



## COMPARAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE FONTES ESCASSAS VISANDO A AMPLIFICAÇÃO PELA TÉCNICA DE PCR

**Adam Arai Martens<sup>1</sup>; Heloisa Filus Galbiati<sup>2</sup>; Adriana Fiorini<sup>3</sup>**

**RESUMO:** As exigências do mundo atual quanto a identificação de pessoas por DNA, entre outras aplicações, demandam do profissional um conhecimento minucioso a respeito desta molécula e seus métodos de obtenção. Porém, devido à escassez deste material em determinadas situações, é importante dar ênfase às fontes consideradas escassas, obtidas em casos forenses ou desastres em massa, visto que a utilização de protocolos eficientes de extração de DNA nestes casos é imprescindível para uma correta análise. Apesar da existência de kits para tais reações, a escolha e aplicação de um método acessível no preço e na praticidade é essencial. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência dos métodos de extração: proteinase K seguida de purificação com fenol e clorofórmio, sem fenol e clorofórmio; lise alcalina e fervura em água estéril em amostras de bulbos capilares, *swab* bucal e sangue em papel filtro, bem como a qualidade da amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foi possível verificar que o método de extração com proteinase K seguido de purificação com fenol e clorofórmio foi o mais eficiente para a obtenção de DNA de qualidade para amplificação do *locus* de VNTR D1S80. A utilização da PCR *hot-start* forneceu melhores resultados de amplificação, contribuindo para a diminuição da formação de dímeros de *primers*. A possibilidade de fatores que pudessem interferir na PCR também é discutida. Com os resultados obtidos será possível a padronização de métodos eficientes e baratos no que se refere a essas fontes escassas para fins didáticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Extração de DNA; fontes escassas; reação em cadeia da polimerase.

### 1 INTRODUÇÃO

A individualidade biológica pode ser estabelecida pela identificação genética que se fundamenta na exclusividade do seu DNA e na igualdade deste em todas as células do organismo. O DNA é único para cada indivíduo e pode ser identificado em qualquer vestígio biológico. Qualquer tipo de amostra ou produto que contenha material genético pode ser utilizado para a análise por DNA, pois é encontrado em todas as células nucleadas (PINHEIRO, 2003-2004).

Evidências biológicas como manchas de sangue, sêmen, cabelos, entre outros, são frequentemente encontradas em cenas de crime (Crime Scene...). O DNA pode ser extraído dessas evidências, estudado e analisado por técnicas moleculares, possibilitando desta forma a identificação do indivíduo doador destas evidências. No entanto, o teste de DNA pode não apenas provar a culpabilidade criminal de uma pessoa ou inocentá-la, mas pode estabelecer uma conexão precisa entre este indivíduo e a cena do crime. Atualmente, processos judiciais em todo o mundo já utilizam resultados obtidos a partir da determinação de identidade genética pelo DNA (LYNCH, 2003; WALSH, 2004).

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. Programa de Iniciação Científica do Cesumar (PICC). [adam.arai@gmail.com](mailto:adam.arai@gmail.com)

<sup>2</sup> Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. [helo\\_galbiati@hotmail.com](mailto:helo_galbiati@hotmail.com)

<sup>3</sup> Orientadora e Docente do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. [fiorini@cesumar.br](mailto:fiorini@cesumar.br)

Dentre as diversas fontes biológicas existentes para se realizar uma extração de DNA, é importante considerar as fontes escassas. É imprescindível a utilização de protocolos eficientes para a correta extração, amplificação e visualização do DNA destas fontes. Barea, Pardini e Gushiken (2004) relatam que dentre as fontes escassas consideram-se: sangue, ossos, fios de cabelo, resquícios de esperma; bem como de saliva, restos celulares em escovas de dente ou sob unhas, assim como tecidos de cadáveres em decomposição, escarro e diversos outros fluidos corpóreos que possam ser congelados e estocados, ou encontrados em diferentes situações.

Para a extração do DNA destas fontes escassas existem hoje inúmeros métodos orgânicos e não orgânicos que podem ser utilizados em diferentes espécimes biológicos. Dentre estas metodologias, podemos citar a digestão por Proteinase K com e sem fenol e clorofórmio, o método de fervura em água estéril, extração pela resina Chelex®, lise alcalina, dentre outros (BAREA et al., 2004).

O desenvolvimento da biologia molecular e da genética possibilitou o conhecimento de um amplo espectro de técnicas aplicadas na investigação biológica que tiveram profunda influência nas pesquisas médicas. Entre esses grandes avanços tecnológicos destaca-se a possibilidade de amplificação de DNA utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A PCR possibilita a síntese de fragmentos de DNA *in vitro* utilizando a enzima DNA-polimerase. Esta sintetiza uma seqüência complementar de DNA a partir de um iniciador denominado *primer*, desde que este já esteja ligado a uma das cadeias do DNA na região escolhida para se iniciar a síntese.

A PCR é uma técnica rápida e permite a amplificação de regiões do genoma a partir de pequenas quantidades de DNA, mesmo que degradado. Assim, a PCR torna-se um método de escolha para a amplificação de DNA de materiais de arquivos e de fontes escassas (BAREA et al., 2004).

Tendo em vista os conhecimentos abordados, este trabalho tem como intuito a comparação de protocolos alternativos no que diz respeito à extração de DNA de fontes escassas, já que existe uma grande necessidade de se identificar métodos simples, baratos e eficazes para posterior utilização em diversos setores da Biologia Molecular.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados neste trabalho cinco fios de cabelo com bulbo capilar, gotas de sangue em papel filtro e *swab* bucal, coletados de quatro indivíduos mediante consentimento livre e esclarecido. Os experimentos de coleta, extração de DNA e análise dos resultados foram realizados no laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário de Maringá – Cesumar.

Foram aplicados quatro métodos de extração de DNA das fontes escassas citadas acima, sendo eles: Digestão por Proteinase k com fenol/clorofórmio; Digestão por Proteinase k sem fenol/clorofórmio; fervura em água estéril e lise alcalina, com principal objetivo a padronização de métodos eficientes e baratos no que se refere às fontes escassas. Inicialmente foram preparados os reagentes utilizados neste procedimento, assim como a correção de cálculos devido às diferenças existentes entre os protocolos a serem seguidos e as concentrações em que se encontravam os produtos no laboratório.

Para se verificar a eficiência dos métodos na extração do DNA das fontes biológicas utilizadas no trabalho, uma região altamente polimórfica do DNA, o *locus* D1S80 de VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) foi amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguindo o capítulo 1 da apostila de A. Malcolm Campbell et al., (*Use PCR and a Single Hair to Produce a "DNA Fingerprint"*). A. Malcolm Campbell,

John H. Williamson, and Diane Padula), utilizando uma reação de PCR modificada, chamada PCR *hot-start*, que diminui a formação de dímeros de primers.

Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com 0,1mg/ml de brometo de etídeo (EtBr).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As reações de amplificação para o *locus* D1S80 das amostras biológicas testadas (*swab* bucal, bulbo capilar e sangue em papel filtro) apresentaram diferentes resultados de acordo com o protocolo de extração aplicado e as condições operacionais.

Inicialmente as amostras de DNA foram amplificadas pelo método convencional da PCR, sem qualquer otimização, seguindo as recomendações dos protocolos utilizados neste trabalho. Realizou-se inicialmente um teste piloto para três amostras (1, 3 e 5 bulbos capilares) obtidas de um indivíduo. A amplificação foi positiva apenas para 3 e 5 bulbos.

Procedeu-se então as extrações de DNA de outras amostras e na seqüência as amplificações foram realizadas em uma única vez. Devido ao número de amostras, treze no total, ocorreu a formação de dímeros de *primers*, já que o tempo prolongado de manipulação proporcionou a ação prévia da Taq polimerase antes mesmo do início da reação no termociclador. Esta formação é comum para o *locus* D1S80, devido sua alta complementaridade de alguns nucleotídeos dos pares de *primers*, permitindo a amplificação das extremidades 3' dos dímeros pela DNA polimerase (CAMPBELL; WILLIAMSON e PADULA, 1997).

Para a eliminação destas formações, podem ser aplicadas condições estridentes como o uso da PCR *hot-start* (D'AQUILA et al., 1991) que consiste em uma modificação da PCR, em que se adiciona a enzima Taq polimerase na fase de desnaturação do ciclo da PCR, ou a utilização desta enzima complexada a anticorpos (ex: Taq Platinum® Invitrogen) (High Specificity...), que são dissociados da enzima somente na etapa da desnaturação em uma reação da PCR. Dessa forma a realização da PCR *hot-start* foi o fator decisivo no sucesso da amplificação.

Para amostras de *swab* bucal, três das quatro amostras testadas foram positivas. Já para amostras de sangue, observou-se positividade em 3 das 4 amostras testadas, embora a reação não tenha gerado uma quantidade suficiente de *amplicons* comparando com as amostras de *swab* e bulbo capilar. Este resultado pode ser explicado pelo fato do sangue possuir íons  $Fe^{++}$  que são considerados competidores dos íons  $Mg^{++}$  necessários como cofatores da DNA polimerase (BAREA et al., 2004) que são resistentes à ação da Proteinase K.

Para bulbos capilares observou-se positividade para todas as amostras, sendo uma com maior amplificação e pouca amplificação para os demais indivíduos testados.

Estes resultados confirmam a eficiência da PCR *hot-start* em inibir a formação de dímeros de *primers*, que pode ocorrer durante a preparação do mix de reação, pois foi possível concluir que a adição da Taq polimerase no tempo anterior ao primeiro ciclo de PCR (5 minutos a 94° C) é fundamental para evitar a formação destes dímeros.

Em geral, a positividade de amostras de *swab* bucal se deva a uma maior quantidade de células presentes nestas amostras. A quantidade de células obtidas durante a coleta por *swab* bucal depende do tempo que o indivíduo leva para a coleta.

Em relação aos bulbos capilares, as variações nos resultados de amplificação entre os quatro indivíduos analisados podem ser explicadas pelas diferenças nos tamanhos dos bulbos capilares dos indivíduos, o que foi visualmente observado. Um dos inibidores da

PCR em fios de cabelo pode ser a melanina, proteína que dá coloração aos fios. A melanina inibe a PCR por se ligar à enzima Taq polimerase (ECKHART et al., 2000).

Bulbos capilares e células da mucosa bucal constituem ótimas fontes biológicas para análises em casos de paternidade quando o indivíduo passa por transfusão sanguínea e não pode submeter a um teste de DNA antes de 90 dias do procedimento, como encontrado em protocolos clínicos.

Para todas as amostras biológicas testadas, os métodos 3 (Fervura em água estéril) e 4 (Lise alcalina) não demonstraram resultados satisfatórios, visto que não houve amplificação para nenhuma amostra (dados não mostrados).

## 4 CONCLUSÃO

O advento da Biologia Molecular proporcionou o desenvolvimento de diversas técnicas de extração de DNA de fontes escassas, sendo os métodos alternativos uma saída para laboratórios de pequeno porte, onde a aquisição de kits alguns vezes é onerosa.

Os resultados de amplificação do *locus* D1S80 das amostras de DNA extraído de três tipos de amostras biológicas (*swab* bucal, sangue em papel filtro e bulbos capilares) foram diferentes de acordo com os protocolos testados, sendo que os métodos 1 (digestão com Proteinase K seguida de fenol e clorofórmio) e 2 (digestão com Proteinase K sem fenol e clorofórmio) obtiveram melhores resultados.

Comparando os métodos 1 e 2, foi possível concluir que a purificação com fenol e clorofórmio do DNA extraído é essencial para a remoção de interferentes da PCR, principalmente íons  $Fe^{++}$  presentes em amostras de sangue, sendo o método 1 o mais eficiente.

Em relação aos métodos 3 (lise alcalina) e 4 (fervura em água estéril) verificou-se que ambos os métodos não proporcionaram resultados satisfatórios no que se refere a extração de DNA de fontes escassas e amplificação por PCR.

Os métodos testados neste trabalho consistiram de procedimentos de fácil acesso, podendo ser utilizados para fins didáticos. Para procedimentos clínicos e de pesquisa aplicada, a utilização de kits de extração que removem inibidores da PCR como é recomendada.

## REFERÊNCIAS

BAREA, J.A.; PARDINI, M. I M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de Materiais de Arquivo e Fontes Escassas: Revisão e Apontamentos Sobre as Possíveis Aplicações. **NewsLab**, Botucatu, ed 63, p. 96-114, 2004.

BAREA, J.A.; PARDINI, M.I.M.C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Botucatu, v.26, n.4, p.274-281, 06 de dezembro. 2004.

CAMPBELL, A. M.; WILLIAMSON, J. H.; PADULA, D. Use PCR and a single hair to produce a "DNA fingerprint". In: CAMPBELL, A. M; WILLIAMSON, J. H; PADULA, D. Tested studies for laboratory teaching, v.18, p. 1–31, 1996.

Crime Scene Investigation. A Guide for Law Enforcement. Research Report. U.S. Department of Justice. Office of Justice Programs. National Institute of Justice Disponível

em <<http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2000/twgcsi.pdf>>. Acesso em 02 de Setembro de 2007.

D'AQUILA, R.T. et al. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.13, p. 3749, 1991.

ECKHART, L et al. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vienna, v.271, n.3, p.726-30, 19 de maio, 2000.

LYNCH, M. God's signature: DNA profiling, the new gold standard in forensic science. **Endeavour**, Ithaca, v.27, n.2, p.93-97, junho, 2003.

PINHEIRO, M. F. Genética e Biologia Forense, e Criminalística. In: FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO. Noções gerais sobre outras ciências forenses, 2003-2004. Disponível em: <<http://medicina.med.up.pt/legal/NocoosGeraisCF.pdf>> Acesso em: 02 de maio de 2007.

WALSH, S.J. Recent advances in forensic genetics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, Sydney, v.4, n.1, p.31-40, janeiro, 2004.