 minuto, a fim de se coletar eficientemente células do epitélio bucal.

Após esse procedimento, a haste do swab deve ser quebrada, deixando-se apenas a ponta contendo algodão dentro do tubo; em alguns casos é necessário a utilização de uma tesoura. Após a coleta é preciso se certificar que os tubos estão devidamente fechados, pois poderá ocorrer vazamento do líquido durante o transporte. Se possível, a tampa dos tubos deve ser vedada com parafilme.

Discussão sobre a coleta, armazenamento e transporte das amostras

O preparo e armazenamento de amostras referenciais são partes importantes do processo analítico. O sangue líquido deve ser coletado, por punção venosa, em um tubo a vácuo com EDTA, e armazenado em temperatura ambiente por pequenos períodos de tempo, (é preferível 4°C). Para armazenagens mais longas a amostra deve ser alíquotada (0.7 mL) em um tubo de polipropileno de 1.5 mL e congelado a -20 ° ou -70°C. Neste caso o DNA já não apresentará a mesma qualidade para se realizar o exame por RFLP, mas continua adequado para o PCR.

A secagem do sangue em um filtro de papel (particularmente em papel FTA) constitui um modo efetivo de armazenagem. Prioritariamente, para pequenos ou longos períodos de armazenagem, as alíquotas de sangue podem ser colocadas em um papel de filtro ou papel FTA e armazenadas secas, em temperatura ambiente ou então congeladas. Os cartões armazenados a temperatura ambiente mostraram-se mais bem conservados (figura 9).

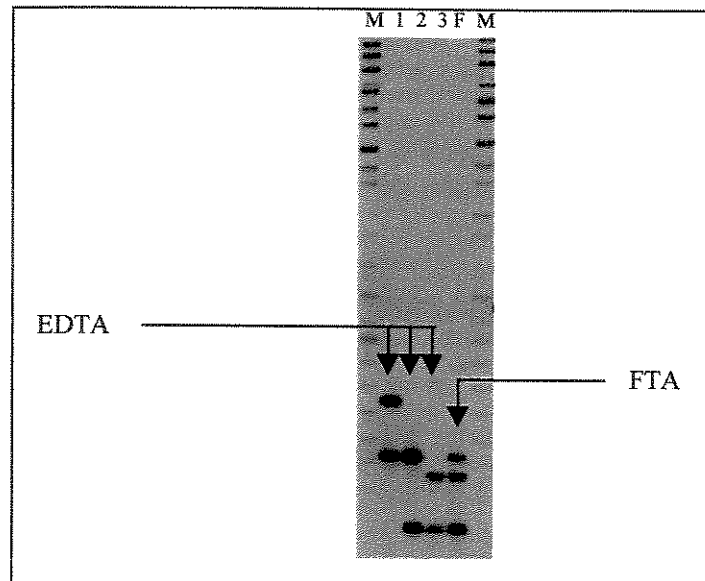


Figura 9 – RFLP de DNA extraído de sangue colhido em tubos com EDTA e em papel FTA, demonstrando que as amostras coletadas com FTA (amostra F) mantêm o mesmo padrão das amostras coletadas com EDTA. M – Marcador. 1, 2, 3 – Amostras de 3 indivíduos diferentes coletados com EDTA.

Alternativamente, células epiteliais da parte interna da bochecha (células bucais) mostraram ser uma boa fonte de DNA (figura 10). As amostras de saliva (ou células bucais epiteliais) foram coletadas com o uso de swabs. Este método de coleta de amostras de DNA é considerado menos invasivo do que a coleta de sangue, mas só permite realizar o exame pelo método de PCR.

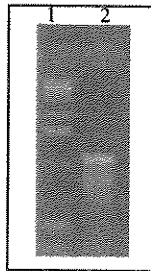


Figura 10 – PCR de DNA extraído de células da mucosa bucal. 1-Lader. 2-Produto de PCR controle.

O material celular a ser usado como amostra referencial pode ser derivado de cabelo, selo, envelopes, escova de dentes, barbeadores, unha, ossos, etc. Esse tipo de material geralmente é trazido ao laboratório já coletado pelo paciente ou por investigadores, nos casos criminais. Como nesses casos não é possível ter controle sobre a coleta, recomenda-se que seja feita uma purificação do material antes de sua extração, utilizando-se como controle o DNA de pessoas que tiveram contato com a amostra.

Swabs vaginais ou outros swabs podem ser coletados, e depois de secos, armazenados a -20°C para posterior extração do DNA.

RECOMENDAÇÕES GERAIS PARA OS PROCEDIMENTOS DE COLETA:

- ✓ Preencher fichas com os dados de todos os envolvidos, incluindo impressão digital para maiores de 5 anos que não possam assinar.
- ✓ Se possível, tirar fotos, em Polaroid das pessoas testadas, colocando as respectivas assinaturas atrás.
- ✓ Recolher uma fotocópia do documento de todos os envolvidos (inclusive das testemunhas, nos casos judiciais) e assinar cada folha após conferência com o original.
- ✓ A coleta só deverá ser realizada se as partes interessadas estiverem presentes no mesmo dia e hora. As exceções devem ser previamente combinadas, escritas e assinadas por ambas as partes.
- ✓ Nos casos judiciais, recomendamos não fazer a coleta na falta de qualquer um dos envolvidos, inclusive das testemunhas.
- ✓ Em muitos casos de Investigação de Paternidade, após a entrega do laudo, uma das partes dá entrada no caso na Justiça, motivo pelo qual os dados deverão estar completamente preenchidos, assinados pelas partes interessadas e com carimbo do laboratório responsável pela coleta.

As fichas com os dados dos envolvidos e as fotocópias dos documentos de cada um, bem como as amostras (à temperatura ambiente), deverão ser enviadas, se possível, no mesmo dia da coleta para o laboratório responsável pelo exame. Caso o próprio laboratório coletor faça a análise, as amostras devem ser armazenadas em geladeira.

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A tabela 2 apresenta um resumo dos resultados e da avaliação de todos os métodos de extração e de tipagem.

Tabela 2 – Métodos de extração de DNA para diferentes tecidos biológicos e indicação do método de tipagem ideal para cada tipo de DNA extraído.

Método de extração	Forma de coleta	Condições do material	Método indicado para tipagem
Sangue - Fenol	Tubo (sem vácuo) com EDTA	Líquido, sem coagular	RFLP e PCR
Sangue – Kits	Tubo (sem vácuo) com EDTA	Líquido, sem coagular	RFLP e PCR
Cabelo	Armazenar em saco de papel e lacrar	Mínimo 20 fios com o bulbo	PCR
Saliva Impregnada em Selo e Envelopes	Armazenar em saco de papel e lacrar	Fragmentos de selos ou bordas de envelopes onde possa constar o DNA de saliva	PCR
Cerdas de Escova de Dentes	Retirar as cerdas da escova com lâmina estéril e armazenar em saco de papel e lacrar	Conforme amostra apresentada	PCR
Amostras de Barbeadores	Raspar as lâminas em um tubo de 1,5mL estéril e armazenar em saco de papel e lacrar	Conforme amostra apresentada	PCR
Sangue Coagulado	Armazenar em tubo estéril	Conforme amostra apresentada	RFLP e PCR
Manchas de Sangue ou Saliva	Armazenar em saco de papel e lacrar	Conforme amostra apresentada	RFLP e PCR
Swab Bucal	Esfregaço de Swab na mucosa bucal e armazenamento em tubo estéril com Tris-EDTA	Esfregaço de Swab na mucosa bucal armazenado em tubo estéril com Tris-EDTA	PCR
Manchas de Fluidos Corpóreos Tais Como Líquido Amniótico e Urina	Armazenar em saco de papel e lacrar	Amostras secas em tecido ou papel	PCR
Células Espermiáticas e DNA de Células Vaginais	Coletor universal ou lâminas com esfregaço	Lâminas apresentadas ou tubos com o material coletado	RFLP e PCR
Filtros de Cigarro	Cortar o filtro em um tubo estéril	Conforme apresentada	PCR
Osso	Armazenar em saco de papel ou caixa apropriada e lacrar	Conforme amostra apresentada	PCR
Dente	Armazenar em saco de papel e lacrar	Conforme amostra apresentada	PCR
Extração Chelex de Sangue ou Manchas de Sangue	Tubo (com ou sem vácuo) com EDTA para sangue líquido. Para manchas ND.	Líquido, sem coagular ou coagulado e seco	PCR
Extração Chelex de Manchas Contendo Sêmen	Armazenar em saco de papel e lacrar	Amostras secas em tecido ou papel	PCR
Extração Chelex de Saliva de Swabs Oraís, Papel de Filtro ou Gaze	Armazenar em saco de papel e lacrar ou em tubo para o swab	Conforme amostra apresentada	PCR
Extração Chelex de Bordas de Envelopes e Selos	Cortar o papel em um tubo estéril	Conforme amostra apresentada	PCR
Extração Chelex de Filtros de Cigarro	Cortar o filtro em um tubo estéril	Conforme amostra apresentada	PCR
Extração Inorgânica de DNA a Partir de Sangue	Tubo (sem vácuo) com EDTA	Líquido, sem coagular ou coagulado e seco	RFLP e PCR

ND – Não Determinada.

O DNA pode ser extraído da maior parte dos materiais biológicos encontrados na cena de um crime. O sucesso da tipagem do DNA depende do isolamento do DNA, de uma quantidade suficiente, do grau de qualidade e pureza. Dependendo do processo de tipagem a quantidade e a qualidade necessárias de DNA podem variar imensamente. A pureza do extrato de DNA refere-se à qualidade da limpeza, de forma a permitir que as subsequentes análises químicas analíticas sejam realizadas efetivamente.

Os procedimentos devem ser adaptáveis para a extração de DNA de uma pequena amostra de sangue, manchas de sangue, ou outros tecidos. Os procedimentos adaptáveis para a extração de DNA de pequenas amostras de sangue e manchas de sangue são baseados em métodos-padrão de extração do DNA. Os procedimentos-padrão para a extração de DNA podem englobar (i) solventes orgânicos, (ii) métodos de dessalinização, (iii) resinas de trocas de cátion, como Chelex 100. Os métodos orgânicos envolvendo sais, são compatíveis com vários procedimentos de tipagem, incluindo as análises baseadas em RFLP e PCR usadas rotineiramente.

Extração de DNA - fenol (padrão)

Adicionou-se 35 mL de solução A para promover a lise das hemácias. Como apenas uma lavagem não é suficiente para que o “pellet” fique limpo (livre dos restos de hemácias lisadas), a lavagem deve ser repetida quantas vezes forem necessárias.

O fenol foi utilizado para a remoção de peptídeos e proteínas de soluções aquosas. Por se tratar de um material neurotóxico, deve-se manipulá-lo em capela de exaustão.

Para a retirada do excesso de sal utilizou-se etanol 70%. Quantidades maiores de sal prejudicam a boa hibridização e a reação de PCR.

Para ressuspender o DNA, dependendo do volume, utilizou-se de 200 a 500µl de solução tampão Tris-EDTA, pois a quantidade obtida do DNA não se mantém sempre a mesma. Essa variação da concentração do DNA extraído não provocou nenhuma alteração

nos dois processos de tipagem analisados de acordo com os protocolos descritos. Os tubos devem ser mantidos à temperatura ambiente durante a noite para que o DNA entre em solução.

EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE LÍQUIDO (KITS COMERCIAIS)

Extração GENTRA e WIZARD de DNA Genômico

Todos os reagentes que fazem parte dos kits GENTRA e WIZARD são análogos, produzindo os mesmos resultados. Portanto o protocolo é igual, mudando-se apenas os nomes das soluções.

Durante a incubação com RBC Lysis Solution é conveniente agitar o tubo por inversão, a cada 10 minutos a fim de se obter uma solução mais homogênea e garantir uma melhor extração.

Durante a incubação com “Cell Lysis Solution” deve-se agitar o tubo vigorosamente para ressuspender as células, mexendo o fundo com uma ponteira.

Durante a incubação com “Protein Precipitation Solution” deve-se agitar a solução até que haja formação de “grumos” escuros, mesmo se o tempo ultrapassar os 60 segundos recomendados.

A precipitação forma um pellet marrom escuro e compacto. Nesse ponto, caso o pellet de proteínas ainda não esteja compacto, deve-se incubar a amostra, no gelo, por 5 minutos, e depois repetir a centrifugação (figura 11).

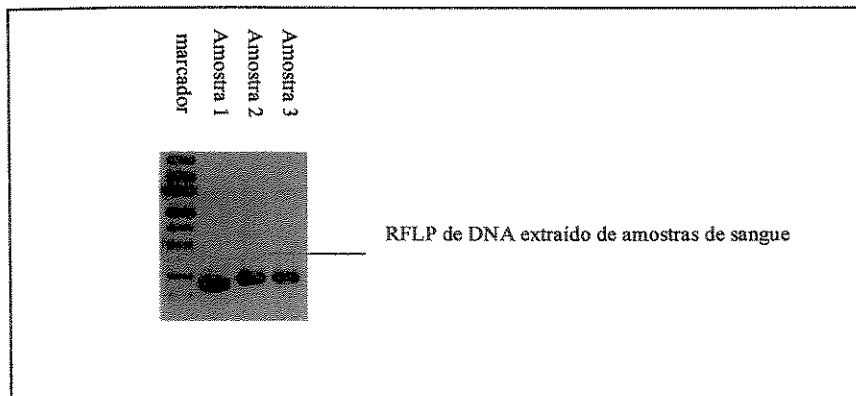


Figura 11 – RFLP de DNA extraído de amostras de sangue de 3 indivíduos diferentes.

Extração de DNA a partir de amostras de cabelo

Colocou-se no tubo de microcentrífuga 2.2mL, 1cm da raiz do cabelo. O cabelo inteiro pode ser colocado no tubo como alternativa. Quanto maior o número de fios de cabelo com bulbo, maiores as chances de se obter DNA. Foi observado que o número ideal de fios com bulbo é de 50, mas é possível fazer a extração com 20 fios. A extração com apenas 1 fio de cabelo não funcionou.

Todo o material deve ficar submerso dentro da solução de extração contendo proteinase K, durante a noite, a 56°C. Não é necessário retirar o material de dentro do tubo ao longo do restante do processo.

Ao se remover o sobrenadante, deve-se ter muito cuidado para não misturar a segunda fase líquida, que corresponde às proteínas retiradas durante a extração.

Incubou-se com TE por pelo menos 2 horas a 56°C em banho-maria para o DNA entrar em solução. É recomendável deixar, durante a noite, numa temperatura de 56°C.

Extração de DNA a partir de amostras de selo e ou envelopes (saliva impregnada no selo ou na borda de envelopes)

Deve-se abrir a borda do envelope ou remover o selo usando-se vapor e um fórceps limpo. Alternativamente, pode-se, com uma lâmina escalpe nova e esterilizada, cuidadosamente cortar metade do selo ou, no mínimo, 1cm² de selo ou envelope.

Toda a amostra deve ser picotada dentro do tubo, sempre com escalpe estéril. Não há a necessidade de se retirar o material de dentro do tubo durante o processo.

O sobrenadante deve ser removido com muito cuidado para não misturar a segunda fase líquida, que corresponde às proteínas retiradas durante a extração.

Incubou-se com TE por pelo menos 2 horas a 56°C, em banho-maria, para o DNA entrar em solução. É recomendável deixar, durante toda a noite, a 56°C.

Extração de DNA a partir de amostras de escova de dentes (cerdas)

Extração de DNA a partir de amostras coletadas de barbeadores

Todo o material deve ficar submerso dentro da solução de extração. Não há necessidade de se retirar o material de dentro do tubo durante o processo. Ao remover o sobrenadante, deve-se ter muito cuidado para não misturar a segunda fase líquida, que corresponde às proteínas retiradas durante a extração. Ao ressuspender o DNA com TE, deixar por toda a noite à 56°C.

Extração de DNA a partir de amostras de sangue coagulado (kit comercial – GENTRA ou WIZARD)

Adicionar em cada tubo um volume de sangue coagulado correspondente a um intervalo de 300µl a 500µl de sangue líquido; esse valor é aproximado, uma vez que o sangue não está líquido.

Incubar por 1 hora; porém se a solução ainda não estiver viscosa, esperar tempo suficiente até que a mesma fique nesse estado.

Durante a remoção do sobrenadante líquido, deve-se tomar cuidado para deixar os “grumos de sangue” no tubo, sem misturar ao resto da solução. Esse procedimento pode ser repetido, se necessário.

Durante a incubação com “Protein Precipitation Solution” deve-se agitar em vortex, vigorosamente, por 1 minuto, segundo o protocolo ou até que se formem os “grumos” escuros, mesmo ultrapassando o tempo recomendado.

A precipitação produz um *pellet* marrom escuro e compacto; porém se esse *pellet* de proteínas não estiver compacto, a amostra deve ser incubada no gelo por 5 minutos, repetindo-se a centrifugação. O *pellet* deve estar compacto.

Deve-se ressuspender o DNA em 100µl de “DNA Hidratation Solution” e esperar que entre em solução por, aproximadamente, 4h. Caso nesse período de tempo o DNA não entre em solução, deixar durante a noite, em temperatura ambiente.

Caso a extração seja para uma reação de PCR, pode-se preparar a reação a partir do momento em que o DNA entrar em solução. Mas se a extração for para uma reação de RFLP, então deve-se prosseguir com a digestão do DNA (figura 12).

Os dois Kits comerciais para extração “GENTRA” e “WIZARD” obtiveram o mesmo padrão de resultados, e apresentam os mesmos protocolos.

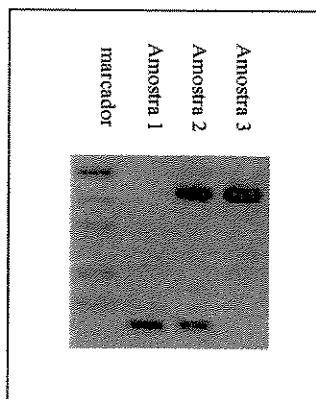


Figura 12 – RFLP de DNA extraído de amostras de sangue coagulado de 3 indivíduos diferentes.

Extração do papel FTA para manchas de sangue ou saliva

Esse protocolo apresentou os procedimentos para extração e digestão seguidas, para se realizar o RFLP; seguindo-se esses procedimentos, obtemos uma maior quantidade de DNA para o RFLP. Caso seja feita a extração para se realizar o PCR, deve-se eliminar a parte correspondente à digestão, sendo que a reação de PCR deve ser montada com o papel dentro do tubo, pois o DNA estará imobilizado no papel ao final da extração.

O papel FTA demonstrou ser um excelente meio para se coletar, transportar e armazenar amostras de sangue e outras amostras biológicas. O sangue pode ser depositado no papel, diretamente de um furo no dedo (*fingerprick*), ou se estiver num tubo a vácuo com EDTA pode ser pipetado no papel FTA; ou ainda pode ser utilizado da forma descrita anteriormente, aplicando-se diretamente da seringa no tubo no momento da coleta.

As membranas celulares são lisadas na matriz FTA deixando o DNA das células emaranhado no papel. O papel de filtro imobiliza o DNA, permitindo assim que proteínas e debris celulares possam ser lavados, e mesmo assim o DNA permaneça intacto, sendo purificado dentro do papel. O papel lavado, contendo o DNA, é o meio para análises de amostra com análises químicas com base em RFLP ou PCR. O papel FTA é impregnado com desnaturantes que impedem o crescimento de fungos e bactérias, assim como os danos por oxidação ou UV; porém, dois lotes de FTA da GIBCO apresentaram problemas com esse fungicida, havendo crescimento de fungos no papel. Quando isso aconteceu, não foi possível analisar o DNA. Exceto nesses casos, o sangue e outras amostras armazenadas com papel FTA permanecerão estáveis por um período de tempo indeterminado, podendo ser guardadas em temperatura ambiente.

Recortou-se amostras de cartão FTA em pequenos pedaços de aproximadamente 2mm^2 que foram colocados, em cada tubo, até o meio da cestinha. De acordo com os protocolos originais, basta um desses pedaços de 2mm^2 para se obter uma boa extração de DNA. No entanto isso não pôde ser demonstrado na prática, pois foi necessário encher meio tubo de 1.5mL com os fragmentos do FTA para se obter uma amostra suficiente para o RFLP. Para o PCR, foram necessários vários fragmentos para se obter uma boa extração. Um número excelente, tanto para o PCR quanto para o RFLP, é de aproximadamente 50 fragmentos de 2mm^2 do papel FTA (figura 13).

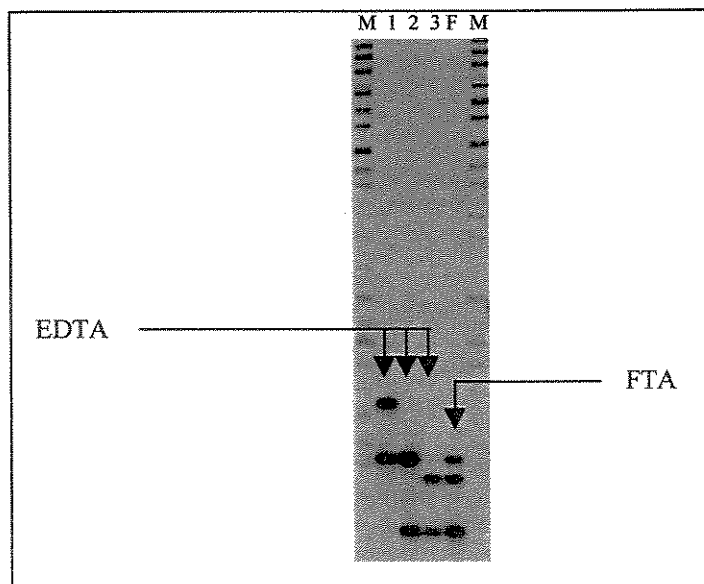


Figura 13 – RFLP de DNA extraído de sangue colhido em tubos com EDTA de 3 indivíduos diferente (1, 2, 3) e a comparação com a mistura das amostras dos indivíduos 2 e 3 (F) de DNA extraído de papel FTA. M – marcador.

Protocolo para extração a partir de swab bucal.

A extração procedeu-se de acordo com o protocolo descrito. Obteve-se um excelente DNA para se fazer uma tipagem por PCR (figura 14). Também foi possível fazer a tipagem por RFLP, porém não obteve-se repetibilidade desses resultados; portanto não é recomendável fazer o RFLP de DNA de “swab bucal”. As amostras que serão guardadas devem ser armazenadas à temperatura de -20°C .

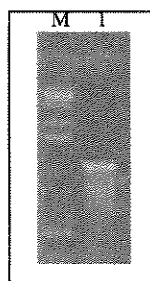


Figura 14 – PCR de DNA extraído de células de mucosa bucal. M – Marcador. 1 – Produto de PCR.

Isolamento do DNA a partir de manchas de fluidos corpóreos tais como líquido amniótico e urina

As amostras contendo as manchas devem ficar mergulhadas totalmente dentro da solução de extração. Não há necessidade de se retirar o material de dentro do tubo durante o processo.

Deve-se remover o sobrenadante com muito cuidado para não misturar à segunda fase líquida, que corresponde às proteínas retiradas durante a extração. Se por acidente ocorrer uma mistura, deve-se repetir a centrifugação.

Ao ressuspender o DNA com TE, caso ainda não esteja em solução após o tempo recomendado, deve-se deixar a solução em banho-maria durante toda a noite, a 56°C.

Isolamento do DNA a partir de fluidos corpóreos tais como líquido amniótico e urina

A remoção do sobrenadante deve ser feita com muito cuidado para não misturar a segunda fase líquida, que corresponde às proteínas retiradas durante a extração. Caso ocorra mistura deve-se fazer nova centrifugação.

Deve-se ressuspender o DNA com TE, incubando-se por pelo menos 2 horas, a 56°C, em banho-maria. Se, após esse tempo, a amostra ainda não tiver entrado em solução, recomenda-se deixar durante toda a noite, a 56°C.

Extração e separação de DNA de células espermáticas e células vaginais

As evidências de casos de estupro, como swabs vaginais e roupas manchadas, muitas vezes apresentam células nucleadas do contribuidor masculino (i.e., predominantemente, espermatozóides) e da vítima feminina (i.e., células epiteliais). A elucidação dos perfis individuais do DNA dos contribuidores pode, algumas vezes, ser complicada devido a essas misturas. Entretanto, durante a extração as células espermáticas

puderam ser separadas de outras células, como demonstraram os resultados descritos. Em casos assim, às vezes é necessário que se faça a extração diferencial do DNA de células espermáticas e células vaginais. As células espermáticas puderam ser separadas de outras células, durante a extração, pelo fato de que a membrana das células espermáticas contém proteínas ricas em tiol, o que causa uma resistência à lise das células na ausência de um agente redutor. Sendo assim, num primeiro momento da extração o agente redutor não foi utilizado, obtendo-se predominantemente o DNA de células femininas. Em seguida, adicionou-se o agente, obtendo-se predominantemente o DNA das células espermáticas.

O sobrenadante retirado correspondeu à porção do DNA de células não espermáticas (predominantemente células femininas).

Deve-se retirar cuidadosamente os restos de tecido ou outro material de dentro do tubo, para não desprender o pellet do fundo.

O segundo sobrenadante retirado corresponde à fração de DNA predominantemente de células masculinas.

Deve-se ressuspender o DNA em TE a 56°C por pelo menos 2h ou durante a noite, para entrar em solução.

A figura 15 mostra, em seqüenciador, a amplificação (picos) de DNA extraído de células espermáticas e vaginais.

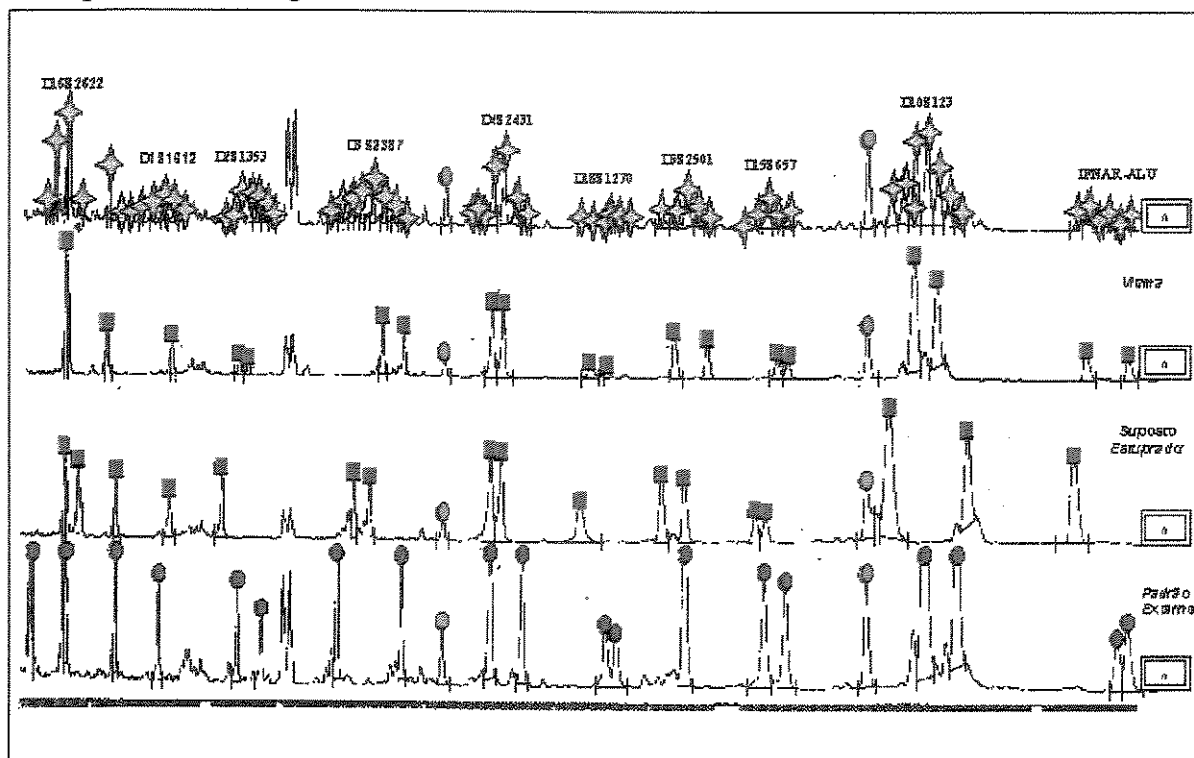


Figura 15 – Produto de amplificação de DNA extraído de células espermáticas e células vaginais comparadas com amostra de suposto estuprador..

Extração de DNA a partir de filtros de cigarro

Picotar toda a amostra dentro do tubo, sempre com escalpe estéril. Não há necessidade de se retirar o material de dentro do tubo durante o processo.

Deve-se remover o sobrenadante com muito cuidado para não misturar a segunda fase líquida, que corresponde às proteínas retiradas durante a extração.

Incubar com TE por pelo menos 2 horas, a 56°C em banho-maria, para o DNA entrar em solução. Recomenda-se deixar durante a noite, a 56°C.

Extração de DNA a partir de amostras de osso

Esse método de extração, embora tenha funcionado em todas as tentativas, não apresentou uma quantidade homogênea do DNA obtido no processo. Portanto, para se ressuspender o DNA é necessário visualizar a quantidade precipitada, e de acordo com o volume, ressuspender em 20 a 50µl de solução tampão Tris-EDTA (ou TE) 1x. O PCR pode ser feito independente do volume de ressuspensão.

Procedimento alternativo para extração de DNA do osso

Nesse processo monitorou-se a descalcificação do osso com oxalato de amônia saturada após descartar o sobrenadante. Se a solução descartada clarear após o oxalato, o processo pode ser encerrado. O monitoramento e a descalcificação podem levar alguns dias, mas garantem uma melhor extração e pureza do DNA.

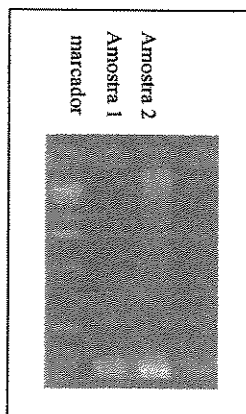


Figura 16 - Amostras amplificadas de DNA extraído de amostra de fêmur: 1 osso
2 – Repetição da extração.

Extração de DNA a partir de amostras de sangue coagulado (protocolo alternativo - fenol)

Colocar em cada tubo um volume de sangue coagulado correspondente a um intervalo de 300µl a 500µl de sangue líquido. Adicionar ao sangue, 900µl de solução A, que promove a lise das hemácias. Esta etapa deve ser realizada quantas vezes for necessária até que o “pellet” esteja limpo, (livre dos restos de hemácias lisadas). A incubação na solução B deve ser feita até que os “grumos de sangue” estejam liquefeitos.

O fenol utilizado para a remoção de peptídeos e proteínas deve ser manipulado sempre dentro de capela de exaustão devido aos riscos pelo contato com esse reagente.

Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante toda a noite para que o DNA entrasse em solução, mesmo com a descrição, no protocolo, de apenas 2 horas de incubação. Esse período de 2 horas é válido para a maioria dos casos mas em alguns foi necessário manter a incubação por toda a noite.

Extração de DNA a partir de amostras de Dente:

Antes de se iniciar o processo, é recomendável fotografar e documentar a amostra, pois esta será destruída durante o procedimento. Conforme demonstrado na Figura 17, o DNA é extraído da camada interna do dente. O DNA é preservado pelo envoltório do dente e conservado por tempo indeterminado, mesmo que as células estejam mortas.

Caso exista possibilidade de selecionar de qual dente será feita a extração, deve-se seguir a ordem apresentada na tabela 3:

Tabela 3 – Ordem de preferência para se escolher o dente para a tentativa de extração.

Ordem de preferência	Dente
1	Molar não restaurado
2	Pré-molar não restaurado
3	Canino não restaurado
4	Dentes anteriores não restaurados
5	Molar restaurado
6	Pré-molar restaurado
7	Canino restaurado
8	Dentes anteriores restaurados

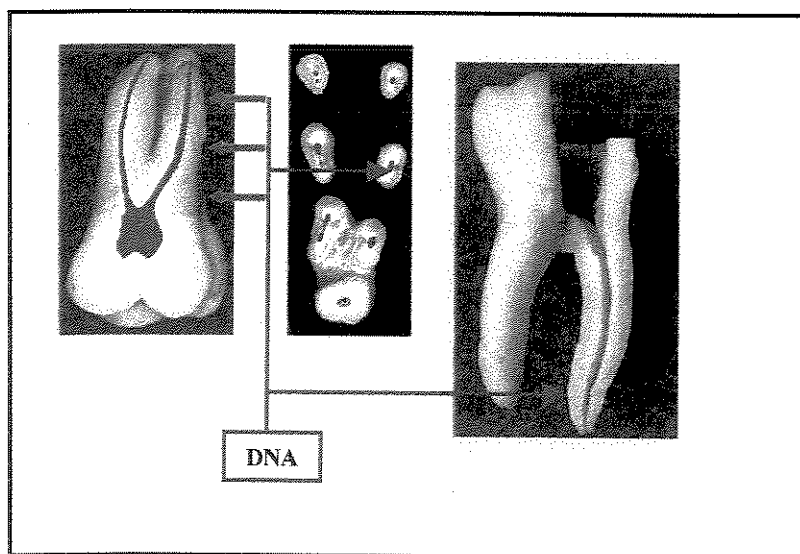


Figura 17 - Local de onde é retirada a amostra de DNA, preservada pela proteção do envoltório do dente.

Extração de DNA a partir de amostras de Dentes (fenol)

Esse método de extração não apresentou uma quantidade homogênea de DNA obtido no processo. Portanto, para se ressuspender o DNA é necessário visualizar a quantidade precipitada e de acordo com o volume, ressuspender em 20 a 50µl de solução tampão Tris-EDTA.

Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente durante toda a noite para que o DNA entrasse em solução; na maioria dos casos, o DNA entrou em solução nas primeiras horas.

Extração de DNA a partir de amostras de Dentes (alternativo)

Concentrou-se a amostra com “Microcom 100”, de acordo com o protocolo do produto. Caso exista possibilidade de selecionar de qual dente será feita a extração, deve-se seguir a ordem apresentada na tabela 3.

Extração Chelex de DNA a partir de sangue ou manchas de sangue

Foi extraído o DNA de mancha de sangue em papel (figura 18). Para remover os inibidores de PCR resultantes da extração com Chelex, transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante (porção contendo o DNA) para a parte superior de um microcon 100. Se o volume ficar abaixo de 2mL deve-se completar com TE, até atingir esse volume.

Deve-se agitar em vortex por 10s.e centrifugar a 14.000rpm por 4 minutos. antes de se usar a amostra para PCR.

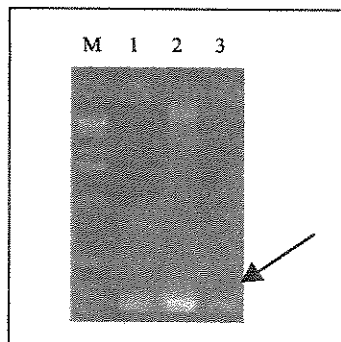


Figura 18 - Amostras amplificadas de DNA extraído de mancha de sangue em papel (3); as amostras 1 e 2 correspondem a repetições de extração de DNA de osso. M – Marcador.

Extração Chelex de DNA a partir de manchas contendo sêmen

O primeiro sobrenadante (cerca de 150 μ l) retirado e colocado em outro tubo, corresponde à fração de células femininas, e geralmente não apresenta células espermáticas. Essa fração pode ser usada como controle para se analisar o DNA da vítima.

As lavagens com “sperm wash buffer” devem ser repetidas até um total de 5 vezes.

Se necessário, estocar em freezer as amostras de DNA extraído, quando utilizados, deve-se agitar em vortex por 10 s e centrifugar por 3 minutos.

Extração Chelex de DNA a partir de saliva de Swabs orais, papel de filtro ou gaze, bordas de envelopes e selos e filtros de cigarro

Para remover os inibidores de PCR resultantes da extração com Chelex, deve-se transferir cuidadosamente o sobrenadante (porção contendo o DNA) para a parte superior de um microcon 100. Caso o volume fique abaixo de 2mL, completar com TE.

Antes de usar a amostra para PCR, é necessário agitar em vortex por 10s.e centrifugar a 14.000rpm por 4 minutos.

Extração inorgânica de DNA a partir de sangue – método da dessalinização

Esse procedimento garante uma boa extração, com DNA suficiente para o RFLP. É preciso, no entanto, se assegurar de que o número de lavagens foi suficiente para retirar o sal das amostras, prejudicando a corrida em gel de agarose.

PROTÓCOLOS DE TIPAGEM DE DNA PARA IDENTIFICAÇÃO HUMANA E PATERNIDADE:

Tipagem de DNA pelo método de RFLP

Para o processo de precipitação, o protocolo inicial sugere duas horas no freezer; no caso, deixou-se no freezer (-20°C) por pelo menos 6 horas. Esse procedimento garante a obtenção de melhores resultados com uma maior quantidade de DNA. O ideal é que se deixe precipitando até o dia seguinte.

Na montagem do gel, deve-se aguardar a solidificação por cerca de 1 hora; menos tempo que isso pode comprometer a corrida e a correta migração dos alelos.

A eletroforese ocorreu a 50 volts, durante 19 horas. O protocolo sugere 18 horas, porém com o acréscimo de 1 hora na duração da corrida tem-se uma melhor definição das bandas de maior peso molecular, principalmente nos marcadores. Nos casos

em que um dos indivíduos apresentar apenas uma banda, para determinada sonda, deve-se considerar a possibilidade de ter perdido a outra na corrida. Portanto não se deve confiar isoladamente, no resultado dessa sonda se não houver confirmação do mesmo resultado em pelo menos outras três sondas.

Na montagem do *transfer*, ao isolar as laterais com *parafilme*, este deve ficar aproximadamente 0,5cm sobre os papéis 3MM, o que garante uma maior segurança na transferência, impedindo que o tampão passe entre a membrana e o papel 3MM.

Para se assegurar do nivelamento da superfície, durante a transferência do DNA do gel para a membrana, deve-se apoiar um peso de cerca de 2 a 3Kg em cima do berço (suporte do gel que pode ser utilizado para nivelar os papéis sobre o transfer). Esse peso não deve ser menor pois implicará uma transferência parcial e a membrana terá uma marcação fraca nos filmes de raio-x.

A solução de pré-hibridização foi retirada da geladeira e aquecida em banho-maria a 55°C. Logo após, foi centrifugada por 5 minutos. e colocada em banho-maria por mais 5 minutos. antes de ser usada. Esse pré-aquecimento é necessário para uma melhor hibridização. A pré-hibridização mostrou-se tão importante quanto a própria hibridização. A maioria dos problemas acontece nessa fase. Quando os filmes de raio-x começam a ficar manchados, a primeira alternativa deve ser trocar a solução de pré-hibridização, pois esse procedimento deve solucionar o problema. Uma solução de sonda (hibridização) dificilmente provoca mancha; antes que isso ocorra o sinal se enfraquece, fazendo necessário a troca da solução.

Ao se retirar a solução de pré-hibridização e a de hibridização da geladeira, estas podem estar cristalizadas. Nesse caso, o tempo de aquecimento no banho-maria deve ser maior que o recomendado, para que a solução se torne homogênea.

Deve-se deixar a pré-hibridização por 1 hora. Uma boa pré-hibridização é muito importante; se os filmes de raios-x começarem a ficar fracos deve-se aumentar o tempo de pré-hibridização para solucionar o problema, mas se o problema não se resolve, deve-se trocar a solução de hibridização. Os cuidados com a sonda devem ser iguais aos da solução de pré-hibridização.

Para se otimizar o tempo do exame, deve-se hibridizar 2 membranas ao mesmo tempo, no mesmo tubo. Nunca se deve hibridizar mais que 2 membranas de cada vez.

Outra alternativa para se diminuir o tempo é fazer 4 extrações de DNA dos mesmos indivíduos analisados, no mesmo gel, dividir a membrana após o *transfer* e fazer 4 hibridizações ao mesmo tempo, em 4 tubos diferentes, com pequenas membranas. Isso reduz o tempo do exame em 5 dias. Não se deve deixar a membrana secar em nenhum momento dos procedimentos.

Ao aquecer a solução de *Strip* no microondas deve-se observar quando a solução começar a ficar turva. Desligar o forno nesse momento e esperar alguns minutos antes de retirar o frasco, pois se este for agitado enquanto estiver turvo a solução pode estourar.

Muitos *loci* de VNTR usados para teste de identidade humana exibem mais de 100 tipos em uma população. De fato, um grau tão alto de polimorfismo é exibido que a tipagem de cinco a oito marcadores é suficiente para diferenciar a maioria, se não todos, os indivíduos não-relacionados. Em outras palavras, múltiplos *loci* de perfis de VNTR são extremamente raros. A tipagem de *loci* de VNTR, atualmente, é o melhor método para eliminar a suspeita sobre uma pessoa falsamente associada a uma amostra-evidência. Além disso, a tipagem pode ser completada, às vezes, com menos de 50ng de DNA genômico de alto peso molecular.

Um fator que pode prejudicar a efetividade da análise por RFLP é a disponibilidade de *loci* de VNTR bem caracterizados. Os *loci* de VNTR devem ser compatíveis com a enzima de restrição utilizada para a análise por RFLP. A compatibilidade se refere à repetição da seqüência da enzima de restrição usada na análise química. Os *loci* dos alelos devem, geralmente, ter uma variedade de tamanho entre 500bp e 20.000bp. Os *loci* mais tipados são D1S7, D2S44, D4S139, D5S110, D10S28 e D17S79, sendo esses os que foram utilizados para testar as amostras estudadas (figura 19).

O protocolo de tipagem por PCR foi realizado de acordo com os protocolos fornecidos pela PROMEGA. Não foram feitas alterações nesses protocolos por se tratar de Kits já padronizados e validados, apresentando resultados adequados. Foram utilizados os protocolos de tipagem pelo PCR tanto do método da Prata quanto o *Powerplex16* para

seqüenciador. Em casos onde a quantidade de DNA era pequena e de baixa qualidade, não foi possível realizar o RFLP das amostras. Nesses casos, o PCR por prata foi a segunda opção. Em outros casos, mesmo pela prata não foi possível se obter um bom resultado com o DNA extraído, então a alternativa foi a utilização do seqüenciador e *Powerplex16*, que apresentou uma sensibilidade muito maior para amostras pequenas.

O PCR demonstrou ser uma estratégia alternativa para a tipagem por RFLP no estudo de DNA forense; nesses casos, as amostras normalmente não são abundantes, ou no processo de extração não se obtém um DNA de qualidade necessária para o RFLP. Porém, é preciso tomar cuidado para que não haja contaminação de uma amostra para outra, já que nessa técnica, o risco é muito grande. Para que isso não aconteça, deve-se utilizar somente ponteiras esterilizadas. A reação deve ser montada somente em capela de fluxo laminar; assim como a sala onde as amostras são manipuladas para análise por PCR, deve ser separada da sala de preparo das amostras para RFLP e da sala onde se faz a extração.

Os *loci* de STR foram estudados pela técnica de PCR. Essa técnica é especialmente útil por oferecer maior sensibilidade de detecção e maior especificidade, com o benefício de ser mais veloz que a técnica do RFLP. Essa maior especificidade permite diferenciar alelos de pequeno número de bases de diferença, enquanto o RFLP não permite uma definição tão precisa.

Os STRs podem ser utilizados na análise de investigação de paternidade, mas não possuem o polimorfismo dos *loci* de minissatélites, devendo-se analisar o maior número possível de *loci*. Os STRs são valiosos para o estudo de casos onde há necessidade de análise de ossos, dentes, fios de cabelo, manchas de sangue e outros materiais alternativos ao sangue ou sêmen. Nesses casos, como a quantidade de DNA não é suficiente pra um RFLP, a melhor alternativa realmente é o PCR de STRs.

Os *loci*, tanto de VNTR quanto os de STR, devem ser analisados em cada laboratório para conhecimento da freqüência alélica, em pelo menos 100 indivíduos não-relacionados. Cerca de 40 STRs, entre os milhares existentes, são utilizados na prática forense. Eles apresentam um grau maior de sensibilidade, apesar de menor precisão (Budowle 2000).

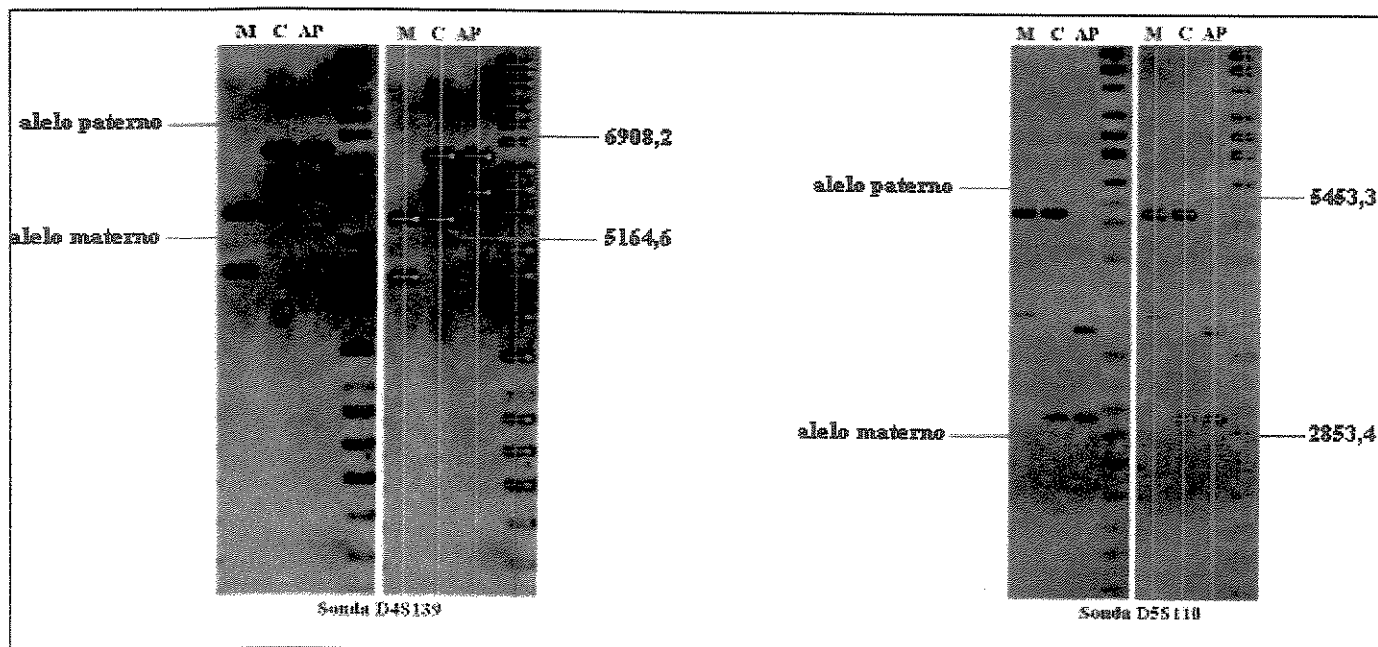


Figura 19 - Resultados de uma tipagem completa de dois *loci*, D4S139 e D5S110 feitas pelo método de RFLP. M – Mãe; C – Filho; AP – Suposto Pai.

Quantificação do DNA

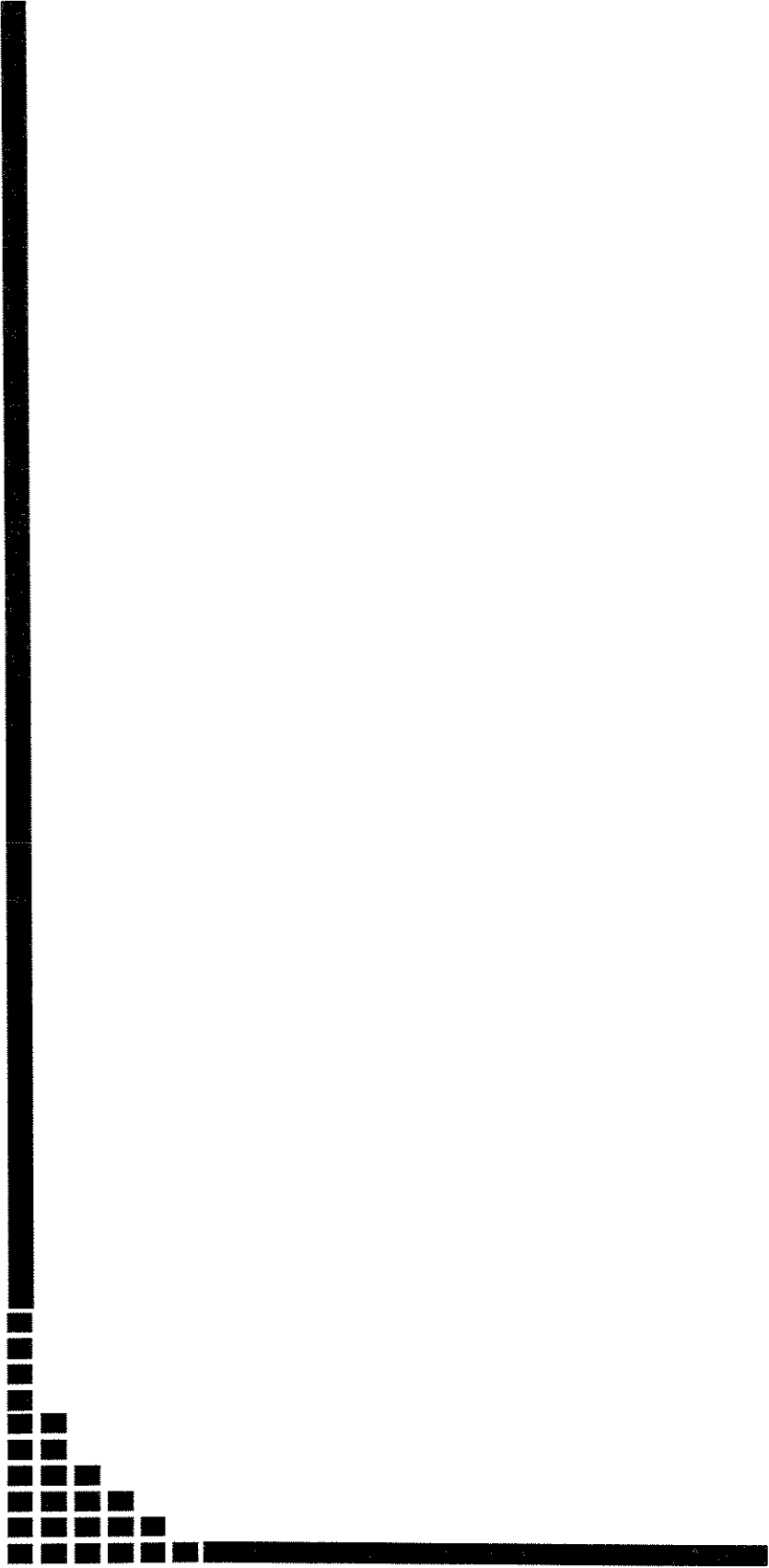
É recomendável que se determine a quantidade de DNA, para aprimorar a qualidade dos resultados durante a tipagem do DNA, principalmente para o PCR (*polymerase chain reaction*) pois uma amostra que não se pode quantificar provavelmente não poderá também ser tipado. Em alguns casos foi possível obter uma boa amplificação de amostras pequenas que não puderam ser quantificadas. No entanto, esses casos são exceções e não podem ser tomados como padrão para se definir pela não realização da quantificação.

A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria ou por análises em gel de agarose corado com brometo de etídio. A espectrofotometria mede a quantidade de DNA solúvel em uma amostra, por absorção a 260 nm. Outra alternativa é submeter a amostra à eletroforese, em gel de agarose; após esse processo, o DNA é exposto a um corante como o brometo de etídio. Em seguida, sob luz UV, o complexo brometo de

etidium/DNA irá fluorescer. Para estimar a quantidade de DNA, a intensidade da fluorescência da amostra desconhecida é comparada com as amostras de controle de concentração conhecidas: geralmente de 1 a 5 ng (Budowle, 2000). Optou-se por padronizar a leitura em espectrofotômetro para todas as amostras.

Gel de agarose corado com brometo de etídio e espectrofotometria são incapazes de distinguir entre DNA genômico humano e não-humano, e com isso a fração de DNA utilizável para uma análise química especificamente humana pode ser superestimada. Por outro lado, DNAs em fita única resultantes de extração Chelex ou DNA danificado pelo meio ambiente ficaram pouco corados com uso de brometo de etídio, fazendo com que, a quantidade de DNA de interesse seja subestimada. Além disso, o gel de brometo de etídio possui pouca sensibilidade para detectar menos de 1-5 ng de DNA. Assim sendo, uma amostra que contém DNA suficiente para uma amplificação PCR pode estar abaixo do limiar de detecção da análise química quantitativa (Budowle, 2000). Desenvolveu-se então um método simples para a quantificação do DNA genômico especificamente humano com base em slot blot. Como é uma técnica baseada na hibridização, este método é mais efetivo (devido a sua insensibilidade para com o DNA não-humano contaminante) do que o uso de géis corados com brometo de etídio, para estimar a quantidade apropriada de DNA humano para PCR. O procedimento *slot blot* pode ser completado em um dia de trabalho, permitindo a análise simultânea de um grande número de amostras; pode também detectar quantidades subanalíticas de DNA humano, sendo desenvolvido para usar tanto reagentes para detecção radioativa como não radioativa. Para os não radioativos, a detecção quimiluminescente é empregada e envolve emissão de luz por decomposição do *Lumi-Phos Plus*®. O substrato de *Lumi-Phos Plus*® gera uma emissão de luz contínua por mais de 48 horas, habilitando análises químicas baseadas em quimiluminescência a se adequarem convenientemente à maioria dos protocolos e rotinas dos laboratórios (Budowle, 2000).

Em nossos procedimentos não achamos necessária a quantificação do DNA para se realizar a paternidade, esta se faz necessária apenas em casos forenses.



CONCLUSÃO

Os procedimentos de coleta se mostraram adequados para os dois métodos, sendo que a coleta de sangue em tubo com EDTA foi o procedimento que garantiu uma quantidade maior e melhor de DNA após a extração.

A coleta em FTA garante a possibilidade de se armazenar o DNA de forma segura e fácil, por longos períodos de tempo, sendo possível extrair DNA suficiente para se usado nos dois métodos.

A coleta de saliva garantiu uma boa extração para o método de PCR, mas para o RFLP não se mostrou viável.

Sendo assim a coleta de sangue garante um melhor exame e a possibilidade de se usar qualquer método, enquanto que a coleta da saliva tem como vantagem ser um método menos invasivo.

Embora seja possível extrair o DNA de qualquer um dos materiais apresentados, sugerimos uma ordem de preferência:

1. Sangue
2. FTA
3. Saliva
4. Líquidos corpóreos
5. Ossos
6. Dentes
7. Cabelo

Avaliação do DNA extraído quanto ao método de tipagem

Tabela 4 – Avaliação do DNA extraído quanto ao método de tipagem.

Material estudado	Método de tipagem	
	RFLP	PCR
Sangue – Fenol	Adequado	Adequado
Sangue – Kits GENTRA E WIZARD	Adequado	Adequado
Cabelo	Inadequado	Adequado*
Saliva impregnada no selo ou na borda de envelopes	Inadequado	Adequado
Papel FTA para manchas de sangue ou saliva	Adequado*	Adequado*
Amostras de escova de dentes (cerdas)	Inadequado	Adequado
Amostras coletadas de barbeadores	Inadequado	Adequado
Amostras de sangue coagulado (GENTRA ou WIZARD)	Adequado	Adequado
Amostras de sangue coagulado (Fenol)	Adequado	Adequado
Swab bucal	Inadequado	Adequado
Manchas de líquido amniótico e urina	Inadequado	Adequado
Líquido amniótico e urina	Inadequado	Adequado
Células espermáticas e células vaginais	Adequado	Adequado
Filtros de cigarro	Inadequado	Adequado
Amostras de osso	Inadequado	Adequado
Amostras de dentes	Inadequado	Adequado*
Amostras de sangue ou manchas de sangue (Chelex)	Inadequado	Adequado
Manchas contendo sêmen(Chelex)	Inadequado	Adequado
Saliva de Swabs orais, papel de filtro ou gaze (Chelex)	Inadequado	Adequado
Bordas de envelopes ou selos (Chelex)	Inadequado	Adequado
Filtros de cigarros (Chelex)	Inadequado	Adequado
Sangue – método da dessalinização	Adequado	Adequado

*Cabelo – Seguindo-se esse protocolo, o DNA extraído nem sempre mostrou-se adequado para análises de paternidade por qualquer método. A extração não funcionou em 50% dos casos, sendo necessário repeti-la. Quanto ao método de tipagem, o DNA extraído não é adequado para tipagem por RFLP; pelo método de PCR, em 50% dos casos foi possível realizar a análise.

*Papel FTA para manchas de sangue ou saliva – Seguindo-se esse protocolo e realizando a coleta, secagem e armazenamento adequado das amostras, o DNA extraído mostrou ser adequado para análises de paternidade por qualquer método de tipagem, sendo RFLP ou PCR.

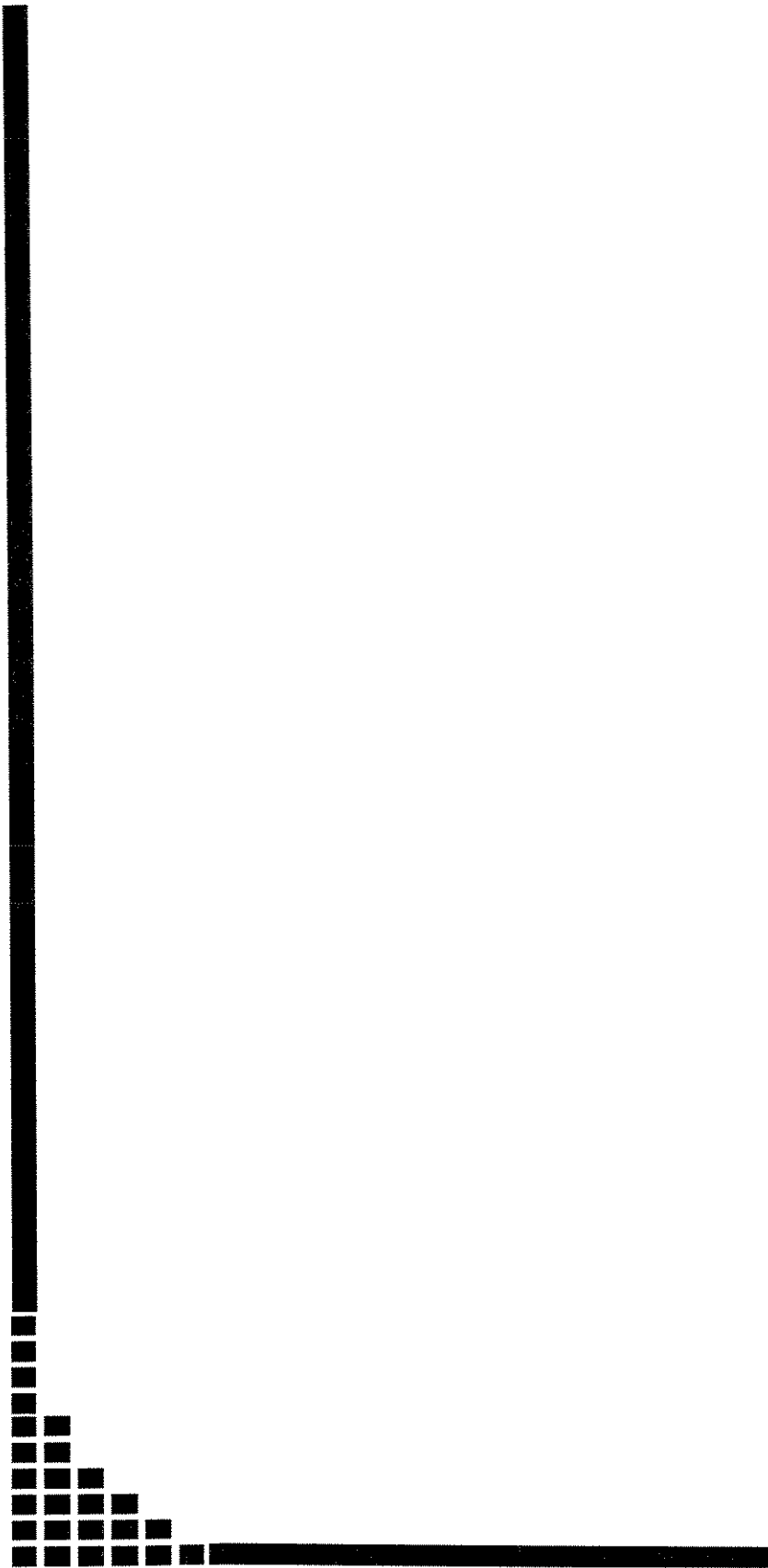
*Amostras de dentes – O DNA extraído mostrou ser adequado para análises de paternidade pelo método PCR, e não pelo método RFLP. As chances de se conseguir DNA de uma amostra de dente variam de acordo com o tipo de dente extraído. A ordem de preferência recomendada para se tentar extrair o DNA é a seguinte:

1. Molar não restaurado
2. Pré-molar não restaurado
3. Canino não restaurado
4. Dentes anteriores não restaurados
5. Molar restaurado
6. Pré-molar restaurado
7. Canino restaurado
8. Dentes anteriores restaurados

Dos métodos de tipagem analisados (tabela 4) (RFLP ou PCR) o RFLP foi considerado o melhor em relação a segurança, precisão, nitidez dos resultados e facilidade na solução de problemas. O método de PCR, porém, foi considerado como única alternativa para as amostras biológicas em que não se consegue um DNA adequado para o RFLP.

Portanto, recomendamos que todo laboratório que se propuser a realizar investigação de paternidade, tenha à disposição os dois métodos, para que o exame seja realizado pelo mais indicado, de acordo com a amostra apresentada.

Os métodos apresentados foram os que tiveram maior desempenho quanto ao tempo de execução e custos. Essa avaliação foi feita considerando em primeiro lugar a qualidade dos resultados. Portanto, nos métodos de extração, apresentamos protocolos que reduziram significativamente o tempo de execução embora tenham custos maiores (Wizard), mas que apresentam um melhor produto (DNA) extraído. Também, nos métodos de tipagem, seguindo-se os protocolos propostos temos significativa redução no tempo e principalmente custos em relação aos protocolos existentes na literatura.



*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

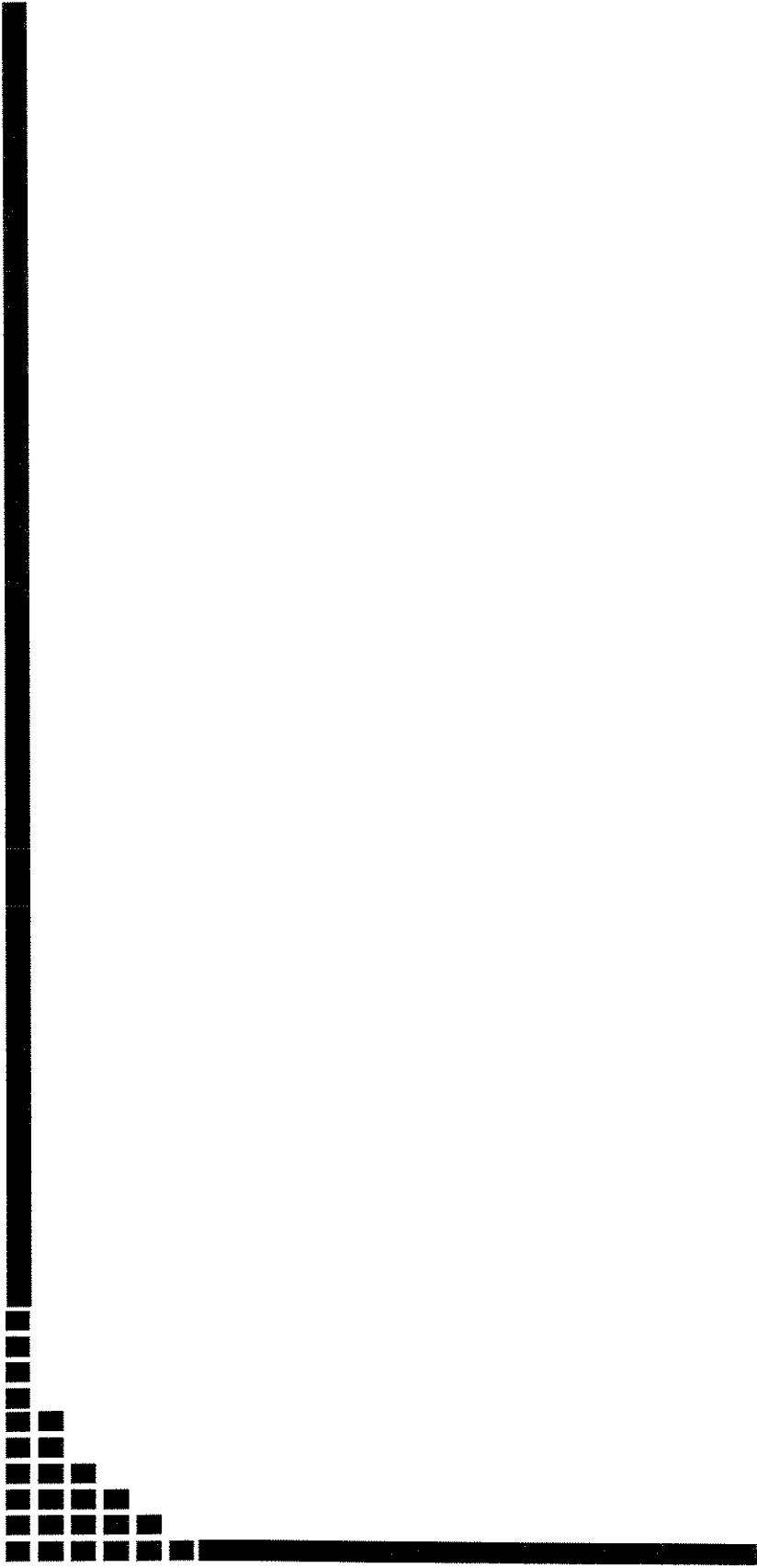
- Beiguelman, B.** (1995) Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- Budowle, B, Smith, J, Moretti, T e DiZinno, J.** (2000) DNA Typing protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis. Eaton Publishing, Natick.
- Delgado, LEM.** (1998) Probabilidade de paternidade: uma proposta metodológica para seu cálculo. Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Farah, SB.** (1997) DNA: segredos e mistérios. Sarvier, São Paulo.
- Ferreira, ME, Grattapaglia, D.** (1995) Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA – CENARGEN, Brasília.
- Hausmann, R.** (1997) História da biologia molecular. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- Herrmann, B, Hummel S.** (1994) Ancient DNA : recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens. Springer, New York.
- Jeffreys, AJ, Brookfield, JFY, Someonoff, R.** (1985b) Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature. v.317. n.31. p.818-819.
- Jeffreys, AJ, Wilson, V e Thein, SL.** (1985a) Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. Nature. v. 314. n.7. p.67-73.
- Jobim, LF, Jobim, MR, Brenner, C.** (1999) Identificação humana pelo DNA. Sagra Luzzatto, Porto Alegre.
- Lewin, B.** (2000) Genes VII. 7th ed. Oxford Press, United Kingdom.
- Martinez, SM.** (1998) Manipulação genética e direito penal.: IBCCrim, São Paulo.
- Miyajima, F.** (2001) Aspectos fundamentais da validade jurídica das provas em DNA. UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.
- Otto, PG, Otto, PA, Frota-Pessoa, O.** (1998) Genética Humana e Clínica. Editora Roca, São Paulo.

Pena, SDJ. (1995) Pitfalls of paternity testing based solely on PCR analysis of minisatelites and microsatelites. *Am. J. Hum. Genet.* V.56. p.1503-4.

Raskin S. (1998) *Investigação de paternidade: manual prático do DNA.* Juruá, Curitiba.

Simas Filho, F. (1999) *A prova na investigação de paternidade.* Juruá, Curitiba.

Thompson, JA. (1998) Validation of short tandem repeat analysis for the investigation of cases of disputed paternity. *Forensic Sci. Int. Limerick.* v.100. p.1-16.



ANEXOS

Soluções

Foram utilizadas todas as soluções descritas a seguir. Nas soluções que pertencem a Kits comerciais, são citados os Kits a que pertencem, podendo ser encontradas nos catálogos correspondentes. As soluções que foram preparadas no próprio laboratório apresentam o protocolo de preparação. As demais soluções são apenas citadas por serem de fácil localização em catálogos de biologia molecular, tais como Promega, Biobrás, Life-codes, GIBCO e Wathman.

✓ Tris-EDTA (TE):

TE 1X - 10mM Tris-HCl pH 8,0

- 1mM EDTA pH 8,0

Pipetar 2,5 ml de Tris-HCl 2M pH 8,0 e 1 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 e completar o volume para 500 ml com água deionizada.

✓ EDTA 0,5M pH 8

Pesar 93.06g de EDTA e dissolver em um pouco de água; acertar o pH para 8.0 com NaOH e completar o volume para 500ml. O soluto só dissolve por completo quando acertar o pH.

✓ EDTA 0.5M pH 7.5

✓ Solução A – Triton 100X a 1%, MgCl₂ a 5mM, sacarose a 0,32M (109,5g de sacarose ultra pura/litro) e Tris-HCl a 10mM em pH 8,0.

✓ Solução B - Na₂EDTA a 20mM, NaCl a 20mM e Tris-HCl a 20mM em pH 8,0.

✓ Solução C (preparada apenas no momento do uso) é composta de: 50% da solução B, 50% de SDS 10% e 1mg de Proteinase K (Boehring Mannheim GmbH, Mannheim, Germany).

- ✓ Solução A e B para marcadores de DNA. Embora tenham os mesmos nomes essas duas soluções correspondem ao marcador e fazem parte do pacote da GIBCO.
- ✓ PCIA (Fenol, Clorofórmio e álcool isoamilico) - 25:24:1.
- ✓ Etanol absoluto gelado
- ✓ etanol 70%.
- ✓ fenol (70% Phenol/Water/Chloroform - Applied Biosystems)
- ✓ acetato de sódio 3M em pH 5,5
- ✓ Acetato de Sódio 0.2M
- ✓ Acetato de Sódio 2M
- ✓ Acetato de sódio 0.5M
- ✓ Gel de agarose 0,8%
- ✓ TBE 10X: Tris 1M (*PM=121,14*)
 ácido bórico 0,9 M (*PM=61,83*)
 EDTA 0,01 M (*PM=372,2*)
 Pesar 121,14g de Tris e 55,64g de ácido bórico. Pipetar 20 ml de EDTA 0,5M.
 Dissolver para 1000 ml de água deionizada.
- ✓ Água Milli-Q
- ✓ Água destilada e deionizada estéril
- ✓ RBC Lysis Solution – Esta solução faz parte do Kit GENTRA e corresponde à mesma solução “Cell Lysis Solution” do kit WIZARD.
- ✓ Cell Lysis Solution - Esta solução faz parte do Kit GENTRA e corresponde à mesma solução “Nuclei Lysis Solution” do kit WIZARD.
- ✓ Protein Precipitation Solution
- ✓ Cell Lysis buffer (Sacarose 0.32 M; Tris-HCl 10mM pH 7.6; MgCl₂ 5mM e Triton X-100 1%).
- ✓ Protein digestion buffer (Tris-HCl 10mM pH 8.0; NaCl 10mM; e EDTA 10mM).

- ✓ Isopropanol Merck 100%
- ✓ Reaction Buffer 10x (GIBCO)
- ✓ Enzima HaeIII (GIBCO)
- ✓ Transfer Wash Solution (GIBCO)
- ✓ DNA Hidratation Solution (GENTRA ou WIZARD).
- ✓ SSC 20X: Cloreto de sódio 3,0 M ($PM=58,44$)
Citrato de sódio 0,3 M ($PM=294,10$)

Pesar 175,32 g de cloreto de sódio e 88,23 g de citrato de sódio dihidratado e dissolver para 1000ml de água deionizada.

- ✓ SSC 1x; 2X e 10X
- ✓ Proteinase K (20mg/ml)
- ✓ Proteinase K (10mg/ml).
- ✓ escalpe estéril
- ✓ Bisturi estéril
- ✓ Swab de algodão estéril
- ✓ Cartões FTA
- ✓ FTA purification reagent (GIBCO)
- ✓ Tampão fosfato (PBS)
- ✓ NaOH 50mM
- ✓ NaOH 10 N ($PM=40$)

Pesar 200g de hidróxido de sódio e dissolver para 500 ml de água deionizada.

Armazenar em frasco plástico.

✓ TrisHCl 2M pH8

✓ Tris-HCl 2M pH 7,5

Pesar 121,14 g de Tris e dissolver em 300 ml de água deionizada. Acertar o pH para 7,5 ou 8,0 com ácido clorídrico concentrado e completar volume para 500 ml.

✓ TNE (Tris/EDTA/NaCl)

✓ Sarcosil 20%

✓ DTT(ditiotreitol) 0.39M

✓ DTT (ditiotreitol) 1.0 M

✓ Nitrogênio líquido

✓ Brometo de etídio (0,5µg/ml)

O brometo de etídio utilizado (na concentração 0,5µg/ml) foi feito a partir de 5µl da solução estoque (a 10mg/ml) diluída em 100ml de água Milli-Q.

✓ oxalato de amônia saturada

✓ Centricon30

✓ Microcom 100

✓ Chelex 100 - 5%

✓ Chelex 100 - 20%

✓ Sperm Wash buffer

✓ tampão de extração

✓ Espermidina (GIBCO)

✓ K562 (GIBCO)

✓ Azul de Bromo-fenol

✓ Agarose

✓ NaCl 5M (PM=58,44)

Pesar 292,20 g de cloreto de sódio e dissolver para 1000ml de água deionizada.

✓ Papel 3MM

✓ Membrana de náilon

✓ Parafilm

✓ Papel absorvente

✓ Filme de Raio-X

- ✓ Solução de Pré-hibridização (GIBCO)
- ✓ Sondas (GIBCO; LIFE CODES; PROMEGA)
- ✓ LUMI-PHOS PLUS
- ✓ Tween 20 (MERCK)
- ✓ Wash Buffer (Gibco BRL) – 1,0x – 50ml para volume final de 500ml
- ✓ Wash Buffer – 0,5x – 25ml para volume final de 500ml
- ✓ Final Wash – 1,0x – 50ml para volume final de 500ml
- ✓ SOLUÇÃO DE DESNATURAÇÃO

0,5M NaOH

1,5M NaCl

35 ml de NaOH 10 N

210 ml de NaCl 5M

para 700 ml de água deionizada.

- ✓ SOLUÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO

0,5M TRIS-HCl pH 7,5

1,5M NaCl

175 ml de TRIS-HCl 2M pH 7,5

210 ml de NaCl 5M

para 700 ml de água deionizada.

- ✓ TRANSFER WASH SOLUTION

0,2M TRIS-HCl pH 7,5

✓ SSC 2X

50 ml de TRIS-HCl 2M pH 7,5
50 ml de SSC 20X
para 500 ml de água deionizada.

✓ SOLUÇÃO DE STRIP

10 mM TRIS-HCl pH 7,5
1mM EDTA
2.5ml Tween 20
2,5ml TRIS-HCl pH 7,5 2M
1ml EDTA 0.5M e 2,5ml
Tween 20
para 500ml de água Milli-Q.

✓ SOLUÇÃO DE PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO

25ml sol. de hibridização (GIBCO) p/ cada tubo do forno.

Obs.: Centrifugar 5 min. Passar para o tubo novo e descartar o tubo com precipitado.

✓ HIBRIDIZAÇÃO (SONDA)

25ml sol. de hibridização (GIBCO) p/ cada tubo do forno.

Obs.: Centrifugar 5 min. Passar para o tubo novo e descartar o tubo com precipitado.

Adicionar 25µl da sonda + 15µl da sonda do marcador (centrifugar os tubos antes de aliquotar).

PROCESSO DE INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE EXP /

DATA DO EXAME / /

ENTREGA LAUDO / /

P A I	Alegado Pai _____	POL. BOA DIREITO	IMPRESSÃO DIGITAL
	Rg _____ cutis _____ idade _____ anos		
	Pai menor de 21 anos obrigatório preenchimento no verso		

M A E	Mãe _____	POL. BOA DIREITO	IMPRESSÃO DIGITAL
	Rg _____ cutis _____ idade _____ anos		
	Mãe menor de 21 anos obrigatório preenchimento no verso		

F I L H O	Suposto(a) Filho(a) _____	POL. DIREITO	IMPRESSÃO DIGITAL
	Nº doc. _____ cutis _____ idade _____		

EU, _____ declaro ser o(a) responsável legal do(a) menor acima citado e autorizo a retirada de amostras de sangue ou outro material biológico para exame de investigação de paternidade.

Assinatura do responsável: _____ RG: _____

- INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DOS ENVOLVIDOS** (positivo assinalar S, negativo assinalar N) () Caso judicial?
- | | | |
|---------------------------|--------------------------------------------------|----------|
| () MÁ FORMAÇÃO CONGÊNITA | () CONSANGÜINIDADE (PARENTESCO ENTRE PAI E MÃE) | () PCR |
| () TRANSPLANTE DE MEDULA | () TRANSFUSÃO DE SANGUE NOS ÚLTIMOS 90 DIAS | () VNTR |

OBSERVAÇÃO

Por estarem de acordo as partes interessadas assinam o presente instrumento, declarando estarem cientes das informações contidas nessa ficha e de todas as implicações legais provenientes de informações incorretas ou falsas na realização desse exame.

X _____
ALEGADO PAI

X _____
MÃE

X _____
ASSINATURA DA COLETORA

_____ - coren _____

Campo destinado ao carimbo do Laboratório Coletor com CNPJ e assinatura

