

18º Congresso Nacional de Iniciação Científica

**TÍTULO:** DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS QUALITATIVOS NA AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS EM CENÁRIOS DE SIMULAÇÃO

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** Biomedicina

**INSTITUIÇÃO(ÕES):** CENTRO UNIVERSITÁRIO DAS FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS - FMU

**AUTOR(ES):** LÍVIA CAVALCANTI DE MORAIS GAMA, KELMER MARTINS FIGUEIREDO

**ORIENTADOR(ES):** CHARLOTTE CESTY BORDA DE SAENZ, RENATA RUOCO LOUREIRO

**COLABORADOR(ES):** MARIANA DE CAMPOS FREITAS, TAYNÁ DE CASTRO BRITO RANGEL

## 1. RESUMO

A extração de DNA é primordial para a identificação de indivíduos, indicação de possíveis suspeitos e elucidação de diversos crimes em ciências forenses. É possível qualificar o material genético através da análise do gel de agarose na eletroforese. Este trabalho teve o intuito de coletar e avaliar amostras biológicas de um cenário de simulação de uma cena do crime para determinação de parâmetros qualitativos. Foram realizados os testes confirmatórios de fluorescência em luz UV e *Kastle-meyer*, assim como o preparo das amostras e do gel de agarose. Para a extração do DNA das amostras de sangue e mucosa oral foi utilizado o protocolo de *salting out*, e para o esperma a extração de DNA de espermatozoides. A função de cada reagente dos protocolos foi analisada, e justificado o porquê da utilização destes protocolos. Foi comprovada a presença de líquido espermático por meio da fluorescência e de sangue humano pela formação de bolhas. As bandas do gel de agarose foram analisadas em relação à pureza e o rendimento. É possível concluir que uma boa extração de DNA, seja qual for a origem da amostra biológica coletada, é muito importante para obter uma boa eletroforese em análises forenses.

## 2. INTRODUÇÃO

A extração de DNA de amostras biológicas (coletadas da cena do crime) é primordial para a identificação de indivíduos, indicação de possíveis suspeitos e elucidação de diversos crimes em ciências forenses. É possível qualificar o material genético através da análise do gel de agarose na eletroforese e assim ter confiabilidade nos resultados. (1)

A eletroforese é uma técnica essencial que permite a migração, visualização e qualificação de macromoléculas. O princípio é baseado na propriedade do DNA de possuir carga negativa em pH neutro ou alcalino. Quando o gel é imerso em uma solução tampão e submetido a um campo elétrico, ocorre a migração para o polo positivo. A velocidade de migração depende do tamanho das macromoléculas. (2)

A escolha do DNA para estudo se justifica por suas diversas vantagens e facilidades: 1) É possível extraí-lo de qualquer amostra biológica 2) É discriminatório 3) Possui alta estabilidade química mesmo após longos períodos de tempo 5) Está presente em todas as células nucleadas de um organismo humano 6) É possível separá-lo de células espermáticas e outro DNA celular. (1)

Diversos fatores como coleta, armazenamento, transporte, manipulação das amostras e método de extração escolhido podem influenciar na quantidade, pureza e integridade do DNA. Por isso é importante que todo o processo siga critérios rígidos a fim de evitar contaminações e para produzir resultados fidedignos. (3, 4) O gel de agarose reflete se esses parâmetros foram seguidos através da pureza, integridade e *smear* (grande quantidade de proteínas e contaminantes) da amostra.

Existem diversos protocolos de extração de DNA, porém a técnica escolhida depende do tipo (esperma, sangue, células de mucosa oral) e a quantidade de material disponível, o grau de pureza e também da integridade exigida ao método em que a amostra gênica será utilizada (como PCR, sequenciamento, etc). (5) É válido reforçar que a extração orgânica é o método mais tradicional na genética forense. (6)

De forma geral para utilizar o DNA realiza-se o rompimento das membranas plasmática e celular para exteriorização do material genético através de detergentes (como o SDS). As etapas posteriores visam a separação do DNA de outros componentes celulares como proteínas, membrana e RNA. (7-9) É feita a digestão pela enzima proteinase K, extração com fenol ou clorofórmio (possuem um baixo custo e dão um alto grau de pureza à amostra, mas são altamente tóxicos) e purificação por meio de precipitação com etanol. Segue-se à qualificação, visualização e caracterização dos fragmentos através da eletroforese, interpretação e análise do resultado. (10)

Uma alternativa aos reagentes tóxicos como o fenol e o clorofórmio é realizar a separação das proteínas usando altas concentrações de sal pelo protocolo de *salting out*. (8)

O *salting out* é uma técnica simples, rápida e barata para a realização de testes laboratoriais, e pode ser utilizada para análise de células de mucosa oral (de bituca de cigarro por exemplo) e sangue (presente em algum tecido ou objeto). Com a extração desse material, é possível detectar patologias e vínculo de parentesco. (11) As amostras utilizadas no experimento devem ser purificadas antes de serem analisadas no gel de agarose.

### 3. OBJETIVOS

Coletar e avaliar amostras biológicas de um cenário de simulação de uma cena do crime para determinação de parâmetros qualitativos.

### 4. METODOLOGIA

As amostras foram coletadas de uma simulação de cena de crime.

#### **Fluorescência em luz UV e Teste de *Kastle Meyer***

O líquido espermático foi exposto ao transiluminador e a amostra de sangue submetida a uma gota de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### **Preparo das amostras**

As duas amostras de DNA de mucosa oral foram incubadas a 40°C por 10 minutos no banho maria e posteriormente foram adicionados 10µL de DNA e 2µL de *loading buffer*. Após a confirmação das amostras, todas foram diluídas em 10mL de TE (Tris/EDTA). Todas as amostras foram filtradas com papel filtro e funil para retirar as impurezas contaminantes.

#### **Preparo do gel de agarose**

Foi utilizado agarose 0,8% em 100mL de TBE 1X, depois foi pesado 0,8g de agarose e diluído em 100mL de TBE 1x.

#### **Extração de DNA por *salting out***

Para extração do DNA da bituca de cigarro e da amostra de sangue foi utilizado o protocolo de *salting out*.

Foi centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos e foi descartado o sobrenadante. Foi adicionado 150µl de Buffer A (NaCl/Tris/EDTA) ao pellet de mucosa oral e ressuspendido totalmente (dando “batidinhas” até entrar em solução novamente).

Foi adicionado 10µl de SDS 10% e homogeneizado devagar, depois colocado 5µl da enzima PK (proteínase K) e incubado no banho-maria a 56°C durante 30 minutos.

Foi colocado 50µl de NaCl 5M e homogeneizado por 10 minutos no vórtex, e então centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos novamente.

Após a segunda centrifugação, transferiu-se aproximadamente 200µl de sobrenadante para um tubo auto clavado de 1,5ml.

No tubo novo, foi adicionado 500µl de etanol absoluto gelado e homogeneizado. Foi realizada uma terceira centrifugação de 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e então foram adicionados 200µl de etanol 70% gelado e homogeneizados.

Uma quarta centrifugação foi realizada, também a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e esperou-se secar muito bem por aproximadamente 15 minutos com o tubo dentro do fluxo laminar por inversão.

O último passo consistiu na ressuspensão da amostra em 50µl de água Milli-Q, e armazenamento *overnight* na geladeira a 4°C.

### **Extração de DNA de espermatozoides**

Foi adicionado 500µl de sêmen e 500µl de TE (Tris/EDTA). A amostra foi homogeneizada, centrifugada a 1200 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspendido muito bem em 300µl de Buffer A, foi adicionado 20µl de SDS 10% e homogeneizado devagar.

Posteriormente foi adicionado 5µl de PK (proteínase K) e homogeneizado levemente. A amostra foi incubada a 55°C por 30 minutos, foi adicionado 100µl de NaCl 5M e homogeneizado por 10 minutos no vórtex. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo.

Então foi colocado 1000µl de álcool absoluto gelado e homogeneizado até aparecer o precipitado fibrilar, centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Por fim foi adicionado 400µl de etanol 70%, homogeneizado levemente e centrifugado a 10.000rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar muito bem. Ressuspendeu-se em 100µl de água Milli-Q e armazenou-se na geladeira.

## **5. DESENVOLVIMENTO**

O teste de fluorescência em luz UV no transiluminador foi utilizado para confirmar a presença de líquido espermático no tecido e o teste de *Kastle Meyer* para confirmar se a amostra sanguínea era humana. Já que não havia fenolftaleína para

realizar o último teste, foi utilizado peróxido de hidrogênio cujo acesso é mais fácil e o resultado é o mesmo. Após a realização dos testes, as amostras foram preparadas.

A preparação consistiu na incubação por banho-maria para auxiliar na desnaturação de enzimas como DNAses e ajudar o detergente SDS a desestabilizar as membranas lipídicas. (12) No uso do *loading buffer* para aumentar a densidade da amostra e permitir sua visualização, e na diluição em TE (Tris/EDTA) para conservação das células e materiais presentes.

O Tris (pH 8) e o EDTA presentes no TE são responsáveis por proteger o DNA contra a degradação, porém atuam de formas diferentes. O Tris é uma solução tampão responsável por manter as condições (ph, forma) e evitar a degradação pelo pH, já que o seu é 8 mas o das enzimas DNAses endógenas é 7; já o EDTA realiza a quelação de íons  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  que são cofatores de várias enzimas nucleares (como as DNAses). (13)

O Tris e o EDTA também estão na composição do TBE e do Buffer A.

O buffer (ou tampão) utilizado no gel foi o TBE (Tris-Borato-EDTA). A função do Borato é realizar a condutividade.

No Buffer A (NaCl/Tris/EDTA) o NaCl neutraliza a carga negativa do DNA e precipita as proteínas graças ao excesso de íons. O NaCl 5M possui a mesma função.

O SDS é um forte detergente iônico que emulsifica os lipídios e lisa as membranas celulares e plasmática, para deixar o DNA disperso no meio.

A enzima proteinase K hidrolisa as proteínas.

O uso do etanol absoluto gelado foi utilizado para a obtenção do precipitado. É fundamental que o volume de etanol seja pelo menos duas vezes o volume da solução para que haja uma precipitação eficiente.

O etanol desidrata o DNA e este não se dissolve mais na solução pois o meio se torna extremamente hidrofóbico. O material genético então sobe à superfície por ser menos denso do que os outros componentes celulares.

O uso do etanol 70% gelado foi utilizado para uma “lavagem”, e não o etanol 100% pois ele faz com que muitos sais se precipitem junto com o DNA, além do que

dificulta a ressuspensão do DNA. Quanto mais gelado é o álcool, menos solúvel é o DNA.

Após a terceira centrifugação, o sobrenadante foi descartado para a retirada dos sais.

No protocolo de extração de espermatozoides foram utilizados diversos reagentes em comum com o protocolo de *salting out* (utilizado para a bituca de cigarro e sangue). Apesar das amostras biológicas serem diferentes, os protocolos são adaptados em relação à quantidade de reagentes e de centrifugações.

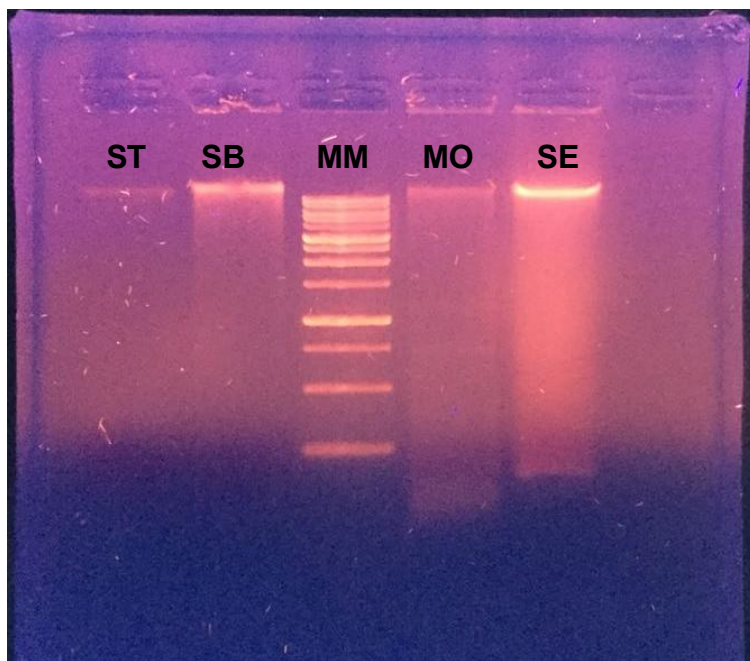
É importante salientar que não foi utilizado o protocolo de *salting out* modificado (uma variação do *salting out*) para a bituca de cigarro e sangue devido à escassez de material. Como o foco deste método é a obtenção de maior pureza e menor rendimento graças às diversas lavagens a mais, haveria a perda de mais amostra. Então optou-se por focar em um DNA com menos pureza, porém com maior rendimento (no *salting out*).

## 6. RESULTADOS

Foi comprovada a presença de líquido espermático por meio da fluorescência e de sangue humano pela formação de bolhas.

A banda de sangue de tecido (ST) apresentou pouco rendimento, porém uma alta pureza. Já a de sangue de boneca (SB) teve maior rendimento, mas apresentou um discreto *smear*, indicando uma possível contaminação por proteínas. Entretanto, o leve *smear* é aceitável.

A banda de mucosa oral (MO) de bituca de cigarro apresentou uma ótima pureza, mas um menor rendimento quando comparada à de SB. É possível que a banda apresentou menos *smear* por haver menos amostra. A banda de sêmen (SE) foi a que teve maior rendimento e *smear*, mas também teve uma pureza relativamente boa. Essa pode ser uma característica do gel do próprio material.



**Figura 1:** Gel de Agarose 0,8% em 100 mL de TBE. Corrida realizada a 100V por 30'. Da esquerda para a direita: ST: Sangue tecido. SB: Sangue boneca. MM: Marcador molecular. Mucosa oral (bituca de cigarro). SE: Sêmen

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível concluir que uma boa extração de DNA, seja qual for a origem da amostra biológica coletada, é muito importante para obter uma boa eletroforese em análises forenses. A partir desse experimento seria possível quantificar as amostras em um espectrofotômetro e comparar com o gel para assim realizar outras técnicas de biologia molecular como PCR nas bandas que apresentassem uma boa pureza e *Southern blot* para assim levantar hipóteses sobre a confirmação de suspeitos e vítimas.

## 8. FONTES CONSULTADAS

1. Marcelo Fruehwirth RMD, Rafaela de Araujo Folha. Técnicas de Biologia Molecular aplicadas a Perícia e Ciência Forense. 2015.
2. Elisete Marcia Corrêa PAP. A ANÁLISE DE DNA POR ELETROFORESE. Available from: [http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biologia\\_molecular/testesgeneticos.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biologia_molecular/testesgeneticos.pdf).
3. Luiz Antônio Ferreira da Silva NSP. Dna Forense - Coleta de Amostras Biológicas Em Locais de Crime Para Estudo do Dna. 2 ed2006.
4. Butler JM. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. 2 ed. USA2005.
5. John M. S. Bartlett DS. PCR Protocols. In: Park DJ, editor. Methods in Molecular Biology. 226. 2 ed: Humana Press; 2003.



6. Council NR. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. Washington, DC: The National Academies Press; 1996. 272 p.
7. Regitano LCdA. Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). 2001.
8. Azevedo MdOF, Maria Sueli Soares Brígido, Marcelo de Macedo. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. Brasília: UnB; 2003.
9. Romano E, Brasileiro ACM. Extração de DNA de Plantas. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. 1999:40-3.
10. ORGANIZATION ICP. INTERPOL HANDBOOK ON DNA DATA EXCHANGE AND PRACTICE. 2 ed 2009.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16(3):1215.
12. USP. Extração de DNA [Available from: [http://www.cdcc.usp.br/exper/medio/biologia/8dna.extracao\\_op.pdf](http://www.cdcc.usp.br/exper/medio/biologia/8dna.extracao_op.pdf)].
13. EMBRAPA. EXTRAÇÃO DE DNA. In: Gouveia JdS, Regitano LCdA, editors. Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal 2007.