

VANESSA ROSÁLIA REMUALDO

**AVALIAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE  
DENTES HUMANOS SUBMETIDOS AO CALOR**

São Paulo  
2004

Vanessa Rosália Remualdo

**Avaliação de três métodos de extração de DNA de dentes  
humanos submetidos ao calor**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Odontologia Legal

Orientador: Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira

São Paulo  
2004

Catálogo-na-Publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Remualdo, Vanessa Rosália

Avaliação de três métodos de extração de DNA de dentes humanos submetidos ao calor / Vanessa Rosália Remualdo; orientador Rogério Nogueira de Oliveira. -- São Paulo, 2004.  
75p., 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Odontologia Legal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Odontologia forense 2. Dentes – Carbonização humana – DNA 3. DNA – Dente - Amostras

CDD 614.1  
BLACK D873

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO A AUTORA A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, 30/11/2004.

Assinatura:

E-mail:vanessa@laboratoriofenolab.com.br

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Remualdo VR. Avaliação de três métodos de extração de DNA de dentes humanos submetidos ao calor [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

São Paulo, 16/12/2004

### Banca Examinadora

1) Prof. Dr. Eduardo Daruge Junior

Titulação: Prof. Dr. Do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

2) Prof. Dr.Mário Hiroyuki Hirata

Titulação: Prof. Dr. Assoc. do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

3) Prof. Dr.Rogério Nogueira de Oliveira

Titulação: Prof. Dr. do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia** da Universidade de São Paulo, em nome de seu diretor **Prof. Dr. Ney Soares de Araújo**.

Ao **Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira** pela orientação segura e paciente na elaboração deste trabalho. Pela valiosa amizade.

Ao **Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata**, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela cessão de insumos e equipamentos que possibilitaram a elaboração desta pesquisa, assim como pela grande oportunidade de aprendizado.

Aos docentes do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Profs. Drs.: **Moacyr da Silva, Rodolfo Francisco Haltenhoff Melani, Edgar Crosato, Ida Tecla Calvielli, Dalton Luis de Paula Ramos, Maria Ercília de Araújo**, em especial a **Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Hilda Ferreira Cardoso**, pelos conhecimentos transmitidos e pela agradável convivência. Assim como ao **Prof. Dr. Jose Leopoldo Ferreira Antunes** pela paciente revisão dos indicativos estatísticos.

Ao **Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes**, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela cessão de insumos e equipamentos, e pelas incansáveis discussões sobre o trabalho.

Às secretárias do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, **Maria Laura de Toledo, Andréia dos Santos Teixeira, Marieta Trancoso de Castro e Sônia Castro Lucia Lopes** pelo auxílio constante e incansável, pelo carinho e amizade.

À bibliotecária **Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro**, pela paciência e dedicação na formatação deste trabalho, onde o tempo era tão curto e minha expectativa tão grande.

Aos **amigos** do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em especial ao **Paulo Carbone** e a **Evelyn Ansai kanto**, pela amizade, companheirismo, convivência e acima de tudo paciência, no auxílio laboratorial.

Aos **colegas** do curso de pós-graduação em Odontologia Legal, por todas as novas amizades.

Ao protético **Edwin Moeller**, por ceder o forno de porcelana e por cuidadosamente preparar os cadinhos e acompanhar o processo de queima dos elementos dentais.

A incansável amiga **Eliane Rodrigues**, quem sempre me apoiou e muito me ajudou durante o tempo do mestrado.

Ao meu amigo **Caio Mauricio Mendes de Cordova**, que com seu senso de humor fantástico, ajudava a transformar o desespero das horas em alegria. Assim como sua esposa **Simone de Cordova**, pelo seu carinho e grande amizade.

Ao meu amigo **Paulo Affolter Filho** e sua esposa **Wal**, dois seres humanos iluminados os quais Deus me concedeu a honra de chamá-los de amigos.

Ao grande amigo **Wellington Zaitter**, meu caro coordenador no curso de especialização em Odontologia Legal de Curitiba, quem sempre desde o início me apoiou nesta jornada.

Ao **Vilmar Paterno** pela sua amizade e companheirismo sempre muito presentes, e por todo seu apoio, minha eterna gratidão.

À minha avó **Maria Ivany Silva**, que sempre me incluía nas suas preces, por toda doçura que ela me representa.

À minha mãe **Margareth dos Santos**, por me ensinar desde muito cedo, a simplicidade e magnitude da vida.

E acima de tudo a **Deus**, por permitir que a vida aconteça.

*"Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, porque cada pessoa é única, para nós, nenhuma substitui a outra.*

*Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai sozinho, nem deixa a sós... Leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo.*

*Há os que levam muito, mas não há os que deixam nada.*

*Esta é a mais bela responsabilidade de nossas vidas: a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso".*

*Antoine De Saint Exupéry*

Remualdo VR. Avaliação de três métodos de extração de DNA de dentes humanos submetidos ao calor [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2004.

## RESUMO

Nos casos de carbonização humana usualmente há uma limitação do emprego dos remanescentes biológicos para estudo. Nestes casos, têm-se usado por eleição dentes para análises forenses, já que sua constituição anatômica proporciona proteção ao material genético. No presente estudo avaliou-se a amplificação por PCR do DNA obtido de dentes submetidos ao calor (200°C, 400°C, 500°C e 600°C) durante 60 minutos testando-se três métodos de extração (orgânico, acetato de amônia/isopropanol e sílica). Foram utilizados 8 pares de dentes de indivíduos diferentes, sendo que um foi mantido *in natura* (*gold standart*) e o outro submetido à queima. Para amplificação do DNA empregaram-se iniciadores de DNA genômico (STR-F13A01) e DNA mitocondrial (MPSs). Para o DNA genômico, a análise em gel de poliacrilamida permitiu verificar que com o método orgânico 50% das amostras foram amplificadas, 38% com o acetato de amônia/isopropanol, e 0% com a sílica. Para os MPSs, o seqüenciamento das amostras mostrou que o método orgânico confirmou 100% dos resultados em 200°C, 50% em 400°C e 0% em 500°C e 600°C. Para o método acetato de amônia/isopropanol em 100% das temperaturas foi possível a análise do mtDNA. Para o método da sílica, obtivemos resultados de 50% em 400°C e 500°C, e 0% em 200°C e 600°C. Nossos resultados permitem concluir que o método acetato de



amônia/isopropanol é o mais indicado para obtenção de DNA amplificável por PCR de amostras carbonizadas nas temperaturas utilizadas neste trabalho.

Palavras-Chave: identificação humana; odontologia legal; DNA mitocondrial; DNA

Remualdo VR. DNA extraction of human teeth submitted to high temperatures: evaluation of three methods [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2004.

## ABSTRACT

Biological remains of carbonized human bodies are usually not possible to use in forensic analysis. In these cases, teeth are usually selected since enamel, dentin and cement provides protection to the genetic material. The present study evaluates DNA extracted using three methods (organic, isopropilic alcohol and silica) of teeth submitted to different temperatures (200°C, 400°C, 500°C and 600°C). The method of evaluation was amplification by PCR. Two third molars of eight different individuals were used; one was kept *in natura* (gold standart) and the other submitted to burning. For amplification primers for genomic (STR-F13A01) and mitochondrial (MPSs) DNA were used. For genomic DNA, polyacrylamide gel analysis showed that 50% of the samples extracted with organic method were amplified, 38% with isopropilic alcohol, and 0% with the silica method. For mitochondrial DNA, amplicons sequencing showed that 100% of the samples extracted with isopropilic alcohol method were confirmed in all temperatures; 100% with the organic method in 200°C, 50% in 400°C, and 0% in 500°C and 600°C. For silica method, 50% in 400°C and 500°C and 0% in 200°C and 600°C. Our results show that the isopropilic alcohol method is the best method to extract DNA from burned teeth of all used temperatures.

Keywords: human identification; forensic dentistry; DNA, mitochondrial; DNA

## LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 - Iniciadores utilizados para amplificação do STR F13A01 e das MPSs.....	47
Quadro 5.1 - Resultados obtidos para o STR F13A01, segundo o número de amostras analisadas, método de extração de DNA e temperatura da queima.....	50
Quadro 5.2 - Resultados obtidos pelo método orgânico de extração de DNA, segundo o número de amostras analisadas, a região MPS, e a temperatura da queima.....	51
Quadro 5.3 - Quantidade de resultados obtidos pelo método álcool isopropílico/acetato de amônia de extração de DNA, segundo o número de amostras analisadas, a região MPS, e a temperatura da queima.....	51
Quadro 5.4 - Quantidade de resultados obtidos pelo método de extração de DNA da sílica, segundo o número de amostras analisadas, a região MPS, e a temperatura da queima.....	52
Quadro 5.5 - Apresentação resumida de todos os resultados obtidos para as amostras submetidas ao calor e analisadas para a região MPS, segundo os géis efetuados, e temperatura .....	53
Quadro 5.6 - Polimorfismo pontual para a região 3A, segundo o indivíduo .....	53
Quadro 5.7 - Polimorfismo pontual para a região 3B, segundo o indivíduo.....	53
Quadro 5.8 - Polimorfismo pontual para a região 4A, segundo o indivíduo .....	54
Quadro 5.9 - Polimorfismo pontual para a região 4B, segundo o indivíduo.....	54

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A	Adenina
ABO	Sistema sangüíneo ABO
Amel	Amelogenina
Amp-FLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados
C	Citosina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CFO	Conselho Federal de Odontologia
CRS	Cambridge Reference Sequence
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Didesoxinucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramma
G	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HV1	Hipervariável 1
HV2	Hipervariável 2
KCl	Cloreto de potássio
LTR	Large Tandem Repeats

mA	Miliampere
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MN	Sistema sangüíneo MN
MPS	Mini Primer Set
mtDNA	DNA mitocondrial
n	Número de repetições
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
pb	Pares de base
PAGE	Poliacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
rpm	Rotações por minuto
Rh	Sistema sangüíneo Rh
SSP-SP	Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo
STR	Short Tandem Repeat
T	Timina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
V	Volts
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
W	Watts

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C      Graus Celsius

## SUMÁRIO

	p.
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
<b>2.1 Identificação humana pós-morte</b> .....	19
2.1.1 Identificação humana através da antropologia e exame antropométrico .....	20
<b>2.2 Utilização do DNA para identificação humana pós-morte</b> .....	20
<b>2.3 Aspectos históricos na utilização do DNA para fins de identificação humana</b> .....	21
2.3.1 Vantagens do DNA sobre a sorologia tradicional .....	23
<b>2.4 O DNA</b> .....	25
2.4.1 Aspectos estruturais .....	25
2.4.2 Transmissão da informação genética .....	28
2.4.3 Regiões hipervariáveis .....	30
2.4.3.1 <i>tipos de polimorfismos</i> .....	31
2.4.3.2 <i>métodos de detecção</i> .....	33
<b>2.5 Amplificação do DNA através da Polimerase Chain Reaction</b> .....	34
<b>2.6 Metodologias de extração de DNA</b> .....	36
<b>2.7 Utilização do DNA obtido de tecidos dentários para identificação humana</b> .....	37
<b>2.8 Parâmetros periciais</b> .....	42
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	44
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
<b>5 RESULTADOS</b> .....	50

<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>68</b>



# 1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo a odontologia legal vem contribuindo para os processos de identificação humana (AMOEDO, 1993). Frequentemente os peritos se utilizam de elementos comparativos anteriores à morte do indivíduo, como por exemplo, o prontuário odontológico (ficha clínica), para proceder à identificação. Entretanto, essa condição básica para executar tecnicamente a identificação de uma pessoa (documentação prévia) nem sempre se faz presente ou se mostra deficiente. Mesmo na presença de uma documentação adequada há casos em que, devido à exposição corpórea a fatores exógenos (físicos, químicos ou biológicos), o estado de conservação dos remanescentes corpóreos se apresenta incompleto tal como bem relata Sada (1985), tornando o processo de análise odontolegal de difícil execução ou mesmo inconcludente. Até recentemente situações como essas onde era impossível utilizar-se dos documentos *ante mortem*, empregavam-se exclusivamente técnicas antropométricas, que não nominavam o indivíduo, apenas forneciam parâmetros quanto a sexo, estatura e idade (SILVA, 1987).

Atualmente com a aplicação dos recursos da biologia molecular na identificação humana, é possível identificar uma pessoa mesmo sem informações *ante mortem* de ordem física, ou até mesmo na presença de material biológico deteriorado e em ínfimas quantidades, condições estas relativamente frequentes nas análises forenses (CORACH, 1997).

O principal fator exógeno que pode limitar a recuperação da informação a partir dos remanescentes corpóreos e restringir todo o

processo de identificação humana são os elementos presentes ou associados aos incêndios: fogo, calor, e explosões (MELANI, 1999).

A padronização da obtenção de material genético para identificação de indivíduos queimados justifica-se pela ocorrência desses incidentes. Nos Estados Unidos, calcula-se que haja aproximadamente 4000 mortes causadas pelo fogo anualmente, de acordo com Bohnert, Rost e Pollak (1998). No ano de 2003 nas rodovias federais do Brasil ocorreram 423 acidentes automobilísticos com explosões (MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES, 2003). Nestas situações os dentes por oferecerem condições de preservação e integridade ao DNA nas circunstâncias mais adversas do meio, se apresentam como material eletivo para análise (TSUCHIMOCHI et al., 2002).

Enfatizamos que a utilização de técnicas de biologia molecular para fins de identificação humana pelo cirurgião-dentista, está respaldada na Lei 5081 de 24 de agosto de 1966 (BRASIL, 1966), que regula o exercício da odontologia e estabelece as competências do profissional. O Art. 6º., incisos IV e IX, da referida lei reza:

Compete ao Cirurgião-Dentista:

...

IV – proceder à perícia odontolegal em foro civil, criminal e trabalhista e em sede administrativa;

...

IX – utilizar, no exercício da função de perito-odontólogo, em caso de necropsia, as vias de acesso do pescoço e da cabeça.

Além dessa legislação, de alçada federal, temos a Resolução CFO-22/2001 (CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA, 2001), também de âmbito federal, que estabelece o elenco das especialidades odontológicas. Em seu artigo 27, a Odontologia Legal está definida da seguinte forma:

Odontologia Legal é a especialidade que tem como objetivo a pesquisa de fenômenos psíquicos, físicos, químicos e biológicos que podem atingir ou ter atingido o homem, vivo, morto ou ossada, e mesmo fragmentos ou vestígios, resultando lesões parciais ou totais reversíveis ou irreversíveis.

Parágrafo único: A atuação da Odontologia legal restringe-se à análise, perícia e avaliação de eventos relacionados com a área de competência do Cirurgião-Dentista podendo, se as circunstâncias o exigirem, estender-se a outras áreas, se disso depender à busca da verdade, no estrito interesse da justiça e da administração.

Desta forma, devidamente respaldado em Leis, os cirurgiões-dentistas podem executar perícias envolvendo quaisquer materiais biológicos, não havendo nenhum impedimento para a utilização de técnicas de biologia molecular. Consideramos de fundamental importância que os cirurgiões-dentistas que atuam na odontologia legal na área pericial se familiarizem com os conhecimentos tecnológicos de análise do DNA, assim como gradualmente incorporem essas metodologias à sua prática, pois tais recursos certamente terão caráter preponderante no contexto das ciências forenses relacionadas à identificação humana.

Na odontologia legal não há uma uniformização dos protocolos a serem empregados na extração do DNA a partir de dentes submetidos ao calor e, nem se tem claro qual a possibilidade de recuperação de DNA desses dentes. Assim nos propusemos a avaliar o potencial de análise para identificação humana do DNA obtido utilizando-se três métodos de extração (orgânico, isopropanol/acetato de amônia e sílica – Anexos B, C e D), a partir de elementos dentários submetidos a diferentes graus de queima, durante 60 minutos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Identificação Humana pós-morte

Identidade por definição é o conjunto de características que individualizam uma pessoa ou uma coisa, fazendo-a distinta das demais, reunindo uma série de atributo que torna alguém ou alguma coisa igual a apenas si próprio. Identificação é o ato mediante o qual se estabelece a identidade de alguém. Identificar consiste em demonstrar que certo corpo humano, que em dado momento se apresenta para exame, é o mesmo que em ocasião anterior já havia sido apresentado (ALMEIDA Jr; COSTA Jr, 1998). Ou ainda, pode-se dizer que identidade é o conjunto de caracteres físicos, funcionais ou psíquicos, normais ou patológicos, que individualizam determinada pessoa (ALVES, 1965).

É indiscutível o valor da identificação humana pós-morte. As relações sociais ou as exigências civis, administrativas, comerciais e penais, exigem e reclamam essa forma de reconhecimento (FRANÇA, 2001).

O primeiro caso de identificação humana pós-morte foi registrado em Lion na França em 1889, por Alexander Lacassagne. Este, ao examinar um corpo humano encontrado nos arredores de Lion em avançado estado de decomposição procedeu à análise, determinando sexo e altura, e estimando a idade do mesmo (FRANÇA, 2001). Dessa forma, Lacassagne utilizou-se da antropologia para análise desde corpo.

### 2.1.1 Identificação humana através da antropologia e exame antropométrico

O exame antropométrico é a análise preliminar na identificação humana, podendo ser efetuado através da observação e análise de alguns elementos característicos, como dados somatoscópicos e somatométricos. Os dados somatoscópicos referem-se à cor da pele, dos pelos, dos cabelos, cor dos olhos, sinais profissionais, tatuagens, cicatrizes, sinais individuais, malformações, identificação por superposição de fotografias. Os somatométricos são todos os dados mensuráveis do ser humano, onde através da craniometria e também cefalometria, é possível estimarem-se dados como espécie, grupo étnico, idade, estatura; como também estabelecer a identificação através do exame dos pelos arcos dentais. Por fim, a dactiloscopia, este último fazendo parte do processo de identificação judiciária (FRANÇA, 2001; SILVA, 1997).

## 2.2 Utilização do DNA para identificação humana pós-morte

Quando impressões digitais, exame de arcos dentários e exames antropométricos já estabelecidos são inviáveis de serem realizados para proceder-se a identificação humana; pode-se utilizar a tipagem de DNA para tal processo. Por estarem sujeitos a decomposição, fragmentação, incineração ou inexistência de dados comparativos *antemortem*, os métodos antropométricos

tradicionais muitas vezes têm sua utilização limitada ou até mesmo impossibilitada. Na presença das características acima mencionadas, a análise do DNA apresenta bons resultados, pois um fragmento de tecido, principalmente tecidos duros como osso e dente, pode ser potencialmente identificado (WEEDEN; SWARNER, 1999).

Amostras de sangue de cadáveres e tecidos moles podem degradar-se rapidamente, mesmo em curtos períodos de tempo, devendo-se basicamente ao rápido crescimento bacteriano, especialmente exposto a altas temperaturas e umidade (HOCHMEISTER et al., 1991).

### **2.3 Aspectos históricos da utilização do DNA para fins de identificação humana**

O processo de recombinação gênica proporciona um alto grau de variabilidade entre os organismos vivos. Cada indivíduo da espécie humana possui um perfil genético único, com exceção de gêmeos monozigóticos que compartilham do mesmo genótipo. Inúmeras características hereditárias humanas permitem aferir, até certo grau, esta individualidade genética, fato este de importância forense (GARDNER, 1986).

Há bem pouco tempo a ciência da identificação de casos criminais pautava-se apenas nas análises sorológicas dos polimorfismos de proteínas e grupos sanguíneos e em alguns marcadores genéticos. O exame forense de amostras biológicas teve seu início por volta do princípio do século XX com a

aplicação dos grupos sanguíneos ABO em evidências relacionadas a crimes ou à identificação de pessoas. Hoje, os grupos sanguíneos eritrocitários, como os sistemas ABO, Rh (CcDEe) e MNSs, foram substituídos na maioria dos centros, sendo hoje pouco utilizados (MOURA NETO, 1998).

Marcando uma segunda fase na evolução desta ciência, em 1954, foi demonstrada a ocorrência de um sistema de histocompatibilidade mediado por antígenos na superfície dos leucócitos, conhecido por complexo HLA (do Inglês “histocompatibility leucocyte antigen”), determinado por genes alélicos muito próximos localizados no braço curto do cromossomo 6, com acentuado poder de discriminação individual ou determinação da individualidade genética (GRIFFITHS et al., 2001).

A terceira fase do desenvolvimento das ciências forenses voltadas à identificação humana veio com a publicação de um artigo na Revista Nature, por Jeffreys, Wilson e Thein (1985), sobre certas regiões de minissatélites do genoma humano que produziam uma espécie de “impressões digitais” de DNA.

A tipagem molecular de material genético foi utilizada oficialmente pela primeira vez, por Jeffreys, Brookfield e Semeor (1995) na Inglaterra para a resolução de um problema de imigração (JEFFREYS et al. 1985). Um ano após, o mesmo autor empregou esta técnica para identificar o verdadeiro estuprador e assassino de duas vítimas. A partir deste caso, que ficou conhecido como “Enderby” (Queen v. Pitchfork), a Criminalística e a Medicina Legal ganharam novo fôlego e têm empregado a técnica de tipagem molecular de DNA como potente arma no esclarecimento de diversos delitos e na identificação humana (MOURA NETO, 1998).

### 2.3.1 Vantagens do DNA sobre a sorologia tradicional

No aspecto forense, a caracterização do material biológico tem por objetivo limitar ou reduzir o número de indivíduos que poderiam ser a fonte do material em análise. A população sob suspeita algumas vezes é limitada ou muito próxima, permitindo assim a resolução do caso mesmo com marcadores genéticos de baixo poder discriminatório. Contudo, quando a população não é limitada pelas circunstâncias do caso, os métodos de maior poder discriminatório tornam-se recursos importantes. Com o estudo do DNA, o poder discriminatório pode atingir o limite necessário para permitir a identificação (SILVA; PASSOS, 2002).

Várias vantagens do DNA sobre a sorologia tradicional. A primeira e principal delas reside na possibilidade de sua aplicação sobre toda e qualquer fonte de material biológico. Uma ampla variedade de líquidos corporais é encontrada nos exames de evidência; todavia um exame sorológico completo pode ser realizado somente no sangue e não em outros tecidos ou líquidos corporais. Entretanto, com estudos de DNA, ínfimas quantidades de qualquer material biológico, incluindo o sangue, cabelos, saliva, dente, sêmen, tecido, urina ou qualquer outro fluido biológico, podem ser passíveis de análise para associar um suspeito ao crime (WEEDN; SWARNEN, 1999).

A segunda e mais amplamente propalada vantagem do exame de DNA é seu potencial discriminatório. Em alguns casos, os estudos de DNA podem revelar a identificação positiva, comparativamente aos exames envolvendo o grupo sangüíneo ABO, que tem a capacidade de discriminar aproximadamente



um em três indivíduos na população geral, e, mesmo com marcadores sorológicos adicionais, os valores típicos são de um em alguns milhares, enquanto que com o DNA, os valores podem chegar a um em alguns bilhões ou mais (WEEDN; SWARNEN, 1999).

A sensibilidade do exame de DNA constitui a terceira grande vantagem deste método. A tipagem do polimorfismo do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês Polimerase Chain Reaction), que descreveremos mais adiante, pode ser efetuada com o DNA de algumas poucas células, de longe superando a sensibilidade dos exames tradicionais (WEEDN; SWARNEN, 1999).

A quarta vantagem do DNA é sua resistência aos fatores ambientais. O DNA é uma molécula robusta, relativamente resistente aos ácidos, álcalis e detergentes, diferentemente dos determinantes protéicos, lipídicos e carboidratos. As proteínas podem ser desnaturadas de forma relativamente mais fácil e sua estrutura terciária conformacional, que é importante na tipagem, é de fácil desnaturação. A informação da tipagem do DNA, por sua vez, é encontrada na seqüência nucleotídica, que independe da conformação da molécula. Conseqüentemente, os exames com DNA, diferentemente dos marcadores sorológicos tradicionais, podem ser realizados com maior segurança em amostras muito antigas e que estiveram expostas a maiores agressões ambientais (WEEDN; SWARNEN, 1999).

Finalmente, a quinta vantagem do DNA reside na possibilidade de se separar o DNA da célula espermática de qualquer outro DNA celular. Um dos problemas históricos nos casos de evidência de violência sexual é a presença, quase que exclusivamente, de uma mistura de sêmen e outro líquido corporal,

o que representa um problema sério para os exames sorológicos tradicionais de tipagem, pois em aproximadamente dois terços dos casos, não há possibilidade de se identificar o sêmen do doador pelo fato de a mistura dos fluidos biológicos resultar em uma mistura de tipos sorológicos. Todavia o DNA do esperma pode ser separado de DNA não-espermático por lise diferencial, o que permite a individualização da fonte do sêmen (WEEDN; SWARNEN, 1999).

## **2.4 O DNA**

### 2.4.1 Aspectos estruturais

Os ácidos nucléicos foram descobertos, em 1869, por Friedrich Miescher, um médico suíço de 22 anos de idade. Através de técnicas, notavelmente avançadas para a época, Miescher isolou, dos núcleos de células de pus e de esperma de salmão, uma macromolécula, nunca antes identificada, à qual deu o nome de nucleína. Posteriormente a nucleína foi denominada ácido nucléico. No início do século XX o bioquímico Kossel evidenciou a existência de dois tipos de ácidos nucléicos: o ácido desoxirribonucléico (ADN ou DNA) e o ácido ribonucléico (ARN ou RNA) (GRIFFITHS et al., 2001).

Os ácidos nucléicos são moléculas de maior importância para os seres vivos, dado que controlam os processos vitais de todos os organismos. O

DNA contem o gene, enquanto que o RNA serve como agente intermediário na atividade do gene (ALBERTS et al., 1997).

Os ácidos nucléicos são polinucleotídeos, isto é, macromoléculas formadas pelo encadeamento de unidades chamadas de nucleotídeos. Por sua vez, cada nucleotídeo resulta da combinação de três componentes: fosfato, açúcar e base nitrogenada. No DNA as bases nitrogenadas são a adenina (A), a guanina (G), a citosina (C) e a timina (T) (GRIFFITHS et al., 2001).

O DNA é formado por duas cadeias de polinucleotídeos enrolados de forma helicoidal e ligados transversalmente através de pontes de hidrogênio. A adenina forma especificamente pontes com a timina; e a guanina com a citosina. Para cada nucleotídeo de adenina existe um de timina (A - T), e para cada nucleotídeo de guanina existe um de citosina (G - C), formando duas cadeias que são designadas por complementares (GARDNER, 1986).

James Watson e Francis Crick propuseram, em 1953, um modelo helicoidal para a estrutura do DNA, baseados em estudos de difração de raios X (JOBIM; JOBIN; BRENNER, 1999).

In vivo, o DNA se replica ou duplica através de um processo chamado de semiconservativo. Sob a ação de uma enzima específica, a DNA-polimerase, ocorre a quebra de pontes de hidrogênio e a conseqüente separação das duas cadeias. Ao mesmo tempo cada cadeia vai completando a sua cadeia complementar através do encadeamento de novos nucleotídeos. O resultado é a formação de duas cadeias que conservam, em sua estrutura, uma metade da molécula-mãe. Dada esta forma de replicação, tem-se a designação semiconservativa (ALBERTS et al., 1997).

O DNA é encontrado principalmente no núcleo das células e nas mitocôndrias (GRIFFITHS et al., 2001). As mitocôndrias são corpúsculos esféricos ou em forma de bastonetes, relacionados com a respiração celular, que aparecem imersos no citoplasma. São encontradas em todas as células de organismos eucariotes aeróbios. A quantidade de mitocôndrias por célula varia em função de suas necessidades energéticas, sendo que uma única célula pode chegar a possuir mais de 5.000 cópias desta organela (JOBIM; JOBIN; BRENNER, 1999).

As mitocôndrias são formadas pela divisão de outras preexistentes. O processo acontece graças à existência de DNA em seu interior. Este DNA é circular com regiões codificantes e uma região hipervariável denominada controladora ou alça D, sendo esta última a região utilizada para a identificação humana (STRACHAN; READ, 2002).

A análise do DNA mitocondrial (mtDNA) para fins forenses fica reservada para tecidos antigos como ossos, cabelos e dentes dos quais o DNA nuclear já não oferece mais condições de análise (SILVA; PASSOS, 2002). Porém, por seu exame se dar pelo seqüenciamento direto de suas bases nitrogenadas, técnica esta dispendiosa, por exigir o emprego de tecnologia altamente especializada, e também pelo fato do mtDNA ser unicamente matrilineo e, por isto, menos informativo, a análise do mtDNA não é usual a todos os laboratórios forenses, voltados à elucidação de crimes e à identificação de pessoas (VOGEL; MOTULSKY, 2000).

O núcleo controla todas as atividades celulares, representando assim, o centro de coordenação celular, através de seus ácidos nucléicos. É no DNA nuclear que estão localizados os genes, responsáveis pelas atividades da

célula. Tais informações são transmitidas ao citoplasma através do RNA mensageiro, que é transcrito do DNA, passa ao citoplasma e comanda, através dos ribossomos, a síntese de proteínas específicas, responsáveis pela estrutura e fisiologia celulares (ALBERTS et al., 1997).

#### 2.4.2 Transmissão da informação genética

O DNA se arranja em uma estrutura denominada cromossomo. Para facilidade de estudos, os cromossomos podem ser considerados uma seqüência linear de genes. Os cromossomos ocorrem aos pares nas células somáticas. Essas células são diplóides, isto é, possuem  $2n$  cromossomos. Os cromossomos que formam cada par são chamados de homólogos. Cada espécie tem um número de cromossomos constante. Na espécie humana, as células somáticas apresentam 46 cromossomos ou 23 pares de cromossomos homólogos ( $2n = 46$ ) (GRIFFITHS et al., 2001).

Cada gene ocupa um lugar definido no cromossomo, que é denominado locus gênico. Os cromossomos homólogos que formam cada par apresentam o mesmo locus gênico (ALBERTS et al., 1997).

Quando, nas células de um indivíduo, os genes que compõem um par não são idênticos entre si, o indivíduo é denominado heterozigoto para o caráter determinado pelo par de genes e se diz que os genes estão em heterozigose. Quando os genes alelos são idênticos, o indivíduo é denominado

homozigoto para aquele caráter e se diz que os genes estão em homozigose (GRIFFITHS et al., 2001).

Na espécie humana, cada uma das células somáticas, ao sofrer um processo de divisão chamado mitose, originará duas outras células com 46 cromossomos. A mitose é um processo importante no crescimento de organismos multicelulares e também nos processos de regeneração de tecidos do corpo (STRACHAN; READ, 2002).

A meiose é um tipo de divisão em que uma célula dá origem a quatro novas células com a metade do número de cromossomos da célula inicial. Uma célula que apresenta  $2n = 46$  cromossomos, ao sofrer meiose, originará quatro células com  $n = 23$  cromossomos. Este tipo de divisão ocorre no processo de formação de gametas, em estreita relação com a 1ª lei de Mendel (GRIFFITHS et al., 2001).

Os trabalhos de Gregor Mendel resultaram em leis fundamentais para a Genética atual. O enunciado da 1ª lei de Mendel pode ser assim apresentado: "Cada caráter é determinado por 'fatores' (genes) que se separam na formação dos gametas, indo um 'fator' do par para cada gameta" (ALBERTS et al., 1997).

Em cada célula somática, a espécie humana, como já dissemos, possui 46 cromossomos, sendo metade deles de herança materna e a outra metade de herança paterna, oriundos, respectivamente, de um óvulo e de um espermatozóide (STRACHAN; READ, 2002).

Uma pessoa possui bilhões e bilhões de células em seu corpo e todas elas, com exceção de seus gametas, são, em termos genéticos, idênticas. São cópias fiéis oriundas de uma única célula  $2n$  (fusão do óvulo com o

espermatozóide) que se multiplicou através do processo de divisão celular chamado mitose. Deste modo, um indivíduo carrega, em cada uma de suas células, as mesmas características genéticas que foram herdadas de seus pais (VOGEL; MOTULSKY, 2000).

#### 2.4.3 Regiões hipervariáveis

O objetivo da análise de DNA é diferenciar um indivíduo de outro, permitindo que ele seja diferenciado dentre bilhões de outros indivíduos. A variabilidade humana em termos de DNA é enorme. Dois genomas humanos escolhidos ao acaso diferem aproximadamente em uma de cada 500 bases do DNA (nucleotídeos). Como o genoma humano tem cerca de 3.109 de bases (numero errado), isto implica em 6 milhões de diferenças entre duas pessoas (STRACHAN; READ, 2002).

Na espécie humana existem cerca de 50 mil genes que codificam, através de RNA, proteínas. Estes genes codificadores de proteínas representam, aproximadamente, 10% do genoma. Todo o restante trata-se de seqüências repetitivas que têm função estrutural (PENA, 1993).

É a variabilidade deste restante, quais sejam as regiões hipervariáveis ou polimórficas, de função estrutural, que se utiliza nos exames forenses de DNA. De nada adiantaria comparar, por exemplo, o gene codificador da insulina (hormônio protéico) de dois indivíduos saudáveis, pois seriam absolutamente iguais. Muitas vezes, mutações genéticas (variações nas bases

nitrogenadas do DNA), ao nível dos genes codificadores de proteínas, podem levar à inviabilidade do indivíduo; ao passo que mutações gênicas nas regiões estruturais têm sido toleradas ao longo da evolução humana, uma vez que não possuem função fisiológica definida além da estrutural (VOGEL; MOTULSKY, 2000).

#### *2.4.3.1 tipos de polimorfismo*

Os polimorfismos das regiões hipervariáveis do DNA podem ser agrupados em dois tipos: polimorfismos de comprimento e polimorfismos de seqüências.

Segundo Weedn e Swarner (1999),

Os polimorfismos de seqüência são compostos de diferentes nucleotídeos em uma determinada localização do genoma. Estas variações em seqüência podem ser manifestadas como regiões de alelos alternativos ou substituições, adições ou deleções de bases, mas a maioria dos polimorfismos de seqüência são meras mutações pontual.

Já os polimorfismos de comprimento são seqüências de nucleotídeos que se repetem, sendo denominadas VNTRs (do Inglês “variable number of tandem repeats”) ou número variável de repetições consecutivas (STRACHAN; READ, 2002).

As regiões com repetições da seqüência básica maiores que 8 pares de bases (bp) foram denominadas de minissatélites ou regiões em repetições em



tandem longas (LTRs – do inglês large tandem repeats). Os minissatélites são formados por seqüências de vários nucleotídeos, por exemplo, (ATGCGAGCTACTGAGCC)<sub>n</sub>, repetidas em números diferentes em cada indivíduo, dando-lhe uma característica única. Um locus de minissatélite pode ter muitos alelos em função do número de vezes (n) em que esta estrutura é repetida ao longo do DNA, deixando a população polimórfica em relação ao locus (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985).

As regiões com repetições da seqüência básica de aproximadamente 2 a 8 bp são denominadas de regiões microssatélites ou STRs (short tandem repeats) e (, 1999). Os loci de microssatélites ou STR (do inglês short tandem repeats) ou repetições curtas consecutivas se assemelham aos minissatélites, porém com estrutura repetida menor, como, por exemplo, na seqüência (GATA)<sub>n</sub>. Esses loci estão dentro de uma faixa de 120 a 350 pares de bases, o que os tornam ideais para análise de DNA degradado (JOBIM; JOBIN; BRENNER, 1999; WALKER; RAPLEY, 1999).

Os STRs ou microssatélites, são abundantes no genoma humano, fornecendo uma variedade para escolha dos loci para os testes de identificação (BECKMAN; WEBER, 1992). Além disso, devido ao pequeno tamanho dos alelos (geralmente menores a 300 pb), a análise de STR é utilizada para espécimes antigas, ou mal acondicionadas, que sofreram ações degradatórias do meio ambiente, e que freqüentemente contém DNA degradado (WALKER; RAPLEY, 1999).

O número de repetições básicas nos minissatélites e microssatélites pode variar em diferentes indivíduos criando um polimorfismo de comprimento (WEEDN; SWARNER, 1999).

#### 2.4.3.2 métodos de detecção

O primeiro método de detecção de regiões polimórficas do DNA denomina-se RFLP (restriction fragment length polymorphism) ou polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição. Nas análises clássicas de RFLP, fragmentos de DNA contendo VNTRs (minissatélites) são cortados do DNA cromossômico por enzimas de restrição. Um determinado comprimento de fragmento é conhecido como alelo. Assim, são analisados os fragmentos de corte (restrição) do DNA que diferem (são polimórficos) em tamanho (comprimento) entre os indivíduos (WEEDN; SWARNER, 1999).

O desenvolvimento de sondas de DNA para os loci VNTR foi a chave para a aplicação das análises de RFLP na medicina forense.

A sonda original descrita por Jeffreys, Wilson e Thein (1985), que originou o termo “padrão de impressões digitais de DNA” (fingerprint of DNA), é uma sonda multilocal. Uma sonda multilocal SLP (do inglês single locus polymorphism) liga-se a várias seqüências de DNA e produz inúmeras bandas; a auto-radiografia resultante assemelha-se a um código de barras comercial. Os laboratórios atualmente usam sondas para locus únicos, que se liga a um único locus do DNA. Os sistemas de locus únicos são adotados por serem mais sensíveis, mais facilmente interpretados e por possuírem uma genética definida (JOBIM; JOBIN; BRENNER, 1999).

As sondas RFLP locus únicos são elaboradas de modo a se ligarem a uma localização-alvo em cada conjunto cromossômico. Estas sondas são tipicamente específicas para humanos ou primatas. Os fragmentos de DNA

ligados à sonda variam em tamanho e, portanto, são visualizados como bandas que variam em posição em uma auto-radiografia. Geralmente são geradas duas bandas em uma auto-radiografia para cada sonda de locus único, correspondendo aos alelos maternos e paternos, a menos que estes sejam compartilhados (WEEDN; SWARNER, 1999).

Atualmente, apenas as análises de RFLP SLP são empregadas e, na grande maioria das vezes, em testes de determinação de paternidade. Esta técnica é extremamente potente, porém, é laboriosa, complexa e exige DNA íntegro e em grande quantidade para sua aplicação. Por estas razões ela não é recomendada para análises voltadas à elucidação de crimes, devido à escassez e, mormente, ao estado de degradação das amostras (WEEDN; SWARNER, 1999).

Todos os testes de DNA não realizados por RFLP atualmente em uso baseiam-se em métodos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e incluem os sistemas dotblot, AmpFLPs (polimorfismos do comprimento amplificado do fragmento de DNA), STRs (repetições tandem curtas) e seqüenciamento direto do DNA mitocondrial – mtDNA (GRIFFITHS et al., 2001).

## **2.5 Amplificação do DNA através da Polimerase Chain Reaction (PCR)**

A PCR ou reação em cadeia da polimerase (do Inglês polymerase chain reaction) foi descrita pela primeira vez em 1985, por Kary Mullis que, em 1993, recebeu o prêmio Nobel em química por seu feito. Desde o início, a PCR foi

reconhecida como uma técnica com potencial de utilização para análise da quantidade traço de líquido biológico, freqüentemente encontrado na área forense. Amíúde, estas amostras são diminutas para serem utilizadas com os métodos de RFLP (GRIFFITHS et al., 2001).

As tecnologias da PCR são principalmente insensíveis à degradação, uma vez que os loci de DNA-alvo são pequenos e apenas algumas poucas cópias da seqüência-alvo precisam estar intactas na amostra de DNA antes da amplificação. As análises por RFLP, ao contrário, são extremamente sensíveis à degradação uma vez que a fragmentação do DNA atinge exatamente o cerne do método analítico (WEEDN; SWARNER, 1999).

A PCR propicia uma tipagem rápida do DNA, e permite assim a automação. A tecnologia da PCR é a despeito de poderosa, tem suas desvantagens. Como um todo os sistemas genéticos analisados por PCR são menos discriminatórios (informativos) que os sistemas genéticos RFLP. Contudo, o poder discriminatório é aceitável tendendo a aumentar com sistemas adicionais (WALKER; RAPLEY, 1999).

Os fragmentos STR são mais suscetíveis à análise por instrumental automatizado do que os fragmentos de DNA maiores de outros sistemas e, por isto, são normalmente empregados nos laboratórios de ciência forense (SILVA; PASSOS, 2002).

As análises STR não automatizadas empregam géis de poliacrilamida (PAGE, do inglês polyacriladime gel eletrophoreses) que são, mormente, corados pela prata para evidenciação dos fragmentos de DNA. Já as análises automatizadas usam produto amplificado de DNA marcado com corantes

fluorescentes e a leitura e interpretação de seus géis de eletroforeses se dá automaticamente em aparelho próprio (WALKER; RAPLEY, 1999).

Em outra aparelhagem mais sofisticada, os fragmentos STR de DNA são detectados na medida da migração no gel através de um detector. Diferentes fluoróforos, agentes químicos fluorescentes, são utilizados em uma dada coluna. Além disto, vários fragmentos STR são suscetíveis a ampliações simultâneas como conjuntos multiplex, permitindo a detecção simultânea de vários sistemas genéticos. Inúmeros sistemas STR estão disponíveis e com números suficientes de sistemas genéticos (8, 12 e até 16) no qual são testados simultaneamente e dos quais se obtém poderes discriminatórios semelhantes aos alcançados nos testes de RFLP (WEEDN; SWARNER, 1999).

Além das metodologias citadas para estudar os polimorfismos de DNA tanto em nível de variação de seqüência quanto de comprimento, a partir de 1996 ocorreram avanços enormes no desenvolvimento e utilização de “microchips de hibridização de DNA”, metodologia esta que poderá tornar-se de escolha no futuro, dada a sua simplicidade e eficiência. (STRACHAN; READ, 2002).

## **2.6 Metodologias de extração de DNA**

A capacidade de isolar do DNA de células em quantidade, qualidade e integridade suficiente representa um requerimento essencial das análises de biologia molecular envolvendo a identificação de indivíduos. Métodos para extrair e isolar o DNA são numerosos e variam em complexidade de acordo

como os requerimentos da aplicação final. Podem também variar de acordo com o tipo de inativação, degradação ou inibição de proteínas intracelulares, principalmente as nucleases. Os métodos amplamente empregados envolvem homogeneização, solubilização com detergentes ou sonicação fazendo-se, a seguir, a desnaturação ou inativação das proteínas. O DNA pode então ser separado de macromoléculas celulares contaminantes e em seguida precipitado e purificado (WALKER; RAPPLEY, 1999).

## **2.7 Utilização de DNA obtido de tecidos dentários para identificação humana**

Inicialmente, os estudos relacionando dentes e aspectos genéticos refletiam uma preocupação em relação à determinação do sexo em virtude da possibilidade de marcação do cromossomo Y contido em polpas dentárias. Esse procedimento era estabelecido com o auxílio da microscopia de fluorescência. Tais trabalhos relatavam a utilização de dentes sob condições variadas, cariados, ou armazenados sem cuidados específicos - que permaneciam expostos à temperatura ambiente – com períodos entre extração dos elementos e a obtenção do DNA que variavam de há 4 anos (CAMERON, 1973; WHITTAKER; LLEWELYN; JONES, 1975; DANGE; MALVANKAR; MADIWALE, 1978).

Evoluindo nessa linha de pesquisa, Yokoi, Aoki e Sagisaka (1989) analisaram amostras de manchas de sangue, tecidos ósseos e polpas dentais, para estimar a pertinência desses materiais aos seres humanos e ao seu sexo,

por meio de sondas de DNA (BLUR8 e pHY10). O método de extração foi o orgânico, havendo um lapso de tempo entre a extração dental e a obtenção do DNA de 0 a 34 dias. Em todas as amostras femininas a sonda pHY10 - concebida a partir do cromossomo Y - teve resultados negativos. Entretanto, a sonda de identificação humana (BLUR8) demonstrou ser 3 a 5 vezes mais sensível.

Pesquisas apontam que uma proteína encontrada no esmalte dental e denominada amelogenina ou AMEL apresenta distinções entre os sexos quanto ao tamanho e ao padrão da seqüência de nucleotídeos. De fato, o gene que codifica a amelogenina feminina está localizado no cromossomo X, enquanto a amelogenina masculina é encontrada no cromossomo Y; as mulheres apresentam alelos homozigotos e genes idênticos, e os homens apresentam dois genes diferentes, alelos heterozigotos (SLAVKIN, 1997).

Reportando a dificuldade de extrair DNA tendo como substrato somente os tecidos duros dentários, Sivagami, Rao e Varshney (2000) propõem a aplicação de ultra-som aos tubos numa fase intermediária da extração orgânica. Os autores utilizaram nitrogênio líquido para pulverizar as estruturas dentárias, obtendo sucesso no diagnóstico do sexo com o gene AMEL.

Comentando a particular resistência dos dentes quando submetidos ao fogo ou expostos ao meio ambiente Haerting, Crainic e Durigon (1985) realizaram um ensaio com 257 dentes, de cujos doadores eram conhecidos a idade e o grupo sangüíneo. Com a utilização do método de Gustafson para estimativa da idade, obtiveram margem de erro de 4,6 anos. Já os resultados da determinação dos antígenos A, B e O foram concordantes em mais de 85% dos exames.

A influência do meio ambiente na concentração, integridade e recuperação do DNA, extraído de polpas dentárias, foi anteriormente mensurada por Schwartz et al., (1991). Os autores variaram o pH (3, 7 e 10), a temperatura (4oC, 25oC, 37oC e incinerando o dente), a umidade (20, 66 e 98%), as condições do solo em que foi feito o enterramento dos dentes (areia, terra de vaso, terra de jardim, submersão em água e enterrados ao relento), e os tempos de enterramento (de uma semana a seis meses). Constataram que esses fatores não são determinantes para a obtenção de DNA de alto peso molecular a partir de polpas dentárias.

A polpa dental é um dos poucos materiais orgânicos disponíveis para análise do DNA em alguns casos especiais como acidentes aéreos, corpos carbonizados ou putrefatos (POTSCH et al., 1992). Os autores estudaram uma população composta de três grupos de dentes. O primeiro grupo era formado por 30 dentes obtidos de extrações dentárias e armazenados por períodos de 6 semanas a 4 anos; um controle positivo foi realizado com gazes contendo sangue do transoperatório. No segundo grupo, 10 dentes foram extraídos de fragmentos mandibulares armazenados por 15 anos. O último grupo, de 8 dentes, foi obtido de cadáveres recentes. Em todos os casos os autores trabalharam com as polpas dentais, obtendo cotas de DNA entre 6-50µg, sendo possível, com o auxílio da PCR e das sondas VNTR, avaliar o perfil genético e o sexo dos indivíduos.

Hanaoka et al. (1995), avaliaram a extração de DNA de 50 dentes (polpas e tecidos duros) por lócus de VNTR. O DNA obtido das polpas dentárias variou de 3 a 40µg, e não foi encontrada correlação entre o período de estocagem dos dentes e a quantidade de DNA. Os autores investigaram a



eficiência da extração de DNA a partir de tecidos duros dentais em diferentes concentrações de solução descalcificante. O DNA obtido das polpas dentárias foi de alto peso molecular, sendo susceptível a análise por sondas multilocus ou por PCR; já o material obtido dos tecidos duros dentais só apresentou análise satisfatória pela PCR.

Confirmando essa propriedade de conservação das estruturas dentárias em relação ao DNA, Drancourt et al. (1998) demonstraram ser possível que polpas dentárias sirvam de substrato para extração e análise do DNA. E comprovam de forma irrefutável essa assertiva citando epidemias que ocorreram no passado – há cerca de 400 anos atrás - e que, até então, não contavam com a confirmação de sua história clínica. A amplificação do DNA de alguns agentes patogênicos através da polpa dentária pode permitir essa confirmação.

O ponto de partida de toda análise forense do DNA é uma boa extração, pois o manejo dos dentes apresenta algumas particularidades (SMITH et al., 1997). Entre outras recomendações, os autores sugerem que se radiografe todo o material previamente às análises moleculares, e que se preserve a coroa para eventual confrontação documental, propondo um corte horizontal na junção amelo-dentinária com remoção da polpa, ou mesmo o aproveitamento de todo o remanescente dental. Em estudo comparativo, constataram haver um ganho significativo na extração do DNA quando há pulverização de todo remanescente dental.

Para pulverizar o elemento dental o proporcionado adequado para extração de DNA Sweet e Hildebrand (1998) descreveram uma metodologia de

pulverização criogênica dos elementos dentários. Em um estudo com 20 dentes obtiveram média de 18,4µg de DNA por grama de dente seco pelo método orgânico de extração, destacando que a pulverização diminui os riscos de contaminação.

Em um caso real de carbonização humana Sweet e Sweet (1995), relataram um caso no qual, por meio de polpas de dentes molares inclusos, comparadas a outras evidências biológicas encontradas no local do crime, foi possível, pela análise de regiões polimórficas do DNA (VNTR), confirmar que a vítima estivera no veículo do suspeito, embasando assim a acusação.

Em outro relato, Sweet, Hildebrand e Phillips (1999) descreveram uma identificação por meio de comparação de STR de dentes e esfregaços de exame de Papanicolau, e comentam que, apesar de os dentes apresentarem trabalhos odontológicos representativos, não havia documentação para confronto. Assim, dois dentes foram selecionados e pulverizados pelo método criogênico, sendo o DNA extraído pelo método orgânico. Muitos laboratórios citológicos armazenam as lâminas de diagnóstico de seus pacientes e, assim, o exame de Papanicolau apresenta-se como uma opção quando da impossibilidade de utilizar os registros médicos e odontológicos tradicionais.

Até aqui demos destaque aos trabalhos que se utilizaram de sondas ou de STR para análise do DNA dental, ou seja, descrevemos trabalhos que empregaram DNA genômico. Mas o mtDNA apresenta-se como outra efetiva opção de análise. O mtDNA é de origem extranuclear, e possui milhares de cópias em uma única célula, como descrevemos anteriormente; recebemos esse material genético de nossas mães, o que faz com que tenhamos identidade com nossos irmãos e parentes ligados pela linhagem materna. O

mtDNA é circular e tem grande resistência à digestão enzimática; já foi totalmente seqüenciado e sua região hipervariável está determinada. Outra característica relevante é a sua propriedade monoclonal, ou seja, todo o mtDNA do indivíduo apresenta a mesma seqüência (FARAH, 2000).

Ginther, Issel-Tarver e King (1992) avaliaram o mtDNA extraído de dentes pelo método orgânico, com posterior seqüenciamento. Confirmaram sua aplicabilidade em casuísticas como aquela descrita por Yamada et al. (1997), que relatam um caso de carbonização em que o mtDNA foi extraído pelo método Chelex®, ou aquela relatada por Boles, Snow w Stover (1995), que realizaram identificação pelo seqüenciamento do mtDNA a partir de elementos dentários de 12 esqueletos.

## **2.8 Parâmetros periciais**

Preocupado com as interferências do meio ambiente na recuperação do DNA, a equipe de DNA do Instituto de Criminalística da Polícia Civil do Estado de São Paulo, por meio da Resolução SSP-194, de 2 de junho de 1999 (SÃO PAULO, 1999), apresenta-nos parâmetros de conduta para a coleta, o acondicionamento, a preservação e o encaminhamento de material biológico para identificação humana, incluindo o manejo de dentes e saliva. Alguns itens merecem destaque, assim transcrevemos os seguintes trechos da citada resolução:

Art. 3 § 1 Ficam impedidos de proceder às análises de laboratório os Peritos que efetuaram a coleta de material em local.

...

Art. 4 § 1 Não havendo condições imediatas de confronto pela ausência de material padrão para comparação, mas sendo o caso de interesse judiciário para futura identificação, as amostras que, após análise por Perito especialista em identificação humana, revelarem-se adequadas, serão devidamente selecionadas, etiquetadas e preservadas, pelo prazo de 90 (noventa) dias, para futuro exame. Art.5o. é competência exclusiva de médico legista a coleta de material biológico para fins de identificação de pessoas vivas ou cadáveres, nos termos desta Portaria.

As demais recomendações versam sobre a coleta e o manuseio usuais, e buscam minimizar as possibilidades de contaminação e degradação das amostras por meio do emprego de barreiras físicas, da utilização de material estéril e/ou descartável, do acondicionamento em locais apropriados, da secagem de amostras úmidas, da limpeza dos ossos e dos dentes, da coleta em duplicata para contraprova entre outras rotinas.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Avaliar o potencial de recuperação de DNA e análise através de três metodologias propostas (orgânico, isopropanol/acetato de amônia e sílica) de elementos dentais submetidos à queima em diferentes temperaturas (200°C, 400°C, 500°C e 600°C), durante um tempo de 60 minutos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Essa pesquisa está registrada no Comitê de Ética Nacional em pesquisa (CONEP) sob nº. 9070, processo nº. 25000.091111/2003-07, parecer nº. 1509/2003 e registrada no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob nº. 142/03 (Anexo A).

O grupo de estudo foi constituído de dezesseis elementos dentais, terceiros molares íntegros extraídos por motivos ortodônticos, de oito indivíduos, e cada indivíduo forneceu dois elementos dentais.

Após a cirurgia dos elementos dentais, estes foram imediatamente submetidos a um processo de limpeza físico-química, que se constituiu de raspagens com curetas periodontais da porção radicular, e lavagem com álcool 70%. Foram acondicionados em recipientes plásticos esterilizados e mantidos em temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dos dois elementos dentais removidos de cada indivíduo, um foi mantido *in natura* e outro submetido à queima, em um cadinho estéril em um forno de porcelana de prótese Knebel (keramat I). Todos os dentes foram submetidos ao calor durante 60 minutos, sendo que dois elementos a  $200^{\circ}\text{C}$ , dois a  $400^{\circ}\text{C}$ , dois a  $500^{\circ}\text{C}$  e dois a  $600^{\circ}\text{C}$ . As temperaturas e o tempo foram selecionados, pautando-se em outro trabalho realizado no Departamento de Odontologia Legal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, voltado para identificação humana, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (MELANI, 1999).

O processo da queima dos elementos ocorreu em intervalos que variaram de 1 semana a 1 mês da data da exodontia. Para os elementos

dentais *in natura*, seccionou-se a porção coronária do elemento dental com o auxílio de um disco de carborundo também esterilizado e trocado para cada elemento. Apenas a porção radicular destes elementos foi utilizada para a pulverização, visto a dificuldade técnica de se realizar a pulverização manual de elementos dentais *in natura*, e justificando-se por outro trabalho descrito na literatura (Gaytmenn; Sweet, 2003), que relata que a porção coronária de dentes não submetidos à queima é suficiente para a realização da análise do DNA. Para os dentes submetidos à queima utilizou-se todo elemento dental com exceção do esmalte pois este, durante o processo de queima, separou-se da dentina coronária.

Cada amostra foi pulverizada dentro de um almofariz de porcelana estéril contendo nitrogênio líquido, por meio de batimentos contínuos utilizando-se um pistilo estéril. Após pulverização, de cada elemento dental submetido à queima, extraiu-se o DNA através das três metodologias: orgânico, isopropanol/acetato de amônia e sílica (Anexos B, C e D). Das amostras dentais mantidas *in natura* (*gold standard*) procedeu-se à extração de DNA através do método orgânico.

As regiões escolhidas para amplificação pela técnica PCR (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988) foram: STR F13A01 (HAMMOND et al., 1994), e quatro MPS da região hipervariável HV2 do mtDNA: MPS3A, MPS3B, MPS4A e MPS4B (GABRIEL et al, 2001). Os iniciadores utilizados foram obtidos da literatura e estão descritos no quadro 4.1.

Frag. Amplif.	Seqüência do Iniciador		Inf.seq.
*F13A01	5' GAG GTT GCA CTC GAG CCT TTG CAA – 3' (AAA G strand) 5' TTC CTG AAT CAT CCC AGA GCC ACA – 3' (TTT C strand)		279-335
**MPS3A 126	F34	5' GGG AGC TCT CCA TGC ATT TGG TA – 3'	57-135
	R159	5' AAA TAA TAG GAT GAG GCA GGA ATC – 3'	
**MPS3B 132	F109	5' GCA CCC TAT GTC GCA GTA TCT GTC – 3'	133-219
	R240	5' TAT TAT TAT GTC CTA CAA GCA – 3'	
**MPS4A 142	F151	5' CTA TTA TTT ATC GCA CCT – 3'	169-273
	R292	5' ATT TTT TGT TAT GAT GTC T – 3'	
**MPS4B 158	F220	5' TGC TTG TAG GAC ATA ATA AT – 3'	240-357
	R377	5' GTG TTA GGG TTC TTT GTT TT – 3'	

Quadro 4.1 – Iniciadores utilizados para amplificação do STR F13A01 e das MPSs

\*Hamond et al., 1994.

\*\*Gabriel et al., 2001.

Para a região F13A01, a reação de amplificação foi realizada em volume final de 25µL, aplicando-se 0,4µL da enzima Taq DNA Polimerase 1U/µL (Biotools – Madri, Espanha); 2,5µL de tampão de reação de PCR 10X, (Biotools – Madri, Espanha) Tris-HCl a 75mM, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM e KCl a 50mM; desoxinucleotídeos – dNTPs (Pharmacia Biotech, Inc – Uppsala, Suécia) na concentração final de 200µM; e 0,8 µM de cada iniciador (Invitrogen – São Paulo, Brasil). Para padronizar as condições de pipetagem foi realizado um mix dos reagentes, exceto a Taq DNA polimerase e o DNA a ser amplificado. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 98°C/3min., e 38 ciclos de desnaturação a 94°C/1min, associação a 56°C/1min e extensão 72°C/2min, com extensão final a 72°C/10min.

Para os MPSs da região HV2, a reação de amplificação foi feita em volume final de 40µL, aplicando-se 0,5µL da enzima Taq DNA Polimerase (1U/µL), 4,0µL de tampão de reação de PCR 10X (Tris-HCl a 75mM; MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM e KCl a 50mM), desoxinucleotídeos (dNTPs) na concentração final de



100 $\mu$ M e 0,8 $\mu$ M de cada iniciador. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 96°C/10min., e ciclos de desnaturação a 94°C/20seg., associação, descrita abaixo, e extensão 72°C/30seg., com extensão final a 72°C/10min. O número de ciclos foi de 38 para a MPS 3A, 46 para as MPS 3B e 4B e 42 para a MPS 4A. As temperaturas de associação foram 54°C/20seg., 46°C/20seg. e 45°C/3seg., respectivamente para as MPSs 3A, 3B e 4B, e 4A.

Os produtos de PCR do STR F13A01 foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 8% em tampão TBS, juntamente com um marcador de tamanho molecular de 50 pares de base (Invitrogen – São Paulo, Brasil). A 2 $\mu$ L do produto de PCR foram adicionados 2 $\mu$ L de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25% e glicerol 30%) e a separação eletroforética foi realizada a 120V, 60mA durante 3 horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi revelado pela precipitação com prata (Sambrook et al, 2001) e posteriormente digitalizado utilizando-se o sistema de aquisição de imagens (Multimage<sup>TM</sup> Light Cabinet, Alpha Innotech, San Leandro, EUA).

Os produtos de PCR dos MPS 3A, 3B, 4A e 4B, foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-HCl 0,45mM, ácido bórico 0,45mM, EDTA 2,5mM), juntamente com um marcador de tamanho molecular de 100 pares de base (Invitrogen – São Paulo, Brasil). A 5 $\mu$ L do produto de PCR foram adicionados 2 $\mu$ L de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25% e glicerol 30%) e a separação eletroforética foi realizada a 100V, 60mA durante 30 minutos. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com uma solução de brometo de etídio (0,03 $\mu$ g/ml) durante 20 minutos, e posteriormente digitalizados como descrito acima.

Das amostras amplificadas com os MPSs foram selecionadas para purificação (QIAquick PCR purification Kit), no intento da eliminação do excesso de sais e reagentes, aquelas que apresentaram maior intensidade de banda no transiluminador. Após a purificação, segundo instruções do fabricante, foi realizado um novo gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-HCl 0,45mM, ácido bórico 0,45mM, EDTA 2,5mM). A 4 $\mu$ L do produto de PCR foi adicionado 1 $\mu$ L de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25% e glicerol 30%), e a separação eletroforética foi realizada a 100V, 60mA por 30 minutos. A banda do amplicon foi avaliada e quantificada, por comparação com a banda de 400pb (40ng) do marcador de pares de base, que consiste da mistura equimolar de 6 fragmentos de 100 a 2000pb (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA). Os amplicons que tiveram a intensidade da banda igual ou superior a da banda de 400pb foram selecionados para seqüenciamento e enviados para o Instituto de Biologia da USP onde foi utilizado o equipamento Megabace 1000 (Pharmacia, Uppsala, Suécia).

A análise do seqüenciamento foi realizada da seguinte forma: as duas fitas seqüenciadas foram sobrepostas alinhadas e analisadas em relação à seqüência CRS (Cambridge Reference Sequence, Andrews et al, 1999) através do programa BioEdit (versão 5.0.9 – Department of Microbiology North Carolina State University).

## 5 RESULTADOS

### STR

Todos os produtos de PCR, das amostras *in natura* que tiveram o DNA extraído pelo método orgânico (*gold standart*), puderam ser analisados pelo gel de poliacrilamida corado pela prata.

Foi possível a análise pelo PAGE de 50% das amostras submetidas à queima, que tiveram seu DNA extraído pelo método orgânico, sendo duas amostras a 200°C e duas a 400°C. Na metodologia de extração pelo álcool isopropílico/acetato de amônia, a possibilidade de análise representou 38% dessas amostras, onde duas amostras foram submetidas a 200°C e uma amostra a 500°C. Na metodologia pela sílica, nenhuma amostra submetida à queima foi passível de análise. O resultado geral obtido segundo o método de extração pode ser observado no quadro 5.1.

Método	Orgânico	Ac.amônia	Sílica
Temperatura			
200°C	2/2	2/2	0/2
400°C	2/2	0/2	0/2
500°C	0/2	1/2	0/2
600°C	0/2	0/2	0/2
Gold Standart	8/8		

Quadro 5.1 – Quantidade de resultados obtidos para o STR F13A01, segundo o número de amostras analisadas, método de extração de DNA e temperatura da queima.

### MPSs

Todas as amostras *in natura* que tiveram o DNA extraído pelo método orgânico (*gold standart*) puderam ser analisadas pelo seqüenciamento.

Das amostras submetidas à queima, as que tiveram o DNA extraído pelo método orgânico 38% puderam ser analisadas pelo seqüenciamento, 100% pelo método isopropanol/acetato de amônia, e 25% pelo método da sílica.

Pelo método orgânico (Quadro 5.2) observa-se que dois elementos queimados a 200°C e um elemento queimado a 400°C, da mesma região (3A), permitiram a análise pelo seqüenciamento. Sendo que as três outras regiões MPSs assim como as amostras submetidas a 500°C e 600°C não puderam ser analisadas.

MPS	3A	3B	4A	4B
Temperatura				
200°C	2/2	0/2	0/2	0/2
400°C	1/2	0/2	0/2	0/2
500°C	0/2	0/2	0/2	0/2
600°C	0/2	0/2	0/2	0/2
Gold Standart	8/8	8/8	8/8	8/8

Quadro 5.2 – Resultados obtidos pelo método orgânico de extração de DNA, segundo o número de amostras analisadas, a região MPS, e a temperatura da queima.

Das amostras submetidas à queima que tiveram o DNA extraído através da metodologia isopropanol/acetato de amônia (Quadro 5.3), a 200°C sete amostras foram analisadas pelo seqüenciamento. A 400°C cinco amostras puderam ser analisadas. A 500°C três amostras puderam ser analisadas, o mesmo número ocorrendo para 600°C.

Método	3A	3B	4A	4B
Temperatura				
200°C	2/2	2/2	2/2	1/2
400°C	2/2	2/2	0/2	1/2
500°C	1/2	2/2	0/2	0/2
600°C	0/2	2/2	0/2	1/2
Gold Standart	8/8	8/8	8/8	8/8

Quadro 5.3 – Resultados obtidos pelo método álcool isopropílico/ acetato de amônia de extração de DNA, segundo o número de amostras analisadas, a região MPS, e a temperatura da queima.

Pelo método de extração da sílica (Quadro 5.4) duas amostras foram passíveis de análise pelo seqüenciamento, uma submetida a 400°C e outra a 500°C.

Método	3A	3B	4A	4B
Temperatura				
200°C	0/2	0/2	0/2	0/2
400°C	0/2	0/2	0/2	1/2
500°C	0/2	0/2	1/2	0/2
600°C	0/2	0/2	0/2	0/2
Gold Standart	8/8	8/8	8/8	8/8

Quadro 5.4 – Resultados obtidos pelo método de extração de DNA da sílica, segundo o número de amostras analisadas, a região MPS, e a temperatura da queima.

O quadro 5.5 ilustra os resultados obtidos as amostras submetidas ao calor e analisadas pela região MPS, nas diferentes metodologias, condições e etapas.

Apesar de não ter sido o objetivo deste trabalho, ao analisar-se o seqüenciamento do mtDNA, observaram-se alguns polimorfismos pontuais descritos nos quadros 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9. Os polimorfismos encontrados nos dentes submetidos à queima puderam ser observados também no *gold standart*.

M	T	1º.Gel	2º.Gel	3A	1º.Gel	2º.Gel	3B	1º.Gel	2º.Gel	4A	1º.Gel	2º.Gel	4B
A	200°C	+	+	+	+	↓ int.	-	+	+	+	+	+	+
	200°C	+	+	+	+	↓ int.	-	+	+	+	+	+	+
	400°C	+	-	-	+	↓ int.	-	+	+	+	+	+	+
	400°C	+	+	+	+	↓ int.	-	+	+	+	+	+	SA
	500°C	NA	-	-	NA	-	-	+	+	+	+	+	SA
	500°C	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-	+	↓ int.	-
	600°C	NA	-	-	+	↓ int.	-	+	+	+	+	↓ int.	-
	600°C	+	-	-	NA	-	-	+	↓ int.	-	+	↓ int.	-
B	200°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	200°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	SA
	400°C	+	+	+	+	+	+	+	↓ int.	-	+	+	SA
	400°C	+	+	+	+	+	+	NA	-	-	+	+	+
	500°C	+	+	+	+	+	+	+	↓ int.	-	+	↓ int.	-
	500°C	+	+	SA	+	+	+	+	↓ int.	-	+	-	-
	600°C	+	-	-	+	+	+	+	↓ int.	-	+	↓ int.	-
	600°C	+	-	-	+	+	+	+	↓ int.	-	+	+	+
C	200°C	+	-	-	+	-	-	+	↓ int.	-	+	+	SA
	200°C	+	-	-	+	↓ int.	-	NA	-	-	+	+	SA
	400°C	+	-	-	+	↓ int.	-	+	↓ int.	-	+	+	+
	400°C	+	-	-	+	↓ int.	-	+	↓ int.	-	NA	-	-
	500°C	NA	-	-	+	↓ int.	-	+	-	-	NA	-	-
	500°C	NA	-	-	+	↓ int.	-	+	+	+	+	+	SA
	600°C	NA	-	-	+	↓ int.	-	+	-	-	+	+	SA
	600°C	+	-	-	+	↓ int.	-	+	↓ int.	-	+	+	SA

Quadro 5.5 – Resumo das amostras submetidas ao calor e analisadas pela região MPS

M - metodologia de extração de DNA; T - temperatura utilizada; A - DNA extraído pelo método orgânico; B - DNA extraído pelo método álcool isopropílico/acetato de amônia; C - DNA extraído pelo método sílica; (+) - resultado positivo; NA - amostra não amplificada na PCR; ↓ int - baixa intensidade de banda no gel de agarose 2%, após a purificação; (-) - etapa não realizada por comprometimento na etapa anterior; SA - amostra que foi realizada o seqüenciamento, porém o mesmo não foi possível de ser analisado.

	CRS	Polimorfismo	Tipo	Método	Temp.
Indivíduo 2	73	A/G	Transição	1 e 2	200°C
Indivíduo 4	73	A/G	Transição	1 e 2	400°C

Quadro 5.6 – Polimorfismo pontual para a região 3A

Método1 - orgânico; Método 2 - álcool isopropílico/acetato de amônia

	CRS	Polimorfismo	Tipo	Método	Temp.
Indivíduo 1	187	G/T	Transversão	1	200°C
Indivíduo 2	146	T/C	Transição	1	200°C
Indivíduo 2	151	A/G	Transição	1	200°C
Indivíduo 5	168	T/A	Transversão	1	500°C
Indivíduo7	151	A/G	Transição	1	600°C

Quadro 5.7– Polimorfismo pontual para a região 3B

Método1 - álcool isopropílico/acetato de amônia

	CRS	Polimorfismo	Tipo	Método	Temp.
Indivíduo 1	187	G/T	Transversão	1 e 2	200 <sup>o</sup> C
Indivíduo 1	263	A/G	Transição	1 e 2	200 <sup>o</sup> C
Indivíduo 2	235	A/G	Transição	1 e 2	200 <sup>o</sup> C
Indivíduo 2	263	A/G	Transição	1 e 2	200 <sup>o</sup> C
Indivíduo 3	263	A/G	Transição	1	400 <sup>o</sup> C
Indivíduo 4	263	A/G	Transição	1	400 <sup>o</sup> C
Indivíduo 5	263	A/G	Transição	1	500 <sup>o</sup> C
Indivíduo 6	263	A/G	Transição	1	500 <sup>o</sup> C
Indivíduo 7	235	A/G	Transição	1	600 <sup>o</sup> C
Indivíduo7	263	A/G	Transição	1	600 <sup>o</sup> C

Quadro 5.8 – Polimorfismo pontual para a região 4A Método1 - orgânico; Método 2 - álcool isopropílico/acetato de amônia

	CRS	Polimorfismo	Tipo	Método	Temp.
Indivíduo 1	263	A/G	Transição	1	200 <sup>o</sup> C
Indivíduo 2	263	A/G	Transição	1	200 <sup>o</sup> C
Indivíduo 3	263	A/G	Transição	1 e 3	400 <sup>o</sup> C
Indivíduo 4	263	A/G	Transição	2	400 <sup>o</sup> C
Indivíduo 8	263	A/G	Transição	2	600 <sup>o</sup> C

Quadro 5.9 – Polimorfismo pontual para a região 4B  
Método1 - orgânico; Método 2 - álcool isopropílico/acetato de amônia; Método 3 - sílica

## 6 DISCUSSÃO

Em um estudo realizado observando as alterações ocorridas durante a carbonização de 15 corpos em temperaturas variando de 670 a 810°C Bohnert, Rost e Pollak (1998), verificaram que, após 60 minutos os elementos dentais permaneceram intactos. Esse estudo, porém, foi realizado sob condições controladas de temperatura, onde os corpos foram expostos ao fogo de forma uniforme. Isto não ocorre nos acidentes com o fogo, onde esta exposição nem sempre é contínua, existindo variações de temperatura de acordo com a presença, ou não, de materiais combustíveis e do seu tipo. Levamos em consideração essas variáveis nas diferentes temperaturas de queima do elemento dental utilizadas.

Em casos de acidentes, o elemento dental está sob proteção de tecido epitelial, conjuntivo, muscular e ósseo, antes de ser atingido, bem como da proteção que o esmalte, dentina e cemento conferem às células e tecidos (MELANI, 1999), resguardando então, o conteúdo genético do indivíduo. Acentuamos que em nosso trabalho, o elemento dental foi exposto diretamente ao calor, sem a proteção dos demais tecidos, e obtivemos resultados favoráveis que indicaram não somente a possibilidade de análise do DNA, como o método de extração mais adequado, para casos de carbonização.

Desconsiderando a população edêntula, existe cerca de 28 a 32 elementos dentais na cavidade bucal, ampliando o número de exemplares que têm o DNA potencialmente analisável.



Em 1996, em Tóquio – Japão foi encontrado um corpo carbonizado, sem cabeça, num parque da cidade, quatro meses depois, uma cabeça, também carbonizada, foi encontrada próxima ao local onde o corpo havia sido encontrado. Em virtude do estado em que a cabeça se encontrava, carbonizada e em avançado estado de decomposição, procedeu-se à identificação da mesma através da análise do seqüenciamento do mtDNA (YAMADA et al., 1997). Nesses casos, a utilização do mtDNA é preferível em relação ao DNA genômico, por estar presente em maior número de cópias resistindo, dessa forma, às adversidades do meio no qual a amostra está exposta. Em nosso estudo, utilizamos as regiões MPS que, em conjunto, compõem a região HV2 do mtDNA, e também um STR (genômico), o F13A01.

O objetivo de analisar os MPSs da região HV2 é devido ao tamanho pequeno (em pares de bases) das regiões, ou seja, se utilizássemos a região HV2 com um único iniciador teríamos que amplificar uma grande região de uma vez só, o que poderia ser mais um fator limitante no processo de amplificação, já que o DNA pode estar fragmentado pelas condições sofridas.

A escolha de um iniciador genômico, deve-se ao fato do mesmo possuir poder discriminatório superior ao mtDNA, em virtude do mesmo possuir alelos de origem materna e paterna, o que não ocorre com o mtDNA que possui alelos apenas de origem materna. Dessa forma neste trabalho, testamos um iniciador com maior poder discriminatório, porém com limitações quanto às adversidades do meio ambiente, e quanto ao menor número de cópias; assim como também testamos os menores iniciadores atualmente descritos na literatura para fins de identificação humana.

Neste aspecto, um estudo realizado em 2002 (TSUCHIMOCHI et al., 2002), focando o potencial de análise do DNA de dentes submetidos ao calor, utilizou amplificação por PCR com iniciadores STRs de diferentes tamanhos (DYZ3, DYS19, SYS389, DYS390 e DYS393), e o método Chelex 100 para extração do DNA. Todas as amostras que foram submetidas a 300°C durante 2 minutos puderam ser analisadas, com exceção de algumas amostras que utilizaram o iniciador DYS389, que era o que tinha maior tamanho entre eles. Isto indica a relevância que o tamanho do STR, assim como a integridade da amostra contribuem para determinar o sucesso da análise. Ainda no mesmo estudo, os autores não conseguiram amplificar as STRs supracitadas quando os dentes foram submetidos a 300°C, 400°C e 500°C, durante 2 minutos. Nossos resultados mostram a possibilidade de análise do STR pelo PAGE em quatro amostras que tiveram seu DNA extraído pelo método orgânico, sendo duas amostras a 200°C e duas a 400°C num tempo de 60 minutos. Obtivemos, ainda, a análise deste STR pelo PAGE em duas amostras que tiveram seu DNA extraído pelo método isopropanol/acetato de amônia, cujo dente foi submetido a 200°C durante 60 minutos, e ainda através do mesmo método de extração, analisamos outra amostra submetida a 500°C também durante 60 minutos.

Em linhas gerais o presente estudo demonstra a possibilidade de extração e amplificação do DNA a partir de dentes submetidos a temperaturas elevadas, e por um tempo prolongado; uma vez que nossos resultados mostram sucesso na análise de DNA extraído pelo método isopropanol/acetato de amônia em três amostras submetidas a 500°C (com iniciador MPS), uma amostra também submetida a 500°C (com iniciador F13A01) e três amostras

submetidas a 600°C (iniciador MPS). Pelo método da sílica também conseguimos analisar uma amostra submetida a 400°C e outra a 500°C (iniciador MPS), apesar de este método ter apresentado recuperação inferior de DNA quando comparada aos outros métodos utilizados.

Aparentemente, pode-se pensar em discrepância de resultados, uma vez que, por exemplo, analisamos através do método de extração da sílica, uma amostra submetida à queima a 400°C e outra a 500°C, porém através desse método, nenhuma amostra pôde ser analisada a 200°C. O mesmo ocorrendo para análise do SRT F13A01, utilizando o método de extração isopropanol/acetato de amônia, onde pudemos analisar duas amostras a 200°C, e uma amostra a 500°C, porém nenhuma a 400°C. Acreditamos, porém, que essa aparente discrepância deve-se ao fato de analisarmos apenas dois elementos dentais para cada temperatura de queima testada, possibilitando apenas indicadores estatísticos, e não estatísticas elaboradas. Essa limitação de amostras testadas para cada temperatura, deu-se pelo fato do custo que envolve as análises de DNA, onde nesta pesquisa não foi possível ampliarmos o número de amostras testadas para cada grau de queima. Apesar desta limitação econômica, temos indicadores que é possível a recuperação e análise de amostras de dentes submetidos à queima em temperaturas elevadas.

Em um estudo utilizando a amplificação da amelogenina (URBANI et al., 1999), os autores identificaram 100% das amostras dentais submetidas a 100°C durante 15 minutos, que tiveram o DNA extraído pelo método orgânico. Pelo mesmo método de extração em temperatura de 300°C durante 30 minutos, os mesmos autores chegaram a um percentual de análise de 14.3%. Nosso estudo mostra resultados superiores, pois foi possível analisar 100%

das amostras submetidas a 200°C e 400°C, utilizando o método orgânico para extração de DNA com o iniciador STR F13A01.

Os iniciadores MPS que utilizamos amplificaram segmentos de DNA variando entre 126 e 158pb, não muito diferente dos iniciadores do estudo anterior (amelogenina) que tinham 106pb para o cromossomo X e 112pb para o cromossomo Y. A diferença de resultados, pode ser devida ao fato dos MPSs serem iniciadores de mtDNA, o qual encontra-se em maior quantidade na célula, do que seqüências de DNA genômico, como a amelogenina. Ressalta-se, porém, que o método de extração contribui significativamente para os resultados; visto que nossos resultados tanto para o DNA genômico quanto para o mtDNA com o método orgânico a 500°C e a 600°C foram 100% negativos.

Enfatizamos que através do método isopropanol/acetato de amônia, foi possível a análise de amostras em todas as temperaturas testadas (200°C, 400°C, 500°C e 600°C) durante 60 minutos, utilizando os iniciadores MPS; conferindo um perfil estatístico de 100% de sucesso para este método de extração.

Os achados de polimorfismos (apresentados nos quadros 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9 do capítulo Resultados) somente vêm reforçar a possibilidade e o poder discriminatório das análises de seqüenciamento nos processos de identificação humana, pois, a partir da coincidência do polimorfismo na amostra referência (*gold standart*) e na amostra submetida ao calor, independentemente do método de extração utilizado, podemos inferir que em casos reais também podemos relacionar evidências biológicas – dentes submetidos à

carbonização – a aparentados vivos e assim procedem a identificação individual.

## 7 CONCLUSÕES

Sendo o elemento dental por sua estrutura anatômica altamente mineralizada capaz de resistir a temperaturas elevadas, protegendo o tecido orgânico que nele encerra; avaliamos o mesmo com possibilidade de emprego em casos reais de carbonização humana.

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, parece lícito concluir que, mesmo o elemento dental sendo submetido a altas temperaturas (500°C e 600°C) e pelo período de 60 minutos, é possível proceder-se à identificação humana através da análise do DNA.

O método orgânico mostrou-se adequado para amostras submetidas à queima em temperaturas mais baixas, porém através deste método não pudemos analisar nenhuma amostra submetida nas temperaturas de 500°C e 600°C.

O método de extração isopropanol/acetato de amônia conferiu melhores resultados, do que os outros métodos testados, para amostras submetidas tanto em temperaturas mais baixas como temperaturas mais altas.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.

Almeida Jr A, Costa Jr JBO. *Lições de medicina legal*. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 1998.

Alves SE. *Medicina legal e deontologia*. Curitiba: Edição do autor; 1965.

Amoedo O. Study of the teeth after death from a medicolegal standpoint. *Dent Dig* 1993;9:604-8.

Beckman JS, Weber JL. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 1992;12:627-31.

Bohnert M, Rost T, Pollak S. The degree of destruction of human bodies in relation to the duration of the fire. *Forensic Sci Int* 1998;95:11-21.

Boles TC, Snow CC, Stover E. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *J Forensic Sci* 1995;40(3):349-55.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28(3):495-503.

Brasil. Lei 5081 de 24 de agosto de 1966. Regulamenta o exercício da Odontologia no Brasil. Brasília: Diário Oficial da União, 1966.

Cameron JM, Sims BG. *Forensic Dentistry*. London: Churchill Livingstone, 1973.

Conselho Federal de Odontologia. Resolução CFO 22/2001. Define as especialidades odontológicas. Brasília: Diário Oficial da União, 2001.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Corach D. Additional approaches to DNA typing of skeletal remains: the search for "missing" persons killed during the last dictatorship. *Electrophoresis* 1997;18:1608-12.

Dange AH, Malvankar AG, Madiwale MS. Determination of sex origin of teeth. *Arch Kriminol* 1978;162:115-9.

Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D. Detection of 400 year old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:12637-40.

Farah SB. *DNA segredos e mistérios*. São Paulo: Sarvier; 2000.

França GV. *Medicina legal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Gabriel MN, Huffine EF, Ryan JH, Holland MM, Parsons TJ. Improved mtDNA sequence analysis of forensic remains using a "Mini-Primer- Set" amplification strategy. *J Forensic Sci* 2001;46(2):247-53.

Gardner EJ. *Genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1986.

Gaytmenn R, Sweet D. Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *J Forensic Sci* 2003;48(3):622-5.

Ginther C, Issel-Tarver L, King MC. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat Genet* 1992;2(2):135-8.

Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. *Genética moderna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Haerting A, Crainic K, Durigon M. Identification medico-legale par le système dentaire. *Press Med* 1985;14(9):543-45.

Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification application. *Am J Human Genet* 1994;55:175-89.



Hanaoka Y, Inoue M, Tsai TH, Minaguchi K. Fundamental and practical study for DNA analysis using tooth as a source of DNA. *Jpn J Legal Med* 1995;49(1):1-10.

Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Comey CT, Dihofer R. Using multiplex PCR amplification and typing kits for the analysis of DNA evidence in a serial killer case. *J Forensic Sci* 1991;36(6):1649-61.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellites' regions in human DNA. *Nature* 1985;314:67-73.

Jeffreys AJ, Brookfield JFY, Semeor FR. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 1985;31:818-9.

Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A. Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci Int* 1992;56:65-76.

Jobin LF, Jobin Mr, Brenner C. Identificação humana pelo DNA. In: Galante Filho H, Figini AL, Reis AB, Jobin LF, Silva M. *Identificação Humana*. Poro Alegre: Sagra Luzzatto; 1999.

Lincoln PJ, Thomson J. *Forensic DNA profiling protocols*. Totowa: Humana Press; 1998.

Melani RFH. *Identificação humana em vítimas de carbonização: análise odonto-legal através da microscopia eletrônica [Tese de Doutorado]*. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 1999.

Melton T. *Mitotyping technologies* 2000. Disponível em URL: <http://www.mitotyping.com/> [Oct 25 2004].

Ministério dos transportes. *Estatísticas da Polícia Rodoviária Federal*. <http://www.transportes.gov.br/Pare/D.Estat2003.htm>

Moura Neto RS. *Análise forense*. *Rev Panorama Justiça* 1998;9:38.

Möller KE, Brinckmann B. PCR-VNTRs in forensic science. *Cell Mol Biol* 1995, 41(5):715-24.

Mullis KB, Faloona F. Specific syntesis of DNA in vitro via a polymerse-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.

Pena SDJ. Breve introdução ás impressões digitais de DNA. *Rev Bras Genet* 1993;16(3):856-7.

Potsch L, Meyer U, Rothschild S, Schneider PM, Rittner C. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *Int J Legal Med* 1992;105(3):139-43.

Rivero ERC, Valenzuela MGS, Souza SCOM, Nunes FD. Método de extração de DNA de material arqueológico pelo acetato de amônio e pelo isopropanol. *Pesq Odont Bras* 2002;16(supl):210.

Sada JM, Arroyo G. Identification through odontologic study. *Trib Med* 1985;11:1-6.

Saiki R, Gelfond DH, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed enzymatic amplification of DNA with termostable DNA polimerase. *Science* 1988;239:487-91.

Sambrook J, Russel D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3.ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

São Paulo. Secretaria de Segurança Pública. Resolução SSP-SP 194, de 02 de junho de 1999. *Diário Oficial do Estado* 1999 seção 1:104.

Schwartz TR, Schwartz EZ, Mieszerski L, McNally L, Kobilinsky L. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various enviromental conditions. *J Forensic Sci* 1991;36(4):979-90.

Silva LAF, Passos NS. *DNA forense*. Alagoas: UFAL; 2002.

Silva M. *Compêndio de odontologia legal*. Rio de Janeiro: Medsi; 1997.

Sivagami AV, Rao AR, Varshney UA. A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in na Indian population. *Forensic Sci Int* 2000;110:107-15.

Slavkin HC. Sex, enamel and forensic dentistry: a search for identify. J Am Dental Assoc 1997;128(7):1021-5.

Smith BC, Holland MM, Swett, DL, Dizinno JA. DNA and the forensic odontology In: Bowers CM, Bell GL. Manual of forensic odontology. Ontario: Manticore Publisher; 1997.

Strachan T, Read AP. Genética molecular humana. Porto Alegre: Artmed; 2002.

Sweet D, Hildebrand D. Recovery of DNA from human by cryogenic grindind. J Forensic Sci 1998;43(6):167-77.

Sweet D, Hildebrand D, Phillips DRT. Identification of a skeleton using DNA from teeth and PAP smear. J Forensic Sci 1999;44(3):630-33.

Swett D, Swett CHW. DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains oh homicide victim to crime scene. J Forensic Sci 1995;40(2):310-4.

Tsuchimochi T, Iwasa M, Maeno Y, Koyama H, Inoue H, Isobe I, et al. Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats. Am J Forensic Med Pathol 2002;23(3):268-71.

Urbani C, Dubreuil A, Lastrucci R, Kramer B. The effect of temperature on sex determination using DNA-PCR analysis of dental pulp. J Forensic Odontostomatol 1999;17(2):35-9.

Vogel F, Motulsky AG. Genética humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Walker MR, Rapley R. Guia de rotas na tecnologia do gene. São Paulo: Atheneu;1999.

Weeden VW, Swarner SL. Exames forenses de identidade por análises de DNA. In: Hery JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. São Paulo: Manola;1999.

Whittaker DK, Llewelyn DR, Jones RW. Sex determination from necrotic pulpal tissue. *Br Dent J* 1975;139:403-5.

Yamada Y, Ohira H, Iwase H, Takatori T, Nagao M, Ohtani S. Sequencing mitochondrial DNA from a tooth and application to forensic odontology. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology* 1997;15(1):13-6.

Yokoi T, Aoki Y, Sagisaka K. Human identification and sex determination of dental pulp, bone marrow and blood stains with a recombinant DNA probe. *Z. Rechtsmed* 1989;102:323-30.

ANEXO A – Parecer e registro no CONEP, registro do CEP

ANEXO B - Protocolo de extração de DNA através do método orgânico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001)

- Primeiro dia

1. Colocar 0,25g do dente em um eppendorf esterilizado;
2. Adicionar 700µL de tampão (TRIS pH 8,0; 10mM EDTA; 0,1 M NaCl e 2 % SDS);
3. Adicionar 35µL de Proeinase K (20mg/mL);
4. Incubar *overnigth* a 56°C.

- Segundo dia

1. Inativar a proteinase K por 10 min. a 95°C;
2. Acrescentar 700µL de fenol tamponado pH 8,0;
3. Deixar homogeneizar por 5 min.;
4. Centrifugar 3000 rpm por 30 min.;
5. Transferir o sobrenadante para outro eppendorf;
6. Acrescentar fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) na mesma quantidade do sobrenadante removido;
7. Centrifugar 3000 rpm por 3 min.;
8. Transferir o sobrenadante para outro eppendorf;
9. Acrescentar álcool 100% e acetato de sódio (álcool 100%: 2 a 3 vezes a mais que o sobrenadante – em torno de 800µL; e acetato de sódio: 1/10 do sobrenadante – em torno de 60µL);
10. Incubar *overnight* a -20°C.

- Terceiro dia

1. Centrifugar 15000 rpm por 10 min.;

2. Remover o álcool cuidadosamente;
3. Colocar 1mL de álcool 70%;
4. Centrifugar 15000 rpm por 10 min.;
5. Remover o álcool cuidadosamente;
6. Secar o corpo precipitado deixando-o em forno aquecido previamente a 56°C por aproximadamente 30 min., até secar bem;
7. Ressuspender com 20µL de TE;
8. Deixar 10 min. em banho-maria a 65°C.

ANEXO C - Protocolo de extração de DNA através do método isopropanol/acetato de amônia (RIVERO et al., 2002)

1. Transferir 0,25g do dente para um tubo eppendorf esterilizado;
2. Centrifugar 1000 rpm por 5 min.;
3. Desprezar o sobrenadante e lavar o corpo de fundo com 1000 $\mu$ L PBS 1X, centrifugando-se então em 2000 rpm por 5 min, e desprezar o sobrenadante;
4. Lavar o corpo de fundo com 1000 $\mu$ L de PBS 1X, centrifugando novamente em 2000 rpm por 5 min., e desprezar novamente o sobrenadante;
5. Submeter o corpo de fundo a digestão enzimática com proteinase K: adicionar ao corpo de fundo 200 a 400 $\mu$ L de tampão de lise estéril (NaCl 1M; TRIS-HCl 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M, pH 8,0; SDS 10%) e proteinase K na concentração final de 500 $\mu$ g/mL. Os tubos serão mantidos a 55°C em banho-maria por três a cinco dias até a completa dissolução do corpo de fundo do tecido. Será adicionada proteinase K (10 a 30 $\mu$ L na concentração de 250 $\mu$ g/mL) em intervalos de 24 horas, e os tubos serão invertidos pelo menos uma vez ao dia;
6. Após a completa dissolução do material (a solução no tubo eppendorf estará praticamente transparente) procede-se a inativação da proteinase K, incubando-se os tubos a 95°C durante 10 min., no banho seco ou banho-maria.



7. Para a extração de DNA, adiciona-se 200 $\mu$ L de acetato de amônia 4M no tubo contendo o lisado, para precipitação da proteína. O tubo será homogeneizado por 20 segundos vigorosamente, incubado em gelo durante 5 min., e centrifugado a 13000 g durante 3 minutos. A proteína precipitada será observada como um corpo de fundo no tubo. O sobrenadante, contendo o DNA será transferido para outro tubo eppendorf.

8. Para a precipitação do DNA adiciona-se 600 $\mu$ L de isopropanol 100%, que homogeneizado, será centrifugado a 16000 g durante 5 minutos, O sobrenadante será então desprezado e o corpo de fundo de DNA obtido será lavado com etanol 70% a temperatura ambiente e o corpo de fundo de DNA será dissolvido em 30 a 50 $\mu$ L de tampão de diluição TE (TRIS-HCl 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, pH 8,0) e mantido a 4°C.

ANEXO D - Protocolo de extração de DNA através do método as sílica (BOOM et al., 1990)

PARTE I – PREPARO DOS COMPONENTES DA SÍLICA

- Sílica Fracionada
  - Juntar 12g de sílica a 100mL de água estéril, agitando bem e deixar secar por 24 horas.
  - Remover 6mL do sobrenadante e adicionar água estéril até completar 100mL, agitando bem para ressuspender a sílica, deixar secar novamente durante 5 horas.
  - Remover 88mL do sobrenadante. Na solução remanescente acrescentar 120 $\mu$ L de HCl (32% peso/vol).
  - Pipetar a sílica e tubos eppendorf armazenandos em ambiente escuro a temperatura de 4°C. Nestas condições a vida útil é de cerca de 3 meses.
  
- Preparo dos componentes a partir da sílica
  - L2 - Adicionar 20mL de TRIS 0,1M, pH 6,04 a 24g de tiocianato de guanidina, aquecer para facilitar a dissolução (60 a 65°C). Adicionar 1,5mL de sílica fracionada. Antes do uso, agitar bem para homogeneizar os componentes.

Armazenado em temperatura ambiente e ao abrigo da luz sua estabilidade é de pelo menos 3 semanas.

- L6 - Adicionar 20mL de TRIS 0,1M, pH 6,0 a 24g de tiocianato de guanidina, aquecer para facilitar a dissolução (60 a 65°C). Adicionar 4,4mL de EDTA 0,2M pH 8,0. Adicionar 0,5mL de Triton X-100, por último acrescentar 1,5mL de sílica fracionada. Antes do uso agitar bem para homogeneizar os componentes. Armazenado em temperatura ambiente e ao abrigo da luz sua estabilidade é de pelo menos 3 semanas.

## PARTE II – EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO DA SÍLICA

1. Com 0,25g de dente pulverizado adicionar 820µL de tampão L6 homogeneizando a solução, e incubar a 62°C. A cada 15 min. realizar novas homogeneizações até completar 2 horas;
2. Centrifugar a 3000 rpm por 1 min.;
3. Retirar 500µL de sobrenadante, transferindo-o para outro tubo;
4. Adicionar 500µL de L e 40µL de sílica fracionada homogeneizando bem;
5. Deixar por 15 min. em repouso;
6. Centrifugar 2000 rpm por 30 seg;

7. Remover o sobrenadante e lavar o corpo de fundo com: L2, etanol 70% (duas vezes) e acetona. Para cada lavagem adiciona-se 1mL de cada solução, homogeneizando e centrifugando a 10000 rpm por 10 seg. Descarta-se todo o líquido a cada passo;
8. Após a última lavagem com acetona, deixar o tubo aberto para secagem do corpo de fundo (56°C/10 min.);
9. Centrifugar 10000 rpm por 1 min. transferindo o sobrenadante para novo tubo.