

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

THAYS FRANCYERY ANDRADE CARVALHO

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA COLETA E EXTRAÇÃO DE
DNA DE CÉLULAS BUCAIS.

Maceió

2023

THAYS FRANCYERY ANDRADE CARVALHO

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA COLETA E EXTRAÇÃO DE
DNA DE CÉLULAS BUCAIS.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Ciências
Biológicas e da Saúde (ICBS) da
Universidade Federal de Alagoas como
requisito parcial para a obtenção do
título de bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Dalmo Almeida de Azevedo

Maceió

2023

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

C331a Carvalho, Thays Francery Andrade.
Avaliação de protocolos utilizados para coleta e extração de DNA de células bucais / Thays Francery Andrade Carvalho. – 2023.
32 f. : il. color.

Orientador: Dalmo Almeida de Azevedo.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 30-32.

1. Genética forense. 2. DNA. 3. PCR. 4. Suabes estéreis. I. Título.

CDU: 575 : 340.64

Dedico este trabalho aos meus pais Francisco de Assis Carvalho e Erinalda Carvalho, dedico ainda a minha avó Luiza A. de Andrade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Francisco e Erinalda, por me ensinarem que o estudo era o melhor caminho a seguir. Aos meus familiares que me deram todo apoio e carinho ao longo desses anos em especial: Meraldo, Marleide, Vaninha, Joseias, Thallyson, Luiza, Angélica, Rafael, vô Geraldo e Paulo.

Agradeço a todos aqueles envolvidos no meu período pré-universitário, desde o início da minha vida acadêmica tive o prazer de conhecer profissionais incríveis que me incentivam até os dias atuais. As “tias”: Georgina, Teresinha, Josilda e Helena. Aos meus queridos professores do EREMG em especial, Marcelo, Márcia, Berenice, Socorro Duarte e Dorgivanice. As minhas amigas, Iasmin, Carol, Helena, Nayara e Bruna, especialmente a Graziela, Larissa e Micaelle, e a suas famílias que me acolheram tão carinhosamente.

Agradeço aos meus companheiros de graduação, carinhosamente chamados de “perdidos do ICBS” esse período da minha vida foi muito mais fácil de lidar ao lado de vocês. Aos meus parceiros de trabalhos desde o primeiro período: Amanda, Alana, Bruna e Tadeu, nosso santo das causas impossíveis. A Karol (pessoa que mais remou o mesmo barco que eu, ou seja, se desesperou), Tony, Matheus, Jhenifer, Mariana e Aline (as agregadas dos perdidos).

Agradeço às minhas amigas do Laboratório de Genética Molecular Humana, Gabriela, Rayssa, Mirele, Clara, Rayane e Grazi, por tornarem os nossos momentos tão incríveis e por todo o apoio nessa reta final. E ao Diogo meu eterno chefinho.

Agradeço ao meu namorado Henrique, por ser o meu ponto de paz em meio a tempestade, por me incentivar, ouvir os meus desabafos e fazer tudo e muito mais por mim ao longo desses anos.

Agradeço aos meus professores de graduação especialmente a Prof. Dra Graziela Cury por cada conhecimento compartilhado, e fazer dessa fase da minha vida algo tão leve. E ao meu orientador Prof. Dr. Dalmo por sua incrível orientação, paciência e dedicação.

E claro, agradeço a mim que cheguei até aqui e que em nenhum momento me permitir pensar na desistência de seguir o meu sonho. Por último e não menos importante agradeço a Deus por me dar forças para seguir a minha jornada.

“Ser biólogo não é um trabalho, é um modo de vida”

-Ernst Mayr

RESUMO

A ciência forense é uma área interdisciplinar que abrange entre outras ciências a biologia, tendo como objetivo de dar suporte para as investigações relacionadas à justiça criminal e civil. Uma das ciências forenses é a genética forense, sendo esta uma das principais atividades realizadas com o auxílio de laboratório, que por sua vez possui diversas atividades relacionadas ao estudo do material genético, dentre elas, encontram-se a execução de perícias de casos de filiação, identificação individual e criminalística biológica. Com a descoberta do DNA, e os avanços da biologia molecular, o desenvolvimento de novas técnicas contribuem com o processo de identificação humana, dentre elas a PCR. Neste estudo foram avaliadas diferentes variáveis no protocolo de extração de DNA oriundo de células da mucosa oral, coletadas a partir de suabes estéreis, com objetivo de padronizar a coleta de DNA de células bucais no laboratório de DNA Forense da Universidade Federal de Alagoas. Foram realizadas análises descritivas e teste de variância (ANOVA). Os resultados obtidos demonstraram que é preferível o uso da coleta sublingual, a secagem de 15 min à temperatura ambiente é suficiente, e que há uma relação inversa entre tempo de armazenamento à temperatura ambiente e a quantidade de DNA. Vale ressaltar que foi possível obter DNA amplificado em amostras armazenadas à temperatura ambiente por até 240 dias. Contribuindo assim para a padronização da coleta através de Chelex 100 no lab de DNA Forense.

Palavras chaves: DNA; PCR; RT-qPCR; suabe; chelex; perícia criminal

ABSTRACT

Forensic science is an interdisciplinary area that includes biology, among other sciences, and aims to provide support for investigations related to criminal and civil justice. One of the forensic sciences is forensic genetics, which is one of the main activities performed with the help of a laboratory, which in turn has several activities related to the study of genetic material, among them are the execution of forensics in cases of parentage, individual identification, and biological criminalistics. With the discovery of DNA, and the advances in molecular biology, the development of new techniques contribute to the process of human identification, among them PCR. In this study, different variables were evaluated in the protocol of DNA extraction from oral mucosa cells, collected from sterile swabs, aiming to standardize the collection of DNA from oral cells in the Forensic DNA laboratory of the Federal University of Alagoas. Descriptive analysis and test of variance (ANOVA) were carried out. The results obtained showed that the use of sublingual collection is preferable, drying for 15 min at room temperature is sufficient, and that there is an inverse relationship between storage time at room temperature and the quantity of DNA. It is worth mentioning that it was possible to obtain amplified DNA in samples stored at room temperature for up to 240 days. This contributes to the standardization of the collection using Chélex 100 in the Forensic DNA lab.

Keywords: DNA; PCR; RT-qPCR; swabe; chelex; forensics

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Metodologias para coleta de células bucais com suabe	20
4.1.1 Esfregaço na bochecha	20
4.1.2. Sublingual	21
4.2 . Diferentes tempos de secagem	21
4.3 Experimentos com o tempo de armazenamento	22
4.4 Extração de DNA	23
4.5 Avaliação da eficácia dos protocolos	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

A ciência forense é uma área interdisciplinar que abrange entre outras ciências a biologia, tendo como objetivo dar suporte para as investigações relacionadas à justiça criminal e civil. Uma das ciências forenses é a genética forense, que estuda o material genético (sendo esta uma das principais atividades realizadas com o auxílio de laboratório) executando perícias de casos de filiação, identificação individual e criminalística biológica. Sua utilização se dá através de materiais biológicos encontrados nas cenas de crime (SEBASTIANY et al., 2013 e SALA, 2018).

Segundo Bezerra (2004), a área da genética forense tem como principal objetivo a identificação genética em material biológico, na qual são utilizados marcadores genéticos. Pode ser fonte de DNA qualquer tipo de tecido ou fluidos biológicos encontrados no local de crime.

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é uma molécula de cadeia longa, com estrutura em forma de dupla hélice, formada por nucleotídeos constituídos por uma base nitrogenada (Adenina, Timina, Guanina ou Citosina), um açúcar (Desoxirribose) e por um grupamento de fosfato. Pardini et al. (2001), descreve a molécula como a responsável pela identificação, pois carrega ao longo de seus 23 pares de cromossomos informações das características hereditárias de cada indivíduo.

Sir Alec Jeffreys desenvolveu na década de 80, o primeiro método para a análise de DNA aplicado à identificação humana. A partir de então, os avanços nas técnicas de DNA propiciaram significativo impacto no campo da ciência forense, e foi pelas técnicas de identificação, e análise do DNA, que se verificou que esta era uma poderosa ferramenta para a identificação humana e para a investigação criminal. (KOCH, 2008).

Até o presente momento diversos avanços nos estudos das variações no DNA foram realizados, assim como a criação de novas técnicas, uma delas a reação em cadeia polimerase (PCR), desenvolvida por Kary Mullis em 1983. Esta técnica é revolucionária por ser rápida e de fácil utilização, além de possuir alta sensibilidade, sendo capaz de amplificar DNA em quantidades mínimas de DNA e com certo grau de degradação. Contudo, uma limitação da PCR é que está sujeita a contaminações

(KOCH, 2008). Outro fator limitante para a análise do DNA é a quantidade. Deste modo, a quantificação do DNA obtido das amostras é realizada com a finalidade de assegurar que existe quantidade suficiente para posterior amplificação. O estado de preservação da amostra também influencia em sua análise permitindo a escolha de qual DNA estudar, ou seja mitocondrial (mtDNA) ou nuclear (ncDNA). Outros fatores que podem interferir na PCR são as contaminações e a presença de inibidores na amostra (MARTINS, 2016).

A PCR em tempo-real (RT-qPCR), descrita pela primeira vez em 1992 por Higuchi e seus colaboradores, consiste no monitoramento da PCR no decorrer de todos os seus ciclos. Sendo semelhante a técnica da PCR convencional, a sua vantagem se dá na possibilidade de quantificar em tempo real o DNA amplificado em cada ciclo da PCR (HIGUCHI et al., 1992 e MARTINS, 2016).

O estudo de Oliveira e Moraes Filho (2018), ao relatar a utilização de técnicas de biologia molecular para desvendar crimes, tendo como base a identificação através do DNA, cita a PCR. Vale ressaltar, que a aplicação da biologia molecular para a investigação de crimes tem evoluído ao longo das últimas décadas, a Genética Forense ou DNA Forense tem evoluído e adquirido destaque nas questões investigativas, apesar de ser mais direcionada para a identificação humana e teste de paternidade, sua investigação consiste na realização de técnicas de análise obtidas de materiais biológicos tais como: fios de cabelos, sangue, tecido, sêmen, saliva dentre outros, sendo o resultado obtido utilizado para resolução de crimes (DECANINE, 2016).

No ano de 2012 foi sancionada no Brasil Lei nº 12.654/2012 e a partir de então passou a realizar-se coleta de material biológico em indivíduos condenados ou suspeitos de crimes. No ano seguinte a partir do decreto nº 7950/2013 foi instituída no país a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG), a qual auxilia tanto no contexto de apuração criminal, quanto na identificação de pessoas desaparecidas. Com base neste decreto, o Ministério da justiça através da Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP) no ano de 2013 atribuiu o procedimento operacional padrão da perícia criminal, o qual prevê a coleta de DNA a partir da mucosa oral. (“SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL, 2022).

O DNA obtido de amostras bucais tem sido cada vez mais utilizados pois além da facilidade na coleta, não é um método invasivo, também tem qualidade comparável ao de amostras de sangue (WOO; LU, 2018). Sendo defendido por Hosono e colaboradores (2003), por poder ser utilizado inclusive em crianças. Vanrell (2002) relata que o DNA presente na saliva pode ser recuperado na vítima ou cadáver, a depender do tempo em que ocorreu a lesão.

O uso do suabe tornou-se popularmente conhecido após a pandemia da síndrome respiratória aguda grave do coronavírus (SARS-COV-2) em 2020. No entanto, o mesmo instrumento é utilizado em outras jurisdições, como por exemplo a análise de casos forenses, sendo ferramenta básica para coleta de DNA (ADAMOWICZ et al., 2014), a exemplo de coletas de DNA através de células epiteliais em vítimas de agressores (DE BRUIN et al., 2012). Como alternativa aos métodos invasivos pode se utilizar a coleta de DNA bucal, sendo ela realizada através das técnicas de cotonetes, escovas, enxaguatórios bucais e cartões tratados (cartões FTA ou IsoCode). Segundo Van Wieren-de Wijer et al. (2009), a utilização de esfregaços possui algumas vantagens como a praticidade na obtenção, armazenamento a longo prazo e processamento econômico pois são necessários apenas nanogramas de DNA para análise por PCR.

Existe uma variedade de métodos, assim como de modelos de suabes, disponíveis para o trabalho forense. Porém assim como Descrito por Lijnen e Willems ocorre a preocupação com a qualidade das amostras coletadas, deste modo a adaptação de um método de coleta de DNA, necessita ser cuidadosamente estudada, a fim de simplificar o procedimento otimizando o tempo, garantir quantidade suficiente de amostra e ao mesmo tempo garantir a integridade do DNA. (GONÇALVES DA SILVA, 2010).

Existem algumas dificuldades relacionadas à coleta de amostras na área forense, podendo estar relacionadas a problemas durante a coleta, acondicionamento, preservação e análise, seja por falta de recursos materiais e físicos. O Código de Processo Penal, no Art. 170, dispõe que: “Nas perícias de laboratório, os peritos guardarão material suficiente para eventualidade de nova perícia”. A coleta de células bucais com suabe é considerada eficaz permitindo que se obtenha DNA com qualidade e em quantidade adequada para a tipagem genética.

No Brasil, o último Procedimento Operacional Padrão, para coleta de material biológico da perícia criminal é do ano de 2013, e não apresenta informações precisas quanto aos métodos de coleta, além disso o mesmo não é seguido em todos os laboratório forenses do país. Com isso, no presente trabalho foi feita a avaliação de protocolos para coleta de células bucais com suabe, armazenamento e extração de DNA, com o objetivo de padronizar um protocolo a ser utilizado no Laboratório de DNA Forense/ICBS/UFAL.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contexto histórico

Não é possível afirmar o contexto exato em que a ciência criminalística teve início na história, no entanto desde os primórdios da sociedade é possível identificar traços do que hoje chamamos de perícia criminal. Um exemplo se encontra na bíblia no livro de Daniel capítulo 9 no qual o profeta prova ao rei Ciro, que os sacerdotes consumiam as oferendas feita aos Deus abel, para tal espalhou cinzas no chão do templo as quais evidenciaram pegadas (mesmo com o templo fechado) resultando na confissão dos sacerdotes que entravam no templo através de uma passagem secreta.

A sistematização da ciência tem início no século XVI, e apesar de seu desenvolvimento no século XVIII através do que foi chamado de revolução científica apenas no século XIX passou a ser disseminada a partir dos ideais iluministas somada a criação de diversas agências de investigação criminal na Europa e na América do Norte, contribuindo com o surgimento de duas áreas importantes para a criminalística: a identificação humana e a balística (BRAGA; GUERRA; REIS, 2005; SILVA, 2010). Inman e Rudin (2001) relatam o magistrado austríaco Hans Gross, como o pai da criminalística devido a sua obra “Guia Prático Para Instruções Criminais, 1981” tratou de diversos tipos de perícias como como balísticas, grafotécnicas, odontológicas, microscópicas em manchas e vestígios, entre outras.

A genética forense, bem como outras áreas da perícia, se desenvolveu gradualmente ao longo dos anos. Karl Landsteiner (1900) descobriu os tipos sanguíneos ABO e passou a utilizá-los na identificação humana. Mais tarde, em 1949, Rosalind Franklin determinou a estrutura helicoidal da dupla hélice do DNA, permitindo assim o início da pesquisa genética em nível molecular. (GARRIDO; GIOVANELLI, 2012; DIAS et al, 2021).

Em 1983, na Inglaterra, foi solucionado o primeiro caso criminal através de exames de DNA realizados por Alec Jeffreys, o “Caso Leicester” que refere-se ao assassinato de Lynda Mann. A divisão de Ciência forense de Virginia, no ano de

1989, começou também a oferecer a análise de DNA às agências de aplicação da lei. Em seguida, foram criados bancos de dados de DNA, oriundo de criminosos condenados e relacionados a crimes sexuais (BARBOSA; ROMANO, 2018). No mesmo ano teve início o Projeto Genoma Humano, o qual tinha o objetivo de sequenciar as bases nitrogenadas do genoma humano, o mesmo só foi concluído no ano de 2003, e resultou no sequenciamento de um genoma de referência composto por amostras de diferentes povos (GÓES; OLIVEIRA, 2014).

No Brasil o código Criminal datado de 29 de novembro de 1832, já trazia conteúdos relacionados a perícia, como é possível observar em seu capítulo IV, que trata da formação da culpa

Capítulo IV: Art. 134. Formar-se-há auto de corpo de delicto, quando este deixa vestígios que podem ser ocularmente examinados; não existindo porém vestígios, formar-se-ha o dito auto por duas testemunhas, que deponham da existencia do facto, e suas circunstancias. (“LIM-29-11-1832”, 2023)

Mas somente em 1947 a criminalística recebeu sua primeira definição no país, durante o I Congresso Nacional de Criminalística, onde José Del Picchia Filho a definiu como: “disciplina que tem por objetivo o reconhecimento e interpretação dos indícios materiais extrínsecos, relativos ao crime ou à identidade do criminoso. Os exames dos vestígios intrínsecos são da alçada Médico-Legal” (VELHO, 2011).

Em 1995 inaugurou-se o primeiro laboratório de DNA criminal da Polícia Civil do Distrito Federal, o qual visava a genética forense como importante ferramenta para solução de casos criminais, o mesmo foi responsável por realizar os primeiros treinamentos de peritos oficiais no país (DIAS et al, 2021).

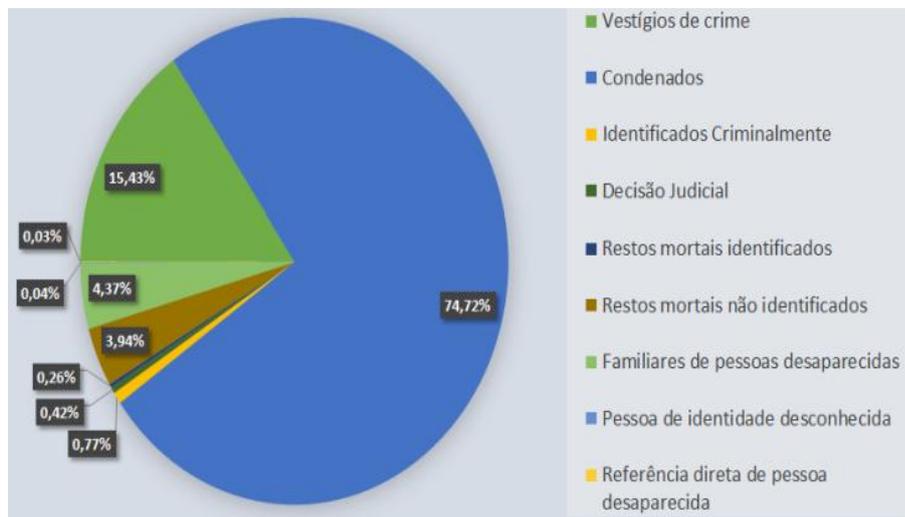
Em 2013, com base na Lei nº 12.654/2012, foi feito um acordo entre Brasil e Estados Unidos segundo o qual o FBI permitiu à Polícia Federal ter acesso ao software CODIS, o banco de dados de perfis genéticos americano (WOYCIEKOSKI, 2021). Por meio do decreto nº7.950, instituiu-se o Banco Nacional de Perfis Genéticos (BNPG) e a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG) (GARRIDO; RODRIGUES, 2015), a partir de então foi prevista a coleta de material biológico de indivíduos condenados ou suspeitos de crimes. Em Fevereiro de 2019 o

então ministro da justiça Sérgio Moro, apresentou o projeto de lei conhecido como Pacote Anti Crime, o qual modificou algumas leis, dentre elas a da Lei de Execução Penal, introduzindo o seguinte artigo:

'Art. 9º-A. O condenado por crime doloso praticado com violência grave contra a pessoa, bem como por crime contra a vida, contra a liberdade sexual ou por crime sexual contra vulnerável, será submetido, obrigatoriamente, à identificação do perfil genético, mediante extração de DNA (ácido desoxirribonucleico), por técnica adequada e indolor, por ocasião do ingresso no estabelecimento prisional (Brasil, 2019 12-28).

Atualmente, a rede RIBPG conta com um total de 22 laboratórios, (20 na esfera estadual, 1 distrital e 1 da polícia federal). Alagoas faz parte dessa rede através do Laboratório vinculado à Polícia científica do Estado. O armazenamento de dados no banco é classificado por diferentes categorias de perfis genéticos dispostas no RIBPG. É possível observar que atualmente há no BNPG uma maior proporção de perfis genéticos de condenados (74,72%) e de vestígios (15,43%). Em menor proporção temos os perfis de pessoas de identidade desconhecida (0,04%) e referências diretas de pessoas desaparecidas (0,03%) como é possível observar no gráfico 1.

Gráfico - 1 Distribuição de perfis genéticos no Banco Nacional de Perfis Genéticos, por categoria



Fonte: RIBPG 2022

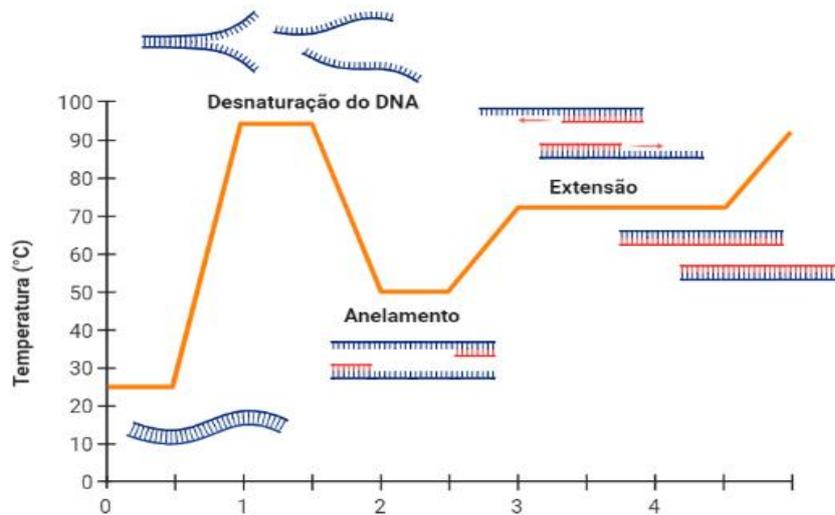
Nas últimas décadas muitas técnicas foram desenvolvidas para melhoria nos processos de identificação através da genética. A técnica de RFLP utilizada inicialmente foi substituída pela tipagem genética de microssatélites feita por meio da amplificação por PCR, seguida da eletroforese capilar (ALBUQUERQUE, 2004; BUTLER, 2011).

2.2 Chelex 100 e RT-qPCR

Com o objetivo de implementar melhorias na identificação humana a partir da genética, muitas técnicas foram desenvolvidas. Dentre elas, segundo Bomfim (2019) a Reação em cadeia Polimerase (PCR), sequenciamento de DNA e eletroforese em gel de agarose. Desta forma, a mais significativa é a PCR, o que deve-se ao fato de sua fácil aplicabilidade, baixo custo e principalmente pela alta sensibilidade (CARDOSO, 2021).

A PCR foi desenvolvida em 1983 pelo bioquímico Kary Mullis, e consiste na amplificação do DNA, para tal necessita de uma combinação de tempo e temperatura específica realizada por ciclos que combinam 3 fases: desnaturação, através da elevação de temperatura (94°C a 95°C.). Anelamento se da redução da temperatura, a qual varia de acordo com os primers a serem utilizados. E extensão, que ocorre por meio da elevação da temperatura a 72°C, e permite a ação da Taq polimerase, iniciando a síntese uma nova fita (gráfico 2). Este processo é repetido inúmeras vezes. (OLIVEIRA et al., 2007).

Gráfico 2 - Esquema das fases da PCR de acordo com a Temperatura



Fonte: Elaborado com Biorender.com

A reação em Cadeia Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR, foi descrita por Higuchi e colaboradores em 1993, esta técnica consiste na monitorização da PCR ao longo de seus ciclos. Sua diferença da PCR convencional está justamente no fato de poder simultaneamente, amplificar, detectar e quantificar o DNA de forma simultânea (MARTINS, 2016).

Um estudo realizado por WALSH et al 2018 demonstra alguns métodos utilizados para a extração de DNA, como o método fenol clorofórmio e/ou precipitação com etanol. Os procedimentos de extração inorgânica incluíram o uso de alta concentração de sal, excesso de digestão com proteinase K e o uso de pó de vidro. Embora sua alta eficácia, estes métodos requerem uma série de etapas, o que pode contribuir para a contaminação cruzada das amostras.

Chelex 100 consiste em uma resina de alta afinidade por íons metálicos polivalente, sua composição contém copolímeros de estireno divinilbenzeno, íons iminodiacetato pareados que atuam como grupos quelantes (WALSH et al., 2018). Singer-Sam et al. (1989) relataram o uso do Chelex 100 como meio de aumentar o sinal da amplificação por PCR, e evitar a degradação do DNA. Atualmente os procedimentos para amostras forenses são adaptados com base no protocolo de singer-Sam (1989).

A alcalinidade das suspensões de Chelex a concentração de 5%, e a exposição a temperaturas elevadas originam a ruptura das membranas celulares e a desnaturação do DNA (Walsh et al 2018 e Singer-Sam et al, 1989).

Os procedimentos de coleta e extração de DNA têm como finalidade a obtenção de um perfil genético, o qual é obtido após a amplificação por PCR. Para que haja uma amplificação bem sucedida, é necessário que o DNA extraído esteja a uma concentração de no mínimo 0,03 ng/ μ l (DALY; MURPHY; MCDERMOT, 2012). Por esse motivo é importante que seja feita a quantificação do DNA antes da amplificação por PCR. A quantificação de DNA por PCR em tempo real, possibilita que se obtenha uma quantificação bastante acurada, sendo uma ferramenta importante para a avaliação da eficácia dos métodos empregados para coleta e extração.

Tendo em vista os grandes avanços na genética forense o aprimoramento de técnicas tanto de coleta, quanto de extração e análise de material biológico é de suma importância, afim de uma maior eficácia na realização destes procedimentos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar protocolos e técnicas utilizados na coleta e armazenamento de DNA obtido através de células bucais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar diferentes procedimentos para coleta de amostras de células bucais com suabe;
- Testar diferentes períodos de armazenamento à temperatura ambiente de amostras em suabe;
- Padronizar um protocolo para coleta, armazenamento e extração de DNA de células bucais colhidas com suabe.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras analisadas tiveram como doadores a autora do presente trabalho e o seu orientador. Essa limitação dos doadores teve como finalidade reduzir a variação resultante de possíveis diferenças entre indivíduos.

4.1 Metodologias para coleta de células bucais com suabe

A coleta de células bucais foi realizada com suabe estéril em duplicata, totalizando um número de 120 amostras coletadas. Sendo testados dois procedimentos de coleta, ambos dispostos nas mesmas condições, em ambiente laboratorial mantido em temperatura ambiente as quais tiveram valores mínimos de 25°C e máxima de aproximadamente 28°C.

4.1.1 Esfregação na bochecha

O suabe estéril foi esfregado na face interna da bochecha, fazendo movimentos giratórios no suabe, seguido o recomendado, ou seja, com esfregação de 10 vezes em cada lado da bochecha, esquerdo e direito, totalizando assim 20 esfregaços.

Figura 1 - Coleta de amostra com esfregação de suabe na bochecha.

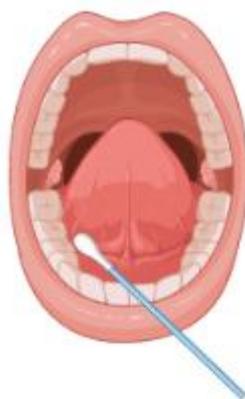


Fonte: Adaptado de UFES, 2020

4.1.2. Sublingual

Neste caso o suabe foi posicionado abaixo da língua até ficar encharcado com saliva não foi realizado nenhum esfregação

Figura 2 - Coleta de amostra sublingual com suabe.

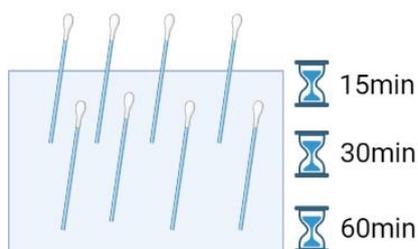


Fonte: Criado no Biorender.com

4.2 . Diferentes tempos de secagem

Foi criado um suporte nos quais os suabes foram posicionados e deixados para secar, à temperatura ambiente,. Variando o tempo de secagem em: 15 min, 30, min,e 60 min. (Figura 3). Após a secagem, os suabes foram acondicionados em envelope de papel, devidamente etiquetados, e mantidos à temperatura ambiente (Figura 4).

Figura 3 - Esquema para secagem das amostras



Fonte: Criado no Biorender.com

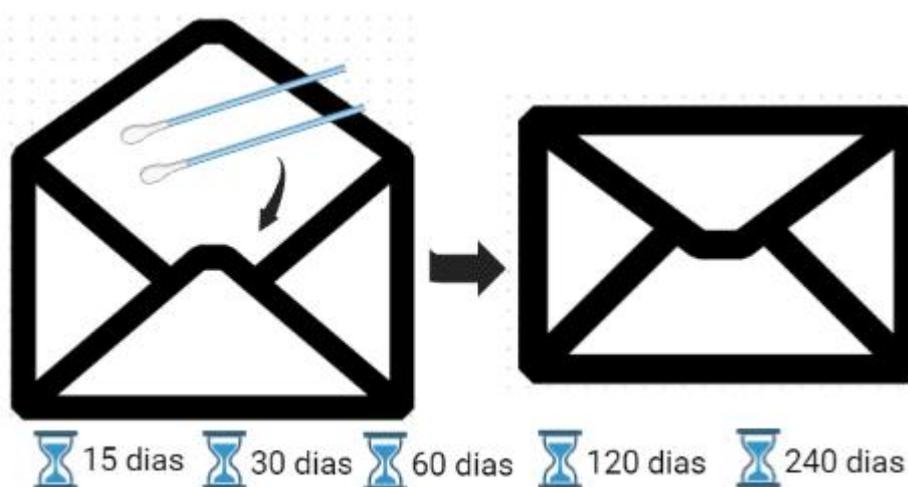
4.3 Experimentos com o tempo de armazenamento

Para avaliação dos efeitos do armazenamento sobre a qualidade do DNA, foram empregados diferentes intervalos de tempo entre a coleta e a extração de DNA sendo eles: 15 dias, 30 dias, 60 dias, 120 dias e 240.

Os códigos para controle interno, serviram não só para identificação a quem pertencia determinada amostra, bem como ao tipo de coleta e referia-se ao tempo de secagem e armazenamento. No envelope também foi colocada a respectiva data de realização da coleta, bem como a data prevista para extração.

Exemplo de código: B15240-A1, onde B= bochecha, 15 o tempo de secagem de 15 min, 240 tem referência ao tempo o qual a amostra esteve armazenada, A= indivíduo 1 e o número 1, o número da amostra, lembrando que a mesma fora colhida em duplicata. L15240-B1, nesse caso o L identifica a amostra coleta de forma sublingual, os números correspondem a mesma linha de raciocínio citada anteriormente, onde a letra B identifica o indivíduo 2.

Figura 4. Armazenamento



Fonte: Criado no Biorender.com

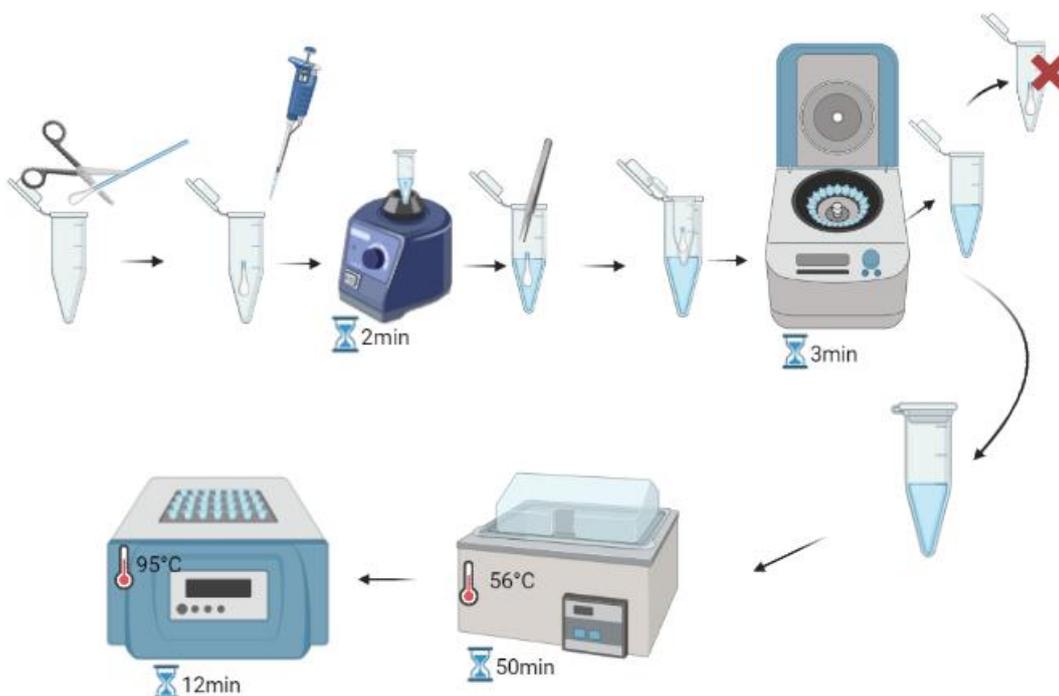
4.4 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com a resina chelex 100, de acordo com o seguinte protocolo, (seja para o suabe com esfregaço na bochecha ou o sublingual), com os tubos devidamente esterelizados e etiquetados (Figura 5):

1. Cortou a extremidade com algodão e colocar em um tubo de 2ml;
2. Foi adicionado 300 μ l de chelex 100 (5% concentrado)
3. Agitado no vórtex por 2 min;
4. Retirou-se suabe com uma pinça e colocou em um microtubo de 0,5 ml, perfurado e levado a centrifugação na velocidade máxima (14.100 g) por 3 min;
5. Descartou-se o suabe e retirou o tubo perfurado;
6. Incubou-se em banho-maria a 56°C por 50 min;
7. Incubou-se em termobloco a 95°C por 12 min;

Após estes passos foram armazenados em geladeira para posterior realização da RT-qPCR.

Figura 5. Esquema para extração de DNA com Chélex (5% concentrado)



Fonte: Criado no Biorender.com

4.5 Avaliação da eficácia dos protocolos

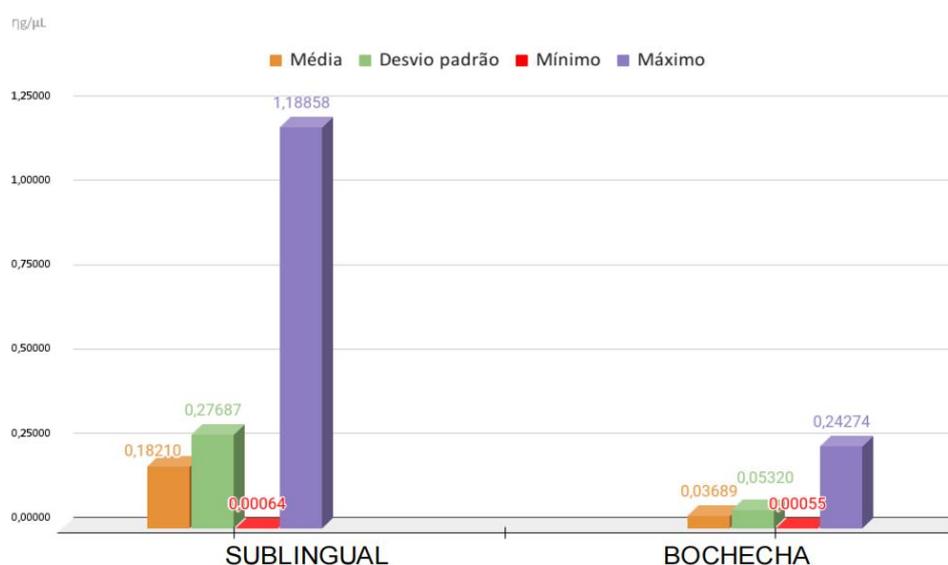
Para a avaliação da eficácia dos protocolos, após a extração, o DNA foi submetido ao método de RT-qPCR para sua amplificação e quantificação através do kit comercial Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit, (Applied Biosystems, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente realizou-se a análise estatística descritiva para estimativa da média, variância e desvio padrão dos dados obtidos. Para a comparação das concentrações médias de DNA depositados nos diferentes substratos, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA). Ambas realizadas no programa computacional Microsoft Excel.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram coletadas um total de 120 amostras, destas 5 apresentaram falha na quantificação por RT-qPCR. Sendo assim 115 amostras apresentaram quantificação bem sucedida, cujos resultados foram submetidos à análise estatística descritiva e à análise de variância (ANOVA). Por meio da análise estatística realizada foi possível verificar se os tipos de coleta, o tempo de secagem e o tempo de armazenamento têm relação com a concentração de DNA obtido.

Quanto ao local de coleta foi possível observar que a coleta sublingual demonstrou maiores níveis de concentração de DNA. No que diz respeito ao esfregaço na bochecha os valores mínimos encontrados foram de 0,00055 ng/μL e máximo de 0,24274 ng/μL, com média de 0,03689 ng/μL. Já no suabe sublingual estes números correspondem a 0,00064 ng/μL, 1,18858 ng/μL e 0,18210 ng/μL como é possível observar no gráfico 3. Sendo assim é possível observar que através da coleta de DNA por suabe sublingual obtém-se uma quantidade maior de DNA, como é comprovado através do teste de ANOVA, o qual demonstra uma diferença significativa entre as médias ($F= 14,87616$; $p = 0,00019$).

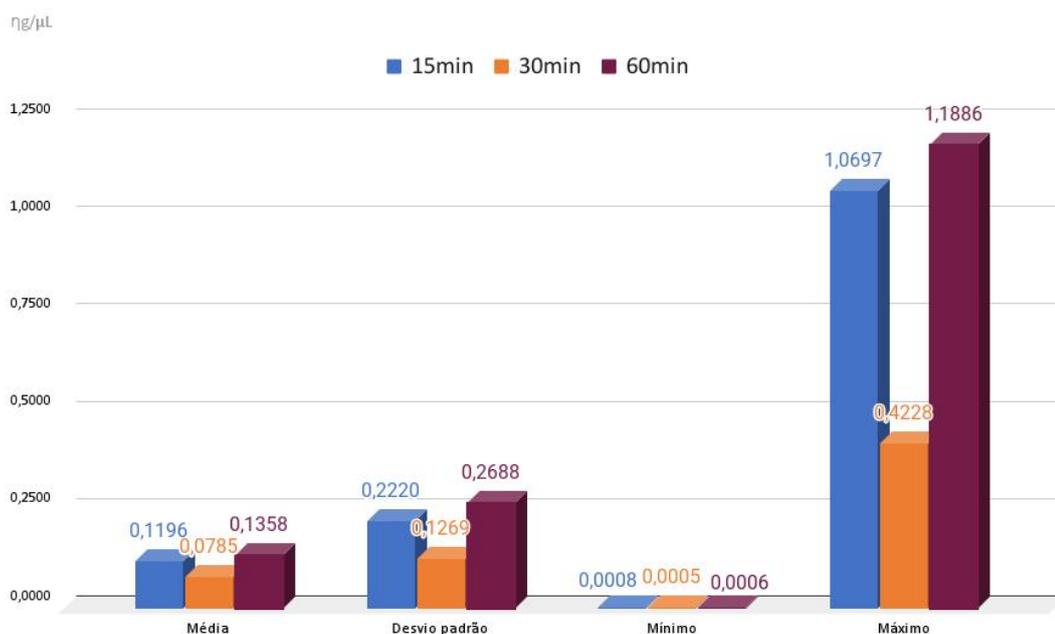
Gráfico 3 - Gráfico contendo as variações de média, desvio padrão, valores mínimos e Máximos de DNA obtido de acordo com o local de coleta



Fonte: Própria autora 2023

Após aplicação do teste ANOVA foi possível observar que não há diferença significativa entre as médias das concentrações de DNA de suabes submetidos a diferentes tempos de secagem ($F= 0,72411$; $p=0,48701$). Os quais podem ser melhor observados na tabela 2 obtida através da análise descritiva.

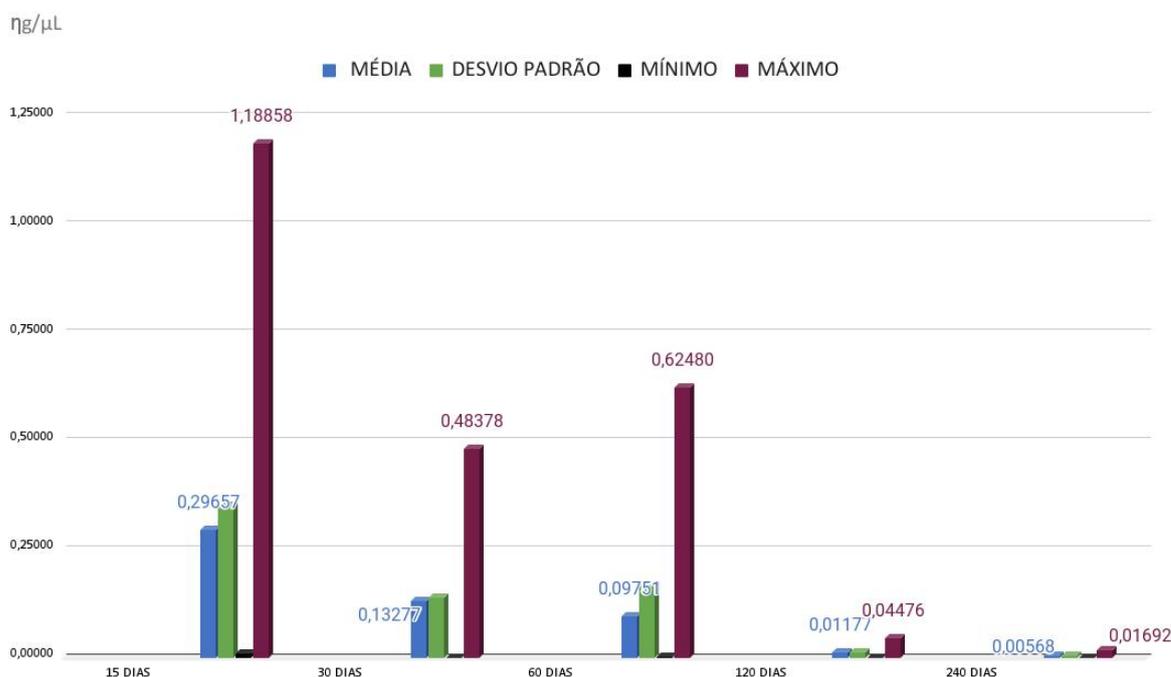
Gráfico 4 - Valores mínimos, máximo de média e desvio padrão obtidos a partir dos diferentes tempo de secagem (115 amostras), referentes ao tempo de secagem.



Fonte: Própria autora 2023

No que diz respeito ao tempo de armazenamento, no presente estudo observou-se que quanto menor o tempo de armazenamento maior a quantidade de DNA obtido. Verificou-se ainda, por meio do teste de ANOVA, que há diferença significativa entre as médias das concentrações de DNA levando-se em conta o tempo de armazenamento ($F=9,26271$; $p=0,0000017$). Quanto às médias observadas por meio da análise descritiva foram as seguintes: 0,29657ng/μL; 0,13277ng/μL; 0,09751ng/μL; 0,01177ng/μL e 0,00568ng/μL, respectivamente para os tempos de 15; 30; 60; 120 e 240 dias de armazenamento, respectivamente, assim como é possível observar na tabela 3. Verificou-se, portanto, que quanto maior o tempo de armazenamento, menor a média da quantidade de DNA.

Gráfico 5 - Resultados da quantificação de 115 amostras obtidas de células bucais e armazenadas em intervalos de tempo diferentes, porém sob as mesmas condições.



Fonte: Própria autora 2023

No que se refere à coleta de DNA através da mucosa oral por meio da utilização de suabe estéril. O Ministério da Justiça divulgou em 2013 um procedimento operacional padrão para. Neste consta que a coleta deve ter pelo menos, 2 suabes orais. O recomendado é que se fricção o mesmo suabe 10 vezes em cada uma das bochechas, conforme citado anteriormente. Recomenda-se ainda que sempre que possível devem ser deixados à temperatura ambiente, sendo esta menor ou igual a 25°C, ao abrigo da luz solar sequem naturalmente, ou acondicionados em embalagens que permitam a secagem. Após secagem é recomendada que sejam mantidos sob refrigeração (0 a 7°C). O protocolo recomenda ainda que a extração de DNA seja realizada através de método orgânico.

Vale ressaltar que os laboratórios de perícias do país possuem protocolos individuais adaptados de acordo com suas necessidades, seguindo os critérios básicos de coleta, extração e armazenamento.

A coleta de DNA através de suabe estéril é comumente relacionada ao método de esfregação, no entanto, o presente estudo averiguou que a coleta de DNA,

com o suabe posicionado abaixo da língua até que o algodão esteja encharcado possui concentrações significativamente maiores de DNA.

6. CONCLUSÃO

A genética forense é uma ferramenta crucial para a resolução de crimes e de questões jurídicas. As técnicas utilizadas para a identificação humana através do DNA são consideradas uma das maiores revoluções do âmbito criminal, isto devido a suas duas principais vantagens: a estabilidade química da molécula de DNA e devido ao fato que este ocorre em todas as células do corpo humano, sendo passível de obtenção das mais variadas formas. A coleta e armazenamento adequado de amostras biológicas, têm grande importância para o sucesso da análise subsequente.

O presente trabalho teve como principal objetivo padronizar a técnica utilizada na obtenção de DNA através do uso de suabe no Laboratório de DNA Forense da Universidade Federal de Alagoas.

Os resultados obtidos demonstraram que:

- A coleta sublingual de células bucais deve ser utilizada preferencialmente, pois apresentou melhor resultado do que a coleta por fricção do suabe na bochecha.
- Os tempos de secagem avaliados não apresentaram resultados significativamente diferentes, o que sugere que, para as condições ambientais do presente estudo, um tempo de secagem de 15 min é suficiente.
- Há uma relação inversa entre o tempo de armazenamento à temperatura ambiente e a quantidade de DNA obtida. Como a quantidade de DNA vai sendo reduzida com o passar do tempo, é preferível fazer o processamento das amostras após períodos mais curtos de armazenamento. Porém, no presente estudo verificou-se que é possível obter DNA amplificável em amostras colhidas com suabe, armazenadas por 240 dias à temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. K. Identificação humana através de marcadores moleculares. **Caderno La Salle XI**, Canoas, v. 2, n. 1, p. 265 - 270, 2004.
- ADAMOWICZ, M. S. et al. Avaliação de métodos para melhorar a extração e recuperação de DNA de cotonetes para análise forense. **PloS one**, v. 9, n. 12, pág. e116351, 2014.
- BARBOSA, R.P; ROMANO, L.H. História e importância da genética na área forense. **Revista Saúde em Foco** – Edição nº 10. 2018.
- BRAGA, M.; GUERRA, A.; REIS, J. C. **Breve História da Ciência Moderna – Das Luzes ao Sonho do Doutor Frankenstein**, vol. 3, Rio de Janeiro, Jorge Zahar Editora LTDA, 2005.
- BRASIL. Ministério da Justiça Secretaria Nacional de Segurança Pública. 2013.
- BRASIL. Lei nº 12.654, de 28 de maio de 2012. **Diário Oficial União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 mai. 2012. Seção 1, p.1.
- BRASIL. Decreto nº 7.950, de 12 de março de 2013. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, DF, 13 mar. 2013. Seção 1, p. 4.
- BUTLER, J. M. **Advanced topics in forensic DNA typing: methodology**. U.S.A: Academic Press, 2011.
- CARDOSO, A. P. M. **Técnicas de genética forense: uma revisão sobre as principais técnicas utilizadas para a obtenção de perfil de DNA na resolução de crimes e sua importância no âmbito jurídico**. Tubarão: UNISUL, 2021.
- DALY, D. J.; MURPHY, C.; MCDERMOTT, S. D. The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood. **Forensic Sci. Int.: Genetics**, v. 6, n. 1, p. 41-46, 2012.
- DECANINE, D. O papel de marcadores moleculares na genética forense. **Rev. Bras. Crimin.** v. 5, n. 2, p. 18-27, 2016.
- DE BRUIN, Karla G. et al. Comparison of stubbing and the double suabe method for collecting offender epithelial material from a victim's skin. **Forensic Sci. Int.: Genetics**, v. 6, n. 2, p. 219-223, 2012.
- DIAS FILHO, C. R. et al. **História da Genética Forense**. Acesso em: 18 nov. 2021
- GARRIDO, R. G.; RODRIGUES, E. L. O banco de perfis genéticos brasileiro três anos após a Lei nº 12.654. **Revista de bioética y derecho**, n. 35, p. 94-107, 2015.
- GARRIDO, R. G.; GIOVANELLI, A. Criminalística: origens, evolução e descaminhos. **Cadernos de ciências sociais aplicadas**, 2012

GÓES, A. C. DE S.; OLIVEIRA, B. V. X. DE. Projeto Genoma Humano: um retrato da construção do conhecimento científico sob a ótica da revista *Ciência Hoje*. **Ciência & Educação** (Bauru), v. 20, n. 3, p. 561–577, set. 2014.

GALTON ORGANIZATION. **Francis Galton and Fingerprints**. Disponível em . Acessado em 30/08/2019 15 GALTON, F. *Finger Prints*. Londres: Macmillan and CO. and New York, 1892.

GROSS, H. **Guia Prático para Instrução dos Processos Criminaes**, Lisboa, Livraria Clássica Editora, 1909.

HOSONO, S. Unbiased Whole-Genome Amplification Directly From Clinical Samples. **Genome Research**, v. 13, n. 5, p. 954–964, 14 abr. 2003.

INMAN, K.; RUDIN, N. **Principles and Practice of Criminalistics – The Profession of Forensic Science**, Boca Raton, CRC Press, 2001.

KOCH, A.; MICHELSEN DE ANDRADE, F. **The use of molecular biology techniques in forensic genetics: a review**. RBAC, v. 40, n. 1, p. 17–23, 2008.

LISITA, A. **A autonomia da perícia criminal oficial**. Brasília: UNB, 2019.

LOCARD, E. **A Investigação Criminal e os Métodos Científicos**, Ed. Saraiva, São Paulo, 1939

MARTINS, C. A. P. **Quantificação de DNA por PCR em Tempo Real em diferentes Amostras Forenses**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade do Porto (Portugal).

MITTERMAIER, C. J. A. **Tratado da prova em matéria criminal ou exposição comparada dos princípios da prova em matéria criminal, etc., de suas aplicações diversas na Alemanha, França, Inglaterra, etc.** AA da Cruz Coutinho, 1871.

MULLIS, Kary B. A origem incomum da reação em cadeia da polimerase. **Sci. Am.**, v. 262, n. 4, pág. 56-65, 1990.

OLIVEIRA, MC de S. et al. **Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase**. 2007.

OLIVEIRA, T. S.; MORAES FILHO, A. V. M. Técnicas de biologia molecular utilizadas para desvendar crimes. **Saúde & Ciência em Ação**, v.4, n.1, p. 89-102, 2018.

PARDINI, V. C. et al. Uso do DNA proveniente de polpa dentária para identificação humana: relato de caso e técnica. **Rev. Cons. Reg. Odontol. Minas Gerais**, v. 7, n. 1, p. 33-5, 2001.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. **Biotechniques**, v. 54, n. 3, p. 134–139, mar. 2013.

SALA, D. A perícia criminal: evidências, profissional perito e nulidade pericial – uma revisão literária. **Rev. Bras. Crimin.** v. 7, n. 3, p. 28-31, 2018.

SEBASTIANY, A. P. et al. The use of Forensic Science and Criminal Investigation as a didactic strategy in the understanding of scientific concepts. **Educ. Quím.**, México, v. 24, n. 1, p. 49-56, 2013.

SILVA, A. A. G. **A perícia forense no Brasil** . 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Singer-Sam, J. "Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells." **Forum for PCR Users**, Vol. 3. 1989.

SOPRAN, J.; DO BOMFIM, F. R. C. O Uso dos Marcadores Epigenéticos na Área Forense. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 8, n. 2, p. 43-43, 2019.

VAN WIEREN-DE WIJER, D. B. M. A. et al. Determinants of DNA yield and purity collected with buccal cell samples. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 24, n. 11, p. 677–682, 17 set. 2009.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. **Biotechniques**, v. 54, n. 3, p. 134–139, mar. 2013.

WOYCIEKOSKI, L. **O Banco Nacional de Perfis Genéticos no sistema penal brasileiro**. Santa Cruz do Sul: UNISC, 2021.

VANRELL JP. **Odontologia legal e antropologia forense**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

VELHO, J. A. GEISER, G. C. ESPÍNDULA, A. **Ciências Forenses: uma introdução às principais áreas da criminalística moderna**. Campinas-SP: Millennium, 2011.