

KÁTIA SOUZA CARVALHO

**“INFLUÊNCIA DO FORMOL UTILIZADO PARA CONSERVAÇÃO DE
CADÁVERES NA OBTENÇÃO DE DNA NUCLEAR EM TECIDO
MUSCULAR”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Bucodental, com área de concentração em Odontologia Legal e Deontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Darcy de Oliveira Tosello.

PIRACICABA

2009

*FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA*
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C253i Carvalho, Katia Souza.
Influência do formol utilizado para conservação de cadáveres
na obtenção de DNA nuclear em tecido muscular. / Katia Souza
Carvalho. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Darcy de Oliveira Tosello.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

**1. Genética. I. Tosello, Darcy de Oliveira. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.**

(mg/fop)

**Título em Inglês: Influence of formalin used for preservation of cadavers in
obtaining nuclear DNA in muscle tissue**

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Genetics

Área de Concentração: Odontologia Legal e Deontologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Darcy de Oliveira Tosello, Eduardo Daruge, Célio Spadácio

Data da Defesa: 17-02-2009

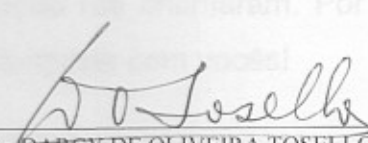
Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



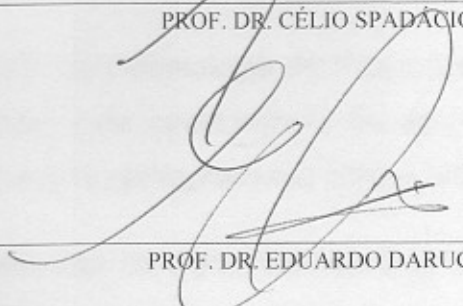
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 17 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata KÁTIA SOUZA CARVALHO aprovada.


PROF^a. DR^a. DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO


PROF. DR. CÉLIO SPADÁCIO


PROF. DR. EDUARDO DARUGE

844606002

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela vida, pelas tantas graças a mim concedidas, e por tanto amor a mim dispensado.

Aos meus filhos por fazerem dos seus sonhos a minha realização. Que, através de minha luta, puderam me dar à oportunidade de concretizar este objetivo, me incentivando a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos, principalmente por tantas vezes abrirem mão de momentos de convívio quando o dever e o estudo me chamaram. Por isso e muito mais sou grata e quero compartilhar esta conquista com vocês!

Aos meus pais, pois foi deles que recebi o dom mais precioso: a vida; pela educação, coragem, amor e determinação para lutar pelos meus ideais.

As minhas irmãs que, apesar da distância, tenho certeza de que estão sempre incentivando e torcendo por mim.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pela oportunidade de aprender e de crescer, acolhendo todos aqueles que desejam aprimorar seus conhecimentos científicos.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Legal e Deontologia, pela dedicada atenção e apoio para a nossa formação científica.

Ao Prof. Dr. Fausto Bérzin, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental, que dedicou sua vida ao ensino, modelando nesse caminho muitas vocações, incentivando o raciocínio do estudante e transformando os nossos ideais em realizações.

A minha querida orientadora Prof. Dra. Darcy de Oliveira Tosello, quero deixar registrado o meu profundo agradecimento, por acreditar e incentivar a

prosseguir a jornada acadêmica. Profissional competente e de grande saber. Exemplo de dedicação, abnegação e disponibilidade. Sempre pronta a ajudar, com seu modo amável e de grande simpatia. Agradeço à oportunidade de concretizar este objetivo.

Ao Dr. Eduardo Daruge Júnior, professor Titular do Curso de Odontologia Legal e Deontologia da UNICAMP/FOP, pelo convívio, amizade e estímulo. Meu profundo agradecimento, não só pela ajuda em realizar este trabalho, mas também pela oportunidade de crescer. Obrigado pela dedicação e renúncia pessoal, por repartir sua experiência de vida e auxílio para trilhar com sabedoria este caminho, que tantas vezes me confortou com palavras sábias, que tantas horas destinou a me ouvir, a me entender, a me aconselhar. A pessoa que me ensinou a arte de saber lidar com as situações mais inusitadas sem perder o bom-humor, tornando mais leve e saudável nossa passagem por essa vida. Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

Ao Prof. Dr. Eduardo Daruge, não poderia deixar de registrar os meus agradecimentos pelas lições de saber. Admiro-te pelo seu empenho em formar futuros mestres e pesquisadores, pela arte de fazer pesquisa independente de condições estruturais e materiais. Hoje me espelho em ti, buscando refletir todos os valores e aprendizados que me foram concedidos durante a convivência contigo, baseados sempre no mais nobre dos sentimentos, a paixão de ensinar.

Ao Prof. Dr. Luiz Franceschini Júnior, agradeço pelas constantes correções, com suas sugestões valiosas. Mestre da arte do ensino, você é a reunião em um único ser humano, dos sentimentos mais nobres, como o amor ao próximo, a solidariedade, a bondade e a compaixão.

Ao Prof. Dr. Luís Renato da Silveira Costa, médico do Trabalho e Especialista em Genética Forense e Responsável Técnico pelo Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil do Espírito Santo, agradeço por acreditar e incentivar a prosseguir esta minha jornada, fossem quais fossem os obstáculos e

ensinando-me que é preciso acreditar nos ideais. Grande incentivador e responsável direto por todas as minhas conquistas profissionais, desde o mestrado na UNICAMP, até a minha efetivação na área acadêmica. Sou grata pelo auxílio e pela condição oferecida para a realização dos exames de DNA. Com certeza, sem a sua ajuda esse sonho jamais seria possível. Parabéns por ser um profissional competente e de grande saber, você sempre será para mim um exemplo de dedicação, abnegação e disponibilidade.

Ao Dr. Emerson Gonçalves da Rocha, delegado de Polícia Civil, Superintendente de Polícia Técnica Científica do Estado do Espírito Santo, pela sua grande simpatia, carinho, eficiência de seu trabalho, sempre pronto a nos ajudar. Meu grande apreço, admiração e sinceros agradecimentos pelo apoio e colaboração deste trabalho, pela condição oferecida para a realização da interpretação dos dados coletados, provando que um trabalho deste tipo, resulta não de um esforço individual, e sim, de um somatório de forças e de intenções.

A Célia Regina Manesco, pelo carinho, simpatia e ajuda inestimável prestada durante o curso através da eficiência de seu trabalho e demonstração ao longo desta caminhada.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação da FOP-Unicamp, pela convivência saudável e feliz durante todo o curso.

A minha amiga Patrícia Bitencourt da Rocha, a quem eu devo todas as minhas alegrias e conquistas vividas em Piracicaba. Sei que Deus te colocou na minha vida no momento em que mais precisei, veio como uma representante dele. Você sempre estará presente eternamente na minha memória e no meu coração. Aprendi que o valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Á Bibliotecária da FOP/UNICAMP Marilene Girello, pela confecção da ficha catalográfica.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, sem exceção, pela amabilidade e atenção com que sempre me trataram.

A todos aqueles que contribuíram para o êxito deste trabalho, o meu profundo sentimento de gratidão.

“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos
sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de
que podemos ser interrompidos antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda um passo de
dança,
do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro”

Fernando Sabino

RESUMO

Com os avanços tecnológicos e científicos, bem como mudanças comportamentais no meio social, tornou-se comum a utilização de exames de DNA para fins criminais e/ou para esclarecer a paternidade, sendo que a ciência e a tecnologia trabalhando juntas possibilitaram que esses exames pudessem ser realizados tanto em pessoas vivas quanto em cadáveres nos mais variados estados de conservação. A solução de fixação para o tecido humano mais utilizado no meio científico e acadêmico, seja para estudo e pesquisa, seja para manutenção da integridade corporal do cadáver é sem dúvida o formaldeído. Entretanto, a ação do formol sobre o material genético humano (DNA) gera muitas controvérsias, havendo linhas de pesquisa científica que defendem a não interferência do formol sobre o DNA e as que afirmam que a fixação de cadáveres com formaldeído pode causar a degradação do material genético. A presente pesquisa propôs o estudo do tema na tentativa de colaborar com a comunidade científica e incentivar outros estudos para que, num futuro próximo, o formaldeído possa ser utilizado sem restrições e/ou dúvidas. A análise de perfis genéticos de DNA (ácido desoxirribonucléico) afetou de forma positiva a vida de milhares de pessoas, por se constituir no substrato responsável pela transmissão dos caracteres hereditários e principalmente por ser único em cada indivíduo (exceto em gêmeos univitelinos) possui alto grau de confiabilidade. No que tange à identificação humana, o exame de DNA assume papel preponderante quando esta não é possível pelas técnicas datiloscópicas ou antropológicas, situação rotineiramente verificada nos Serviços Médicos Legais quando do recebimento de corpos em estado adiantado de decomposição ou que não apresentem sinais antropológicos característicos e passíveis de serem válidos para uma identificação segura. A utilização de formol, como substância química fixadora, em corpos nas condições anteriormente descritas, segundo alguns autores, pode dificultar a obtenção futura de material genômico (DNA). Outros pesquisadores

acenam com a possibilidade de interferência de pequena monta, o que não dificultaria as análises de DNA. Raros são os estudos publicados e raríssimas as avaliações experimentais sobre o tema. Considerando que os exames de DNA tem se tornado cada dia mais freqüentes e mais acessíveis às pessoas e ao poder público, entendemos como importante o desenvolvimento de uma pesquisa que possa estabelecer parâmetros e rotinas a serem adotadas quando se busca obter DNA em tecidos formolizados previamente. Neste trabalho foi proposto analisar a ação do formaldeído nas concentrações de 5%, 10% e 20%, sobre tecido muscular humano e seus efeitos na degradação do DNA nuclear e verificar a validade de exames de perfis genéticos de DNA em cadáveres submetidos à conservação através da técnica da formalização. O grupo de estudo foi constituído de 40 (quarenta) cadáveres não identificados. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a fixação para tecido humano mais usado universalmente na conservação de cadáveres, no meio científico, jurídico e acadêmico é o formaldeído ou aldeído fórmico na concentração de 10%. No entanto, de acordo com os resultados obtidos concluimos que o fixador mais adequado é o formol a 5%, devido a sua ação eficaz e por apresentar uma mínima degradação do DNA. Todas as amostras fixadas com 5% de formol foram amplificadas e a validação dos alelos foi realizada com relativa facilidade. Já as amostras formolizadas à 10% e 20% apresentaram a degradação do DNA em 100% (40) das amostras estudadas.

Palavras-chave: genética, DNA, formol.

ABSTRACT

With the new scientific and technological advances, as well as behavioral and social changes, it is becoming increasingly common the use of deoxyribonucleic acid (DNA) analysis in a criminal setting and paternity identification. Science and technology work together to maximize its use in dead and living human tissue in different degrees of conservation. Formaldehyde is the fixation solution most commonly used in academic and scientific settings, either for research purpose or cadaver preservation. However, some authors suggest that fixation of human tissue with formalhyde can cause disintegration of DNA and its use and effect on DNA has been the subject of much controversy. The objective of this study is to evaluate the effects of formalhyde on the DNA chain and collaborate with the scientific community to promote the unrestricted use of formalhyde in the fixation of human tissue. The analysis of DNA genetic profile had a positive impact in the lives of millions of people. DNA provides the vehicle for the transmission of hereditary characteristics unique for each individual and for this reason is a very reliable tool for human identification. DNA analysis has a particularly important role when identification is not possible by dactyloscopic and anthropologic techniques. This is a common situation encountered in “Servicos Medicos Legais” particularly in advanced decomposed cadavers or when reliable anthropologic characteristics are not available. The use of formalhydeide, as the fixation solution, in the above conditions, according to some authors, can interfere with future DNA analysis. Others believe that the interference of the formalhyde in the DNA analysis is minimal. There are few reports of experimental research in the literature addressing this topic. Taking in consideration that increasing use of DNA analysis and accessibility to general public as well as governmental institutions, we understand the importance of developing a research and establish guidelines for DNA analysis in tissue fixated by formalhydeide. This research propose the analysis of formalhyde in the concentrations of 5%, 10% and 20% in human muscle tissue and its effect in the degradation of nuclear DNA, verifying the validity

of genetic analysis of DNA in cadavers submitted to conservation by techniques using formalhydeide. The study group was consisted of 40 non-identified cadavers. Based on the results we concluded despite formalhydeide 10% being universally used in academic, judicial and scientific settings, the more adequate fixation solution is the formalhydeide 5% due to its efficacy, low cost and simplicity of use. All 40 samples fixated with formalhydeide 10 and 20% present degradation of DNA (100%).

Keywords: genetics, DNA, formaldehyde

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>PCR</i>	Reação em cadeia da polimerase
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>RNA</i>	Ácido ribonucleico
<i>dNTPs</i>	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
<i>FOP</i>	Faculdade de Odontologia de Piracicaba
<i>UNICAMP</i>	Universidade Estadual de Campinas
<i>IML</i>	Instituto-médico-legal
<i>IMLs</i>	Institutos-médico-legais
<i>OMS</i>	Organização Mundial de Saúde
<i>AF</i>	Aldeído Fórmico
<i>RNA</i>	Ácido Ribonucleico
<i>VNTRs</i>	<i>Variable number of tandem repeats</i> ou “número variável de repetições em <i>tandem</i> ”, também denominados de minissatélites
<i>STRs</i>	<i>Short tandem repeats</i> ou “repetições curtas em <i>tandem</i> ”, também denominados de microsatélites

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
3. PROPOSIÇÃO	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
5. RESULTADOS	44
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	62

1. INTRODUÇÃO

Com os avanços tecnológicos e científicos, e também em razão das mudanças comportamentais vivenciadas no meio social, tornou-se freqüente a utilização dos exames de DNA (Ácido desoxirribonucleico), inicialmente para fins de determinação de paternidade cível e mais recentemente como ferramenta de fundamental importância nas investigações criminais.

Auxiliando também na identificação humana, em razão da especificidade e singularidade dos perfis genéticos de DNA, distintos em cada pessoa, o DNA amplia seu leque de oferta. As novas técnicas têm permitido a obtenção de perfis genéticos de DNA a partir de amostras biológicas coletadas em pessoas vivas (amostras ditas “seguras” por possuírem quantidade de DNA capaz de permitir uma análise ampla e adequada) e também a partir de amostras coletadas em cadáveres nos mais variados graus de decomposição (amostras consideradas “inseguras” ou “amostras-vestígio”).

Os novos conhecimentos científicos e a tecnologia atualmente disponível permitiram que essas análises fossem possíveis a partir de todos os tecidos orgânicos, nos mais variados estados de conservação.

Um dos problemas vivenciados pelos Serviços Médico Legais em todo o Brasil em particularmente no Espírito Santo é o recebimento de cadáveres vítimas de morte violenta e que se encontram em adiantado estado de decomposição, o que dificulta sobremaneira a identificação a partir da comparação das impressões digitais (método datiloscópico) ou pela análise e comparação de características antropológicas. Esses corpos são, em grande número, submetidos aos processos de formolização.

A solução mais utilizada para fixação de tecidos humanos, nos meios acadêmicos e científicos, para estudo ou para pesquisa, é, sem sombra de dúvida, o formoldeído conhecido também simplesmente como formol na concentração de

10% (dez por cento). O produto também é usado como desinfectante de salas cirúrgicas.

À temperatura ambiente o aldeído fórmico (AF) é um gás incolor e de odor forte e característico. O aldeído fórmico encontrado no comércio é diluído em água (solução aquosa).

De acordo com Ben-ezra (1990) os aldeídos são compostos químicos resultantes da oxidação parcial dos álcoois. Assim, o álcool metanol, ao perder um átomo de hidrogênio (a perda de hidrogênio aumenta a proporção de oxigênio e, por isso, fala-se em oxidação dos álcoois) dá origem ao aldeído fórmico e o etanol, ao aldeído acético.

Segundo Mies (1998) o formol é o produto mais usado universalmente para conservação de cadáveres, mediante as técnicas de formolização e de embalsamamento, como meio de prevenir e retardar a putrefação.

Koshiba em 1993 definiu a fixação em formol como um passo fundamental no processo de conservação de cadáveres. Ela baseia em manter, de modo definitivo, as estruturas citológicas e histológicas das células e tecidos, ou seja, evita a degradação do material em decorrência de fenômenos autolíticos e permite a realização de inúmeras técnicas citológicas e histopatológicas, assim como, o processo de conservação dos cadáveres.

No entanto, Gusmman em 2007 descreveu que o aldeído fórmico atua como fixador interagindo com os aminoácidos lisina e arginina. Tal fixador não provoca precipitação de proteínas, não preserva gorduras livres, porém fixa lipídeos complexos, provoca leve precipitação de outros constituintes celulares e não é o fixador de eleição para carboidratos.

Cheoker (2002) afirmou que o formol tem a propriedade de degradar o DNA, no seu todo ou parcialmente, na dependência da concentração e do tempo

de exposição (fixação) a que um determinado tecido é submetido. Seus estudos baseiam-se em reações bioquímicas, sem a realização de um estudo propositivo de campo ou experimental. No entanto, assegurou que se faz necessária pesquisa a respeito.

Com relação à ação do formol sobre o material genético humano (DNA), a literatura especializada é silente e em razão disto, o tema ainda gera muitas controvérsias, havendo pesquisadores que defendem a não interferência do formol sobre a molécula do DNA e outros que afirmam exatamente o contrário, no sentido de que o formol é um potencial agente na degradação do DNA, conseqüentemente dificultando futuras análises de perfis genéticos.

Notoriamente, verifica-se que ocorrendo à morte tecidual e havendo necessidade de conservação de tecidos, impõe-se a adoção de um processo de fixação, geralmente obtido a partir da utilização de substâncias químicas conhecidas como fixadores. A fixação tem por objetivo manter as estruturas celulares e teciduais em boas condições, evitando ou retardando o processo natural de degradação decorrente de fenômenos autolíticos.

Em vista a este fato, o presente trabalho buscou determinar a influência do formol utilizado para conservação de cadáveres na obtenção de DNA nuclear em tecido muscular e comparar as diferentes concentrações desse fixador. Buscou-se ainda discutir os aspectos éticos e legais pertinentes ao tema.

Este tema visa à tentativa de colaborar com a comunidade científica mediante uma avaliação experimental, propor-se obter os esclarecimentos necessários e suficientes para a indicação ou contra-indicação do uso desta substância quando da preparação de corpos que poderão ser demandados no futuro, com relação a exames de DNA.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Benecke (1997) citou em sua obra que o avanço da ciência e tecnologia a nível forense teve seu ponto culminante em meados dos anos 80, quando as técnicas de identificação, fundamentadas na análise direta do ácido desoxirribonucleico (DNA), tornaram-se uma das mais poderosas ferramentas para a identificação humana e investigações criminais.

Conforme Kling (1999) muito se passou desde a proposta de Bentham, em 1832, nos Estados Unidos, em empregar a tatuagem como processo de identificação civil. Em tempos mais remotos premidos pela necessidade de identificar seus semelhantes, empregavam-se os mais bárbaros e desumanos processos de identificação.

Ainda este autor afirmou que destituídos de quaisquer recursos científicos, tais “tratamentos” consistiam na marcação com ferro em brasa em indivíduos que houvessem praticado, por exemplo, um delito, ou tratando-se simplesmente de um escravo em fuga. Já neste século, com a descoberta dos antígenos eritrocitários, tornou-se possível a idéia de discriminar indivíduos através de análises sangüíneas, mesmo aqueles que tiveram morte violenta, como por exemplo, vítimas de acidentes aéreos.

Segundo Duarte *et al.* (2001) o primeiro método de utilização da análise do DNA para identificar indivíduos foi desenvolvido em meados da década de 1980 por Sir Alec Jeffreys, da Universidade de Leicester e, apesar do seu enorme poder potencial, houve sérias reservas quanto o seu uso real, pois no início, havia muitas dúvidas quanto à reprodutibilidade e à confiabilidade dos métodos.

Luftig (2001) mencionou que em agosto de 1986, na Inglaterra, um caso criminal envolvendo o estupro e homicídio de duas adolescentes foi solucionado com a determinação da autoria do delito após toda a população masculina de dois vilarejos do condado de Leicester ter contribuído com a doação de amostras de

sangue para confronto com vestígios de sêmen coletados do corpo das vítimas. Estava assim inaugurada uma nova página no emprego da biologia molecular e sua utilização na identificação humana criminal.

Segundo Jobim (2003), o estudo do DNA possibilitou informações sobre a individualidade humana, iluminando a ciência da investigação e da identificação em casos criminais. Uma mudança total na tecnologia aconteceu a seguir, pois o estudo do polimorfismo do DNA substituiu, em curto espaço de tempo, as análises sorológicas dos polimorfismos de proteínas e grupos sangüíneos, até então, usados exclusivamente na área forense.

Para o autor as técnicas de amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) na última década tiveram um enorme progresso. Foram também desenvolvidos novos métodos de extração do DNA do sangue periférico, tecidos, ossos, cabelos, manchas de sangue, material vaginal, entre outros. Citou ainda que essa explosão científica, de vasto potencial de aplicação, necessita de especialistas com formação em biologia molecular na análise forense, pois somente o domínio do conjunto das técnicas permite a perfeita avaliação do DNA em medicina legal.

De acordo com Lewis (2004), o estudo do material genético humano (DNA) é uma área interdisciplinar por excelência, de amplas possibilidades e de profunda dimensão; como nenhuma outra disciplina científica, tendo se tornado de importância fundamental para inúmeros aspectos dos interesses humanos e estando presente na humanidade de diversas maneiras. De fato, as questões genéticas parecem emergir diariamente em nossas vidas.

Alonso *et al.* (2005) relataram que a coleta de amostras para o exame de DNA deve ser realizada logo após a identificação possível pelos médicos-legistas, odonto-legistas e papiloscopistas, mesmo quando esta identificação for positiva, pois pode ser necessário um futuro confronto genético para elucidação de dúvidas com relação a identidade do indivíduo e troca de corpos.

Bezerra (2005) relatou que em um grau tão avançado de carbonização somente é possível identificar com o uso da análise de DNA.

Smara (2006) citou que a tecnologia moderna invadiu tão rapidamente nossa vida que até esquecemos quando foi criada. Já faz vinte anos que Alec Jeffreys, professor da Royal Society Wolfson na Universidade de Leicester, Inglaterra, descobriu o “fingerpriting” genético, ou seja, a importância do DNA como referência para a identificação de indivíduos.

Veríssimo *et al.* 2007 descreveram que o desenvolvimento da biologia molecular e da genética nas últimas décadas permitiu o estabelecimento de um amplo corpo de técnicas aplicadas na investigação biológica que tiveram profunda influência nas pesquisas médicas. Entre esses grandes avanços tecnológicos destaca-se a possibilidade de amplificação de DNA utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Mate (2007) relatou que a identificação pelo DNA afetou a vida de milhares de pessoas no planeta e tem sido utilizado rotineiramente na medicina legal e forense para desvendar crimes, revelar paternidade, identificar vítimas em desastres, catástrofes ou atentados terroristas, e comprovar a clonagem, bem como estudar as mudanças que ocorrem na sequência do DNA.

2.1 Ácido desoxirribonucléico (DNA)

A estrutura da molécula de DNA foi descrita conjuntamente pelo americano James Watson e pelo britânico Francis Crick em 7 de março de 1953, e esta pesquisa lhes valeu o Prêmio Nobel de Fisiologia, em 1962, juntamente com Maurice Wilkins. Watson definiu o ácido desoxirribonucleico (DNA) como sendo uma molécula orgânica que contém a “informação” que coordena o desenvolvimento e funcionamento de todos os organismos vivos. O DNA é responsável pela transmissão das características hereditárias de cada espécie de ser vivo.

Inwald (2001) esclareceu que no interior da célula o DNA é organizado numa estrutura chamada cromossomo e o conjunto de cromossomos de uma célula forma o cariótipo. Antes da divisão celular os cromossomos são duplicados através de um processo conhecido como Replicação. Dentro dos cromossomos, proteínas as histonas compactam e organizam o DNA. Estas estruturas compactas guiam as interações entre o DNA e outras proteínas, ajudando a definir que regiões do DNA deverão ser transcritas.

Lewis (2004) descreveu que o seu principal papel é armazenar as informações necessárias para a construção das proteínas e do ácido ribonucleico (RNA). Segundo ele, os segmentos de DNA que são responsáveis por carregar a informação genética são denominados genes. O restante da sequência de DNA tem importância estrutural ou está envolvido na regulação do uso da informação genética.

Propriedades físicas e químicas

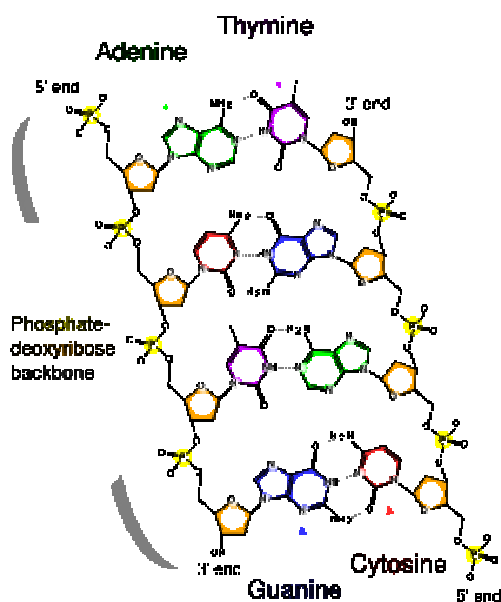


Figura 1: Estrutura química do DNA.

Para este autor o DNA é um longo polímero formado por unidades repetidas chamadas nucleotídeos. A cadeia de DNA tem 2,2 a 2,4 nanômetros de largura, e um nucleotídeo possui aproximadamente 0,33 nanômetros de comprimento. Embora os monômeros (nucleotídeos) que constituem o DNA sejam muito pequenos, polímeros de DNA pode ser moléculas enormes com milhões de nucleotídeos. Por exemplo, o maior cromossomo humano (cromossomo 1), possui 220 milhões de pares de bases de comprimento.

DeSalle (2004) citou que em organismos vivos, o DNA não existe como uma molécula única (fita simples), mas sim como um par de moléculas firmemente associadas. As duas longas fitas de DNA enrolam-se como uma trepadeira formando uma dupla hélice.

Descreveu também que os nucleotídeos estão presentes em ambas as fitas da dupla hélice, unidos com nucleótidos da mesma fita por ligações fosfodiéster e à fita complementar através de pontes de hidrogénio formadas pelas suas bases. Em geral, uma base ligada a um açúcar é chamada nucleosídeo e uma base ligada a um açúcar e um ou mais fosfatos é chamada nucleotídeo. Portanto, o DNA pode ser referido como um polinucleotídeo.

Watson (2007) mencionou que em 1978, Alec pela primeira vez usou a genômica, ciência ainda emergente na época, para pesquisar as alterações no DNA humano e descobrir abundantes variações em determinadas regiões do DNA. A origem das variações na sequência do genoma humano assim começou a ser revelada.

Ainda citou que as alterações podem chegar a aproximadamente a 10 milhões em nosso DNA. Estas possuem a propriedade de serem repetidas com alterações resultantes das diferenças individuais. Esta descoberta em 1984 levou ao desenvolvimento, quase acidental, do “fingerprinting” de DNA e mostrou que em uma análise genética poderia identificar cada pessoa individualmente no planeta (com exceção de gêmeos idênticos).

Este autor descreveu que as alterações genéticas são provenientes de dois processos: mutação e recombinação (“crossover”). A primeira pode induzir mudanças hereditárias no DNA e a segunda pode produzir cópias maternal e paternal de uma determinada região de DNA pelo pareamento e mudar de local estas informações durante a formação dos espermatozóides e dos óvulos.

Gusmman (2007) relatou que algumas vezes a recombinação pode gerar mudanças no DNA que levam a doenças genéticas. Estes dois processos de alterações no DNA são fundamentais para a evolução humana.

Entretanto, para Watson (2007) ambos são difíceis de serem estudados nos seres humanos. Tradicionalmente comparam-se as crianças com seus pais procurando por mutações e locais de recombinação.

Segundo Matte (2007) para este tipo de experimento, cerca de dez mil crianças teriam que ser utilizadas para detectar com segurança uma mutação ou uma recombinação em um gene. Na época, Alec Jeffreys, resolveu este problema desenvolvendo processos alternativos para detectar estas alterações, não em crianças, mas pelo exame de milhões de espermatozóide. Utilizando-se desta estratégia, revelou o modo complexo pelo quais os minissatélites sofrem mutação.

Conforme Remualdo (2007) agora os pesquisadores estão caracterizando as regras básicas que controlam a recombinação que ocorre no DNA humano e afetam a diversidade genética na população humana. Assim, esclareceu a dinâmica da evolução do DNA humano e os fatores que influenciam a integridade de nosso DNA bem como o modo que eles são transmitidos aos nossos descendentes.

2.1.2 Vida

Lewis (2004) citou que cada ser vivo que habita a Terra possui uma codificação diferente de instruções escritas na mesma linguagem no seu DNA. Estas diferenças geram as diferenças orgânicas entre os organismos vivos.

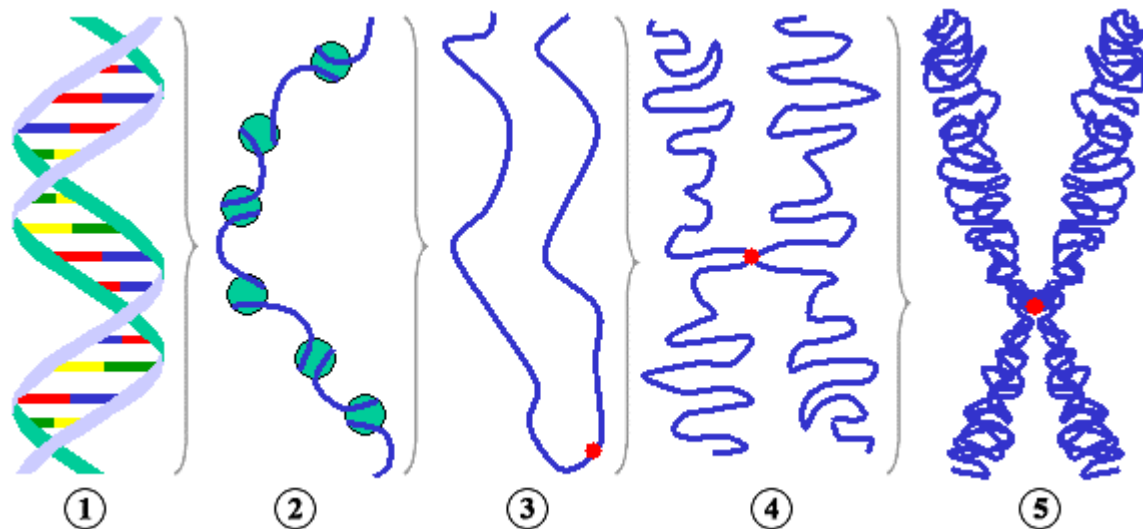


Figura 2:Diferentes níveis de condensação do DNA. (1) Cadeia simples de DNA . (2) Filamento de cromatina (**DNA com histonas**). (3) Cromatina condensada em intérfase com **centrômeros**. (4) Cromatina condensada em prófase. (Existem agora duas cópias da molécula de DNA) (5) Cromossoma em metáfase.

Segundo este autor a dupla cadeia polinucleotídica constitui a molécula de DNA, cuja seqüência de nucleotídeos codifica as instruções hereditárias, organizadas em genes, que codificam as inúmeras proteínas existentes nas mais variadas células. As moléculas de DNA contêm portanto a informação genética necessária para a codificação das características de um indivíduo, como a cor do cabelo em humanos, o formato da folha em Angiospermas e a sua morfologia.

Alonso (2005) relatou que o DNA de todas as células do corpo humano seria equivalente, se fosse visível a olho nu, em comprimento, a oito mil vezes a distância da Terra à Lua.

2.1.3 Função biológica do DNA

De acordo com Tokuda (2000) o DNA normalmente possui forma linear e está presente nos cromossomos de eucariotos ou circulares em cromossomos de procariotos.

Inwald (2001) descreveu que o DNA carrega a informação genética na seqüência de suas bases, logo a utilização ou duplicação da informação depende do pareamento de novas bases.

Conforme Smarra (2006) quando a célula usa a informação nos genes, a seqüência de DNA é copiada em uma seqüência complementar de RNA. Normalmente, o RNA produzido nesse processo codifica proteína (RNAm), mas este pode ser estrutural (ex.: RNAr). A tradução ocorre no caso do RNAm, que também depende da interação dos nucleotídeos de RNA, essa interação ocorre no ribossomo e entre o RNAm e RNAt para formar a seqüência linear de uma proteína.

2.1.4 Estrutura do genoma

Greer (1991) citou que o DNA genômico está localizado no núcleo celular dos eucariotos, mas uma pequena quantia esta presente nas mitocôndrias e cloroplastos. Já em procarioto, o DNA está mantido dentro de um corpo irregular no citoplasma chamado de nucleóide. E a informação genética em um genoma é mantida dentro dos genes.

Sugiyama (2000) descreveu que um gene é uma região do DNA que influência numa característica particular em um organismo. Os genes contém uma matriz de leitura aberta que pode ser transcrito, conjunto de seqüências reguladoras como promotores e reguladores que controlam a expressão dos genes.

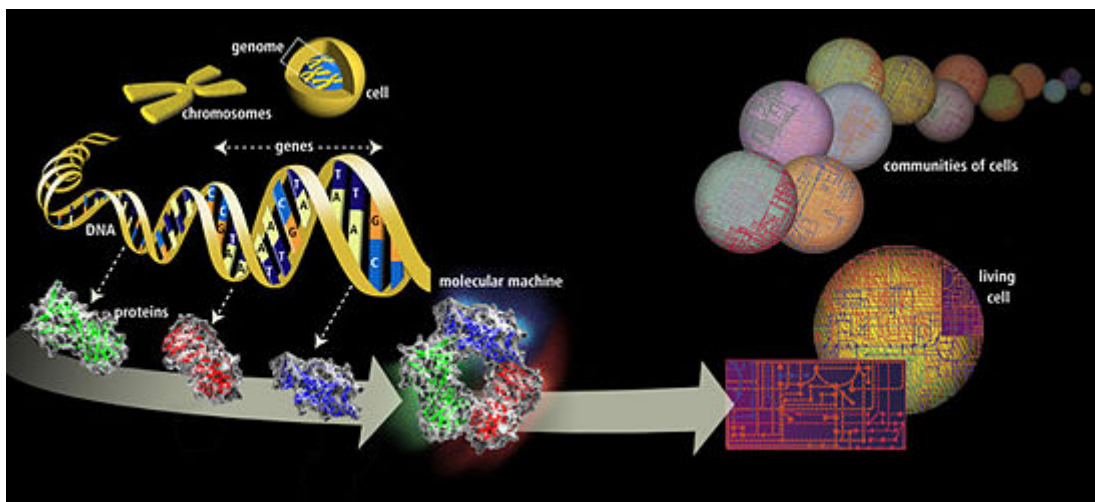


Figura 3: Fluxo da informação genética

Legrand *et al* (2002) relataram que em muitas espécies, só uma pequena quantia do genoma total codifica proteínas. Por exemplo, apenas aproximadamente 1.5% do genoma humano consistem de exons codificantes de proteínas e mais de 50% do genoma humano consiste de seqüências repetidas não codificantes.

Para estes autores a razão para a presença de “tanto” DNA não codificante nos genomas de eucariotos e a extraordinária diferença no tamanho do genoma ou valor-C entre as espécies representa um “velho” quebra-cabeça denominado “enigma do valor-C”. Porém, a seqüência de DNA que não codifica proteína pode codificar moléculas funcionais de RNA não-codificante o qual está envolvido na regulação da expressão gênica.

DeSalle (2004) apontou que algumas seqüências de DNA não codificante mostra papel estrutural nos cromossomos.

Conforme este autor, os telômeros e centrômeros contêm poucos genes, mas são importantes para o funcionamento e estabilidade do cromossomo. Uma forma abundante de DNA não codificante em humanos são os pseudogenes, que nada mais são do que copias de genes que sofreram desativação por

mutações. Na luz do evolucionismo essa seqüência, denominas fosseis moleculares, podem ser a matéria-prima do processo evolutivo.

2.1.5 Evolução

Jobim (2006) afirmou que o planeta Terra era um *Jardim do Éden molecular*, há cerca de quatro bilhões de anos. As moléculas se reproduziam de forma ineficiente, produzindo-se cópias grosseiras. Neste tipo de cenário ocorreram as primeiras replicações, mutações, e extinções de forma selectiva e aleatória.

Ainda relatou este autor que as variedades menos eficientes foram sendo eliminadas, enquanto aquelas que conseguiam sobreviver se tornaram cada vez mais eficientes a cada geração - evolução.

Gusmman (2007) mencionou que com o avanço no tempo, as moléculas orgânicas foram adquirindo mais e mais funções especializadas, foram se juntando aos poucos e de forma casual.

Também descreveu que a princípio, pode-se dizer que estas colectividades moleculares formaram algo parecido com o primeiro *ser vivo* composto a partir de algum momento por um DNA funcional.

2.2.6 Dados Históricos relacionados à Hereditariedade

- 1865 - Gregor Mendel publica trabalho sobre experimentos com ervilhas em que propõe as leis da hereditariedade e supõe que as características hereditárias são transmitidas em unidades.

- 1869 - O suíço Friedrich Miescher isola, a partir do pus humano e do esperma do salmão, uma substância com alto teor de fósforo que chama de "nucleína", posteriormente denominada "ácido desoxirribonucléico" (DNA).
- 1882 - O alemão Walter Flemming descobre corpos com formato de bastão dentro do núcleo das células, que denomina "cromossomas".
- 1900 - O holandês Hugo de Vries, o alemão Carl Correns e o austríaco Erich Tschermak von Seysenegg chegam de forma independente aos resultados de Mendel sobre as leis da hereditariedade.
- 1902 - O norte-americano Walter Sutton e o alemão Theodor Boveri dão início à teoria cromossômica da hereditariedade.
- 1909 - O dinamarquês Wilhelm Johannsen introduz o termo "gene" para descrever a unidade mendeliana da hereditariedade. Utiliza os termos "genótipo" e "fenótipo" para diferenciar as características genéticas de um indivíduo de sua aparência externa.
- 1915 - O norte-americano Thomas Hunt Morgan e outros publicam o livro "O Mecanismo da Hereditariedade Mendeliana", no qual relatam experimentos com drosófilas e mostram que os genes estão linearmente dispostos nos cromossomos.
- 1949 - O austríaco Erwin Chargaff descobre, nos EUA, uma relação quantitativa entre as bases do DNA: a proporção entre adenina e timina é sempre igual, e o mesmo ocorre entre guanina e citosina.
- 1950 - Os norte-americanos Linus Pauling e Robert Corey identificam a estrutura molecular básica de proteínas. Eles propõem uma estrutura para o DNA com três cadeias helicoidais entrelaçadas (o modelo da tripla hélice).

- 1952 - A britânica Rosalind Franklin obtém imagens de DNA , por difracção de raios X.
- 1953 - O norte-americano James Watson e o britânico Francis Crick decifram, em 7 de Março, a estrutura de dupla hélice para o DNA e a publicam na revista "Nature" de 25 de Abril. Em 30 de maio, também na "Nature", Watson e Crick analisam as implicações genéticas de seu modelo e sugerem um mecanismo para a replicação do DNA.
- 1958 - Os norte-americanos Matthew Meselson e Franklin Stahl confirmam a hipótese feita por Watson e Crick de que o DNA replica-se de maneira semiconservativa.
- 1972 - O norte-americano Paul Berg obtém moléculas de DNA recombinante, unindo DNA de diferentes espécies e inserindo esse DNA híbrido em uma célula hospedeira.
- 1975 - Grupos de pesquisa desenvolvem métodos de seqüenciamento de DNA.
- 1976 - Criada a primeira companhia de engenharia genética, a Genentech.
- 1980 - A Suprema Corte dos EUA decide que formas de vida alteradas podem ser patenteadas.
- 1982 - O primeiro animal (camundongo) transgênico é obtido nos EUA.
- 1983 - Companhias nos EUA conseguem obter patentes para plantas geneticamente modificadas. É mapeado nos EUA o primeiro gene relacionado a uma doença.
- 1985 - Alec Jeffreys (inglês) descreve técnica de identificação que ficou conhecida como "impressão digital" por DNA.

Os NIH dos EUA aprovam directrizes gerais para a realização de experimentos com terapia genética em seres humanos.

- 1986 - Plantas de tabaco geneticamente modificadas para se tornarem resistentes a herbicida são testadas em campo pela primeira vez, nos EUA e na França.
- 1988 - Nos EUA, Philip Leder e Timothy Stewart obtêm primeira patente para um animal geneticamente modificado, um camundongo.
- 1989 - Criação nos EUA do Instituto Nacional para Pesquisa do Genoma Humano (NHGRI), chefiado por James Watson, para determinar toda a sequência do DNA que compõe os cromossomas humanos.
- 1994 - Liberação de tomate, primeiro alimento geneticamente modificado cuja venda é aprovada pela FDA.
- 1995 - É obtida a primeira sequência completa de DNA de um organismo de vida livre, a bactéria *Hemophilus influenzae*.
- 1997 - Nascimento da ovelha Dolly, primeiro mamífero clonado a partir de uma célula de um animal adulto pelo Instituto Roslin (Escócia). Mapa genético completo do camundongo.
- 2000 - Pesquisadores do consórcio público Projeto Genoma Humano e da empresa privada norte-americana Celera anunciam o rascunho do genoma humano. No Brasil, pesquisadores paulistas anunciam o seqüenciamento do genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*, a causadora da doença do amarelinho em cítricos. O artigo foi destacado na capa da revista "Nature".
- 12 de Fevereiro de 2001 - É anunciada a publicação da análise da sequência do genoma humano.
- 2003 - Conclusão parcial da análise da sequência do genoma humano (PGH).

2.3 Marcadores moleculares para a identificação humana

Em 2005 Pena descreveu que nos testes de determinação de identidade genética são estudadas regiões genômicas em que há variação entre pessoas normais.

Ainda este autor essas regiões são chamadas de “polimorfismos de DNA” ou “marcadores de DNA”.

Miething *et al* (2006) relataram que nos últimos anos foram desenvolvidas diversas técnicas para estudo de diferentes tipos de polimorfismos de DNA, formando assim um verdadeiro cardápio, no qual os cientistas e laboratórios podem escolher o método mais adequado para solucionar o problema em mãos.

Citaram ainda que o método mais usado hoje em dia é o estudo de regiões repetitivas de DNA, chamadas de “minissatélites” (VNTR's) e “microsatélites” (STR's).

Segundo Evonne (2006) a chave da diversidade nessas regiões é que o número de repetições varia entre indivíduos e pode ser estudada com sondas de DNA, ou através de PCR, como vem sendo feito em maior escala atualmente.

Gusmman (2007) definiu o número variável de repetições em tandem, também denominados de minissatélites, ou VNTRs (do inglês *variable number of tandem repeats*), sendo polimorfismos de DNA que consistem numa série de comprimento de repetições de fragmentos de DNA.

Para este autor uma região VNTR típica consiste de 500 a 1000 pb, compreendendo principalmente unidades repetidas em seqüência, cada qual com cerca de 15 a 35 pb de comprimento.

Para Watson (2007) os locos VNTR são particularmente convenientes como marcadores para a identificação humana, pois possuem um número muito grande de alelos diferentes e, sendo assim, é provável que não existam dois indivíduos não aparentados que compartilhem o mesmo genótipo .

Ainda este autor definiu o *short tandem repeats* ou “repetições curtas em *tandem*” (STRs ou ainda microssatélites) sendo polimorfismos muito similares aos VNTRs, mas diferindo em seu tamanho (em geral não ultrapassam 200pb) e no comprimento das unidades de repetição em tandem, que variam de 2 a 7 nucleotídeos.

Veríssimo (2007) citou que estes locos são muito abundante no genoma humano, e cada um deles possui um grande número de diferentes alelos, inclusive maior do que o encontrado em VNTRs, o que os torna ainda mais útil para identificação humana.

2.3.1 Marcadores bi-alélicos

Pena (2005) relatou que além dos minissatélites e microssatélites há dois grandes grupos de polimorfismos no genoma humano - os polimorfismos de substituição de nucleotídeos únicos (single nucleotide polymorphisms, ou SNPs) e os polimorfismos de inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos (polimorfismos de inserção - deleção; ins/del).

Para este autor ambos polimorfismos apresentam a grande vantagem de que podem ser estudados em produtos de amplificação muito curtos (50 pb ou menos) e, assim, apresentam distintas vantagens sobre os microssatélites no estudo de DNA extremamente degradado.

Jobim (2006) afirmou que os mais abundantes e os melhor estudados desse grupo são os SNPs. Cerca de 5,3 milhões deles foram encontrados no genoma humano, o que corresponde a um SNP a cada 600pb.

Para Xião J, *et al* (2006) a possibilidade de que SNPs marcadores ins/del possam vir a substituir os STRs na identificação de criminosos. Porém, embora estes marcadores possam oferecer algumas vantagens, os bancos de dados já foram montados com microssatélites e, portanto, a facilidade de comparações entre um dado biológico e uma seqüência armazenada é muito maior para marcadores STRs.

Ainda estes autores descreveram que a tipagem dos SNPs é relativamente complexa mas por outro lado, os ins/del são muito mais fáceis de serem tipados porque seus alelos diferem somente em tamanho.

Miething (2006) citou que na área de identificação humana, estes marcadores apresentam a desvantagem de possuírem somente dois alelos, o que torna muito maior a possibilidade de dois indivíduos compartilharem o mesmo genótipo, mesmo sem serem aparentados ou relacionadas à cena do crime.

Para o autor uma maneira de superar esta desvantagem seria a tipagem de um número maior de marcadores ins/del, de maneira que fosse possível uma identificação precisa.

De acordo com Veríssimo (2007), por muito tempo, estes polimorfismos foram detectados por técnicas que possuíam como base a eletroforese, cujos fundamentos permitiram o desenvolvimento de métodos automatizados.

Também relatou que, com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR), todos os tipos de marcadores moleculares passaram a ser detectados a partir de quantidades menores de amostras, com um tempo menor e, assim, uma atenção especial será dada para esta técnica.

2.4 Procedimentos de análise

Um procedimento para analisar um DNA compõe as seguintes fases:

- a) (1 FASE) - Extração;
- b) (2 FASE) - Amplificação;
- c) (3 FASE) Eletroforese e leitura de fragmentos

2.4.1 FASE - EXTRAÇÃO

Em 2001, Luftig descreveu em sua pesquisa que antes, as impressões digitais e outras pistas eram usadas para desvendar crimes; hoje, são inúmeros os espécimes biológicos dos quais o DNA pode ser extraído.

No trabalho supracitado o autor afirmou que podemos encontrar o material genético (DNA) em pequenas amostras de sangue, ossos, sêmen, cabelo, dentes, unhas, saliva, urina, entre outros fluidos.

Benecke (2002) citou que a análise cuidadosa desse material ajuda a identificar criminosos. As aplicações da Biologia Molecular no laboratório criminal centralizam-se, em grande parte, na capacidade da análise do DNA em identificar um indivíduo a partir de cabelos, manchas de sangue e fluidos corporais, entre outros itens recuperados no local do crime.

Jobim (2006) relatou que para analisar o DNA, em primeiro lugar, devemos extrair o material genético da célula ou outro material a ser estudado (exemplo: vestígios de crimes) sem danificá-lo.

Segundo este autor, normalmente o material extraído é o DNA, mas pode-se trabalhar com o RNA em uma RT-PCR que é um desdobramento da PCR e possui outras aplicações. Ou seja, para a extração de DNA existem vários protocolos de acordo com o tipo de amostra.

2.4.2 FASE - AMPLIFICAÇÃO

Inventada em 1983 por Kary Mullis, a PCR é uma das técnicas mais comuns utilizadas em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas para diversas tarefas, como o sequenciamento de genes e diagnóstico de doenças hereditárias, identificação de fingerprint genético (usado em testes de paternidade e na medicina forense), detecção de diagnóstico de doenças infecciosas e criação de organismos transgênicos.

Eglinton (1991) descreveu esta técnica sendo um método *in vitro* rápido e versátil para a amplificação de seqüências-alvo de DNA definidas, presentes em uma preparação de DNA.

Citou ainda que geralmente, o método é programado para permitir a amplificação seletiva de uma seqüência-alvo de DNA específica a partir de DNA total previamente extraído.

Hamazaki *et al* (1993) relataram que para permitir tal amplificação seletiva, alguma informação prévia, a respeito das seqüências-alvo, é necessária. Essa informação é utilizada para desenhar dois oligonucleotídeos iniciadores, denominados *primers*, os quais são específicos para a seqüência-alvo e apresentam cerca de 15 a 25 nucleotídeos de extensão.

Referenciaram ainda que após os *primers* terem sido adicionados ao DNA-molde desnaturado, eles se ligam especificamente às seqüências de DNA complementares ao seu sítio-alvo, flanqueando e delimitando a região a ser analisada.

Em 1994, Karlsen *et al*, afirmaram que na presença de uma DNA-polimerase termoestável apropriada e dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), é iniciada a síntese de novas fitas de DNA, que são complementares a cada uma das fitas de DNA do segmento-alvo de

DNA, formando, desta maneira, um fragmento de DNA com seqüência idêntica à do DNA a ser analisado, e previamente selecionado pelo par de *primers* .

Benecke (2002) citou que este ciclo de duplicação molecular é repetido várias vezes, e que a PCR é uma reação em cadeia porque as fitas de DNA, recentemente sintetizadas, irão atuar como moldes para mais uma síntese de DNA nos ciclos subseqüentes.

Referenciou ainda que após cerca de 25 ciclos de síntese de DNA, os produtos da PCR irão incluir, além do DNA que iniciou a reação, cerca de 105 cópias da seqüência-alvo específica, uma quantidade que é facilmente visualizada como uma banda distinta de tamanho específico quando submetida à eletroforese.

Jobim (2007) descreveu que este processo é relativamente simples e fácil de realizar em laboratório. Os resultados podem ser obtidos em um espaço curto de tempo, freqüentemente menos do que 24 horas, em contraste com uma análise do genoma total com *Southern*, que exige até mesmo semanas.

I-) Procedimentos

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método muito sensível de análise e por isso é realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar ou tornar errôneo o resultado.

II-) Principais vantagens da técnica de PCR e suas aplicações

Duarte (2001) relatou que a clonagem de DNA por PCR pode ser realizada em poucas horas usando-se um equipamento relativamente simples, cuja função fundamental é a variação de temperatura em cada passo da técnica.

Este autor ainda citou que uma reação de PCR consiste de 30 ciclos contendo as etapas de desnaturação, síntese e pareamento, com cada ciclo individual levando em geral 3 a 5 minutos em um termociclador automatizado, o que totaliza menos de três horas para todo o processo. Evidentemente, algum tempo também é necessário para a construção e a síntese dos oligonucleotídeos que servirão como *primers*, mas isso foi simplificado pela disponibilidade de programas de computador para projetar *primers* e pela síntese comercial rápida dos oligonucleotídeos desejados.

Para eles o PCR encontra sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida. Em teoria, é possível amplificar qualquer DNA.

Cheoker (2002) afirmou que uma das principais aplicações do PCR é na medicina forense, onde pequenas amostras de DNA retiradas da cena de um crime (pedaços de cabelo, gotas de sangue ou saliva, pedaços de pêlo ou até mesmo a minúscula quantidade de DNA deixada em uma impressão digital) são amplificadas para serem analisadas pelo método de fingerprinting.

Ainda referenciou que o PCR também é rotineiramente utilizado em procedimentos científicos de Biologia Molecular como amplificação para gerar mutagênese, detecção de mutações ou preparação de fragmentos de DNA para clonagem (inserção em plasmídeo, por exemplo) como também pode ser utilizado para identificação de patógenos que estão presentes em amostras como por exemplo identificação de agentes como *Cândida sp*, *Chlamydia trachomatis*, HPV Vírus do papiloma humano e seus genótipos, HBV Vírus da Hepatite B. Etc

Segundo Miller em 2001, a PCR é capaz de amplificar seqüências a partir de quantidades ínfimas do DNA-alvo e, até mesmo, do DNA de uma única célula. Esta vantagem torna a técnica particularmente útil na análise forense, quando, em muitos casos, a quantidade de material biológico, e portanto, de DNA

extraído de algumas amostras, é muito pequena, como em fios de cabelo ou traços de saliva em tocos de cigarro.

Strachan *et al.*, 2002 relatou em seu estudo que desta maneira a técnica possibilita a tipagem do DNA em amostras de prova que não poderiam ser analisadas através de outras técnicas, como por exemplo, o *Southern*, uma vez que esta técnica necessita de uma grande quantidade de DNA total. Além disso, a pequena quantidade de DNA, necessária para a PCR, torna mais fácil guardar porções de amostras para repetir os testes no mesmo ou em outro laboratório.

Outros pesquisadores, Strachan *et al.*, em 2002, citaram que tal sensibilidade excelente tem fornecido novos métodos para o estudo da origem molecular de doenças e tem encontrado numerosas aplicações na ciência forense, no diagnóstico, na análise de ligações genéticas, utilizando a classificação de um único tipo de esperma, e nos estudos paleontológicos em que as amostras podem conter um número insignificante de células. No entanto, a sensibilidade extrema do método implica que enormes cuidados devem ser tomados para evitar a contaminação da amostra com DNA de outras fontes.

Gino *et al.* (2004) salientaram que a PCR pode permitir a amplificação de seqüências específicas a partir de material no qual o DNA está gravemente degradado ou embebido em um meio onde o isolamento de DNA é problemático. Como o *Southern* utiliza DNA genômico total, é necessário que este DNA esteja em bom estado, ou seja, que as moléculas estejam intactas.

De acordo com Viera (2006) em genética forense, nem sempre as amostras biológicas são novas e se encontram em um bom estado de conservação, o que compromete a integridade do genoma da célula a ser analisada. Uma vez que somente um fragmento do DNA é isolado e amplificado pela PCR, uma enorme vantagem desta técnica é permitir a utilização, com sucesso, de amostras que contenham DNA degradado.

Jobim (2007) descreveu que através da PCR, é possível a tipagem do DNA em amostras que de outra maneira não poderiam ser analisadas, como amostras antigas e já decompostas, restos mortais de vítimas de incêndios ou acidentes e corpos em decomposição.

2.4.3 FASE – ELETROFORESE E LEITURA DE FRAGMENTOS

I-) Métodos automatizados

Saiki *et al.* em 2000 relataram o mecanismo da eletroforese capilar, descrevendo que funciona como a eletroforese normal, porém o gel e a amostra estão dentro de um capilar, e a amostra é detectada automaticamente por um detector. Isso possibilita a automação do processo. Essa é a eletroforese atualmente utilizada em sequenciadores de DNA.

Inwald (2001) descreveu que por meio dessa técnica é possível separar moléculas em função da sua massa (tamanho), forma e compactação. Trata-se de uma técnica rápida, sensível e precisa.

Este autor ainda citou que a molécula do DNA, migra em suportes (géis de agarose ou acrilamida) por ação de uma corrente elétrica, com diferentes velocidades, dependendo do seu tamanho e forma.

Cheoker (2002) afirmou quando submetido a um campo elétrico, as moléculas de DNA migram para o pólo positivo, pois são carregadas negativamente, e como força oposta à migração existe o atrito com o suporte (gel). Quanto maior a molécula, maior o atrito e mais lenta a migração.

Gino *et al.* (2004) salientaram que o DNA pode ser visualizado na presença de compostos intercalantes, sendo que o mais utilizado é o brometo de etídio. Em presença desse composto, o DNA emite fluorescência por exposição à

luz UV e, assim, moléculas de um mesmo tamanho são visualizadas em um mesmo ponto do gel, formando uma faixa fluorescente.

Constataram ainda em seu estudo que se na amostra submetida à corrente elétrica existir mais de um tamanho de molécula, estas serão separadas na migração e, então, serão visíveis bandas em diferentes localizações do gel.

De acordo com Viera (2006) basicamente, duas matrizes sólidas são utilizadas atualmente para eletroforese: géis de agarose e géis de acrilamida.

Para este autor a escolha do tipo de gel depende do tamanho do fragmento e da diferença de tamanho de diferentes fragmentos de DNA que se quer visualizar. As duas substâncias formam tramas de poros de tamanhos variáveis, possibilitando a separação dos fragmentos, que terá sua eficiência dependente da concentração do polímero e da intensidade da voltagem e amperagem aplicadas.

Referenciou ainda que em qualquer um dos casos, estas substâncias são dissolvidas numa solução-tampão eletrolítica, obrigatoriamente a mesma que recobrirá o gel na cuba de eletroforese e possibilitará a passagem de corrente elétrica (Tampão de Corrida).

Segundo Jobim (2007) para eletroforese de DNA, normalmente utiliza-se o TBE (Tris-Borato EDTA) e o TAE (Tris-Acetato EDTA). Quanto à aplicação das amostras no gel, ressaltou que antes disso elas são misturadas a uma outra solução (Tampão de amostra), que tem como função aumentar a viscosidade da amostra e assim impedir que esta comece a flutuar no tampão de corrida antes que a voltagem seja aplicada no sistema.

Também citou que o tampão de amostra possui um corante que possibilita a visualização do andamento da corrida.

2.5 O ALDEÍDO FÓRMICO (FORMOL)

Ben-ezra (1990) descreveu que os aldeídos são compostos químicos resultantes da oxidação parcial dos álcoois. Assim, o álcool metanol, ao perder um átomo de hidrogênio (a perda de hidrogênio aumenta a proporção de oxigênio e, por isso, fala-se em oxidação dos álcoois) dá origem ao aldeído fórmico e o etanol, ao aldeído acético.

Tokuda *et al* (1990) relataram que o formaldeído é normalmente utilizado em solução aquosa em concentração de 37% e contém metanol como preservativo contra a polimerização. Nessa forma de apresentação mostra-se como líquido incolor, possui massa molar de 30.03 g/mol, ponto de ebulição de -19,5°C e ponto de fusão de -92°C. É incompatível com oxidantes fortes, álcalis, ácidos, fenóis e uréia. Tem como sinônimos: formol, formalina, óxido de metileno, componente de exaustão de diesel e produto da pirólise (queima) de revestimento de eletrodos de solda.

Lund *et al*, (1991) citaram que à temperatura ambiente, o aldeído fórmico (AF) é um gás incolor e de cheiro muito forte. O que se encontra disponível para utilização e à venda comercialmente é a solução aquosa de AF, também muito consumido nas indústrias de madeira, plásticos e vernizes.

Greer (1991) relatou as diversas formas de se fixar um tecido, sendo a fixação obtida através do uso de substâncias químicas (fixadores) a mais adequada.

De acordo com seus estudos, ainda este autor, descreveu que o fixador mais utilizado é o formol a 10% (aldeído fórmico), devido ao seu baixo custo e simplicidade de uso.

Para ele o formol é extremamente volátil e provoca irritação dos olhos e vias respiratórias. E quando apresenta em solução aquosa o formol precipita-se

em concentrações superiores a 40%, portanto, recebendo esta solução a denominação de "formol puro".

Jackson *et al* (1991) descreveram que o ácido fórmico é um dos produtos de degradação do formol, sendo que tal ácido freqüentemente interage com a hemoglobina produzindo um pigmento acastanhado chamado de "pigmento de formol" ou hematina. O uso de solução tampão evita a acidificação do fixador, impedindo assim o aparecimento do pigmento de formol.

Eglinton *et al* (1991) citaram que em consequência da invenção do formol em 1893, multiplicou-se o número de monumentos de carne para tornar viva a "memória" dos mortos, sendo usado para mumificar pessoas famosas como Lênin e Evita. O produto mais usado universalmente para conservação de cadáveres é o formol.

Koshiba em 1993 definiu a fixação em formol como um passo fundamental no processo de conservação de cadáveres. Ela baseia em manter, de modo definitivo, as estruturas citológicas e histológicas das células e tecidos, ou seja, evita a degradação do material em decorrência de fenômenos autolíticos e permite a realização de inúmeras técnicas citológicas e histopatológicas, assim como, o processo de conservação dos cadáveres.

Conforme Hamazaki *et al* (1993) elucidaram que a fixação é um passo fundamental no processo de conservação de cadáveres. Este método baseia em manter, de modo definitivo, as estruturas citológicas e histológicas das células e tecidos, ou seja, evita a degradação do material em decorrência de fenômenos autolíticos e permite a realização de inúmeras técnicas citológicas e histopatológicas, assim como, o processo de conservação dos cadáveres.

Karlsen *et al* (1994) descreveram que a exposição ao formaldeído carreta irritação nos olhos e mucosas. Exposições de longa duração a baixas concentrações podem causar dificuldade respiratória.

Para estes autores o aldeído fórmico em concentrações elevadas tem sido classificado com agente carcinogênico humano e relacionado com cânceres de vias aéreas superiores e de pulmão, leucemia e câncer no encéfalo.

Já Romero (1997) citou que o coração, o fígado, os pulmões e as demais vísceras eram colocadas em potes contendo uma substância (bicarbonato de sódio) que dificultava a decomposição. Este autor descreve que o corpo ficava mergulhado no formol durante 3 (três) dias e posteriormente era enfaixado com tiras de algodão, colocado em um sarcófago e transladado para as tumbas existentes nas pirâmides.

Mies em 1998 descreveu que o formol é o produto mais usado universalmente para conservação de cadáveres, mediante as técnicas de formolização e de embalsamamento, como meio de prevenir e retardar a putrefação.

De acordo com Mizuno (1998) o povo do antigo Egito acreditava que havia vida após a morte. Então, quando uma pessoa morria, eram retirados os seus órgãos.

Inwald (2001) descreveu que de a forma molecular H_2CO tem como principais aplicações: produção de resinas, matéria prima para diversos produtos químicos, agente esterilizante para autoclaves, agente preservante de produtos cosméticos e de limpeza, formolização de peças e de cadáveres, embalsamamento de cadáveres, etc.

Cheoker (2002) afirmou que o formol tem a propriedade de degradar o DNA, no seu todo ou parcialmente, na dependência da concentração e do tempo de exposição (fixação) a que um determinado tecido é submetido. Seus estudos baseiam-se em reações bioquímicas, sem a realização de um estudo propositivo de campo ou experimental. Assegura, no entanto, que se fazem necessárias pesquisas a respeito.

Gino *et al.* (2004) salientaram que qualquer afirmativa com relação aos efeitos deletérios do formol na molécula do DNA depende de outros estudos experimentais, recomendando que sejam utilizadas concentrações diferenciadas e com grupo controle.

DeSalle (2004) citou as diversas formas de se fixar um tecido, sendo a fixação obtida através do uso de substâncias químicas (fixadores) a mais adequada.

Mehrdad *et al* (2005) relataram que o povo do antigo Egito acreditava que havia vida após a morte, então, quando uma pessoa morria, eram retirados os seus órgãos, como o coração, fígado, pulmões as vísceras e colocados em potes com uma substância (bicarbonato de sódio), que dificultava a decomposição dos órgão. O corpo ficaria mergulhado na substância durante 3 dias e posteriormente enfaixado com tiras de algodão — ver múmia — e colocado no sarcófago, que seria transladado para uma pirâmide.

De acordo com Miething (2006) a expressão cadáver é o nome dado a um Corpo, após a sua morte, enquanto este ainda conserva parte de seus tecidos. Após a decomposição de todos os órgãos, músculos e tecidos, o mesmo passa a ser denominado como ossada.

Legrand em 2006 descreveu que a origem da palavra cadáver teria inscrição latina "Caro Data Vermibus" (carne dada aos vermes), que supostamente seria inscrita nos túmulos. Na verdade não se encontrou até hoje nenhuma inscrição romana deste género. Os etimologistas defendem que a palavra deriva da raiz latina "cado", que significa "caído". A favor desta teoria está o facto de Santo Isidoro de Sevilha referir que o corpo deixa de ser cadáver a partir do momento em que é sepultado.

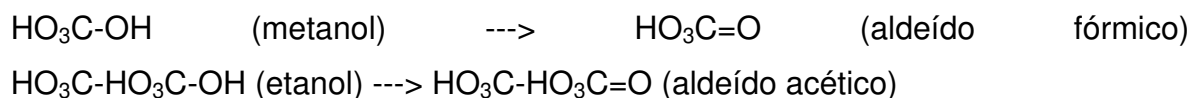
Gusmman (2007) citou que o aldeído fórmico atua como fixador interagindo com os aminoácidos lisina e arginina. Tal fixador não provoca

precipitação de proteínas, não preserva gorduras livres, porém fixa lipídeos complexos, provoca leve precipitação de outros constituintes celulares e não é o fixador de eleição para carboidratos.

Remualdo (2007) salientou que o embalsamento ou embalsamação é uma técnica de preservação de cadáveres para prevenir a putrefração.

2.5.1 Composto químico - Aldeído

Aldeídos são compostos químicos resultantes da oxidação parcial dos álcoois. Assim, o álcool metanol ao perder um átomo de hidrogênio (a perda de hidrogênio aumenta a proporção de oxigênio e, por isso, fala-se em oxidação dos álcoois) dá origem ao aldeído fórmico e o etanol, ao acético:



Na temperatura ambiente o aldeído fórmico (AF) é um gás incolor e de cheiro muito agressivo. O que se encontra como formol no comércio é a solução aquosa de AF. Na Medicina é usado como desinfetante de salas cirúrgicas ou outras, e pelos anatomistas e patologistas para preservarem tecidos, órgãos ou cadáveres. O AF também é muito consumido na indústria da madeira, de plásticos e de vernizes.

2.5.2 Formaldeído

O formaldeído é um dos mais comuns produtos químicos de uso atual. É o aldeído mais simples, de fórmula molecular H_2CO e nome oficial IUPAC metanal.

Suas aplicações principais são:

- Produção de resinas uréia-formol, fenol-formol e melamínica
- Matéria-prima para diversos produtos químicos
- Agente esterilizante. V. autoclave
- Agente preservante de produtos cosméticos e de limpeza
- Embalsamação de peças anatômicas
- Conservação de cadáveres
- Laboratórios

I-) Propriedades químicas e físicas - formaldeído

O formaldeído é um gás. É normalmente utilizado em solução aquosa a cerca de 37% em massa contendo metanol como preservativo contra a polimerização.

- Líquido incolor (solução) ou gás com odor penetrante e irritante
- Massa molar: 30.03 g/mol
- Ponto de ebulição: $-19,5^\circ\text{C}$
- Ponto de fusão: -92°C

Incompatibilidades: oxidantes forte, álcalis, ácidos, fenóis e uréia

- Sinônimos: formol, formalina, óxido de metileno, componente de exaustão de diesel e produto da pirólise (queima) de revestimento de eletrodos de solda.

II-) Limites de tolerância

- OSHA: TWA = 0,75 ppm, STEL = 2 ppm, Nível de ação = 0,5 ppm
- ACGIH: Valor Teto (Ceiling) = 0,3 ppm, A2 = Suspeito de Carcinogênico Humano
- NIOSH: TWA = 0,016 ppm, Valor Teto = 0,1 ppm, Carcinogênico Potencial
- NR-15: TWA = 1,6 ppm
- IDLH: 20 ppm

2.6 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

Os aspectos éticos e legais relacionados com o estabelecimento laboratorial para a prática do exame de DNA, está previsto nas seguintes leis:

ANVISA

De acordo com a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os procedimentos técnicos em laboratórios analíticos deveram seguir as devidas normas: todas as etapas da cadeia de custódia das amostras biológicas devem ser documentadas de modo apropriado, a fim de evitar contaminações e a adequação das condições de trabalho à ISO/IEC 17.025. Em adição, Os procedimentos para estabelecer padrões de qualidade, como a calibração de equipamentos e a presença de um segundo analista devem ser implementados no país para que as análises se equivalham em termos de segurança e credibilidade àquelas realizadas em laboratórios de referência no exterior.

**De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC nº
306, de 07 de dezembro de 2004**

III - Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde

O gerenciamento dos RSS (resíduos de serviços de saúde) constitui-se em um conjunto de procedimentos de gestão, planejados e implementados a partir de bases científicas e técnicas, normativas e legais, com o objetivo de minimizar a produção de resíduos e proporcionar aos resíduos gerados, um encaminhamento seguro, de forma eficiente, visando à proteção dos trabalhadores, a preservação da saúde pública, dos recursos naturais e do meio ambiente.

O programa a ser elaborado deve ser compatível com as normas locais relativas à coleta, transporte e disposição final dos resíduos gerados nos serviços de saúde, estabelecidas pelos órgãos locais responsáveis por estas etapas.

1 - MANEJO: O manejo dos RSS é entendido como a ação de gerenciar os resíduos em seus aspectos intra e extra estabelecimento, desde a geração até a disposição final, incluindo as seguintes etapas:

1.1 - SEGREGAÇÃO - Consiste na separação dos resíduos no momento e local de sua geração, de acordo com as características físicas, químicas, biológicas, o seu estado físico e os riscos envolvidos.

1.2 - ACONDICIONAMENTO - Consiste no ato de embalar os resíduos segregados, em sacos ou recipientes que evitem vazamentos e resistam às ações de punctura e ruptura.

VI - 5.4.6 - As sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos, podem ser descartadas diretamente no sistema de coleta de esgotos, desde que atendam respectivamente as diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes.

A ANVISA classificou em grupo de risco, para exames de DNA segue a seguinte nomenclatura:

GRUPO A1 - Culturas e estoques de microrganismos; resíduos de fabricação de produtos biológicos, exceto os hemoderivados; descarte de vacinas de microrganismos vivos ou atenuados; meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; resíduos de laboratórios de manipulação genética.

Define que:

VII - 19 - Todos os profissionais que trabalham no serviço, mesmo os que atuam temporariamente ou não estejam diretamente envolvidos nas atividades de gerenciamento de resíduos, devem conhecer o sistema adotado para o gerenciamento de RSS, a prática de segregação de resíduos, reconhecer os símbolos, expressões, padrões de cores adotados, conhecer a localização dos abrigos de resíduos, entre outros fatores indispensáveis à completa integração ao PGRSS

Em adição, por fazerem uso de técnicas de engenharia genética, as tipagens genéticas devem obedecer às normas estabelecidas na Lei de Biossegurança N° 8.974/95.

CÓDIGO DE PROCESSO PENAL LEI N° 8.974/95

A confiabilidade e a segurança dos testes de identificação por DNA, quando da utilização da Engenharia Genética, podem ser equacionados pela Lei de Biossegurança (N° 8.974/95):

"Art. 1º - Esta lei estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização no uso das técnicas de engenharia genética na construção, cultivo, manipulação, circulação, comercialização, consumo, liberação e descarte de

Organismo Geneticamente Modificado (OGM), visando proteger a vida e a saúde do Homem, dos animais e das plantas, bem como o meio ambiente."

O decreto de regulamentação (Nº 1.752/95), normatiza as atividades da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio:

"Regulamenta a Lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995, dispõe sobre a vinculação, competência e composição da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, e dá outras providências."

Aspecto relevante desta legislação é que a mesma protege a saúde dos Homens, animais, vegetais e do meio ambiente sem hierarquizar a proteção. Em suma, a Lei de Biossegurança regulamenta todos os procedimentos laboratoriais que envolvam qualquer tipo de DNA, seja humano, animal, vegetal, transgênico e até mesmo quimeroplástico.

Qualquer instituição domiciliada no País e que utilize técnicas de Engenharia Genética deve possuir o Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB por força da lei Nº 8.974/95:

"Art. 2º § 3º - As organizações públicas e privadas, nacionais, estrangeiras ou internacionais, financiadoras ou patrocinadoras de atividades ou de projetos referidos neste artigo, deverão certificar-se da idoneidade técnico-científica e da plena adesão dos entes financiados, patrocinados, conveniados ou contratados às normas e mecanismos de salvaguarda previstos nesta Lei, para o que deverão exigir a apresentação do Certificado de Qualidade em Biossegurança de que trata o art.6º, inciso XIX, sob pena de se tornarem co-responsáveis pelos eventuais efeitos advindos de seu descumprimento."

O decreto de regulamentação Nº 1.752/95 também dá competência à CTNBio para estabelecer o Código de Ética de Manipulação Genética:

"Art. 2º Compete à CTNBio:

IV - propor o Código de Ética de Manipulações Genéticas;"

Não bastasse o referido decreto, a sociedade ainda dispõe da Resolução N° 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, ligado ao Ministério da Saúde, que estabelece os procedimentos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos, e o faz de maneira participativa, pois prevê a criação de Comissões de Ética em Pesquisa, com participação de leigos e de membros não pertencentes à instituição proponente da pesquisa.

"VII - Comitê de Ética em Pesquisa – CEP"

Toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa.

**Do Exame de Corpo de Delito e das Perícias em Geral do Código de
Processo Penal**

II, Art. 166 - Havendo dúvida sobre a identidade do cadáver exumado, proceder-se-á ao reconhecimento pelo Instituto de Identificação.

Art. 170 - Nas perícias de laboratório, os peritos guardarão material suficiente para a eventualidade de nova perícia. Sempre que conveniente, os laudos serão ilustrados com provas fotográficas, ou microfotográficas, desenhos ou esquemas.

Art. 173 - No caso de incêndio, os peritos verificarão a causa e o lugar em que houver começado, o perigo que dele tiver resultado para a vida ou para o patrimônio alheio, a extensão do dano e o seu valor e as demais circunstâncias que interessarem à elucidação do fato.

3. PROPOSIÇÃO

Assim sendo, a pesquisa teve como objetivos:

- a) Analisar a ação do formaldeído nas concentrações de 5%, 10% e 20%, sobre tecido muscular humano e seus efeitos na degradação do DNA nuclear;
- b) Avaliar o grau de degradação do DNA em tecido muscular humano nos quais foi aplicado formol, comparando os resultados com os obtidos em tecido muscular não formolizado, ou seja, *in natura*;
- c) Analisar a confiabilidade dos exames de perfis genéticos de DNA realizados em amostras biológicas conservadas em diferentes concentrações de formaldeído e indicar a concentração de maior confiabilidade, ou seja, a que menos degrada o DNA;
- d) Avaliar a validade de exames de perfis genéticos de DNA em cadáveres submetidos à conservação através da técnica da formalização.
- e) Discutir os aspectos éticos e legais pertinentes ao tema.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado na pesquisa (fragmento de tecido muscular) foi coletado no Departamento Médico Legal de Vitória – ES, em cadáveres não identificados que deram entrada no período de setembro a outubro de 2008, obtendo um total de 40 (quarenta) cadáveres.

Foram incluídos na pesquisa os cadáveres não identificados e que estiveram selecionados para serem sepultados pelo Departamento, em cumprimento à rotina administrativa que estabelece que, decorridos 30 (trinta) dias após a data de entrada, compete ao Estado o sepultamento dos corpos, após tomadas as medidas preventivas legais, ou seja, elaboração do laudo de exame cadavérico pós necrópsia, fotografias, coleta de impressões digitais quando possível, registro de dados antropológicos e coleta de amostra biológica (sangue ou tecidos) para futuro exame de perfil genético de DNA, se necessário.

Foram coletadas três fragmentos musculares intercostais de aproximadamente 1cm³, acondicionado em coletor plástico contendo 30ml de formol a 5%, 10% e 20%.

Armazenados durante período de 6 (seis) dias.

Após esse período, processou-se a análise gênica.

Foram processadas 120 (cento e vinte) amostras-questionadas assim sub-divididas:

- 40 (quarenta) amostras de fragmentos de tecido fixados em formol na concentração de 5%;
- 40 (quarenta) amostras de fragmentos de tecido fixados a 10%;
- 40 (quarenta) amostras de fragmentos de tecido fixados a 20%.

Cumpre-nos informar que a coleta de amostra de tecido muscular faz parte da rotina adotada pelo Departamento Médico Legal de Vitória – ES, quando do sepultamento de corpos não identificados e tem por objetivo a análise de perfis genéticos de DNA.

Uma amostra foi submetida ao exame de DNA *in natura*. Esta amostra compôs o grupo-controle.

Para assegurar a qualidade, integridade e segurança nos exames envolvendo a utilização de DNA estabeleceram-se um padrão de procedimentos de coletas e das análises, através de um manual, que será descrito logo abaixo. As etapas envolvem várias fases que podem ser assim enumeradas:

- a. Coleta dos materiais;
- b. Extração do DNA;
- c. Quantificação do DNA;
- d. Amplificação do DNA;
- e. Análise comparativa do DNA das amostras;
- f. Cálculos Estatísticos;
- g. Elaboração do Relatório das análises realizadas.

Todas as amostras coletadas foram acondicionadas em recipiente plástico com a devida identificação e encaminhadas para armazenamento em câmara fria do Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil – ES, onde permaneceram até o processamento que compreendeu as etapas de extração, amplificação e leitura de fragmentos.

No processo de extração foram utilizados os protocolos normalmente seguidos pelo Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil - ES, recomendados

para tecido muscular.

A amplificação foi realizada para marcadores genéticos em sistema *multiloci*¹, através da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase). Posteriormente será feita a leitura dos fragmentos amplificados em seqüenciador genético com eletroforese capilar.

A degradação do DNA foi avaliada tomando-se por base o número de marcadores amplificados. Em um procedimento normal de análise espera-se amplificar 15 (quinze) marcadores, correspondentes a 15 (quinze) regiões cromossomiais, e o marcador que determina a presença na amostra dos cromossomos X e Y (amelogenina), fato tal obtido nesta pesquisa. A degradação do material genético (DNA) é avaliada comparando-se os resultados encontrados, o número de marcadores amplificados e a intensidade de fluorescência dos picos obtidos.

Os alelos encontrados em todas as amostras (uma amostra controle, e três amostras fixadas em soluções com concentrações distintas de formol) foram validados de acordo com normas recomendadas pelos fabricantes dos reagentes utilizados.

Considerando os volumes das amostras de tecido muscular a serem utilizados na pesquisa temos que quase não houve tecido remanescente, posto que as amostras foram processadas integralmente. Em casos isolados de algum tecido remanescente este foi descartado, de acordo com as normas estabelecidas e em cumprimento no Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil. Os perfis genéticos de DNA das amostras obtidas foram incorporados ao Banco de Dados do Laboratório visando possível necessidade de comparações futuras com amostras-referência de familiares dos corpos não identificados.

Os dados encontrados foram submetidos às análises matemáticas e

¹ Kit comercial multiplex para identificação humana, 16 regiões, Identifiler, Applied Biosystems.

estatísticas pertinentes. Considerando o ineditismo da pesquisa, a falta de referências literárias a respeito, e ainda, a possível inespecificidade dos resultados achamos conveniente utilizarmos três instrumentos estatísticos. Para a análise dos dados os seguintes testes estatísticos foram utilizados: análise de variância para exemplo com um experimento (one-way ANOVA), teste de Pearson, e coeficiente de correlação intra-classe (ICC).

Todos os dados obtidos foram mantidos sob o mais absoluto sigilo, visando preservar a confidencialidade das informações.

Este projeto de pesquisa contou com o apoio operacional do Departamento Médico Legal de Vitória – ES e do Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil - ES, instituições que dispõem de área física, equipamentos, técnicos e profissionais treinados para a realização dos procedimentos necessários, dentro de normas éticas e de biossegurança exigidas em pesquisas que envolvem seres humanos.

Os Métodos de extração de DNA utilizado nesta pesquisa foram:

Material: SANGUE e TECIDO MUSCULAR

Método: CHELEX

O Método de amplificação de STRs autossômicos foi:

kit comercial: IDENTIFILER

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E RELATIVAS À BIOSSEGURANÇA

Em cumprimento aos requisitos necessários para o desenvolvimento deste projeto, o mesmo foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da EMESCAM (Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória). Não foram geradas imagens de qualquer natureza dos corpos não identificados submetidos à coleta de material biológico, portanto, não houve qualquer possibilidade de exposição da identidade da vítima. Os autores assumiram o compromisso de que nenhum dado coletado será publicado individualmente.

No tocante à biossegurança, o manuseio do material foi feito por pessoal habilitado e treinado para a função.

Os critérios de segurança relativos a esta pesquisa estão em conformidade com as normas atuais contidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

As amostras obtidas de cada cadáver foram armazenadas em refrigerador a -20°C, na câmara fria do Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil do Espírito Santo, até o término do processamento e foram integralmente utilizadas nas pesquisas não havendo remanescentes teciduais.

As amostras foram submetidas à análise de perfis genéticos de DNA e foram utilizados marcadores genéticos específicos para identificação humana, em regiões não codificantes do DNA, não havendo, portanto, nenhuma possibilidade da identificação de possíveis portadores de gens relacionados a doenças de qualquer natureza.

5. RESULTADOS

Coletou-se 40 amostras para controle (Tabela 1), verificou-se que os números de marcadores amplificados e extraídos foram em 100% (40) das amostras coletadas. Portanto, verifica-se que é extremamente possível proceder-se a identificação humana por meio da análise do exame de DNA em tecido muscular.

Tabela 1: Relação dos resultados obtidos da análise das amostras de controle

Amostra	Número de marcadores amplificados	Amostra	Número de marcadores amplificados
01	15 e amelogenina	21	15 e amelogenina
02	15 e amelogenina	22	15 e amelogenina
03	14 e amelogenina	23	14 e amelogenina
04	15 e amelogenina	24	15 e amelogenina
05	15 e amelogenina	25	15 e amelogenina
06	15 e amelogenina	26	15 e amelogenina
07	15 e amelogenina	27	15 e amelogenina
08	15 e amelogenina	28	15 e amelogenina
09	14 e amelogenina	29	14 e amelogenina
10	15 e amelogenina	30	15 e amelogenina
11	15 e amelogenina	31	15 e amelogenina
12	15 e amelogenina	32	15 e amelogenina
13	14 e amelogenina	33	14 e amelogenina
14	15 e amelogenina	34	15 e amelogenina
15	15 e amelogenina	35	14 e amelogenina
16	15 e amelogenina	36	15 e amelogenina
17	14 e amelogenina	37	15 e amelogenina
18	15 e amelogenina	38	15 e amelogenina
19	15 e amelogenina	39	14 e amelogenina
20	15 e amelogenina	40	15 e amelogenina

RESULTADO DA AMOSTRA CONTROLE

O resultado da amplificação do marcador chamado AMELOGENINA, que determina a presença na amostra dos cromossomos X e Y, refere-se ao sexo do indivíduo. Verificou-se que em 100% (40) das amostras de controle analisadas obteve-se a presença deste marcador (Gráfico 1).

Quantidade do marcador da Amelogenina em 40 amostras

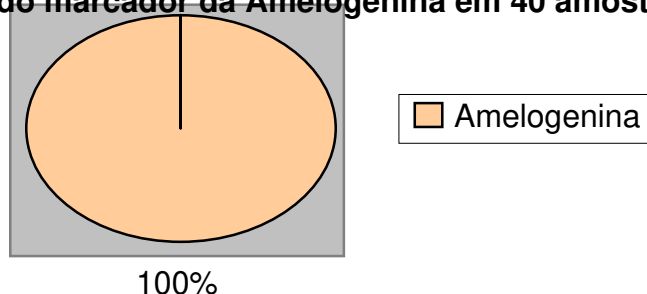
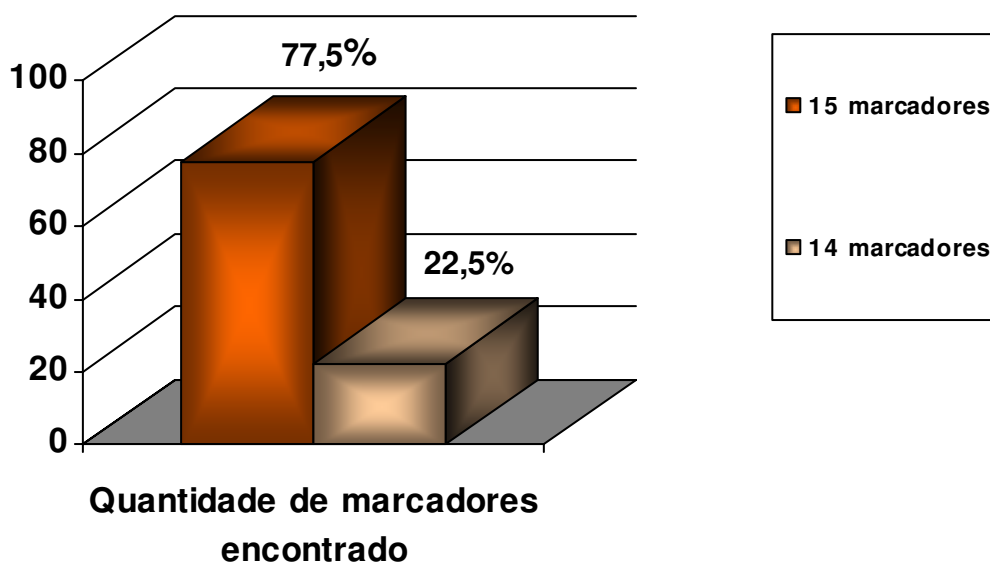


Gráfico 1: Quantidade do marcador amelogenina presentes nas amostras controle.

Com relação ao número de marcadores analisados (D8S1179, HumTH01, HumvWA, D21S11, D13S317, HumTPOX, D7S820, D16S539, D18S51, CSF1PO, D2S1338, D5S818, D3S1358, D19S433 e FIBRA/FGA) em 40 amostras de controle encontrou-se a quantidade de 15 marcadores acima citado em 77,5% (31) das amostras e 14 marcadores amplificados em 22,5% (09) (Gráfico 2).



Verificou-se que os números de marcadores amplificados e extraídos foram em 100% (40) das amostras coletadas, após **formolização a 5%**. Observou-se que estas amostras apresentaram mínima degradação do DNA e a validação dos alelos foram realizadas com relativa facilidade, assim como, verificou a presença da amelogenina em todas as amostras amplificadas, permitindo a confirmação do gênero (sexo) do titular da amostra (tabela 2).

Tabela 2: Relação dos resultados obtidos da análise das amostras formolização a 5%.

Amostra	Número de marcadores amplificados	Amostra	Número de marcadores amplificados
01	14 e amelogenina	21	14 e amelogenina
02	14 e amelogenina	22	15 e amelogenina
03	13 e amelogenina	23	13 e amelogenina
04	13 e amelogenina	24	14 e amelogenina
05	14 e amelogenina	25	15 e amelogenina
06	14 e amelogenina	26	14 e amelogenina
07	15 e amelogenina	27	14 e amelogenina
08	15 e amelogenina	28	13 e amelogenina
09	13 e amelogenina	29	14 e amelogenina
10	14 e amelogenina	30	15 e amelogenina
11	14 e amelogenina	31	15 e amelogenina
12	14 e amelogenina	32	13 e amelogenina
13	13 e amelogenina	33	14 e amelogenina
14	15 e amelogenina	34	14 e amelogenina
15	14 e amelogenina	35	13 e amelogenina
16	13 e amelogenina	36	14 e amelogenina
17	14 e amelogenina	37	13 e amelogenina
18	13 e amelogenina	38	15 e amelogenina
19	15 e amelogenina	39	14 e amelogenina
20	14 e amelogenina	40	13 e amelogenina

Verificou-se que os números de marcadores amplificados e extraídos foram em 100% (40) das amostras analisadas. Observou-se que as amostras **formalizadas a 10%** apresentaram a degradação do DNA em 100% (40) das amostras, pois obedecendo ao protocolo internacional preconizado pelo programa CODIS do FBI, para assegurar uma identificação humana, se faz necessária uma amplificação mínima de 13 marcadores e os resultados obteve-se uma quantidade de marcadores amplificados inferior ao programa CODIS. Notou-se também que a amelogenina não foi amplificada em seis (15%) amostras analisadas (tabela 3).

Amostra	Número de marcadores amplificados	Amostra	Número de marcadores amplificados
01	9 e amelogenina	21	11 e amelogenina
02	11 e amelogenina	22	10 e amelogenina
03	12 e amelogenina	23	10 e amelogenina
04	12 e amelogenina	24	9
05	11 e amelogenina	25	9 e amelogenina
06	11 e amelogenina	26	11 e amelogenina
07	9	27	10 e amelogenina
08	10 e amelogenina	28	10 regiões e amelogenina
09	10 e amelogenina	29	9
10	11 e amelogenina	30	10 e amelogenina
11	11 e amelogenina	31	10 e amelogenina
12	7	32	10 e amelogenina
13	9 e amelogenina	33	10 e amelogenina
14	10 e amelogenina	34	9 e amelogenina
15	11 e amelogenina	35	10 e amelogenina
16	10 e amelogenina	36	9
17	10 e amelogenina	37	9
18	11 e amelogenina	38	10 e amelogenina
19	10 e amelogenina	39	9 e amelogenina
20	10 e amelogenina	40	10 e amelogenina

Verificou-se que os números de marcadores amplificados e extraídos foram em 100% (40) das amostras coletadas, após **formolização a 20%**. Também observou uma degradação maior que as formolizadas a 5% e 10%. Obteve-se uma quantidade de amplificação inferior ao programa CODIS em 100% (40). Portanto, cadáveres formolizados à 20% são descartados para uma possível identificação humana. Com relação à amelogenina, nota-se a presença desse marcador em apenas 23 (57,5%) das amostras (tabela 4).

Amostra	Número de marcadores amplificados	Amostra	Número de marcadores amplificados
01	6 e amelogenina	21	5
02	8 e amelogenina	22	6
03	10	23	6 e amelogenina
04	9 e amelogenina	24	5
05	8	25	7 e amelogenina
06	7	26	6 e amelogenina
07	9 e amelogenina	27	6
08	9 e amelogenina	28	6
09	10	29	5
10	9	30	6 e amelogenina
11	7 e amelogenina	31	6 e amelogenina
12	6	32	7 e amelogenina
13	9	33	5 amelogenina
14	10 e amelogenina	34	6 e amelogenina
15	6 e amelogenina	35	6 s e amelogenina
16	6 e amelogenina	36	7
17	6 e amelogenina	37	7 e amelogenina
18	6 e amelogenina	38	6 e amelogenina
19	5	39	6 e amelogenina
20	6	40	6

GRÁFICO COMPARATIVO DAS CONCENTRAÇÕES DE 5%, 10% E 20%

Com relação ao número de marcadores analisados em 40 amostras nas concentrações de 5%, 10% e 20%, verificou-se que em 100% (40) das amostras coletadas, após **formolização a 5%** apresentaram mínima degradação do DNA e a validação dos alelos foram realizadas com relativa facilidade, assim como, verificou a presença da amelogenina em todas as amostras amplificadas, permitindo a confirmação do gênero (sexo) do titular da amostra. No entanto após **formolização a 10% e 20%** obteve-se uma quantidade de amplificação inferior ao programa CODIS em 100% (40). Com relação à amelogenina, nota-se a presença desse marcador em apenas 25 (85%) das amostras submetidas a concentração de 10% e 23 (57,5%) na concentração de 20% (Gráfico 03).

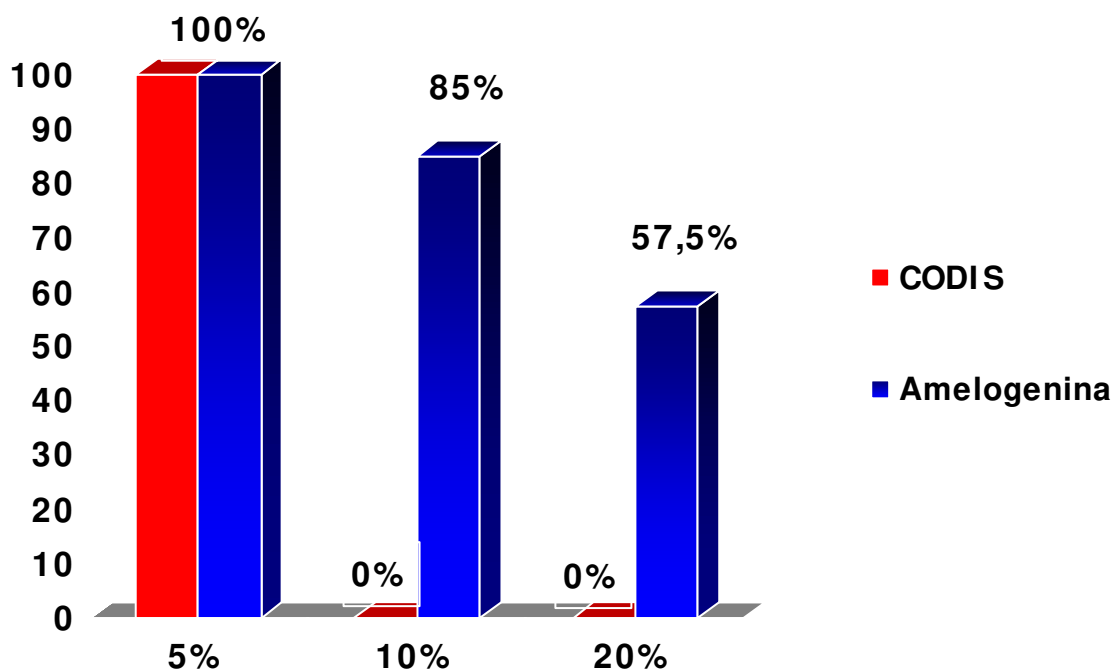


Gráfico 03: Estudo comparativo entre as concentrações das amostras submetidas ao formol de 5%, 10% e 20%.

6. DISCUSSÃO

A identificação pelo DNA afetou a vida de milhares de pessoas no planeta e tem sido utilizado rotineiramente na medicina legal e forense para desvendar crimes, identificar vítimas em desastres, catástrofes ou atentados terroristas, uma vez que o DNA é o único responsável pela transmissão das características hereditárias de cada espécie de ser vivo.

Desde 1893 com a invenção do formol, multiplicou-se o número de monumentos de carne para tornar viva a “memória” dos mortos, sendo usado para mumificar pessoas famosas como Lênin e Evita.

Tratando-se de morte tecidual, é fundamental o processo de fixação obtida através do uso de substâncias químicas (fixadores). Existem vários tipos e concentrações para se fixar um tecido.

A fixação se baseia em manter, de modo definitivo, as estruturas citológicas e histológicas das células e tecidos, ou seja, evita a degradação do material em decorrência de fenômenos autolíticos e permite a realização de inúmeras técnicas citológicas e histopatológicas, assim como, o processo de conservação dos cadáveres.

Segundo Mies (1998) o formol é o produto mais usado universalmente para conservação de cadáveres, mediante as técnicas de formolização e de embalsamamento, como meio de prevenir e retardar a putrefação.

Greer (1991) relatou as diversas formas de se fixar um tecido, sendo a fixação obtida através do uso de substâncias químicas (fixadores) a mais adequada. De acordo com seus estudos, o fixador mais utilizado é o formol a 10% (aldeído fórmico), devido ao seu baixo custo e simplicidade de uso.

No entanto, muitos autores confirmam que as amostras formolizadas a 10% apresentaram a degradação do DNA. Salienta-se que obedecendo ao

protocolo internacional preconizado pelo programa CODIS do FBI, para assegurar uma identificação humana, se faz necessária uma amplificação mínima de 13 marcadores.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se a veracidade da afirmação acima, pois em 100% (40) das amostras formolizadas a 10% e 20% apresentaram degradação do DNA.

Assim como também a amelogenina não foi amplificada em várias amostras, desta forma não sendo possível a confirmação do gênero (sexo) do titular da amostra.

Gusmman (2007) citou que o aldeído fórmico atua como fixador interagindo com os aminoácidos lisina e arginina. Tal fixador não provoca precipitação de proteínas, não preserva gorduras livres, porém fixa lipídeos complexos, provoca leve precipitação de outros constituintes celulares e não é o fixador de eleição para carboidratos.

Cheoker (2002) afirmou que o formol tem a propriedade de degradar o DNA, no seu todo ou parcialmente, na dependência da concentração e do tempo de exposição (fixação) a que um determinado tecido é submetido. Seus estudos baseiam-se em reações bioquímicas, sem a realização de um estudo propositivo de campo ou experimental. No entanto, assegurou que se faz necessária pesquisa a respeito.

Entretanto, da ação do formol sobre o material genético humano (DNA), este tema gera muitas controvérsias, havendo linhas de pesquisa científica que defendem a não interferência do formol sobre o DNA e as que afirmam que a fixação de cadáveres com formaldeído pode causar a degradação do material genético.

Apesar de alguns autores defenderem a hipótese de que tecidos

conservados em formol (como por exemplo, cordão umbelical) perdem todo o seu material genético, os resultados obtidos nesta pesquisa apontam no sentido de que o DNA realmente sofre degradação quando em contato com o formol e que uma concentração maior de formol no tecido dificulta a amplificação do material genômico e que esta dificuldade é diretamente proporcional à concentração, ou seja, a degradação é maior quanto mais concentrada for a solução de formol.

Sabidamente o processo de formolização, muitas vezes útil e imprescindível para a adequada conservação e para o transporte de corpos, não é uma prática regulamentada pelos órgãos públicos e muitas dúvidas pairam sobre o assunto, particularmente sobre a quem compete tal responsabilidade. Desta forma, por não constituir-se em prática regulamentada ou fiscalizada, de uma gama de técnicas em sua grande maioria de fundamentos empíricos, aquele que realiza o ato escolhe uma, a que mais lhe parecer conveniente.

Por esta razão torna-se difícil, diante de uma amostra dita ou considerada formolizada, a elaboração de estimativas seguras quanto à aplicabilidade de uma análise de perfis genéticos de DNA.

Alguns laboratórios, tendo conhecimento de que os tecidos a serem analisados foram submetidos à ação do formol, recusam-se a iniciar as análises.

Entendemos que esta não deva ser a rotina adotada. Os resultados do nosso trabalho mostram que tecidos embebidos em formol em altas concentrações ainda apresentam quantidade de DNA passível de amplificação mediante utilização dos kits comerciais atuais.

Nesse sentido, o trabalho ora exposto, contribui significativamente para desmistificar alguns conceitos adotados por alguns profissionais, conceitos adotados possivelmente empiricamente, sem evidências significativas.

Questiona-se também, a partir dos resultados obtidos no trabalho, a

validade da indicação de concentrações de formol a 5% para realização de processo de formolização, considerando que a degradação do formol mostrou-se menor nos tecidos que foram expostos às menores concentrações.

A princípio este deveria ser o raciocínio e neste sentido a indicação seria viável.

Importa considerar que a literatura mundial, ao referir-se ao uso do formol, tanto para conservação de corpos quanto para preservação de amostras destinadas às análises histopatológicas, recomendam categoricamente “formol a 10%”.

Questionamos se uma redução na concentração de formol, de 10 para 5%, permitiria um mesmo processo de conservação ou se teríamos uma aceleração dos fenômenos transformativos post-mortem. A considerarmos esta última hipótese os objetivos primordiais da utilização do processo de formolização não seriam atingidos.

A colocação acima exposta é válida desde que o uso de formol a 5% fosse indicado somente nos processos de formolização de corpos para fins de transporte ou para conservar corpos por períodos mais curtos de tempo, mantendo-se a recomendação da utilização de formol a 10% para os demais processos de análise histológica.

Sugerimos como recomendação ou rotina a ser seguida pelos serviços médicos legais e serviços de verificação de óbito a coleta de amostra-referência em todos os corpos necropsiados, antes que se proceda à formolização ou embalsamamento.

Considerando que o processo de formolização não é realizado, em regra, por médicos legistas e sim por técnicos em preparação de corpos; considerando ainda que estes não se baseiam em normas preconizadas pelas

instituições sanitárias, não adotando por conseguinte concentrações regulares e padronizadas, entendemos que, diante da necessidade da análise de perfis genéticos de DNA em tecidos que foram submetidos a este procedimento, mesmo diante da comprovação de que o formol é um agente que degrada o DNA,

Ponderamos ainda a qualidade dos kits comerciais atualmente disponíveis, o exame de DNA não deverá ser descartado pois um dado aparentemente negativo no processo de formalização (falta de padronização) pode constituir-se exatamente em um fator favorável.

A atividade pericial voltada para a elucidação de questões referentes ao Direito Penal e ao Processo Penal tem objetivos distintos daquela demandada para fins cíveis (em geral de ordem patrimonial ou financeira). O objetivo precípua da perícia na esfera penal é a colaboração no cumprimento e na aplicabilidade da Justiça, em sentido amplo.

Nesse sentido, amplia-se também e de forma significativa, a atuação do perito, posto que este, em determinadas situações, se constituirá em um arauto que dará aos julgadores uma palavra final.

Este não pode, diante dos sagrados interesses da sociedade, negligenciar em sua área de atuação, e a busca por respostas implica em sempre tentar, sempre questionar, sempre inovar, sempre buscar soluções e alternativas, não acreditando nunca nos que divulgam e defendem a expressão: “Não adianta fazer pois isto não é possível e não vai dar certo”.

A conduta e a postura de não desistir diante das dificuldades porventura encontradas se afina perfeitamente com a genética criminal e deve ser seguida e divulgada por todos aqueles que, de alguma forma, estão comprometidos com esta área da ciência.

7. CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, é lícito concluir que:

a) As amostras formolizadas à:

- 5% apresentaram mínima degradação do DNA comparada com as amostras de controle. Todas as amostras (100%) foram amplificadas, inclusive o marcador da amelogenina, permitindo a confirmação do gênero (sexo) do titular da amostra. Salienta-se ainda que a validação dos alelos foram realizada com relativa facilidade;
- 10% apresentaram a degradação do DNA em 100% (40) das amostras. Confirmando, de acordo com o protocolo internacional preconizado pelo programa CODIS do FBI, esta concentração não serviria para identificar um indivíduo. Pois, para assegurar uma identificação humana, se faz necessária uma amplificação mínima de 13 marcadores, resultado este não alcançado. Notou-se também que a amelogenina não foi amplificada em seis (15%) amostras analisadas.
- 20% apresentaram degradação maior que as formolizadas a 5% e 10%, obtivimos uma quantidade de marcadores amplificados inferior ao programa CODIS em 100% (40) das amostras. Portanto, cadáveres formolizados à 20% são descartados para uma possível identificação humana.

b) O formol tem a propriedade de degradar o DNA, no seu todo ou parcialmente, na dependência da concentração de exposição (fixação) a que um determinado tecido é submetido;

c) O formol ainda é o produto mais usado universalmente para conservação de cadáveres, mediante as técnicas de formolização e de embalsamamento, como meio de prevenir e retardar a putrefação.

d) De acordo com os resultados obtidos concluímos que o fixador mais adequado é o formol a 5% (aldeído fórmico), devido ao seu baixo custo, simplicidade de uso e principalmente pela sua ação eficaz na não degradação do tecido humano.

e) A atividade pericial voltada para a elucidação de questões referentes ao Direito Penal e ao Processo Penal tem objetivos distintos daquela demandada para fins cíveis. Nesse sentido, verificamos a essencial atuação do perito, posto que este, em determinadas situações, se constituirá em um arauto que dará aos julgadores uma palavra final. Este não pode, diante dos sagrados interesses da sociedade, negligenciar em sua área de atuação, e a busca por respostas implica em sempre tentar, questionar, inovar, buscar soluções e alternativas. A conduta e a postura de não desistir diante das dificuldades porventura encontradas se afina perfeitamente com a genética criminal e deve ser seguida e divulgada por todos aqueles que, de alguma forma, estão comprometidos com esta área da ciência.

Verificamos também que, embora exista a Lei 8.501/92 e as "Normas Gerais de Serviço" previsto para as funerárias, nota-se a falta de padronização no processo de conservação dos corpos. Sendo assim, caso haja uma necessidade de análise de DNA, mesmo considerando o formol um agente degradante, a busca por perfis genéticos NÃO deverá ser descartada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, A. *et al.* Challenges of DNA Profiling in Mass Disaster Investigations, Croatian Medical Journal 2005;46(4):540-548

Ben-Ezra, J; Johnson D,A; Rossi, J; Cook, N; Wu, A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. J Histochem Cytochem. 1990; 39: 351-354.

Benecke, Mark. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. Naturwissenschaften, v. 84, p. 181 - 188, 1997

Bezerra, C. C. Metodologia de atuação pericial em desastre de massa - Relato do caso Paraguai. Perícia Federal - Ano VI – Número 20 – janeiro a abril de 2005 – p6-10.

Cheoker, P. The effect of formalin-fixed tissue in DNA molecule. The Chemistry World. 2002; 33: 232-235.

DeSalle, R. & Amato, G. The expansion of conservation genetics. Nat. Rev. Genet. 2004; 425(5): 702-712.

Duarte, Francisco .A.M.; Perez, Augusto.M.; Pena, Sergio.D.; de Barros, Margareth. P.M.; Rossi, Elsie O. A avaliação do DNA como Prova Forense. Ribeirão Preto: FUNPEC. 2001. 283p.

Eglinton, G & Logan, G. A. Molecular preservation. Philosophical Transactions of The Royal Society B. 1991; 333: 315-328.

Evonne P. Y. Tang. Path to Effective Recovering of DNA from Formalin Fixed Biological Samples in Natural History Collections

Formalin-Fixed Biological Samples in Natural History Collections. National Research Council of the National Academies. 2006; 70: 1-70.

Gino, S; Varacalli, S; Robino, C; Torre, C. STR typing of fixed human tissue. Formalin vs. an alcohol-based method. Int Congr Ser. 2004; 1261: 611-612.

Greer, C, E; Peterson, N, B; Kiviat, M, M, Manos. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Effect of fixative and fixation time. Am. J. Clin. Pathol. 1991; 95: 117-124.

Greer, C,E; Lund J,K; Manos M,M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. PCR Methods Appl. 1991; 1: 46-50.

Gusman, T; An disorder in DNA by action of formalin. Scrubber Review of Genetic; 2007; 232-233.

Hamazaki, S; Koshiba, M; Habuchi T; Takahashi, R; Sugiyama, T. The effect of formalin fixation on restriction endonuclease digestion of DNA and PCR amplification. Path Res Pract. 1993; 189: 553-557.

Inwald, G; A extraction of muscular tissue embedded in formalin. Forensic Medicine Journal. 2001; 78-83.

Jackson, D,P; J. D. Hayden; P. Quirke. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. In PCR-A practical approach. 1991; 29-50.

Jobim, L. Fernando; Costa, R. Luís; Silva, Moacyr. Identificação Humana. Identificação pelo DNA. 2006; 302(2): 5-100.

Karlsen, E; Kalantari, M; Chitemerere, M; Johansson,B; Hagmar, B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. Lab Invest. 1994; 71: 604-611.

Kling, James. Genetic counseling: the human side of science. The Scientist; julho-19; 1999.

Legrand, B; Mazancourt P, Durigon, M; Khalifat, V, Crainic, K. DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues. Forensic Science International. 2002; 125: 205-211.

Lewis, R; A molecular biology increase the criminal justice. Forensic Bulletin. 2004; 122-125.

Luftig, M. A., Richey, S. DNA and Forensic Science. New England Law Review. Vol. 35:3; 2001

Malmgren, C; Gustavsson, I; Hurte, I; Saldeen, T; Gyllensten, U. Reliable typing of DNA amplified from formalin-fixed tissue biopsies. Genome Research. 1992; 2: 175-176.

Matte, C.H, F *et al.* A utilização da análise de DNA em desastres em massa: participação Brasileira na Identificação dos corpos do incêndio no Paraguai. Instituto Geral de Perícias. Revista do IPG, R.S, ano 3, janeiro 2007

Mehrdad Hajibabaei; Jeremy R. de Waard; Natalia V. Ivanova; Sujeevan Ratnasingham; Robert T. Dooh; Stephanie L. Kirk; Paula M. Mackie; Paul D. N Hebert. Critical Factors for assembling a high volume of DNA barcodes. Philosophical Transactions of The Royal Society B.

2005; 333: 1-9.

Mies, C. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. *Hum. Pathol.* 1994; 25: 555-560.

Miething, Franziska; Hering Sandra; Hanschke, Bärbel; Dressler, Jan. Effect of fixation to the degradation of nuclear and Mitochondrial DNA in different tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2006; 54(3): 371-374.

Mizuno, T; Nagamura, H; Iwamoto, K, S; Fukuhara, T; Tokunaga, M; Tokunaga, S; Mabuchi, K; Seyama, T. RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. *Diagn. Mol. Pathol.* 1998; 7: 202-208.

Remualdo, Vanessa Roaslia; Oliveira, Rogério Nogueira. Analysis of mitochondrial DNA from the cadáver maintained i formaldehyde. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology.* Julho 2007; 28(2): 145-146.

Romero, R; Juston, A, C; Ballantyne, J; Henry, B, E. The applicability of formalin-fixed and formalin-fixed paraffin embedded tissues in forensic DNA analysis. *Forensic Sci.* 1997; 42: 708-714.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase." *Science* 239 (1988): 487-491.

Smarra, A., Paradela E., Figueiredo, A. A Genética Forense no

Brasil. Scientific American Brasil. 51:87, 2006.

Sano, K; Takayanagi, K; Kaneko, T; Liu, C; Kinoshita, T; Nakamura, N; Asamura, H; *et al.* Application of short tandem repeat of genomic DNA and mitochondrial DNA for identification of mixed-up tissue specimens. Pathol Int. 2000; 50:1-6.

Sugiyama, T; Koshihara, M; Ogama, K; Hamazaki, S; Ogawa, O; Kitajima, T. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded Tissues. Path Res Pract. 1993; 189: 66-72.

Tokuda, T; Nakamura, T; Satonaka, K; Maeda, S; Dóí, K; Baba, S; Sugiyama, T. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. J Clin Pathol. 1990; 43: 748-751.

United States Patent 5,656,493 Mullis, *et al.*: System for automated performance of the polymerase chain reaction; August 12, 1997

Veríssimo, P; Sanger, W; Winston, K; Wats, M; The DNA application in degraded tissues. Am. J. Forensic Genetic. 2007; 343-349.

Wiegand, P; Domhöver, J; Brinkmann, B. DNA-Degradation in formalinfixiertem Gewebe. Pathologie. 1996; 17: 451-454.

ANEXO 1

EMESCAM
Compromisso com a Vida

DECLARAÇÃO

O projeto de pesquisa "Influência do Formol Utilizado para Conservação de Cadáveres na Obtenção de DNA Nuclear em Tecido Muscular.", cadastrado com o No 016/2008, do pesquisador responsável "Darcy de Oliveira Tosello", foi analisado e julgado pelo Colegiado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta Instituição.

Declaramos que o referido projeto cumpre plenamente as exigências da resolução 196/96 e resoluções posteriores da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde e, portanto, foi **APROVADO**, pelo Colegiado do CEP na reunião ordinária de 25/08/2008.

Este projeto de pesquisa não poderá sofrer interrupção ou modificação na forma original apresentada sem o prévio conhecimento e consentimento deste CEP. Cabe esclarecer que o pesquisador responsável tem a obrigação de apresentar relatório dos resultados da pesquisa deste projeto ao CEP na data máxima de 25/08/2009, sendo que o não cumprimento deste prazo resultará no impedimento do pesquisador responsável submeter novos projetos de pesquisa para análise neste CEP.

Vitória, 18 de Agosto de 2008.

Mary Lee dos Santos
Mary Lee dos Santos
Coordenadora Adjunta do
Comitê de Ética em Pesquisa
(CEP-EMESCAM)

ANEXO 2

EXTRAÇÃO DE DNA POR CHELEX- SANGUE

(Conforme Walsh,1991)

Procedimento

1. Sangue: 3mm² ou 3µl de sangue total
Cortar a mancha e colocá-la num tubo de 1,5 mL (com furo na tampa) e adicionar 1 ml de H₂O autoclavada.
2. Deixar em temperatura ambiente durante 30 min (agitar ocasionalmente, se amostra fresca, não agitar)
3. Centrifugar por 3 min (10000-150000 x g).
4. Retirar o sobrenadante e eliminá-lo, deixar cerca de 30µl no tubo.
5. Adicionar 170µl de Chelex (*Chelating resin 100*) a 5% ⇒ não esquecer de cortar a ponta da pipeta
6. Colocar os tubos em banho Maria a 56°C por 30min
7. Agitar um pouco no vórtex (5 a 10s)
8. Ferver os tubos durante 8 min ⇒ não esquecer de furar os tubos com uma agulha
9. Agitar um pouco no vórtex (5 a 10s)
10. Centrifugar por 2 a 3 min (10000-15000)

Observações:

1. O chelex contém resina esférica que precisa ser colocada na solução das amostras. O furo nos tubos é para permitir saída de vapor, logo impedir abertura dos frascos durante fervura.
2. Após extração do DNA deverá ser congelado. Não deitar os tubos antes do congelamento total do produto extraído.

Extração de DNA POR CHELEX

Tecido muscular

Procedimentos

1. Descreveu morfolologicamente o tecido, verificando a porção que tem melhor aspecto, evitando retirar porções do bordo (podem estar contaminadas) ou com muitas fibras (mais difícil digestão).
2. Corar (fragmentar ao máximo) em condições estéreis (sob superfície estéril, com bisturi e pinças estéreis) o tecido muscular (ou útero e próstata) e colocar em tubo de 1,5 mL estéril devidamente identificado (Nº da amostra, Tipo de extração, tempo BM, data e tipo de tecido biológico).
3. Adicionam-se 600µl de Tampão de extração de Tecido.
4. Colocar as amostras no banho a 56°C por 2 horas, por overnight (24 horas), ou por 48 horas (o tempo melhor a usar depende das condições do material)
5. Após retirar as amostras do banho, agitar as amostras um pouco no vórtex (5 a 10s) e centrifugar por 3 minutos a 14.000 rpm.
6. Retirar o sobrenadante e colocá-lo em novo tubo adiciona-se 400µl de Clorofane a cada tubo.
7. Inverter vigorosamente cada tubo até a solução ficar com o aspecto leitoso (manualmente ou 30 segundos no Vórtex)
8. Centrifugar 5 min a 14000 rpm.
9. Marcar novos tubos com a mesma identificação.
10. Após centrifugação observa-se 3 fases distintas, o DNA encontra-se na fase superior. Retira-se esta parte cuidadosamente para o novo tubo respectivo, tendo

o cuidado de não pipetar a fase protéica, pois esta causa inibição da reação de PCR; o precipitado é rejeitado.

11. Colocar 600 μ l de ETOH a 100% a frio (o qual deve ser previamente colocado num copo esterilizado e no gelo) em cada amostra + controle (-).

12. Inverter suavemente e uma só vez cada tubo.

13. Colocar as amostras por 30 min a -20°C para a precipitação do DNA.

14. Centrifugar inicialmente por 15 min a 14000 rpm para poder observar se há formação de pellet; (Atenção: tubos com alça voltada para o lado de fora da centrífuga para orientação do lado do tubo em que se forma o pellet).

15. Decantar cuidadosamente o etanol.

16. Secar o pellet á temperatura ambiente até evaporar todo o etanol (mínimo 12h), colocar os tubos deitados, com a tampa aberta, dentro num armário fechado e voltados para o lado posterior.

17. Ressuspender as amostras com 25 μ l de H₂O desionizada e autoclavada.

18. Agitar e dar um pulso de centrifugação.

19. Colocar no banho Maria a 56°C por 30 min.

Notas:

20. Não esquecer que é fundamental fazer um controle negativo (o qual contém um tampão de Extração e adicionar proteinase K e DTT-usados na extração)

21. Na precipitação o ideal para obter DNA genômico humano é centrifugar por 10 min a 13000x g $\approx$ 56000 rpm;

22. Após a extração o DNA deverá ser congelado. Não deitar os tubos antes do congelamento total do produto extraído. fazer alíquotas da extração quando for necessário para evitar contaminação na sala de pré-PCR.

23. Todo o material a ser usado deve ser lavado com hipoclorito e água MiliQ, autoclavar (esterilização e secagem) e colocar no mínimo 12h na UV.

AMPLIFICAÇÃO DE STRs AUTOSSÔMICOS

Identifiler

1. Organizar a câmara de fluxo laminar colocando papel, pipetas, ponteiras, becker com saco plástico, tubos de 1,5 ml ou de 0,5 µl, tubos 0,2 µl marcados com identificação da amostra e água estéril.
2. Ligar a UV e deixar por 10 minutos.
3. Retirar as amostras da geladeira ou freezer (esperar descongelar).
4. Agitar e centrifugar as amostras.
5. Cinco minutos antes de terminar a esterilização, retirar a Taq Gold e as reações de PCR da geladeira (Reaction Mix e Primer Set).
6. Agitar.
7. Desligar a UV.
8. Distribuir 6,6 µl de água estéril em cada tubo.
9. Pegar as reações de PCR e a Taq Gold.
10. Preparar MASTER MIX:
 - n x 2,5 µl de REACTION MIX
 - n x 0,4 µl de TAQ GOLD
 - n x 2,5 µl de PRIMER SET
11. Agitar no Vortex e centrifugar.
12. Distribuir **5,4 µl** da **MASTER MIX**
13. Adicionar **1 µl** da extração de **DNA** (Chelex).

Volume final = 13 µl