



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

***Extração de DNA de ossos humanos, sem pulverização,
para uso em identificação forense***

HÉRIKA GEOVÂNIA DE ARAÚJO CARVALHO

Recife – PE

Março/2009



HÉRIKA GEOVÂNIA DE ARAÚJO CAVALHO

***Extração de DNA de ossos humanos, sem pulverização,
para uso em identificação forense***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra B. B. Coelho, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE

Colaborador científico: Dr. Vanduir Soares de Araújo Filho, Laboratório de DNA Forense, Instituto de Polícia Científica, PB

Recife – PE

Março/2009

Carvalho, Hérika Geovânia de Araújo

Extração de DNA de ossos humanos, sem pulverização, para uso em identificação forense / Hérika Geovânia de Araújo Carvalho. – Recife: O Autor, 2009.

60 folhas: fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Ciências Biológicas, 2009.

Inclui bibliografia e anexo.

1. DNA 2. Tecido ósseo 3. Identificação forense I Título.

**577.213.3
572.86**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2009- 65**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de
HÉRIKA GEOVÂNIA DE ARAÚJO CARVALHO

***Extração de DNA de ossos humanos, sem pulverização,
para uso em identificação forense***

Área de concentração: Biotecnologia

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do
primeiro, considera a candidata

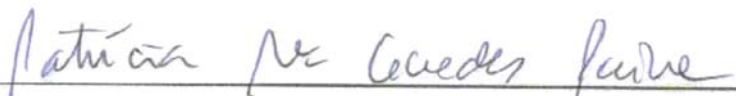
HÉRIKA GEOVÂNIA DE ARAÚJO CARVALHO como **APROVADA COM
DISTINÇÃO**

Recife, 02 de março de 2009.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra B. Barroso Coelho, UFPE



Membro interno: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia, UFPE



Membro interno: Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva, UFPE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meu amado Joelson, minha querida mãe e meu inesquecível pai.

Dedico, ainda, ao amigo Vanduir, pessoa indispensável para a concretização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio sempre presente durante toda minha vida acadêmica;

Ao meu amado Joelson, por todo amor a mim dedicado e por me fazer acreditar que sou capaz de tudo aquilo que desejo;

Ao meu amigo, colega de trabalho e orientador Vanduir S. A. Filho, por toda a paciência, ensinamentos e dedicação para comigo;

À minha orientadora Luana C. B. B. Coelho, pela oportunidade de realização deste trabalho;

À minha amiga Ana Carolina, pela amizade e por tudo que fez por mim nesses dois anos: você foi fundamental;

À Dona Lêda, Seu Vicente e Camila, por terem me acolhido maravilhosamente bem em sua residência;

Ao Diretor do Instituto de Polícia Científica da Paraíba, Antonio Albuquerque Toscano, pela confiança depositada e pela concessão do ambiente e equipamentos para possibilitar o andamento e término do trabalho;

Às minhas chefes e colegas Maria do Carmo e Carmen Lêda, pela compreensão;

Aos colegas e amigos do Laboratório de DNA Forense da Paraíba, Germana, Gisleyde, Sarah, Sérgio, Silvana e Vanessa, pela amizade e bons momentos vividos;

Aos meus amigos de todas as horas, Mary, Beto, Eusébio e Anderson, pelo ombro amigo e pela força.

“Se você procurar bem, você acaba encontrando, não a explicação (duvidosa) da vida, mas a poesia (inexplicável) da vida”. Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

O uso de tecido ósseo como substrato na obtenção de DNA para estudo de *loci* STR (*Repetições Curtas em Tandem*) é bastante útil em ciência forense, especialmente na identificação de restos mortais e de vítimas de desastres em massa. Algumas técnicas de extração de DNA de material ósseo incluem uma incubação prévia do material pulverizado em EDTA (*Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético*) como etapa de descalcificação. Nosso trabalho apresenta um protocolo de obtenção de DNA de ossos bastante eficiente, no qual é feita uma descalcificação da matriz óssea com o auxílio do quelante EDTA, não sendo necessária a pulverização da amostra por moinhos mineralógicos ou criogênicos. Nesse sentido, alíquotas de amostras de osso foram submetidas à extração de DNA pelo método orgânico tradicional com pré-tratamento de descalcificação em EDTA, seguidas por uma amplificação com um sistema *multiloci* e seqüenciadas através de eletroforese capilar. Os resultados mostraram quantidades de DNA compatíveis com a obtenção de perfis genéticos completos, com amplificação simultânea de 16 regiões (*loci*) STR. Portanto, foi visto que este novo protocolo de extração de DNA de amostras ósseas é adequado para emprego na identificação humana com finalidades forenses.

Palavras-chave: Extração de DNA; Tecido Ósseo; Identificação Forense.

ABSTRACT

The use of bony tissue as substratum in the obtaining of DNA for loci study STR (*Short Tandem Repeats*) it is quite useful in forensic science, especially in the identification of mortal remains and of people victims of disasters in mass. Some techniques of extraction of DNA of bony samples include a previous incubation of the material grind in EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) as demineralization stage. Our work presents a protocol of obtaining of quite efficient DNA of bones, in which it is made a demineralization of the bony matrix with the aid of the chelating agent EDTA, not being necessary the grinding of the sample for mineralogical or cryogenic mills. In that sense, aliquots of bone samples were submitted to the extraction of DNA by the traditional organic method with demineralization pre-treatment in EDTA, proceeded by an amplification with a system multiloci and sequenced through capillary eletrophoresis. The results showed amounts of compatible DNA with the obtaining of complete genetic profiles, with simultaneous amplification of 16 areas (loci) STR. Therefore, it was seen that this new protocol of extraction of DNA of bony samples is adapted for employment in the human identification with forensic purposes.

Keywords: Extraction of DNA; Bony Tissue; Forensic Identification.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- FIGURA 1. PADRÃO DE HERANÇA DOS MARCADORES GENÉTICOS STR. NESTE EXEMPLO, DIFERENÇAS NO NÚMERO DE REPETIÇÕES CA ENTRE OS DOIS ALELOS (MATERNO: 6 REPETIÇÕES; PATERNO: 9 REPETIÇÕES) RESULTA EM DOIS PICOS DISTINTOS APÓS A ELETROFORESE CAPILAR (PERFIL GENÉTICO DA CRIANÇA). ESSES PICOS PODEM SER USADOS COMO MARCADORES GENÉTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL. ILUSTRAÇÃO: CARVALHO, H. G. A..... 14
- FIGURA 2. LOCALIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS *LOCi* STR ADOTADOS MUNDIALMENTE PARA UTILIZAÇÃO NAS CIÊNCIAS FORENSES: CSF1PO, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, TH01, TPOX, VWA E AMELOGENINA. FONTE: JOBLING & GILL (2004)..... 15
- FIGURA 3. CORTE MOSTRANDO A ESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO. FONTE: <[HTTP://BIOLOGIA.IFSC.USP.BR/BIO1/AULAS/AULA-08.PDF](http://biologia.ifsc.usp.br/bio1/aulas/aula-08.pdf)>, ACESSO EM 05.01.2009. 18
- FIGURA 4. TIPOS DE OSSOS. OSSO ESPONJOSO COM ESTRUTURA RETICULADA (A); E OSSO COMPACTO COM ESTRUTURA Densa (B). FONTE: <[HTTP://BIOLOGIA.IFSC.USP.BR/BIO1/AULAS/AULA-08.PDF](http://biologia.ifsc.usp.br/bio1/aulas/aula-08.pdf)>, ACESSO EM 05.01.2009. 19
- FIGURA 5. COMPONENTES DOS OSSOS. VALORES APROXIMADOS POR PESO DE OSSO COMPACTO DE ADULTOS. FONTE: KERR (2000)..... 23
- FIGURA 6. COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE DE DISSOLUÇÃO DA CALCITA POR DIFERENTES COMPOSTOS ORGÂNICOS COM PROPRIEDADES DE LIGAÇÃO AO CÁLCIO. OBSERVE QUE O EDTA E O CITRATO TÊM UM MAIOR PODER DE DISSOLUÇÃO, ENQUANTO O GLUCONATO E GOMA XANTANA IMPEDEM A DISSOLUÇÃO DA CALCITA. FONTE: ERLICH *ET AL.* (2009). 25

MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO

- FIGURA 1. Perfil genético obtido de uma amostra de osso por meio de extração com descalcificação sem pulverização. Esta mesma amostra quando submetida a várias extrações pelo método orgânico com pulverização em moinho mineralógico não resultou em perfil genético em condições de análise e confronto..... 41

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

DNA – Ácido Desoxirribonucléico;

RNA – Ácido Ribonucléico;

VNTR – Variable Number of Tandem Repeats: Repetições de Número Variável em Tandem;

pb – pares de bases;

Kb – quilobases;

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphisms: Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição;

PCR – Polymerase Chain Reaction: Reação em Cadeia da Polimerase;

STR – Short Tandem Repeats: Repetições Curtas em Tandem;

X-STR – Repetições Curtas em Tandem do Cromossomo X;

Y-STR – Repetições Curtas em Tandem do Cromossomo Y;

mtDNA – DNA Mitochondrial;

HV1 – região hipervariável 1;

HV2 – região hipervariável 2;

HV3 – região hipervariável 3;

SNP – Single Nucleotide Polymorphism: Polimorfismo de um Único Nucleotídeo;

EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético;

SDS – Sodium Dodecil Sulfato: Dodecil Sulfato de Sódio;

Tris-HCl – Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride;

NaCl – cloreto de sódio;

DTT – Dithiothreitol.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	Identificação humana pelo DNA: um breve histórico.....	12
2.2	O tecido ósseo e sua utilização nas ciências forenses	17
2.3	Obtenção de DNA de ossos humanos: métodos de extração.....	20
2.3.1	Protocolo padrão: método orgânico.....	21
2.3.2	Descalcificação do tecido ósseo.....	23
2.3.3	Pulverização do tecido ósseo	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	RELEVÂNCIA	29
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
6	MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO	38
7	CONCLUSÕES	45
8	ANEXO	46

1 INTRODUÇÃO

Há muitos anos as ciências forenses como a Medicina Legal e a Criminalística vêm buscando e fazendo uso de novos métodos e novas tecnologias, visando um melhor desempenho de suas funções perante a sociedade. Com os avanços na área biológica e molecular surgiu uma das mais importantes e revolucionárias descobertas do século passado: o método de identificação humana a partir da tipagem do DNA (ou *DNA fingerprinting*) presente nas células (SILVA & PASSOS, 2002). A descoberta de regiões variáveis do genoma e a demonstração de que indivíduos diferentes possuíam um perfil genético único que o individualizava perante os demais indivíduos da população, abriu as portas para a utilização do DNA em estudos de identificação humana.

Essas regiões hipervariáveis representam porções da fita de DNA não-codificantes e, dependendo do número de pares de bases que possuem, podem ser classificadas como minissatélites ou VNTR (do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*) e microsatélites ou STR (do inglês *Short Tandem Repeats*). Foi com a utilização de VNTR e da técnica de RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) que a tipagem do DNA auxiliou, pela primeira vez, no desfecho de um crime nas ciências forenses. Desde então, os métodos de identificação humana utilizando-se do DNA vêm sendo aprimorados e, cada vez mais, vêm contribuindo para a elucidação de crimes, bem como para a prisão de culpados e libertação de inocentes (PINHEIRO, 2004).

Atualmente, o estudo de marcadores moleculares do DNA vem sendo utilizado nas ciências forenses de variadas formas, podendo ser de muita valia para a identificação e vinculação de suspeitos a locais de crime; inocentar pessoas vítimas de falsa acusação; identificar paternidade cível ou não; e identificar pessoas desaparecidas ou vítimas de grandes desastres a partir de restos mortais e da comparação com familiares.

Graças à descoberta de um elevado número desses marcadores genéticos, a identificação humana pelo DNA nas ciências forenses pode ser feita a partir de qualquer material biológico contendo células nucleadas, ou pelo DNA presente nas mitocôndrias. Dessa forma, evidências como cabelos, sangue, saliva, sêmen e restos mortais como ossos e dentes encontradas em locais de crime ou que

necessitem de posterior identificação, podem, em princípio, ser analisadas e comparadas pelos métodos atuais de análise de DNA. Tais métodos incluem a amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), onde um fragmento de DNA pode ser amplificado partindo de ínfimas quantidades de DNA (JOBLING & GILL, 2004).

Outro ponto favorável ao estudo do DNA foi, sem dúvida, o desenvolvimento de variadas técnicas de extração e purificação do DNA humano. A etapa de extração é um ponto crítico e primordial no processo de análise do DNA, já que é através dela que são eliminados contaminantes e inibidores do processo de PCR. Em células eucarióticas, a extração pode ser feita com a combinação de proteinases, detergentes e fenol, bem como com uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (EDSON *et al.*, 2004).

A obtenção de DNA de restos mortais humanos, mais especificamente de ossadas, caracteriza-se por ser um procedimento difícil e trabalhoso, uma vez que o DNA dessas amostras geralmente encontra-se com altos níveis de degradação e de contaminação, além de estarem protegidos por uma matriz mineral que dificulta o acesso às poucas células ali existentes. Em amostras antigas de ossos, inumados ou não, a atuação dos fatores ambientais acaba dificultando a obtenção de um DNA em quantidades e qualidade significativa para a determinação de perfil genético em condições de análise (YE *et al.*, 2004).

Para se conseguir êxito na obtenção de DNA de tais amostras e chegar a um resultado satisfatório, é necessário que se proceda a diversas técnicas de extração e purificação. A grande maioria dos protocolos de extração de DNA de ossos faz uso da amostra triturada e do método de extração orgânica tradicional, sem, entretanto, conseguir uma lise total das células e perfis genéticos completos.

Devido à grande necessidade de se obter DNA de ossos e dentes através de métodos simples e eficazes, a proposta do presente trabalho foi a introdução de um novo protocolo de extração de DNA dessas amostras partindo da desmineralização óssea e eliminação da etapa de pulverização, o que facilita o acesso às células e ao material genético de interesse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Identificação humana pelo DNA: um breve histórico

A identificação de pessoas desaparecidas, vítimas de desastres em massa ou a identificação de cadáveres em alto grau de decomposição ou esqueletização sempre foi um desafio para as autoridades da área policial e judiciária, bem como uma angústia para os familiares que perderam parentes e anseiam por respostas. Por muitos anos, estudos antropológicos e médico legais foram as únicas alternativas para casos como esses. Mas, foi com o avanço dos estudos genéticos e moleculares que, a partir de 1985, a identificação humana passou a ser realizada de forma mais confiável, utilizando-se das informações contidas no DNA. O geneticista inglês Alec Jeffreys instituiu o método de identificação humana pela tipagem do DNA que ficou conhecido como *DNA fingerprinting*, após a descoberta de seqüências repetidas do genoma humano, as quais ele batizou de VNTR (Repetições de Número Variável em Tandem) (JEFFREYS *et al.*, 1985). As VNTR fazem parte de um tipo de DNA que se repete em tandem (seqüências altamente repetitivas que se encontram uma após a outra), denominado minissatélite. Os minissatélites são seqüências que variam de cerca de 100 pb até 20 Kb de comprimento e suas unidades de repetição geralmente apresentam de 9 a 30 pb, sendo bastante abundantes no genoma humano. Geralmente eles se agrupam próximos aos telômeros e nos finais dos cromossomos (RAMEL, 1997).

As VNTR caracterizam-se por serem regiões não-codificantes do genoma, ou seja, não são transcritas em RNA, são altamente polimórficas e hipervariáveis, (BENNETT, 2000), variando entre os indivíduos de uma população. Essas seqüências se estabeleceram como bons marcadores moleculares para a utilização em testes de identificação também por apresentarem um padrão de herança Mendeliana, no qual os alelos do filho são oriundos dos genitores, sendo metade dos fragmentos de minissatélites doados pela mãe e a outra metade doada pelo pai (JEFFREYS *et al.*, 1986).

Os primeiros casos de identificação através da técnica de *DNA fingerprinting* foram baseados no método de *Southern Blotting*, com a utilização de sondas radioativas curtas e membranas de fibras sintéticas, e de RFLP (Polimorfismo do

Comprimento do Fragmento de Restrição) (BUTLER, 2005). O caso que deu início a era da identificação humana envolvendo marcadores de DNA foi o de uma família africana – oriunda de Gana – nacionalizada no Reino Unido que, por ter um de seus filhos barrados ao entrar no novo país e com sua identidade contestada, procurou o auxílio do pesquisador Alec Jeffreys para que ajudasse a provar que aquele indivíduo pertencia àquela família. Sangue da mãe, do garoto e de três irmãos foi coletado e submetido aos testes com os minissatélites, o que posteriormente comprovou o vínculo genético existente entre a mãe e o filho questionado, além de demonstrar que todas as crianças possuíam o mesmo pai. Isso possibilitou a abertura das portas para a utilização dos marcadores de DNA como método de identificação humana seguro e confiável e para sua utilização nas ciências forenses (SAAD, 2005).

Com a resolução do primeiro caso, o *DNA fingerprinting* passou a ser visto como uma solução para diversas ocorrências. Em 1986, também no Reino Unido, os minissatélites foram indispensáveis para se chegar à conclusão de um caso policial, iniciando, a partir daí, a história da tipagem de DNA como ferramenta para a resolução de crimes. Duas moças foram violentadas e mortas e um suspeito havia sido preso e confessado a morte de somente uma delas. Por comparação dos perfis genéticos do sêmen encontrado nos corpos das vítimas, com o material biológico do suspeito foi visto que ele não forneceu aquela amostra e que, portanto, estava excluído de tê-las violentado, sendo, assim, inocentado. A partir daí foi feito o levantamento do material genético de cerca de 5.000 indivíduos, para finalmente encontrar o assassino das duas garotas, um homem chamado Colin Pitchfork, que resolveu confessar os crimes após o resultado de inclusão entre as amostras questionadas e seu material genético. Nesse mesmo ano o uso desses marcadores de DNA se espalhou pelo mundo (CORMIER *et al.*, 2005; SAAD, 2005).

A técnica de *DNA fingerprinting* foi, de certo, a pioneira na área de identificação humana pelo DNA e, talvez por isso, apresentava inúmeras dificuldades, como ser bastante demorada, dispendiosa e de difícil interpretação dos resultados. Com o advento da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), no ano de 1986, a tipagem de DNA sofreu um significativo refinamento, uma vez que a PCR é uma reação enzimática que amplifica trechos pré-determinados do DNA, reproduzindo *in vitro* o processo de replicação a partir de um pequeno fragmento

que se quer amplificar. Essa técnica trouxe grande sensibilidade ao exame, já que pequenas quantidades de DNA podem ser amplificadas até mesmo de amostras contendo DNA degradado e de má qualidade (WICKENHEISER & HONS, 2001).

Outro grande e importante salto para a identificação pelo DNA foi a descoberta, nesta mesma época, de um novo tipo de seqüências repetitivas do genoma humano: os STR (Repetições Curtas em Tandem). Tais seqüências, denominadas também microssatélites, são caracterizadas por serem regiões hipervariáveis, formadas por pequenas porções de DNA não-codificante, com cerca de 1 a 7 pb de comprimento, amplamente distribuídas por todo o genoma humano, sem se situarem em um local específico (PENA & JEFFREYS, 1993; PINHEIRO, 2004). Essas unidades se repetem de 5 a 100 vezes em cada *locus* microssatélite e possuem um alto nível de polimorfismo. Por serem altamente polimórficos os marcadores STR oferecem um significativo grau de discriminação entre os indivíduos, além de possibilitar uma maior sensibilidade ao exame quando acoplados com a PCR e com *primers* fluorescentes (COLLINS *et al.*, 2004; SAAD, 2005; MEISSNER *et al.*, 2007).

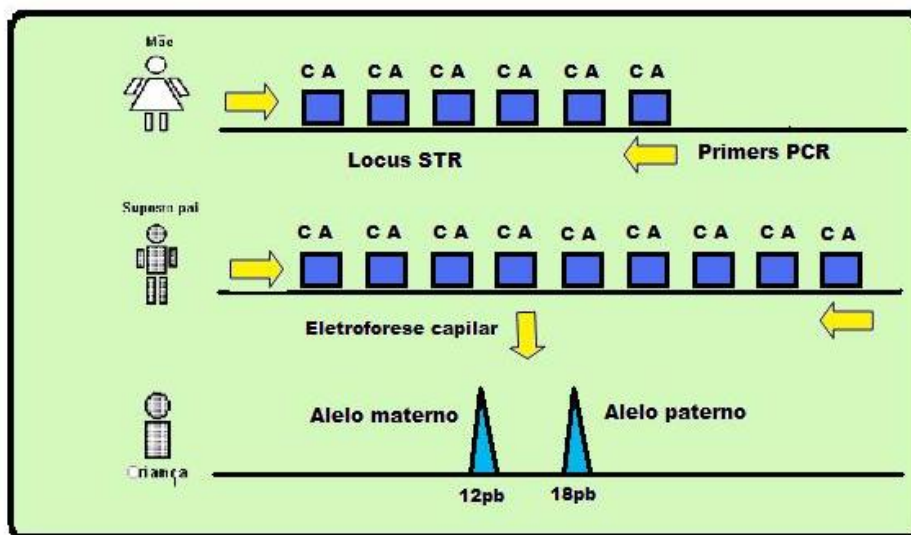


FIGURA 1. Padrão de herança dos marcadores genéticos STR. Neste exemplo, diferenças no número de repetições CA entre os dois alelos (materno: 6 repetições; paterno: 9 repetições) resulta em dois picos distintos após a eletroforese capilar (perfil genético da criança). Esses picos podem ser usados como marcadores genéticos para identificação individual. Ilustração: CARVALHO, H. G. A.

Assim como os marcadores VNTR, os STR também apresentam um padrão de herança Mendeliana, onde cada indivíduo herda um alelo materno e um alelo

paterno de um *locus* STR [Figura 1]. Essa característica, aliada à variabilidade e àquelas anteriormente citadas, fez destes marcadores genéticos os mais importantes e rotineiramente utilizáveis em exames de paternidade e identificação humana, bem como nas ciências forenses (identificação de vestígios de local de crime – sangue, sêmen, saliva, cabelos, entre outros) (GOLDSTEIN & SCHLOTTERER, 1999).

A facilidade de amplificação e análise, já que são seqüências de DNA curtas (< 300 pb), possibilitou a utilização dos STR em estudos evolutivos e antropológicos, na elaboração de mapas gênicos, em estudos populacionais, no diagnóstico de doenças e monitoramento de transplantes, em identificação de espécies e determinação do parentesco evolutivo (COLLINS *et al.*, 2004; SAAD, 2005).

Nos últimos anos, os microssatélites vêm sendo comercializados e largamente utilizados nos laboratórios sob a forma de kits que representam um conjunto de marcadores moleculares usados para identificação humana, previamente validados, os quais são amplificados juntos em uma mesma reação, numa mesma PCR. Esse conjunto é comumente chamado de sistema multilocus ou multiplex; nele, são amplificados simultaneamente quinze *loci* STR e o gene da amelogenina (COLLINS *et al.*, 2004) [Figura 2].

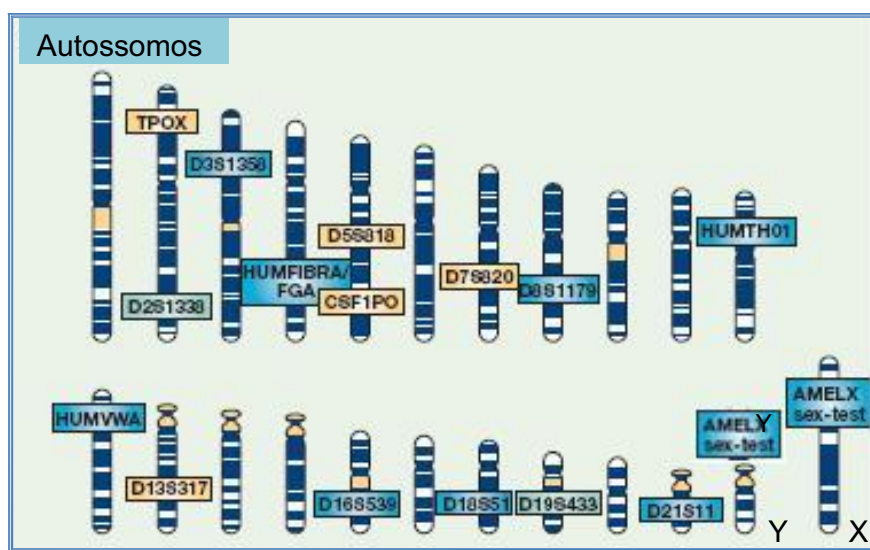


FIGURA 2. Localização dos principais *loci* STR adotados mundialmente para utilização nas ciências forenses: CSF1PO, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, TH01, TPOX, vWA e Amelogenina. Fonte: JOBLING & GILL (2004).

Os marcadores autossômicos são os mais empregados em testes de paternidade ou nas ciências forenses, mas, apesar disso, muitos marcadores localizados nos cromossomos sexuais (Y-STR e X-STR) foram descritos, estão sendo comercializados e são de extrema importância em situações onde se faz necessária a identificação humana pelos cromossomos sexuais (MULERO *et al.*, 2006).

Neste mesmo contexto surgiu uma nova técnica para auxiliar às ciências forenses no que concerne à identificação de restos mortais e pessoas desaparecidas: o seqüenciamento de regiões variáveis presentes no cromossomo das mitocôndrias. O DNA mitocondrial humano (mtDNA) apresenta-se como uma molécula circular, dupla fita, com cerca de 15,5 a 19,5 Kb, onde há uma região controle de 1,2 Kb apresentando grande polimorfismo. A variabilidade presente no DNA mitocondrial utilizada nas ciências forenses são diferenças em nucleotídeos, observadas nas sub-regiões dessa região controle: a região hipervariável 1 (HV1), a região hipervariável 2 (HV2) (GILBERT *et al.*, 2003; TAKAYANAGI *et al.*, 2003) e a região hipervariável 3 (HV3) (HOONG & LEK, 2005). O polimorfismo dessas regiões permite não somente a discriminação individual, como também é útil em determinadas circunstâncias de tipagem de amostras forenses.

A análise do DNA mitocondrial é, atualmente, uma ferramenta de extrema importância na identificação de ossadas e de amostras que apresentam DNA em pouca quantidade ou degradado, o que limita sua análise através de marcadores STR (MATSUDA *et al.*, 2005). Esse material genético é herdado a partir da linhagem materna, destarte, espera-se que um indivíduo, sua mãe e seus parentes maternos apresentem cópias idênticas desse DNA (IMAIZUMI *et al.*, 2002). Tal técnica foi introduzida e vem sendo comumente empregada nos laboratórios, principalmente pelo fato de que a amplificação de regiões do DNA mitocondrial é bem mais fácil, uma vez que o número de cópias desse material genético é aproximadamente 500 vezes maior do que as cópias de um determinado *locus* STR (HOLLAND & PARSONS, 1999; ÁLVAREZ *et al.*, 2001).

Mais recentemente, novos polimorfismos foram descobertos e vêm chamando a atenção de pesquisadores ligados à área forense: são os polimorfismos de um único nucleotídeo ou SNP (do inglês: *Single Nucleotide Polymorphism*). Os SNP são variações em uma seqüência de DNA que envolvem a modificação de apenas um

nucleotídeo por inserção, deleção ou substituição (BUDOWLE, 2004). Em sua grande maioria, os SNP são bialélicos, sendo individualmente menos informativos que os *loci* STR, entretanto são cerca de 15 vezes mais abundantes no genoma humano possuindo, dessa forma, um maior poder discriminatório absoluto (AYRES, 2005). Além de estarem distribuídos aleatoriamente por todo o genoma, inclusive no DNA mitocondrial (COBLE *et al.*, 2004; VALLONE *et al.*, 2004) e cromossomo Y (LESSIG *et al.*, 2005). Por apresentarem seus produtos de amplificação menores, os SNP aumentam a possibilidade de êxito na análise de amostras contendo DNA degradado, em pequena quantidade ou carentes de padrões de comparação (SOBRINO *et al.*, 2005). Essas características representam um indicativo do grande potencial dos SNP como ferramenta para diferenciação de indivíduos com finalidades forenses.

Diversas outras tecnologias vêm sendo desenvolvidas ou ajustadas para que, cada vez mais, essa poderosa ferramenta que é a tipagem do DNA auxilie na identificação humana e na resolução de litígios judiciais, inocentando pessoas e acusando quem realmente deve à justiça.

2.2 O tecido ósseo e sua utilização nas ciências forenses

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado que consiste basicamente de células e de uma matriz extracelular que é atravessada por sistemas neurovasculares – canais de Havers. O osso, visto como um órgão do corpo humano, é formado por um tecido conjuntivo mineralizado, por uma porção cartilaginosa, pela medula óssea e por gordura, sendo uma estrutura viva, densa e que se renova com certa frequência.

Inicialmente, esse tecido apresenta uma matriz orgânica não-mineralizada, possuidora de grandes concentrações da proteína colágeno tipo I e pequena concentração de proteínas não-colagenosas, como as glicosaminoglicanas. Com o avanço do desenvolvimento, essa matriz torna-se mineralizada através da secreção de íons fosfato de cálcio pelas células conjuntivas ali existentes, deixando as fibras colágenas endurecidas. Cristais de fosfato de cálcio bastante comuns na estrutura óssea são denominados hidroxiapatitas ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), que chegam a representar de 65 até 70% do peso total dessa estrutura, mas outros componentes se fazem

presentes em quantidades bem menos significativas, como é o caso do fluoreto de cálcio e dos íons sódio e magnésio (KEMP & SMITH, 2005) [Figura 3]. A mineralização promove ao tecido ósseo sua resistência e faz com que este seja utilizado pelos organismos como uma estrutura de suporte, proteção e auxiliar na locomoção.

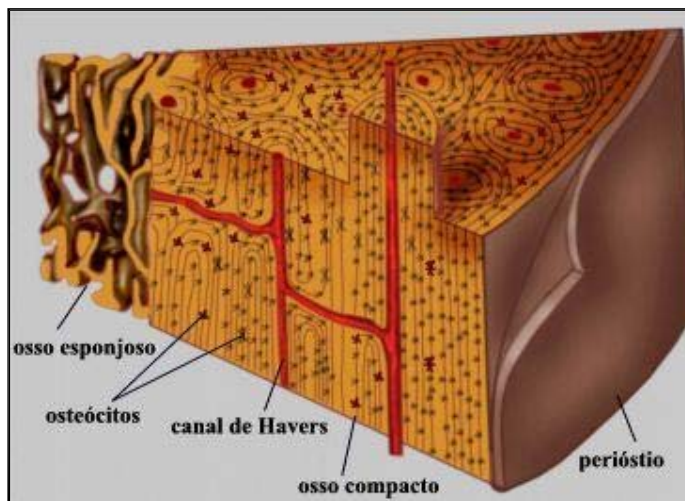


FIGURA 3. Corte mostrando a estrutura do tecido ósseo. Fonte: <<http://biologia.ifsc.usp.br/bio1/aulas/aula-08.pdf>>, acesso em 05.01.2009.

Intercaladas no meio da matriz mineral e colagenosa estão as células conjuntivas, que dão vida àquele emaranhado de cristais de cálcio. Elas representam cerca de 3% da massa óssea total (VELLOSO, 2005). São quatro tipos principais de células que compõem o osso, cada um com sua função específica: as células progenitoras, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. As células progenitoras, como o próprio nome já diz, são aquelas que darão origem a outras células formadoras de osso (osteoclastos e osteoblastos), a partir de processos como a auto-multiplicação ou diferenciação (KERR, 2000). Os osteoblastos têm como função primordial a produção da matriz orgânica na formação de ossos novos, além de controlar a mineralização desses novos tecidos. Os osteoclastos, por outro lado, são células grandes e multinucleadas que desempenham função fagocitária, destruindo e reabsorvendo a matriz calcificada do osso, no processo de remodelação. Ambos, osteoblastos e osteoclastos, são originários de células progenitoras. Quando os osteoblastos são envolvidos pela matriz mineralizada

recém formada, sofrem modificações e são tidos como osteócitos. Os osteócitos localizam-se em pequenos espaços ósseos denominados osteoplastos e responsabilizam-se pelas trocas de íons e nutrientes, regulando, dessa forma, a composição da matriz extracelular (TETI & ZALLONE, 2009).

Os ossos de uma pessoa adulta podem, ainda, ser classificados como esponjoso e compacto, a depender da estrutura mineralizada que possuem [Figura 4]. Os ossos esponjosos apresentam feixes de tecido mineralizado formando uma estrutura reticulada, porosa, preenchida por medula óssea e gordura, enquanto que os ossos compactos são caracterizados por possuírem uma estrutura de tecido calcificado densa e sólida.

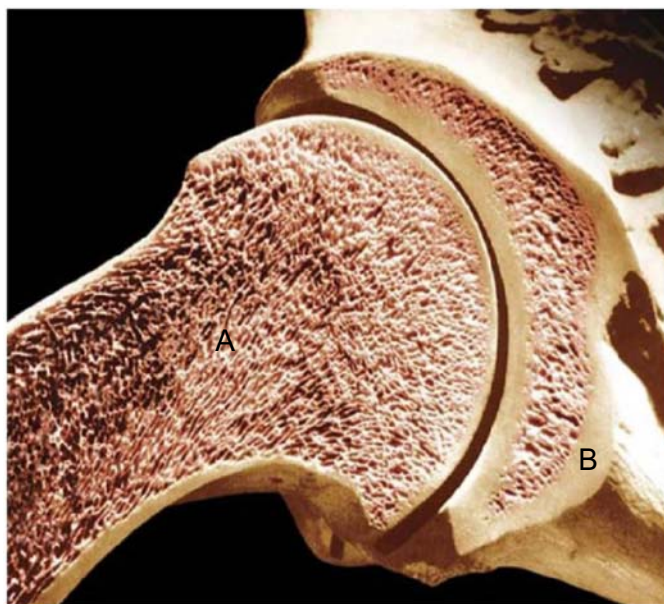


FIGURA 4. Tipos de ossos. Osso esponjoso com estrutura reticulada (A); e osso compacto com estrutura densa (B). Fonte: <<http://biologia.ifsc.usp.br/bio1/aulas/aula-08.pdf>>, acesso em 05.01.2009.

Em diversos casos forenses o estudo de amostras de ossos é a única maneira para se chegar à identificação de um indivíduo. Exames antropológicos e avaliação da arcada dentária são comumente realizados nos Institutos de Medicina Legal e Criminalística com o intuito de se chegar a essa identificação, porém em muitos casos, cadáveres e restos mortais não possibilitam a realização de tais exames por estarem em péssimo estado de conservação – ossos queimados, muito antigos, restos de vítimas de grandes desastres (YE *et al.*, 2004). A saída para estas

amostras com pouca qualidade é a utilização de marcadores genéticos e a posterior identificação através da tipagem do DNA (WURMB-SCHWARK *et al.*, 2004).

Muitos pesquisadores já evidenciaram que o DNA pode persistir em restos mortais e que devido a sua estrutura compactada e mineralizada, os ossos e dentes preservam o material genético por períodos de tempo bem mais longos do que outros tecidos (WURMB-SCHWARK *et al.*, 2003). A estrutura da matriz óssea possibilita ao material genético dessas amostras uma maior resistência às intempéries químicas e físicas do ambiente. Kemp & Smith (2004) acreditam que o DNA se liga à hidroxiapatita através dos seus grupos fosfato carregados negativamente e que esta ligação auxilia na preservação do DNA em amostras de ossos antigos. Nesses casos, desde que sejam mais abundantes do que os restos de tecidos moles, os ossos são considerados as melhores amostras para investigação de identidade (KALMÁR *et al.*, 2000).

2.3 Obtenção de DNA de ossos humanos: métodos de extração

O primeiro passo no exame de identificação humana utilizando marcadores genéticos – e talvez o mais importante – é a extração do DNA. Esta etapa do exame tem como principal objetivo a liberação do material genético do interior do núcleo celular e das proteínas a que está aderido, assim como o seu isolamento. Todas as macromoléculas e conteúdo celular devem ser descartados nesse processo, uma vez que o sucesso da tipagem do DNA requer o isolamento dessa molécula em suficiente quantidade, qualidade e pureza (BUDOWLE & BROWN, 2001).

Existem hoje diversos protocolos para obtenção de DNA das células humanas, que podem variar em função do tipo de amostra a ser utilizada, como sangue, pêlos, saliva, ossos, entre outras; em função da quantidade de amostra que se tem para trabalhar, ou ainda, em função do estado em que a amostra se encontra – se bem preservada ou extremamente degradada (ÁLVAREZ *et al.*, 2001). Os procedimentos padrão de extração de DNA geralmente envolvem solventes orgânicos (DIXON *et al.*, 2006), métodos *salting out* (GOMES *et al.*, 2007), uso de tampão contendo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (YE *et al.*, 2004), precipitação do DNA com etanol ou trocas iônicas com resina, como é o caso do sistema Chelex-100® (BioRad) (KALMÁR *et al.*, 2000). Segundo Budowle & Brown

(2001), o protocolo de extração ideal é aquele que serve para a grande maioria das amostras, é de simples execução e possui baixo custo para o laboratório.

A obtenção de DNA de amostras contendo material genético degradado e em pouca quantidade, como é o caso dos ossos e dentes, é de grande importância para a identificação forense, mas também é particularmente difícil já que alguns interferentes presentes nessas amostras impedem a atuação dos componentes do tampão de extração e inibem a amplificação total do DNA (CATTANEO *et al.*, 1995; KALMÁR *et al.*, 2000). Apesar do DNA dessas amostras ser melhor preservado do que em amostras de tecidos moles, ele não está livre da degradação ou contaminação por fatores que interferem na sua obtenção. Os principais fatores interferentes são aqueles que advêm do local onde a amostra se encontrava, como é o caso dos ácidos húmicos, dos ácidos fúlvicos e de material genético de outros organismos (WURMB-SCHWARK *et al.*, 2004).

É necessário, portanto, que esses inibidores sejam removidos para que se obtenha sucesso na extração e amplificação do DNA de ossos e dentes (YE *et al.*, 2004). Com o intuito de minimizar ou até solucionar este problema foram desenvolvidos, nos últimos anos, alguns métodos de extração de DNA humano baseados em resinas magnéticas que, ao mesmo tempo em que extraem, purificam o DNA, livrando-o de impurezas e material biológico sem interesse. Esses sistemas limitam a quantidade de material genético purificado e extraído, uma vez que a resina magnética capta um número determinado de moléculas. O sistema DNA IQ™ (Promega Corporation) e o sistema ChargeSwitch® (Invitrogen) são exemplos dessa nova tecnologia. Tais métodos são extremamente fáceis de serem executados, além de rápidos e práticos, apresentando uma única desvantagem: o elevado custo (STAITI *et al.*, 2004).

Outro problema visualizado é a contaminação da superfície das amostras de ossos e dentes por DNA exógeno, que pode levar a um resultado falso positivo e a uma análise errônea de um perfil diferente daquele que se busca. Esse problema deve ser resolvido antes do início da extração e geralmente se faz uso de hipoclorito de sódio (NaOCl) para limpar as amostras e retirar o DNA contaminante (KEMP & SMITH, 2005).

2.3.1 Protocolo padrão: método orgânico

Nas ciências forenses, apesar de não existir um protocolo de extração fixo, quando se quer obter DNA de amostras ósseas o método de escolha e mais comumente empregado é o método orgânico, que faz uso de solventes orgânicos como o fenol, associado ao clorofórmio. Este método possibilita a obtenção de DNA de melhor qualidade e pureza, uma vez que grande parte das proteínas acopladas à molécula de DNA é removida no processo, mas há uma pequena perda de material durante as etapas do protocolo (BUTLER, 2005).

O método de fenol/clorofórmio tradicional, se comparado a outros, requer um grau de pró-eficiência técnica, sendo muito trabalhoso e demorado, podendo, no entanto, garantir uma maior purificação do material genético extraído, principalmente quando associado a filtros de lavagem como o Microcon™ (Millipore), os quais garantem a remoção de inibidores enzimáticos (BUDOWLE & BROWN, 2001; TAKAYANAGI *et al.*, 2003). Estes filtros retêm o DNA em sua fina tela, ao mesmo tempo em que eliminam solutos de baixo peso molecular, além de fragmentos de DNA degradado com tamanho inferior a 60 pb (RICAUT *et al.*, 2005).

O protocolo consiste na adição de um tampão de lise celular à amostra, contendo SDS, Tris-HCl, NaCl, DTT, EDTA e proteinase K. Essa solução irá desestabilizar a membrana das células, liberando seu conteúdo, assim como irá destruir as proteínas que rodeiam o DNA. Há, em seguida, a adição dos solventes orgânicos – fenol/clorofórmio – que irão separar o material genético das outras macromoléculas celulares, partindo do princípio da solubilidade. Há também a utilização de álcool isoamílico juntamente com o clorofórmio, para remoção de qualquer vestígio de fenol remanescente. Após centrifugação da amostra, o DNA, solubilizado nesses solventes, será separado dos demais conteúdos celulares. O DNA será retido na fase aquosa, enquanto as proteínas desnaturadas são coletadas na interface das fases aquosa e fenólica. Para “limpar” o material genético de interesse, a maioria dos laboratórios de genética forense faz uso de filtros de lavagem do tipo Microcon™ em conjunto com o método orgânico (GRZYBOWSKI, 2000; BUTLER, 2005).

A extração com mais de um solvente permite que haja uma desproteínização mais eficiente e, apesar de ser um tanto quanto perigoso para a saúde humana e

para o meio ambiente, esse protocolo ainda é amplamente utilizado pelos pesquisadores para o isolamento do DNA (AZEVEDO *et al.*, 2003).

2.3.2 Descalcificação do tecido ósseo

Sabe-se que o osso é o tecido mais resistente do corpo animal, levando-se em consideração o tempo que leva para se decompor ou para que seja degradado. Cerca de 65 a 70% da matriz óssea é constituída por cristais de hidroxiapatita, que inclui fosfato de cálcio, carbonato de cálcio, fluoreto de cálcio e hidróxido de cálcio [Figura 5]. Essa constituição óssea tende a preservar o material genético contra as agressões do meio, mas, por outro lado, essas enormes quantidades de minerais na matriz óssea representam uma barreira física para a obtenção do DNA ali contido, uma vez que dificulta o acesso e ação dos reagentes químicos empregados nas técnicas de extração (STAITI *et al.*, 2004; LOREILLE *et al.*, 2007).

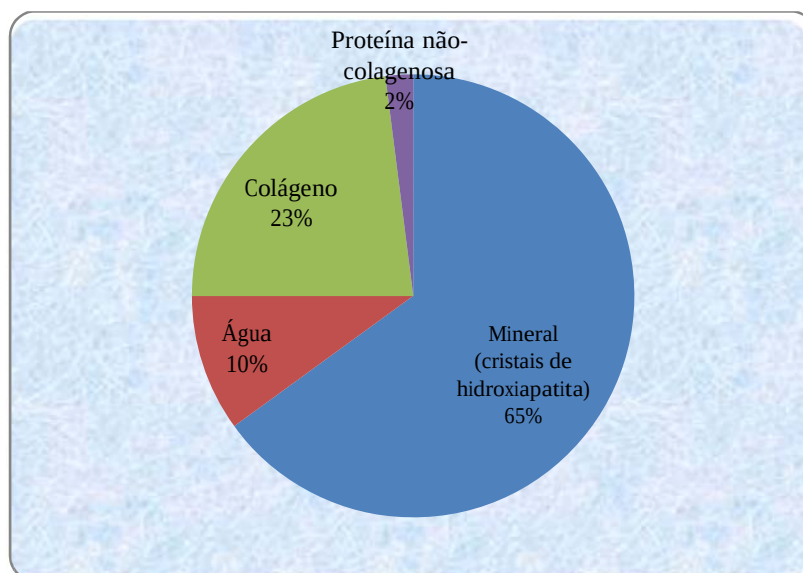


FIGURA 5. Componentes dos ossos. Valores aproximados por peso de osso compacto de adultos. Fonte: KERR (2000).

Para driblar esse problema muitos protocolos de extração fazem uso de agentes químicos que promovem a retirada de minerais do tecido ósseo, principalmente aqueles que eliminam os íons de cálcio, deixando o tecido mais penetrável. Isto é feito através do tratamento com agentes descalcificantes (ALERS

et al., 1999). A descalcificação é tida como um tratamento que tem por objetivo a destruição da fase inorgânica do tecido ósseo, partindo da remoção do elemento principal, o cálcio e, dessa forma, liberando caminho para se chegar à porção orgânica do osso. As técnicas mais empregadas para este fim fazem uso de alguns ácidos fortes que formam sais de cálcio solúveis e agentes quelantes, que seqüestram os íons cálcio deixando a porção orgânica mais maleável e de fácil corte (COOK & EZRA-COHN, 1962).

Os principais ácidos com propriedades descalcificantes utilizados nesses protocolos são o ácido nítrico, o ácido clorídrico, o ácido fórmico e alguns outros ácidos hidrocloreídricos. Estes ácidos, por serem bastante fortes, têm a propriedade de descalcificar o osso rapidamente, embora não possam ter seu uso prolongado por um período maior, já que provocam a hidrólise ácida do DNA, causando sérias deteriorações na estabilidade do mesmo (BROWN *et al.*, 2002). Sarsfield *et al.* (2000) visualizou, com seus experimentos, que o ácido fórmico utilizado para descalcificar tecidos ósseos degradava o DNA, já que após ser empregado nas amostras, nada era observado na eletroforese além de uma sujeira, característica de DNA degradado.

Atualmente, grande parte dos protocolos de descalcificação na área da Histologia e a maioria dos protocolos para extração de DNA de ossos e dentes é fundamentada na utilização do EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético). O EDTA é um ácido orgânico de baixo peso molecular que desmineraliza o osso e inativa enzimas DNAses quelando cátions bivalentes como o Mg^{++} e o Ca^{++} (LOREILLE *et al.*, 2007; ERLICH *et al.*, 2009). Na extração de DNA de restos mortais, em geral, o material pulverizado é incubado em um tampão de lise contendo EDTA (CATTANEO *et al.*, 1995; RICAUT *et al.*, 2005; DESMYTER & DE GREEF, 2008). Mas, apesar dessa quantidade utilizada, ainda existe dificuldade em obter DNA dessas amostras utilizando tais protocolos, por isso, uma incubação prévia do material pulverizado em EDTA vêm sendo empregada em alguns laboratórios como etapa de descalcificação (HAGELBERG & CLEGG, 1991; FUJITA *et al.*, 2004; STAITI *et al.*, 2004; GONZÁLEZ-ANDRADE & SÁNCHEZ, 2005). Essa descalcificação parece ser a melhor maneira de recuperação do DNA de tecidos ósseos, uma vez que, se comparado a outros ácidos fracos, o EDTA possui uma considerável capacidade de retirar íons cálcio da matriz óssea, dissociando os cristais formados [Figura 6].

A descalcificação pelo EDTA age somente na matriz mineralizada do osso, não apresentando nenhum efeito sobre outro tecido, tampouco sobre o material genético contido nas células. Por este motivo, técnicas que fazem uso desse agente quelante são preferíveis àquelas que utilizam agentes descalcificantes que modificam ou degradam DNA e, portanto, são inadequadas para estudos que contém alguma etapa de obtenção de DNA (ALERS *et al.*, 1999). A principal desvantagem do uso do EDTA como descalcificante, em detrimento dos ácidos fortes é o fato de a descalcificação apresentar-se de forma demorada, com tempos de incubação que podem variar de alguns dias, até algumas semanas, dependendo da extensão da mineralização (COOK & EZRA-COHN, 1962; ALERS *et al.*, 1999; ERLICH *et al.*, 2009).

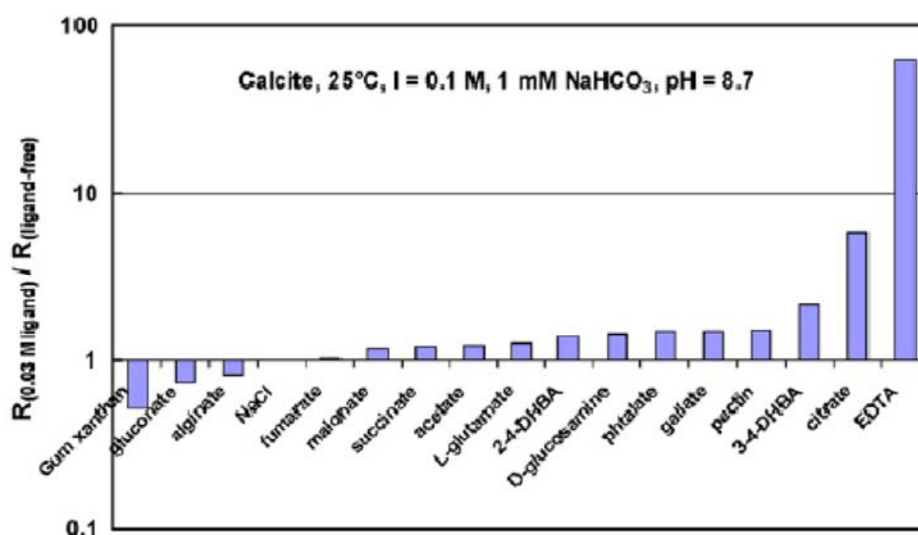


FIGURA 6. Comparação da capacidade de dissolução da calcita por diferentes compostos orgânicos com propriedades de ligação ao cálcio. Observe que o EDTA e o citrato têm um maior poder de dissolução, enquanto o gluconato e goma xantana impedem a dissolução da calcita. Fonte: ERLICH *et al.* (2009).

A primeira utilização do EDTA para descalcificação total de tecidos ósseos com o intuito de obter DNA foi realizada por Hagelberg & Clegg (1991), que observaram que pequenas lavagens com EDTA removiam contaminantes solúveis do pó do osso antes deste ser submetido ao tampão de extração tradicional. A partir

de então, muitos pesquisadores passaram a visualizar esse ácido quelante como um poderoso desmineralizante e o incorporaram em seus protocolos de extração de DNA de restos mortais, como uma etapa de pré-tratamento das amostras. Concluindo, dessa forma, que o EDTA é altamente preferível para ser utilizado em estudos que requerem DNA do que outros ácidos descalcificantes (LOREILLE *et al.*, 2007).

2.3.3 Pulverização do tecido ósseo

Geralmente as amostras de ossos chegam aos laboratórios forenses intactas ou, algumas vezes, quebradas em fragmentos grandes. Portanto, para que tais amostras sejam utilizadas na obtenção de DNA para identificação forense, se faz necessária a quebra desses ossos em fragmentos bem menores, que caibam em pequenos tubos rotineiramente utilizados para este fim – tubos eppendorf de 2 mL.

A maioria dos protocolos de extração de DNA de ossos – senão todos – faz uso do pó obtido após uma etapa de pulverização da amostra. Os ossos em geral são limpos e, em seguida, são cortados em fragmentos de cerca de um centímetro quadrado, são submetidos à radiação ultravioleta e, então, os fragmentos são pulverizados em moinhos, especializados ou não para esta função (HAGELBERG & CLEGG, 1991; HAGELBERG *et al.*, 1991; MEYER *et al.*, 2000; LOREILLE *et al.*, 2007; DESMYTER & DE GREEF, 2008; FONDEVILA *et al.*, 2008).

Há dois tipos de moinhos que são freqüentemente empregados nas ciências forenses: um tipo de moinho mineralógico e um moinho criogênico. O moinho mineralógico é uma ferramenta semelhante a um triturador, utilizado primordialmente para a trituração de pedras e minérios, que foi adaptado para a pulverização de amostras de ossos e dentes (FUJITA *et al.*, 2004; LOREILLE *et al.*, 2007). Já o moinho criogênico, caracteriza-se por ser uma ferramenta mais sofisticada, especializada para a trituração de amostras ósseas, onde se faz necessária a utilização de nitrogênio líquido (HAGELBERG & CLEGG, 1991; HAGELBERG *et al.*, 1991; LOREILLE *et al.*, 2007; FONDEVILA *et al.*, 2008). Um dos moinhos criogênicos mais utilizados para pulverização de ossos é conhecido por *Freezer Mill* e seu uso se dá da seguinte forma: as amostras são colocadas em um frasco que é submerso em um banho de nitrogênio líquido dentro do moinho; elas são mantidas à

temperatura baixa enquanto uma espécie de bastão de impacto movido magneticamente pulveriza-as. As amostras permanecem refrigeradas durante todo o processo (SPEX, 2008).

O nitrogênio líquido é comumente usado em laboratórios para pesquisas que envolvem congelamento e necessitam de temperaturas extremamente baixas. Ele caracteriza-se por ser um gás incolor e inodoro, que se apresenta liquefeito a uma temperatura de -196°C , mas rapidamente pode vaporizar em temperatura ambiente. Apesar de ser um gás não inflamável e pouco tóxico, acidentes fatais relacionados com o uso de nitrogênio líquido são freqüentemente descritos na literatura, portanto, é necessário algumas precauções ao se trabalhar com o nitrogênio líquido, uma vez que pequena quantidade desse gás pode evaporar e, em ambientes com pequeno espaço, ele pode levar a uma redução na quantidade de oxigênio do ar. Este é o principal motivo de acidentes envolvendo pesquisadores que fazem uso do nitrogênio líquido, já que a depleção de oxigênio no ar pode provocar asfixia e levar à morte (KIM & LEE, 2008; KERNBACH-WIGHTON *et al.*, 1998).

De acordo com os experimentos de Loreille *et al.* (2007), que comparou os pós obtidos com os dois tipos de moinhos, as amostras pulverizadas com o moinho mineralógico resultaram em uma maior quantidade de DNA em relação àquelas obtidas com o moinho criogênico, levando-se em consideração a quantidade de pó utilizada. Mas o que foi percebido, no decorrer das pesquisas, foi que o protocolo de extração de DNA utilizando uma completa desmineralização do osso com EDTA traz resultados satisfatórios, independente da utilização de um ou outro triturador. Os autores sugerem que o mais importante são os componentes da técnica de extração e não a forma como o osso é trabalhada – se em pó ou em pequenos cortes finos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Desenvolver um protocolo de extração de DNA de ossos humanos baseado na desmineralização da amostra e sem a utilização de mecanismos de pulverização.

3.2 Objetivos específicos

- Obter DNA de amostras de ossos humanos referentes a casos criminais, com finalidade de identificação forense;
- Avaliar a extração de DNA de ossos humanos sem pulverização;
- Comparar o método de extração de DNA sem pulverização do tecido ósseo com o protocolo padrão, que se utiliza de amostras de osso pulverizadas.

4 RELEVÂNCIA

A tipagem de DNA utilizando marcadores genéticos é, nos dias de hoje, uma ferramenta de extrema importância para a identificação humana com finalidades forenses. Relevantes esforços vêm sendo feitos continuamente para identificar cadáveres e restos humanos após guerras, grandes desastres, bem como cadáveres de pessoas desaparecidas que, rotineiramente, ocupam os necrotérios dos institutos de medicina legal. Na maioria dos casos, a utilização de técnicas de tipagem do DNA oferece uma resposta definitiva para o estabelecimento da identidade das vítimas e, dessa forma, realiza um benefício direto à sociedade. A extração do DNA de amostras de ossos e dentes é uma etapa crucial para o bom andamento do exame e para a obtenção de resultados satisfatórios em identificação humana, uma vez que estas amostras são bastante comuns nos laboratórios forenses. Entretanto, a etapa de lise celular e a eliminação de interferentes são obstáculos para a obtenção de DNA do tecido ósseo. Isto justifica o estudo, desenvolvimento e aprimoramento de novas técnicas para extração de DNA deste material.

A desmineralização das amostras de ossos com um pré-tratamento a base de EDTA demonstra ser uma etapa importante para facilitar a lise celular e, conseqüentemente, a eliminação de interferentes, possibilitando, assim, um melhor acesso a grandes fragmentos de DNA outrora protegidos pela matriz calcificada e a obtenção de material genético com maior qualidade e pureza ao final do processo de extração.

Segundo Budowle & Brown (2001), o protocolo de extração ideal é aquele que serve para a grande maioria das amostras, é de simples execução e possui baixo custo para o laboratório. A pulverização de amostras de osso, parte integrante dos protocolos de extração de DNA de osso em uso corrente, é uma etapa de custo significativo, relativamente complexa e está associada à manipulação de nitrogênio líquido. Portanto, a eliminação da etapa de pulverização diminui os riscos de contaminação e torna o processo de extração do DNA de ossos mais simples, seguro e barato, o que determina a relevância deste trabalho.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALERS, J. C.; KRIJTENBURG, P. J.; VISSERS, K. J.; DEKKEN, H. Effect of Bone Decalcification Procedures on DNA In Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization: EDTA Is Highly Preferable to a Routinely Used Acid Decalcifier. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 703–709, 1999.

ÁLVAREZ, J. C.; ENTRALA, C.; LORENTE, J. A.; LORENTE, M.; FERNÁNDEZ-ROSADO, F. J.; MARTÍNEZ-ESPIN, E.; RODRÍGUEZ, E.; VILLANUEVA, E. Análisis de ADN mitocondrial. **Forénsica**, v. 1, p. 40-59, 2001.

AYRES, K. L. The expected performance of single nucleotide polymorphism loci in paternity testing. **Forensic Science International**, v. 154, n. 2-3, p. 167-172, 2005.

AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. & DE-SOUZA, M. T. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. 211 p.

BENNETT, P. Microsatellites. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 53, p. 177-183, 2000.

BROWN, R.S.D.; EDWARDS, J.; BARTLETT, J.W.; JONES, C.; DOGAN, A. Routine acid decalcification of bone marrow samples can preserve DNA for FISH and CGH studies in metastatic prostate cancer. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 1, p. 113–115, 2002.

BUDOWLE, B. SNP typing strategies. **Forensic Science International**, v. 146s, p. S139–S142, 2004.

BUDOWLE, B. & BROWN, B. L. The use of DNA typing for forensic identification. **Forénsica**, v.1, n. 1, p. 23-37, 2001.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA Typing**. 2.ed. London: Elsevier Academic Press, 2005. 660 p.

CATTANEO, C.; SMILLIE, D.M.; GELSTHORPE, K.; PICCININI, A.; GELSTHORPE, A.R.; SOKOL, R.J. A simple method for extracting DNA from old skeletal material. **Forensic Science International**, v. 74, p. 167-174, 1995.

COBLE, M. D, JUST, R. S., O'CALLAGHAN, J. E., LETMANYI, I. H., PETERSON, C. T., IRWIN, J. A., PARSONS, T. J. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. **International Journal Legal Medicine**, v. 118, n.3, p. 137-146, 2004.

COLLINS, P. J.; HENNESSY, L.K.; LEIBELT, C. S.; ROBY, R. K.; REEDER, D. J.; FOXALL, P. A. Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433, and amelogenin: the AmpFISTR® Identifiler® PCR amplification kit. **Journal of Forensic Science**, v. 49, n. 6, p.1265-1277, 2004.

COOK, S. F. & EZRA-COHN, H. E. A comparison of methods for decalcifying bone. Department of Physiology, University of California, Berkeley, California, p. 560-563, 1962.

CORMIER, K.; CALANDRO, L.; REEDER, D. Evolution of DNA evidence for crime solving – a judicial and legislative history. **Forensic Magazine**, v. 2, n. 4, p. 9-11, 2005.

DESMYTER, S. & DE GREEF, C. A more efficient extraction method of human bone resulting in improved DNA profiling. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 1, p. 24–25, 2008.

DIXON, L.A.; DOBBINS, A.E.; PULKER, H.K.; BUTLER, J.M.; VALLONE, P.M.; COBLE, M.D.; PARSON, W.; BERGER, B.; GRUBWIESER, P.; MOGENSEN, H.S.; MORLING, N.; NIELSEN, K.; SANCHEZ, J.J.; PETKOVSKI, E.; CARRACEDO, A.; SANCHEZ-DIZ, P.; RAMOS-LUIS, E.; BRION, M.; IRWIN, J.A.; JUST, R.S.;

LOREILLE, O.; PARSONS, T.J.; SYNDERCOMBE-COURT, D.; SCHMITTER, H.; STRADMANN-BELLINGHAUSEN, B.; BENDER, K.; GILL, P. Analysis of artificially degraded DNA using STR and SNP—results of a collaborative European (EDNAP) exercise. **Forensic Science International**, v. 164, p. 33–44, 2006.

EDSON, S. M.; ROSS, J. P.; COBLE, M. D.; PARSON, T. J.; BARRITT, S. M. Naming the dead — Confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. **Forensic Science Review**, v.16, n. 1, p. 64-90, 2004.

EHRlich, H.; KOUTSOUKOS, P. G.; DEMADIS, K. D.; POKROVSKY, O. S. Principles of demineralization: modern strategies for the isolation of organic frameworks, Part II. Decalcification. **Micron**, v. 40, p.169–193, 2009.

FONDEVILA, M.; PHILLIPS, C.; NAVERAN, N.; FERNANDEZ, L.; CEREZO, M.; SALAS, A.; CARRACEDO, A.; LAREU, M.V. Case report: Identification of skeletal remains using short-amplicon marker analysis of severely degraded DNA extracted from a decomposed and charred femur. **Forensic Science International: Genetics**, v. 2, p. 212–218, 2008.

FUJITA, Y.; KUBOA, S.; TOKUNAGAA, I.; KITAMURAA, O.; GOTOHDAA, T.; ISHIGAMIA, A. Influence of post-mortem changes on DNA typing (D1S80, TH01, HLA DQA 1, and PM typing system): case studies for personal identification. **Legal Medicine**, v. 6, p. 143–150, 2004.

GILBERT, M. T. P.; WILLERSLEV, E.; HANSEN, A. J.; BARNES, I.; RUDBECK, L.; LYNNERUP, N.; COOPER, A. Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. **Annual Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 32-47, 2003.

GOLDSTEIN, D. & SCHLOTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, 1999.

GOMES, A. V.; MAURICIO-DA-SILVA, L.; RAPOSO, G.; VIEIRA, J. R. C.; SILVA, R. S.13 STR loci frequencies in the population from Paraíba, Northeast Brazil. **Forensic Science International**, 2007. No prelo.

GONZÁLEZ-ANDRADE, F. & SÁNCHEZ, D. DNA typing from skeletal remains following an explosion in a military fort—first experience in Ecuador (South-America). **Legal Medicine**, v. 7, p. 314–318, 2005.

GRZYBOWSKI, T. Extremely high levels of human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots. **Electrophoresis**, v. 21, p. 548-553, 2000.

HAGELBERG, E. & CLEGG, J. B. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. **Proceedings: Biological Sciences**, v. 244, p. 45-50, 1991.

HAGELBERG, E.; BELL, L. S.; ALLEN, T.; BOYDE, A.; JONES, S. J.; CLEGG, J. B. Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v. 333, p. 399-407, 1991.

HOLLAND, M. M.; PARSONS, T. J. Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. **Forensic Science Review**, v. 11, n. 1, p. 22-50, 1999.

HOONG, L. L. & LEK, K. C. Genetic polymorphisms in mitochondrial DNA hypervariable regions I, II and III of the Malaysian population. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 79-85, 2005.

IMAIZUMI, K.; SAITOH, K.; SEKIGUCHI, K.; YOSHINO, M. Identification of fragmented bones based on anthropological and DNA analyses: case report. **Legal Medicine**, v. 4, p. 251-256, 2002.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L.; WEATHERALL, D. J.; PONDER, B. A. J. DNA "Fingerprints" and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. **Annual Journal of Human Genetics**, v. 39, p. 11-24, 1986.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 68-73, 1985.

JOBLING, M. A. & GILL, P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nature Reviews: Genetics**, v. 5, p. 739-751, outubro 2004.

KALMÁR, T.; BACHRATI, Z. C.; MARCSIK, A.; RASKÓ, I. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. i-iv, 2000.

KEMP, B. M. & SMITH, D. G. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. **Forensic Science International**, v. 154, p. 53-61, 2005.

KERNBACH-WIGHTON, G., KIJEWski, H., SCHWANKE, P., SAUR, P., SPRUNG, R. Clinical and morphological aspects of death due to liquid nitrogen. **International Journal of Legal Medicine**, v. 111, n. 4, p. 191-195, 1998.

KERR, J. B. **Atlas de Histologia Funcional**. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. 402 p.

KIM, D. H & LEE, H. J. Evaporated liquid nitrogen-induced asphyxia: a case report. **Journal of Korean Medical Science**, v. 23, p. 163-165, 2008.

LESSIG, R., ZOLEDZIEWSKAC, M., FAHRB, K., EDELMANNA, J., KOSTRZEWA, B., DOBOSZC, M., T., KLEEMANNA, W.J. Y-SNP-genotyping – a new approach in forensic analysis. **Forensic Science International**, v. 154, n. 2-3, p. 128-36, 2005.

LOREILLE, O. M.; DIEGOLI, T. M.; IRWIN, J. A.; COBLE, M. D.; PARSONS, T. J. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. **Forensic Science International: Genetics**, v. 1, p. 191-195, 2007.

MATSUDA, H.; SEO, Y.; KAKIZAKI, E.; KOZAWA, S.; MURAOKA, E.; YUKAWA, N. Identification of DNA of human origin based on amplification of human-specific mitochondrial cytochrome b region. **Forensic Science International**, v. 152, p. 109–114, 2005.

MEISSNER, C.; BRUSE, P.; MUELLER, E.; OEHMICHEN, M. A new sensitive short pentaplex (ShoP) PCR for typing of degraded DNA. **Forensic Science International**, v. 166, p. 121–127, 2007.

MEYER, E.; WIESE, M.; BRUCHHAUS, H.; CLAUSSEN, M.; KLEIN, A. Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. **Forensic Science International**, v. 113, p. 87 –90, 2000.

MULERO, J. J.; CHANG, C. W.; CALANDRO, L. M.; GREEN, R. L.; LI, Y.; JOHNSON, C. L.; HENNESSY, L. K. Development and validation of the AmpFISTR® Yfiler™ PCR amplification kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system. **Journal of Forensic Science**, v. 51, n. 1, p. 64-75, 2006.

PENA, S.D. J. & JEFFREYS, A. J. Breve introdução às impressões digitais de DNA. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, n. 3, p. 857-879, 1993.

PINHEIRO, M. F. Genética, Biologia Forense e Criminalística. In: Noções Gerais Sobre Outras Ciências Forenses. Porto: Faculdade de Medicina do Porto, 2004. 58 p.

RAMEL, C. Mini- and Microsatellites. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, supplement. 4, junho 1997.

RICAUT, F. X; KEYSER-TRACQUI, C.; CRUBEZY, E.; LUDES, B. STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. **Forensic Science International**, v.151, p. 31–35, 2005.

SAAD, R. Discovery, development, and current applications of DNA identity testing. **BUMC Proceedings**, v. 18, p. 130-133, 2005.

SARFIELD, P.; WICKHAM, C. L.; JOYNER, M. V.; ELLARD, S.; JONES, D. B.; WILKINS, B. S. Formic acid decalcification of bone marrow trephines degrades DNA: alternative use of EDTA allows the amplification and sequencing of relatively long PCR products. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 53, p. 336–337, 2000.

SILVA, L. A. F. & PASSOS, N. S. **DNA Forense: coleta de amostras biológicas em locais de crime para estudo de DNA**. Maceió: Editora Universitária Edufal, 2002. 86 p.

SOBRINO, B., BRIÓN, M.; CARRACEDO, A. SNP in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic Science International**, v. 154, p. 181–194, 2005.

SPEX. **Pulverizing and Blending: Freezer/Mills and Their Uses**. 2008. Disponível em: < <http://www.spexcsp.com/sampleprep/catalog/aid34.html> >. Acesso em 10 de janeiro de 2009.

STAITI, N.; DI MARTINO, D.; SARAVO, L. A novel approach in personal identification from tissue samples undergone different processes through STR typing. **Forensic Science International**, v.146S, p. S171–S173, 2004.

TAKAYANAGI, K.; ASAMURA, H.; TSUKADA, K.; OTA, M.; SAITO, S.; FUKUSHIMA, H. Investigation of DNA extraction from hair shafts. **International Congress Series**, v. 1239, p. 759-764, 2003.

TETI, A. & ZALLONE, A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. **Bone**, v. 44, p.11–16, 2009.

VALLONE, P. M., JUST, R. S., COBLE, M. D., BUTLER, J. M., PARSONS, T. J. A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNP distributed throughout the mitochondrial genome. **International Journal Legal Medicine**, v. 118, n.3, p. 147-157, 2004.

VELLOSO, G. R. Fraturas: origem e tratamentos. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 3, n. 2, p. 297-301, jul./dez. 2005

YE, J.; JI, A.; PARRA, E. J.; ZHENG, X.; JIANG, C.; ZHAO, X.; HU, L.; TU, Z. A simple and efficient method for extracting dna from old and burned bone. **Journal of Forensic Science**, v. 49, n. 4, p. 1-6, julho 2004.

WICKENHEISER, R. A. & HONS, B. S. TRACE. DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact. **Journal of Forensic Science**, p. 442-450, 2001.

WURMB-SCHWARK, N.; SCHWARK, T.; HARBECK, M.; OEHMICHEN, M. A simple Duplex-PCR to evaluate the DNA quality of anthropological and forensic samples prior short tandem repeat typing. **Legal Medicine**, v. 6, p. 80–88, 2004.

WURMB-SCHWARK, N. V.; HARBECK, M.; WIESBROCK, U.; SCHROEDER, I.; RITZ-TIMME, S.; OEHMICHEN, M. Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones. **Legal Medicine**, v. 5, p. S169–S172, 2003.

6 MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Extração de DNA de ossos humanos, sem pulverização, para uso em identificação forense

Hérika G. A. Carvalho^{1,2}, Vanduir S. A. Filho^{1,2,3}, Gisleyde V. Bastos², Ana C. B. D. Giustina^{1,2}, Luana C. B. B. Coelho¹

1- Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Rua Nelson Chaves, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil – CEP: 50670-420.

2- Instituto de Polícia Científica, Av. Antônio Teotônio, s/n, Cristo Redentor, João Pessoa – PB, Brasil – CEP 58071-620.

3- Institutos Paraibanos de Educação – IPÊ, Campus Universitário, Br 230, Km 22, João Pessoa PB, Brasil - CEP: 58053-000.

Manuscrito a ser encaminhado à revista

Forensic Science International

ISSN 0379-0738

Elsevier Journals

Resumo

O uso de tecido ósseo como substrato na obtenção de DNA para estudo de *loci* STR é bastante útil em ciência forense, especialmente na identificação de restos mortais. Algumas técnicas de extração de DNA de material ósseo incluem uma incubação prévia do material pulverizado em EDTA como etapa de descalcificação. Neste trabalho, alíquotas de amostras de osso foram submetidas à extração de DNA pelo método orgânico tradicional com pré-tratamento de descalcificação em EDTA sem pulverização prévia e resultaram em quantidades de DNA compatíveis com a obtenção de perfis genéticos com amplificação simultânea de 16 regiões (*loci*) STR. Portanto, esta técnica é adequada para emprego em ciência forense.

Palavras-chave: Extração de DNA; Tecido Ósseo; Identificação Forense.

Introdução

O uso de tecido ósseo como substrato na obtenção de DNA para estudo de *loci* STR é bastante útil em ciência forense, especialmente na identificação de restos mortais. Cerca de 70% da matriz óssea é constituída pelo mineral hidroxiapatita que inclui fosfato de cálcio, carbonato de cálcio, fluoreto de cálcio e hidróxido cálcio e citrato. A grande quantidade destes minerais no tecido ósseo dificulta o acesso e a ação dos reagentes de extração e, portanto, representam uma barreira para a obtenção de DNA.

A maioria dos protocolos atuais para extração de DNA de ossos e dentes é fundamentada na incubação de material pulverizado em um tampão de extração contendo EDTA (acrônimo do inglês: *ethylenediamine tetraacetic acid*, ácido etilenodiamino tetra-acético). Em alguns destes protocolos é empregada uma incubação prévia do material pulverizado em EDTA como etapa de descalcificação [4]. A descalcificação pelo EDTA tem pouco ou nenhum efeito sobre a estrutura do DNA do tecido ósseo, outras técnicas de descalcificação baseadas na utilização de ácidos modificam ou degradam DNA e, portanto, são inadequadas para estudos que contém alguma etapa de obtenção de DNA [1].

Neste trabalho é apresentado um eficiente protocolo para obtenção de DNA em amostras de osso, com descalcificação da matriz óssea por meio do quelante EDTA, sem a etapa de pulverização da amostra.

Materiais e métodos

Amostras

Neste experimento foram utilizadas seis amostras de fêmur de duas ossadas humanas expostas a condições ambientais diversas – como calor, chuva e umidade – por um período de pelo menos três meses.

Descalcificação

Fragmentos de osso de cerca de 1cm², cortados com uma ferramenta rotatória tipo Dremel®300series, foram incubados por cinco dias em 20 mL de uma solução de EDTA 0,5M. Após a incubação, a parte desmineralizada dos ossos foi retirada com o auxílio de uma lâmina de bisturi.

Extração

Entre 0,2 e 0,3 gramas de cada amostra de osso descalcificado, foram incubadas a 56°C *overnight*, em 600 µL do tampão de extração (10 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 2% SDS, pH 8,0), 60 µL de Proteinase K e 30 µL de DTT. Após o período de incubação, foram adicionados 600 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1, v/v/v) em seguida as amostras foram submetidas à agitação até a formação de uma emulsão leitosa e centrifugadas por 7 minutos a 9700 g (Eppendorf 9500 rpm – ALC 12000 rpm). A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo, filtrada em filtro Microcon® e o material retido no filtro foi dissolvido em 50 µL de água ultra pura (Milli Q).

Análise de STR

A amplificação dos *loci* Short Tandem Repeat (STR) foi feita utilizando o sistema Identifiler™ (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os procedimentos de PCR foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante [2]. Os produtos de PCR foram separados em um seqüenciador genético *Applied Biosystems* 3130, e analisados usando software Genemapper versão ID 3.2 para determinação dos alelos nos eletroferogramas, utilizando escada alélica que acompanha o kit Identifiler™ como referência.

Controles positivos e negativos foram incluídos em cada etapa do estudo e não foi observado qualquer sinal de contaminação.

Resultados

Alíquotas de duas amostras de osso que foram submetidas à extração de DNA pelo método orgânico tradicional não resultaram na obtenção de um perfil genético (dados não mostrados). Alíquotas do mesmo material quando foram submetidas ao protocolo de extração com pré-tratamento de descalcificação em EDTA sem pulverização, seguida de uma etapa de lise pelo método fenol-clorofórmio tradicional [9] resultaram em perfis genéticos completos [FIGURA 1].

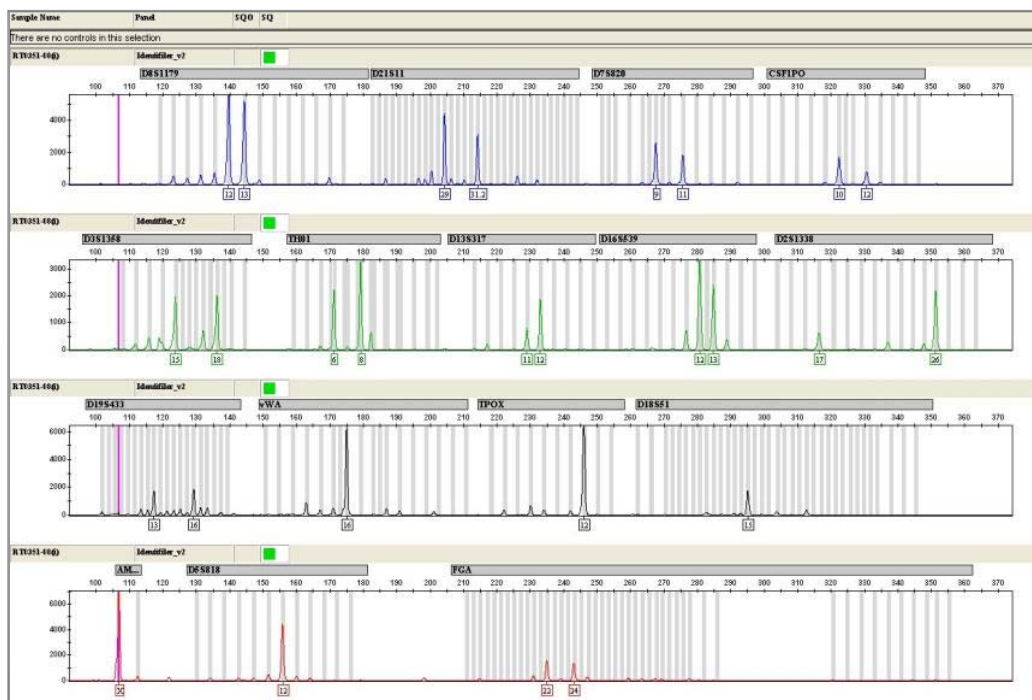


FIGURA 1. Perfil genético obtido de uma amostra de osso por meio de extração com descalcificação sem pulverização. Esta mesma amostra quando submetida a várias extrações pelo método orgânico com pulverização em moinho mineralógico não resultou em perfil genético em condições de análise e confronto.

Discussão

Em ciência forense, o resultado da PCR (acrônimo do inglês: Polimerase Chain Reaction, reação em cadeia da polimerase) pode ser significativamente modificado por impurezas como, por exemplo, inibidores da enzima DNA polimerase que estão naturalmente presentes na matéria prima utilizada como fonte de DNA. Portanto, a escolha do tampão de lise é uma etapa fundamental para o êxito de um protocolo de extração. Estudos relacionados à determinação de tampões de extração são freqüentemente publicados [8, 9].

O emprego de moinhos criogênicos como o *Freezer Mill* em procedimentos de pulverização de ossos [7] aumenta consideravelmente as possibilidades de obtenção de DNA deste material. De fato, as partículas de pó de osso obtido com o *Freezer Mill* são de tamanho menor e mais homogêneo que aquelas obtidas, por exemplo, com o emprego de moinhos mineralógicos. Esta propriedade assegura resultados sensivelmente melhores para obtenção de DNA em amostras ósseas pulverizadas com moinhos criogênicos.

Amostras pulverizadas com o moinho criogênico de impacto submetidas ao protocolo de extração pelo método orgânico tradicional apresentaram uma quantidade considerável de resíduos, o que determina uma lise parcial do material ósseo e, conseqüentemente, uma extração parcial do DNA nele presente. As amostras de osso não pulverizado submetidas ao pré-tratamento com EDTA e à extração pelo método orgânico tradicional resultaram em um produto sem resíduos sólidos, um indicativo de que houve lise total do material ósseo e uma extração total do DNA da amostra.

Loreille *et al.* (2007) propuseram uma técnica de extração para material ósseo pulverizado em moinho criogênico de impacto (CertiPrep 6750 Freezer Mill, Spex/Mill, Spex, Metuchen, NJ) contendo uma etapa de desmineralização com EDTA 0,5 M, pH 8,0, cuja eficácia foi ratificada por Desmyter & Greef (2008). O emprego de moinho criogênico de impacto como o *freezer mill* para pulverização de material ósseo está condicionado à manipulação de nitrogênio líquido, acidentes fatais relacionados com o uso de nitrogênio líquido são freqüentemente descritos na literatura [5, 6]; portanto, o investimento na aquisição do moinho e a manipulação rotineira de nitrogênio líquido representam desvantagens da técnica proposta por Loreille *et al.* (2007). O nosso protocolo utiliza uma quantidade menor de material para extração de DNA de ossos e não inclui a etapa de pulverização, tornando desnecessário o emprego do moinho criogênico de impacto e, conseqüentemente, do nitrogênio líquido.

Para minimizar os riscos de contaminação, após a pulverização de material ósseo os moinhos são submetidos a uma lavagem criteriosa. A eliminação da etapa de pulverização diminui os riscos de contaminação e torna o processo de extração DNA de ossos mais simples, seguro e barato. Segundo Budowle & Brown (2001), o

protocolo de extração ideal é aquele que serve para a grande maioria das amostras, é de simples execução e possui baixo custo para o laboratório.

Conclusão

Os resultados obtidos indicam que o nosso protocolo de extração de DNA de ossos sem etapa de pulverização é seguro, apresenta menor custo e menor risco de contaminação que as técnicas em uso corrente, além de resultar em quantidades de DNA compatíveis com a obtenção de perfis genéticos com amplificação simultânea de 16 regiões (*loci*) STR sendo, portanto, adequado para emprego em ciência forense.

Referências

1. Alers, J. C., Krijtenburg, P.-J., Vissers, K. J., and van Dekken, H. Effect of Bone Decalcification Procedures on DNA *In Situ* Hybridization and Comparative Genomic Hybridization: EDTA Is Highly Preferable to a Routinely Used Acid Decalcifier. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry** v. 47, n. 5, p. 703–709, 1999.
2. AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit, User's Manual, Applied Biosystems, http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041201.pdf.
3. Budowle, B. & Brown, B. L. The use of DNA typing for forensic identification. **Forénsica**, v.1, n. 1, p. 23-37, 2001.
4. Hagelberg, E., Clegg, J.B., Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. **Proceedings. Biological Sciences** v. 244, n. 1309, p. 45–50, 1991.
5. Kernbach-Wighton, G., Kijewski, H., Schwanke, P., Saur, P., Sprung, R. Clinical and morphological aspects of death due to liquid nitrogen **International Journal of Legal Medicine** v. 111, n. 4, p. 191-195, 1998.
6. Kim, D. H & Lee, H. J. Evaporated liquid nitrogen-induced asphyxia: a case report. **Journal of Korean Medical Science**. v. 23, p. 163-165, 2008.
7. Loreille, O. M., Diegoli, T. M.; Irwin, J. A.; Coble, M. D.; Parsons, T. J. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. **Forensic Science International: Genetics** v. 1, p. 191–195, 2007.

8. Rohland, N. & Hofreiter, M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. **BioTechniques**, v. 42, p. 343-352, 2007.
9. Ye, J.; Ji, A.; Parra, E. J.; Zheng, X.; Jiang, C.; Zhao, X.; Hu, L.; and Tu, Z. A simple and efficient method for extracting DNA from old and burned bone. **Journal of Forensic Science**. v. 49, n. 4, p. 1-6, 2004.

7 CONCLUSÕES

- O uso do quelante EDTA auxilia na obtenção de DNA de amostras ósseas, não interferindo na estrutura desse material genético;
- A pulverização do osso não é uma etapa fundamental no processo de extração de DNA deste tecido quando se utiliza uma etapa de desmineralização;
- O protocolo de extração de DNA de ossos com uma etapa de desmineralização e sem uma etapa de pulverização apresentou resultados melhores do que aqueles obtidos com o protocolo padrão;
- Os resultados obtidos são adequados para o emprego em ciência forense, sendo compatíveis com a obtenção de perfis genéticos com amplificação simultânea de 16 regiões (loci) STR;
- A técnica mostrou-se mais simples e com menores custos do que a convencional, uma vez que reduz uma etapa do processo de obtenção de DNA de ossos e elimina o uso e a manutenção de estoques de nitrogênio líquido.

8 ANEXO

Instruções para autores

Revista Forensic Science International

ISSN 0379-0738

Elsevier Journals

FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL - FSI

Guide for Authors

INTRODUCTION

Forensic Science International is a peer-reviewed, international journal for the publication of original contributions in the many different scientific disciplines comprising the forensic sciences. These fields include, but are not limited to, forensic pathology and histochemistry, toxicology (including drugs, alcohol, etc.), serology, chemistry, biochemistry, biology (including the identification of hairs and fibres), odontology, psychiatry, anthropology, the physical sciences, firearms, and document examination, as well as the many other disciplines where science and medicine interact with the law.

Types of paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Forensic Anthropology Population Data
3. Preliminary Communications
4. Letters to the Editor
5. Case Reports
6. Book Reviews
7. Rapid Communications

Please note that all contributions of type 4 to 7 will be published as e-only articles. Their citation details, including e-page numbers, will continue to be listed in the relevant print issue of the journal's Table of Contents.

Announcement of Population Data: these types of articles will be published in Forensic Science International: Genetics, only. Please submit these articles via  <http://www.ees.elsevier.com/fsigen/>.

Review Articles and Preliminary Communications (where brief accounts of important new work may be announced with less delay than is inevitable with major papers) may be accepted after correspondence with the appropriate Associate Editor.

Forensic Anthropology Population Data: Although the main focus of the anthropology section of the journal remains on the publication of original research, authors are invited to submit their forensic anthropology population data articles by selecting the "Forensic Anthropology Population Data" article type on the online submission system. These forensic anthropology population data articles involve the application of already published and standardised methods of aging, sexing, determination of ancestry and stature and other well known diagnoses on different populations. This is at the heart of applied forensic anthropology. For example, in order to correctly assess age, stature or even sex of individuals of different ancestry or from different populations, it is fundamental that the method be tested on the specific population one is working on. In building the biological profile of a skeleton in order to aid identification, one needs to calibrate such techniques on the population of interest before applying them. The same may be true in a completely different scenario of anthropology, for example identifying criminals taped on video surveillance systems and aging victims of juvenile pornography. This section is dedicated to forensic anthropological population data and other types of updates (state of the art of particular issues, etc.), particularly concerning the following:

- Sexing
- Aging sub adult skeletal remains

- Aging adult skeletal remains
- Aging living sub adults and adults
- Determining ancestry
- Stature estimation
- Facial reconstruction
- Non metric trait distribution, pathology and trauma
- Positive identification of human skeletal remains
- Positive identification of the living

Forensic Anthropology Population Data articles will be published in abridged form in print (a clear, descriptive summary taken from the abstract), and the full length article will be published online only. Full citation details and a reference to the online article, including e-page numbers, will be published in the relevant print issue of the journal. All submitted manuscripts will be evaluated by a strict peer review process.

Case Reports will be accepted only if they contain some important new information for the readers.

Rapid Communications should describe work of significant interest, whose impact would suffer if publication were not expedited. They should not be longer than 5 printed journal pages (about 10 submitted pages). Authors may suggest that their work is treated as a Rapid Communication, but the final decision on whether it is suitable as such will be taken by the handling Associate Editor. Rapid Communications requiring revision should be resubmitted as a new submission.

Revisions deadline

Please note that articles that are sent to the author for revision need to be returned within four months. A reminder will be sent in the third month. Any articles that are sent after the fourth month period of revision will be considered a re-submission.

Contact details for submission

Papers for consideration should be submitted by topic. Editors and their topic specialty are listed below.

P. Saukko (Editor-in-Chief): Experimental Forensic Pathology, Traffic Medicine, and subjects not listed elsewhere

Tel: +358 2 3337543

Fax: +358 2 3337600

E-mail: psaukko@utu.fi

A. Carracedo: Forensic Genetics. Please note only review articles on this topic should be submitted to FSI. All non-review papers should be submitted to the FSI daughter journal devoted to this subject Forensic Science International: Genetics, via

<http://ees.elsevier.com/fsigen/>

Fax: +34 981 580336

E-mail: carrafsi@usc.es

C. Cattaneo: Osteology and Anthropology

Tel: +39 2 5031 5678

Fax: +39 2 5031 5724

E-mail: cristina.cattaneo@unimi.it

P. Margot: Questioned Documents and Physical Science: ballistics, tool marks, contact traces, drugs analysis, fingerprints and identification, etc.

Tel: +41 21 692 4605

Fax: +41 21 692 4605

E-mail: pierre.margot@unil.ch

O.H. Drummer: Toxicology

Tel: +61 3 9684 4334

Fax: +61 3 9682 7353

E-mail: olaf@vifm.org

G. Willems: Odontology

Tel: +32 16 33 24 59

Fax: +32 16 33 24 35

E-Mail: guy.willems@med.kuleuven.ac.be

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission Declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Additional information

Multiple submissions is not acceptable to the Editor, and any such papers, together with future submissions from the authors, will be rejected outright. Submission also

implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained Author Rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the Funding Source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language Services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://www.elsevier.com/journals>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even

though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

PREPARATION

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Article Structure

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential Title Page Information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Color Artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your

preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in Text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result"

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2000) 51-59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 1999, pp. 281-304.

Supplementary Material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ➡ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at ➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission Checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at  <http://epsupport.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The

assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from  <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site:  <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.