



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rosana Coutinho Freire Silva

**DESENVOLVIMENTO DE KIT E PROTOCOLO ALTERNATIVOS PARA COLETA E
EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS FORENSES E RESTOS MORTAIS
DEGRADADOS**

**Maceió
2018**

ROSANA COUTINHO FREIRE SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE KIT E PROTOCOLO ALTERNATIVOS PARA COLETA E
EXTRAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS FORENSES E RESTOS MORTAIS
DEGRADADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto, PhD

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Maceió/AL
Outubro/2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S586d Silva, Rosana Coutinho Freire.
Desenvolvimento de kit e protocolo alternativos para coleta e extração de DNA de amostras forenses e restos mortais degradados / Rosana Coutinho Freire Silva. – 2018.
98 f. : il.

Orientador: Cícero Eduardo Ramalho Neto.
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 67-71.
Anexos: f. 72-98.

1. Genética forense. 2. DNA - Ossos. 3. Descalcificação (Técnica genética).
I. Título.

CDU: 340.64:577.212

ROSANA COUTINHO FREIRE SILVA

Desenvolvimento de kit e protocolo alternativos para coleta e extração de DNA de amostras forenses e restos mortais degradados

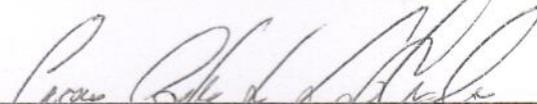
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 05/12/2018.

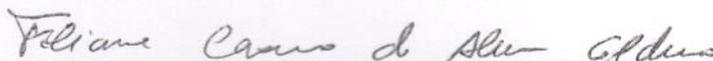
BANCA EXAMINADORA



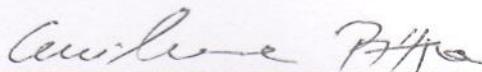
Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida
Universidade Federal de Alagoas – UFAL Arapiraca



Prof.ª Dr.ª Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta
Universidade Federal de Alagoas – UFAL Arapiraca
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - Uncisal



Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Aos meus pais José Francisco e Rubenita, pelos constantes exemplos de honradez e caráter e por terem me dado o maior tesouro que se pode deixar por herança: a educação.

Ao meu esposo, Clesivaldo, e aos meus filhos, Vinícius e Déborah, pelos laços de família, que não podem ser esquecidos jamais.

Aos homens e mulheres simples das Alagoas, que puderam enxergar um pouco de cidadania por meio do Laboratório de Genética Forense da Perícia Oficial de Alagoas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eduardo Ramalho Neto, pela orientação e transmissão do seu vasto conhecimento, contribuindo para minha formação e para a implantação do Laboratório de Genética Forense, da Perícia Oficial do Estado de Alagoas;

À Perícia Oficial de Alagoas, órgão do qual sou servidora pública, pelo apoio durante toda a pesquisa e pela oportunidade de me possibilitar ser feliz com meu trabalho;

Ao Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica – GEMPRO, por estar de portas abertas para quem vai buscar o conhecimento;

Aos graduandos estagiários, que me ajudaram durante a pesquisa no GEMPRO;

À Gerência Operacional de Análise em DNA do Estado da Paraíba, pelo apoio durante a pesquisa;

Ao Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense do Estado de Pernambuco, pelo apoio durante a pesquisa;

A todo o corpo docente pelo qual passei no programa de doutorado RENORBIO, pela competência com que nos transmitiram seus conhecimentos, nos conduzindo ao aprendizado;

Ao Governo do Estado de Alagoas, nas pessoas do Governador, Renan Calheiros Filho e do Secretário de Estado da Segurança Pública, Paulo Domingos Lima Júnior, por efetivar avanços imprescindíveis na Perícia Oficial de Alagoas;

A minha querida colega de trabalho e amiga, Cláudia Couto, pelo apoio incondicional para que eu chegasse até aqui;

Aos colegas Peritos Criminais, Peritos Médico-Legistas, Peritos Odonto-Legistas e Técnicos Forenses pelo compartilhamento do conhecimento no trabalho diário;

A minha família, porto seguro nos momentos difíceis;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para idealização, desenvolvimento e conclusão do presente trabalho.

Resumo

A robustez da molécula de DNA, aliado ao fato de que ela contém informação digital, torna-a ideal como fonte de identificação que resiste ao tempo e às agressões ambientais impostas a amostras presentes em locais de crime, porém esses mesmos fatores fazem com que essas amostras apresentem DNA em baixa concentração e com degradações em sua estrutura química. A recuperação de material genético de remanescentes de esqueletos humanos é parte essencial para a identificação humana forense, pois a identificação genética pelo DNA é um método que supera todos os outros métodos existentes, dentre eles, a identificação por impressões digitais e a identificação por arcada dentária. Para que se tenha êxito na obtenção de DNA de amostras de ossos degradados e se obtenha um eletroferograma com a quantidade mínima de marcadores recomendados pela comunidade científica forense, é imprescindível que se proceda a técnicas mais modernas de extração e purificação de DNA. Dentre essas técnicas, temos a desmineralização de ossos e dentes pulverizados em moinhos específicos, seguida de extração orgânica tradicional, em que não se consegue a lise total das células, o que muitas vezes gera perfis eletroforéticos incompletos. Considerando, que na área forense, é iminente a necessidade de obtenção de DNA de ossos e dentes por meio de protocolos simples e eficazes, o presente trabalho pretendeu aperfeiçoar o método de descalcificação desses materiais biológicos, de modo a se conseguir um DNA de alta qualidade em amostras de ossos antigos, já nas primeiras tentativas de extração, gerando eletroferogramas com a detecção de alelos em todos os marcadores recomendados pela comunidade forense. Nesse sentido, o nosso protocolo de extração alternativo mostrou-se eficiente, pois possibilitou o isolamento de DNA de alta qualidade de um osso de 17 anos de inumado e de dentes de 3 anos de inumado, de modo a apresentar um perfil genético completo com os sistemas *PowerPlex Fusion 6C* e *PowerPlex Fusion*, ambos da empresa *Promega Corporation* e com o sistema *GlobalFiler®* da empresa *Life Technologies*. Em relação ao DNA de toque, quando um crime é cometido, o autor pode depositar algumas células da pele em objetos presentes na cena de crime. Se o objeto tocado é coletado, possíveis evidências ali existentes podem ser identificadas pela análise do DNA de toque, possibilitando-se ligar o criminoso à cena do crime. Para a coleta de DNA de toque em cenas de crime ou em laboratórios forenses de testes para DNA, algumas técnicas convencionais são utilizadas, porém estas têm se mostrado muitas vezes ineficiente, pois esse tipo de amostra biológica apresenta escasso número de células e conseqüente baixa quantidade de DNA que geralmente é deixada nos suportes, quando da realização da coleta. Outro problema verificado é a contaminação por amostras biológicas de outras pessoas, por esses motivos, para obtenção de bons resultados de DNA de toque, são necessários adequados coleta e armazenamento desses materiais, bem como, a utilização subsequente de uma técnica de extração ideal para se recuperar o maior número de cópias de DNA possível. Diante do exposto, registramos a patente n.º BR 10 2018 071232 2, que tem por finalidade precípua a produção de um kit contendo coletores e solução extratora para DNA de toque, presente em amostras biológicas humanas coletadas em locais de crime em diferentes suportes, com finalidade de vinculação biológica criminal forense.

Palavras chave: DNA Forense, DNA de ossos, Descalcificação de ossos, DNA de toque.

Abstract

The robustness of the DNA molecule, coupled with the fact that it contains digital information, makes it ideal as a source of identification which resists weather and environmental aggressions imposed on samples found in crime scenes, but these same factors make these samples exhibiting low DNA concentration and with degradation in your chemical structure. The recovery of remaining genetic material of human skeletons is essential part human forensic identification, because the genetic identification by DNA is a method that outperforms all other existing methods, including the identification fingerprints and dental records identification. In order to succeed in obtaining DNA from bone samples degraded and produce an eletropherogram with the minimum amount of recommended by the scientific community forensic markers, it is imperative that the most modern techniques of extraction and DNA purification. Among these techniques, we have the bone and tooth demineralization pulverized in specific Mills, followed by traditional organic extraction, in that you don't get the total cell lysis, which often generates the electrophoretic profiles. Considering that in forensics, is the imminent need for obtaining DNA from bones and teeth by using simple and effective protocols, this work is intended to improve the descaling method of these biological materials in order to achieve a High quality DNA samples from ancient bones, in the first attempts of extraction, generating eletropherograms with the detection of alleles in all markers recommended by forensic community. In this sense, our alternative extraction protocol proved to be efficient, because it allowed the isolation of high quality DNA from the bone of 17 years of buried and 3 years of teeth buried in order to present a complete genetic profiles with PowerPlex Fusion 6C and PowerPlex Fusion, both from company Promega Corporation and with the GlobalFiler® system of company Life Technologies. In relation to the touch DNA, when a crime is committed, the author can deposit some skin cells into objects present at the crime scene. If the object is touched is collected, possible evidence existing there can be identified by DNA analysis, enabling the criminal to the crime scene. For the collection of touch DNA from crime scenes or in forensic DNA testing laboratories, some conventional techniques are used, but these have been shown to often inefficient, because this type of biological sample presents scarce number of cells and consequent low amount of DNA that is usually left in brackets when the day of collection. Another problem checked is contamination by biological samples of other people, for these reasons, to obtain good results of DNA, are necessary suitable collection and storage of these materials, as well as the subsequent use of an optimal extraction technique to recover the largest possible DNA copy numbers. On the exposed, we register the Patent No. 10 2018 071232 2 BR, which main purpose is the production of a kit containing collectors and extracting solution for DNA, present in human biological samples collected at crime scenes in different media with binding criminal forensic biological purpose.

Keywords: Forensic DNA, DNA bones, Decalcification of bones, Touch DNA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Objetivos	13
1.1.1. Objetivo Geral	13
1.1.2. Objetivos Específicos	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 O Tecido Ósseo como Fonte de DNA para Identificação Humana	24
2.2 Métodos de Extração de DNA em Tecido Ósseo	26
2.2.1 Descalcificação do Tecido Ósseo	28
2.2.2 Pulverização versus não Pulverização do Material Ósseo	30
2.2 DNA de Toque	31
ARTIGO I	36
ARTIGO II	52
3 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	72

1 Introdução

Nos últimos 60 anos, ocorreu uma revolução no entendimento do mundo vivo, e a base dessa revolução foram as descobertas da pesquisa genética. A molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) está sendo o ponto central de interesse dos geneticistas, mas também se tornou uma espécie de logomarca para as ciências da vida como um todo (GRIFFITHS *et al*, 2013).

O período de 1970 a 1980 foi marcado pelo desenvolvimento das principais técnicas moleculares que subsidiaram o avanço da Genética Forense como ferramenta indispensável na identificação humana. Dentre essas técnicas destacam-se: a análise de polimorfismos de minissatélites, por Alec Jeffreys; o aprimoramento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, por Kery Mullis; e o sequenciamento de moléculas de DNA, por Frederick Sanger (FRANCEZ *et al*, 2016).

Essas técnicas tornaram a identificação genética pelo DNA um método que supera todos os outros métodos existentes, dentre eles, a identificação por impressões digitais e a identificação por arcada dentária, métodos estes que apresentam restrições, uma vez que as impressões digitais estão presentes apenas nas faces palmar das mãos e plantar dos pés, tendo registro por determinação legal, apenas para as impressões dos dedos das mãos, já os dados de arcada dentária, apenas são registrados quando as pessoas se submetem a tratamento dentário com profissional dessa área, o que não é comum em pessoas de baixo poder aquisitivo, a exemplo do Nordeste do Brasil, por outro lado, o DNA está presente em todos os fluidos e tecidos biológicos humanos.

A robustez da molécula de DNA, aliado ao fato de que ela contém informação digital, torna-a ideal como fonte de identificação que resiste ao tempo decorrido e às agressões ambientais impostas a amostras presentes em locais de crime, porém esses mesmos fatores fazem com que essas amostras apresentem DNA em baixa concentração e com degradações em sua estrutura química. (GARRIDO *et al.*, 2016).

Para MORETI (2009), em cadáveres, cujo tempo de morte seja maior que dois anos, o material biológico de escolha são os ossos, tendo em vista que os tecidos moles já não existem mais, os dentes se perdem com facilidade e os cabelos, caso ainda existam, possuem quantidades exíguas e degradadas de DNA. Já a extração de tecidos duros como os ossos, propiciam resultados mais satisfatórios, pois se tornam um depósito natural de ácidos nucleicos protegidos do meio ambiente. Entretanto, após a morte, não mais existe o balanceamento do processo de reparo, o que gera danos progressivos e cumulativos, motivo pelo qual, os ácidos nucleicos vão gradualmente sendo degradados por meio de processos de hidrólise e oxidação.

O DNA é uma molécula orgânica, polimérica, formada pela repetição de monômeros compostos por moléculas de açúcar (desoxirribose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada, que pode ser Adenina, Citosina, Timina e Guanina (A, C, T, G).

CARVALHO (2009) expõe que a degradação do DNA pode parti-lo em pequenos fragmentos de menor tamanho (entre 100 e 500 pares de bases). Essa amostra, quando genotipada, gera um eletroferograma característico, com visualização de *locus* de menor tamanho e uma perda de amplificação dos marcadores de dimensões maiores. Nesse sentido, a degradação causa a não obtenção de resultados, mas nunca o surgimento de um genótipo diferente daquele correspondente à amostra respectiva.

Para que se tenha êxito na obtenção de DNA de amostras de ossos degradados e se obtenha um eletroferograma com a quantidade mínima de marcadores recomendados pela comunidade científica forense, é imprescindível que se proceda a técnicas mais modernas de extração e purificação de DNA. Dentre essas técnicas, a maioria dos laboratórios forenses utiliza o procedimento de pulverização da amostra em moinhos específicos, seguida de meios automatizados de extração, método que, para amostras críticas (de alto intervalo pós-morte) não consegue a lise total das células, nem o isolamento do DNA para amplificação, gerando perfis eletroforéticos incompletos FERREIRA *et al*, (2013).

Considerando, que na área forense, é iminente a necessidade de obtenção de DNA de ossos e dentes por meio de protocolos simples e eficazes, o presente trabalho pretende aperfeiçoar o método de descalcificação desses materiais biológicos, de modo a se conseguir um DNA de alta qualidade em amostras de ossos antigos, já nas primeiras tentativas de extração, gerando eletroferogramas com a detecção de alelos em todos os marcadores recomendados pela comunidade forense DESMYTER *et al*, (2017).

Diante do exposto, e tendo em vista que as análises dos polimorfismos do DNA (regiões do genoma nas quais existem variações entre pessoas sadias) possibilitam traçar um perfil genético totalmente indivíduo-específico, e que o DNA está presente em qualquer material biológico do corpo humano, inclusive nos fluídos excretados, como por exemplo, sangue, saliva, sêmen, e também em células epiteliais liberadas da pele, propõe-se neste trabalho, também, estudos relacionados a DNA de toque (*Touch DNA*).

O DNA de toque, para fins forenses, preconiza a recuperação (isolamento) do material genético de células da pele, depositadas pelo autor do delito em suportes diversos. Essas células podem ser encontradas, em locais de crime, nos mais diversos suportes, tais como, superfícies de madeira, ferro, plástico, vidro, borracha e até tecidos de vestuários e outros, após serem tocados por alguém (VELHO *et al*, 2013).

Alguns dos problemas que esse tipo de amostra biológica apresenta são: o escasso número de células e conseqüente baixa quantidade de DNA que geralmente é deixada nos suportes, bem como, contaminações por amostras biológicas de outras pessoas. Se cada contato deixa um traço, como Edmond Locard (1877-1966 – Lyon, França) declarou em seu Fundamentado Princípio de Troca, então devemos estar preparados para deparar com essas limitações e recuperar esse DNA deixado nas cenas de crime.

Amostras de toque, pela sua natureza não contêm grandes quantidades de material biológico, especialmente em comparação com fluidos biológicos como sangue, sêmen ou saliva. Conseqüentemente, requerem armazenamento e recuperação mais cuidadosos, a fim de maximizar a quantidade de DNA disponível. Por esses motivos, todas as amostras de DNA devem ser manipuladas

cuidadosamente, pois são suscetíveis à degradação e/ou contaminação por condições ambientais ou pela própria manipulação durante a recuperação e antes da extração do DNA, o que faz com que muitas vezes seja amplificado um DNA exógeno. Técnicas que maximizam a estabilidade e recuperação do DNA de toque melhoram a possibilidade de gerar um perfil de DNA utilizável (KIRGIZ & CALLOWAY, 2017).

O DNA de toque também pode ser obtido a partir do toque de agressores em suas vítimas, MINOR (2013) afirma que, em uma ocasião, fez esfregaços com suabe em suas próprias mãos, após apertos de mão e, após extração do DNA presente no suabe, o laboratório foi capaz de obter uma mistura do seu DNA, com mais dois outros indivíduos.

A lista de suportes possíveis para depósito de DNA de toque inclui regiões internas de bolsos de vestes, revestimentos e superfícies de armas brancas ou de fogo, asfalto, cadarços, *sticks* de motocicletas, dentre outros.

1.1 Objetivos

Diante do exposto o presente trabalho tem como objetivos:

1.1.1 Geral

- Utilização de biotecnologias inovadoras para o desenvolvimento de kit e protocolo alternativo para coleta e extração de DNA de amostras forenses humanas, aplicados a vestígios de cenas de crime e a restos mortais degradados, visando à identificação forense.

1.1.2 Específicos

- Efetuar a completa desmineralização de ossos e dentes antigos de restos mortais humanos;
- Obter DNA de amostras de ossos humanos antigos desmineralizados, referentes a casos criminais, com finalidade de identificação forense;

- Obter DNA de toque existente em amostras biológicas humanas presentes em locais de crime em diferentes suportes, com finalidade de vinculação biológica forense;
- Avaliar a extração de DNA de ossos antigos degradados e de DNA de toque coletados em locais de crime, com a utilização do protocolo alternativo desenvolvido;
- Comparar os resultados obtidos por meio da utilização do kit e do protocolo alternativo, com resultados obtidos por protocolos convencionais utilizados para amostras forenses.

Abordagem pelo método de *Vancouver*

As normas de Vancouver são um conjunto de regras para a publicação de trabalhos no âmbito das ciências da saúde e receberam esse nome devido à uma reunião que foi realizada na cidade de Vancouver, no Canadá, em 1978.

Nesta reunião, surgiu o Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas e também o estilo Vancouver, que foi desenvolvido pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos e diz respeito ao modo de se fazer uso de citações e referências bibliográficas nas produções acadêmicas e científicas.

No Brasil, o mais conhecido desse conjunto de padrões são as normas ABNT, porém existem diversas outras padronizações que podem ser utilizadas.

De acordo com SANTOS *et al* (2007), para Estudos Baseados em Prática - EBP, é proposto que problemas clínicos que emergem da prática de cuidados, de ensino ou investigação sejam decompostos e organizados usando a estratégia PICO.

O PICO representa um acrônimo para paciente ou população, intervenção, comparação e resultado/conclusão (outcome). Esses quatro componentes são os elementos essenciais da pesquisa em EBP e da construção da questão para a pesquisa bibliográfica de provas.

A estratégia PICO pode ser usada para construir vários tipos de perguntas de pesquisa, originou-se da prática clínica, gestão de recursos humanos e materiais, a busca de instrumentos de avaliação do sintoma, entre outros. A questão de investigação adequada (bem construída) permite a definição correta de quais informações (provas) são necessárias para resolver a questão de pesquisa clínica, maximiza a recuperação de provas no banco de dados, enfoca o escopo de pesquisa e evita busca desnecessária (SANTOS *et al*, 2007).

Uma vez que a questão de pesquisa é formulada, a etapa seguinte é o início da pesquisa bibliográfica para a prova, o que permite a recuperação de provas nos bancos de dados, e pode ser esquematizada nas fases seguintes.

P	I	C	O
População	Intervenção	Comparação	<i>Outcome</i>
Ossos de corpos com mais de 2 anos de inumado e DNA de toque em cenas de crime	Kit e Protocolo alternativos para coleta e extração de DNA	Métodos tradicionais de coleta e extração de DNA	Tempo e qualidade do DNA extraído

Pergunta da pesquisa:

O kit e o protocolo alternativos de coleta e extração de DNA de toque e de ossos antigos são mais eficientes do que os atualmente utilizados?

Hipótese:

A qualidade do DNA coletado e extraído com o kit e protocolo alternativos é melhor que com os protocolos convencionais e o tempo de extração é reduzido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A recuperação de material genético de remanescentes de esqueletos humanos é uma parte essencial de pesquisas arqueológicas e forenses. Entretanto há pouco entendimento sobre concentrações relativas de DNA presente nos diferentes tecidos e o impacto dos métodos de amostragem do DNA extraído, bem como, do papel das taxas de degradação ambiental determinadas na conservação do DNA nas espécies (ADLER *et al.*, 2011).

Por esse motivo, um dos maiores desafios para a área de Segurança Pública e Judiciária tem sido a identificação de cadáveres em adiantado estado de decomposição ou esqueletização e isso tem gerado muita angústia para os profissionais da área e, principalmente, para os familiares dessas vítimas, que perderam seus parentes e têm direito a respostas do ente governamental (SANTOS, 2014)

Há alguns anos, os métodos de identificação desses cadáveres se restringiam a estudos antropológicos e médico-legais. Com o avanço das descobertas genéticas passou-se a utilizar, para esse tipo de identificação, as informações contidas no DNA, que apresentam as propriedades de: unicidade (é único em cada indivíduo), imutabilidade (não muda com o tempo de vida do indivíduo), perenidade (existe desde a célula ovo e permanece no esqueleto), praticabilidade (permite aos responsáveis uma coleta segura e prática das amostras), classificabilidade (permite a comparação entre dados, de forma precisa e sistemática), reprodutibilidade (capacidade de se produzir os dados) e hereditariedade (é transmitido pelos pais, de forma matemática, possibilitando cálculos estatísticos de probabilidade de parentesco) (PACHECO, 2010).

Por isso, dentre as metodologias atualmente utilizadas para a identificação de seres humanos, destaca-se o DNA (ácido desoxirribonucleico), principalmente em casos que envolvem crimes, locais em que são encontrados materiais biológicos diversos, tanto da vítima quanto do autor, porém, na maioria das vezes, esses materiais se encontram em quantidades ínfimas e/ou degradados (ZEITKIEWICZ *et al.*, 2012)

De acordo com WATSON *et al* (2006), a compreensão da estrutura e das características do pareamento de bases do DNA e do RNA possibilitou o desenvolvimento de técnicas de hibridização e de sequenciamento, que por sua vez permitiram a análise rápida e detalhada da estrutura e da expressão gênica. Particularidades das atividades das DNA-polimerase, endonucleases de restrição e DNA-ligases¹ viabilizaram o surgimento da técnica da reação em cadeia da polimerase *in vitro*, que permitiu o isolamento de praticamente qualquer segmento de DNA – mesmo de algumas formas pré-históricas de vida – em quantidades limitadas. O sucesso de tais métodos tem sido uma das principais forças propulsoras da biologia molecular nas últimas décadas, assim como, um de seus grandes triunfos.

Os primeiros testes de DNA para a análise da individualidade humana foram desenvolvidos por Alec Jeffreys – professor da Universidade de Leicester, na Inglaterra, que publicou um artigo na revista Nature em 1986, sobre certas regiões do genoma humano que produziam as chamadas impressões digitais do DNA - *DNA fingerprint*.. A partir da descoberta de sequências repetidas do genoma humano, que Jeffreys batizou de VNTRs (Repetições de Número Variável em Tandem), tendo estas, o comprimento de 400pb a 1000pb, com unidades de repetição de 9 a 30pb que se repetem uma após a outra, denominadas minissatélites² (FRANCEZ *et al*, 2016).

As VNTRs são regiões não-codificantes do genoma³, isto é, que não são transcritas em RNA e, por conseguinte, não transcrevem proteínas, caracterizam-se por serem altamente polimórficas e hipervariáveis, variando entre os indivíduos de uma população (JEFFREYS *et al*, 1985). Essas sequências são consideradas bons marcadores moleculares utilizados em identificação humana por incluírem um padrão de herança Mendeliana, em que os pais doam alelos aos filhos, sendo a metade dos fragmentos de minissatélites destes, doada pelo pai e a outra metade, pela mãe (JEFFREYS *et al*, 1986).

¹ Enzima de adesão de DNA. Se dois pedaços de DNA tiverem terminações complementares, a ligase pode ligá-las para formar uma molécula de DNA única e contínua.

² Sequência de vários nucleotídeos, como por exemplo, (AATGCCGTACTGAGCC)_n, repetidas em números diferentes no genoma de cada indivíduo, dando-lhe uma característica única.

³ Apenas 2% do genoma humano codificam proteínas que irão definir fenótipos, os outros 98% do genoma humano não codifica proteínas (Molly *et al.*, 2014).

Apesar de ter seu pioneirismo reconhecido, a técnica do DNA *fingerprint*, como técnica de identificação humana, apresentava alguns entraves, como a demora na realização dos exames, o alto custo financeiro e a difícil interpretação dos resultados (SANTOS, 2014). Foi com o advento da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (*in vitro*), que a tipagem de DNA teve um significativo refinamento, tendo em vista que, a PCR ocorre por meio de uma reação enzimática que amplifica trechos pré-determinados dos ácidos nucleicos, reproduzindo, a partir de um pequeno fragmento de DNA que se quer amplificar, todo o processo de replicação. Por meio dessa técnica, pequenas quantidades de DNA podem ser amplificadas, incluindo amostras com DNA degradado por fatores diversos (JOBIM, 2005).

Após a descoberta dessa técnica, descobriu-se também um novo tipo de sequências repetitivas do genoma humano: as STR (Repetições Curtas em Tandem). Essas sequências foram denominadas microssatélites, que se caracterizam como regiões hipervariáveis do genoma humano, com cerca de 100 a 400 pb (pares de bases) de comprimento, formadas por pequenos fragmentos de DNA não codificante, compostos por 1 a 6 pb, sendo amplamente distribuídas em regiões aleatórias de todo o genoma (Figura 1). As STRs se repetem de 5 a 100 vezes em cada *locus* microssatélite⁴ e possuem um grande polimorfismo, motivo pelo qual, esses marcadores⁵ STR possuem um alto poder de discriminação entre os indivíduos, possibilitando uma maior sensibilidade ao exame, quando submetidos à PCR e acoplados a *primers* fluorescentes (MOLLY et al., 2014).

⁴ Sequências curtas (1 a 6 pb), repetidas em tandem, distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos.

⁵ Sequências de DNA que revelam polimorfismos entre indivíduos geneticamente relacionados

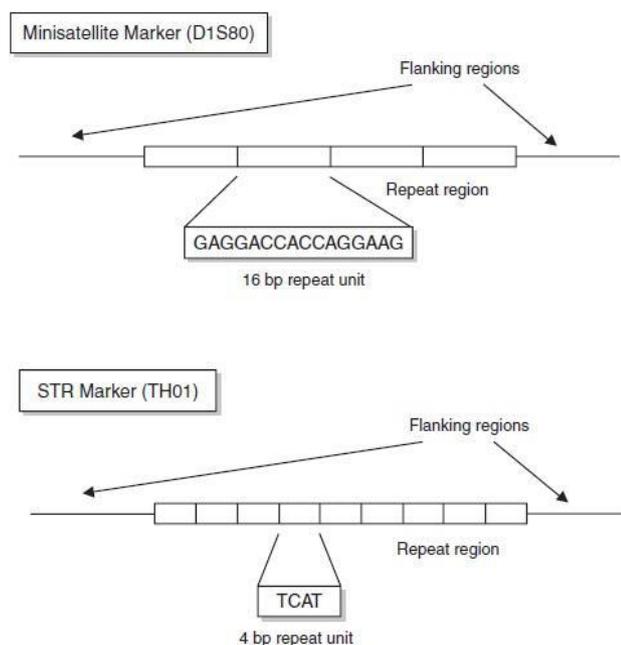


Figura 1 - Representação de seqüências de bases nitrogenadas do DNA, apresentando repetições consecutivas de VNTRs e STRs. Fonte: Butler, 2005; Santos, 2014.

Dessa forma, o tamanho reduzido dos STRs, quando comparado aos VNTRs, faz com que eles sejam mais utilizados nas análises de amostras forenses, uma vez que produtos de PCR de menor tamanho têm mais chances de serem amplificados (FRANCEZ *et al*, 2016).

Para o estudo de DNA degradado podem ser utilizados na prática forense, mini-STRs, que são STR cujos *primers* foram desenhados mais próximos da região de repetição, com o objetivo de se obterem produtos de amplificação menores (50-150pb), como mostrado na figura 2.

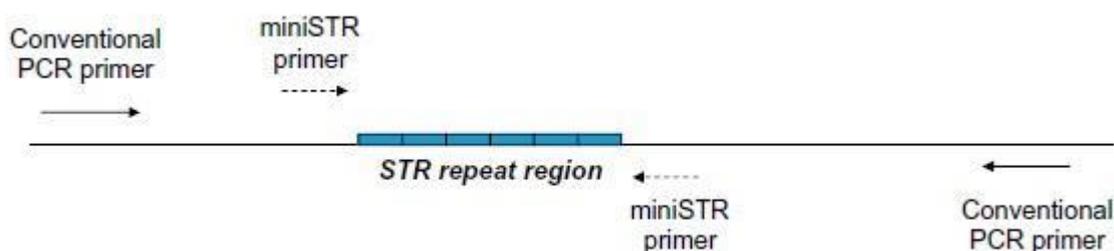


Figura 3. Imagem ilustrativa do local de ligação dos primers dos miniSTR comparativamente aos primers convencionais de STR. Fonte: Francez, 2016.

De acordo com RODRIGUES *et. al.* (2016), além dos VNTRs e STRs, existem dois outros tipos de polimorfismos no genoma humano, que são os polimorfismos de substituição de nucleotídeos únicos – SNPs (Figura 3) e os polimorfismos de inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos (INDELS). Ambos têm a vantagem de poder ser estudados em produtos de amplificação (amplicons) muito curtos, sendo extremamente úteis em amostras forenses altamente degradadas. Os SNPs são caracterizados pela variação de uma base em determinada posição da sequência genética entre indivíduos. Esses polimorfismos são extremamente abundantes no genoma humano (aproximadamente um SNP a cada mil nucleotídeos).

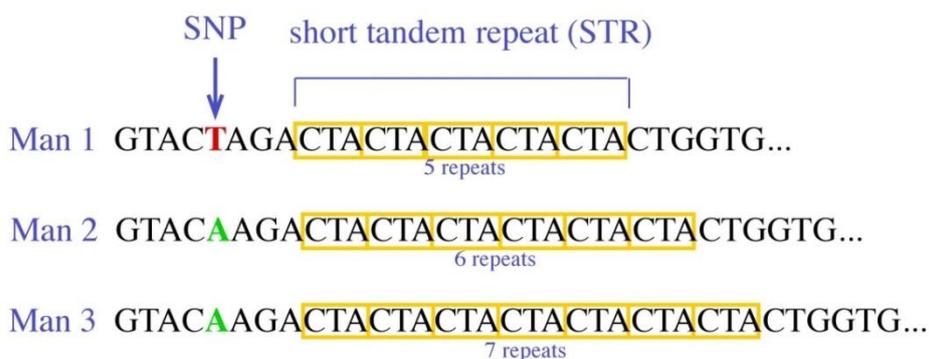


Figura 2 - Representação de sequência de bases nitrogenadas do DNA, apresentando repetições consecutivas do bloco CTA, exemplificando um microssatélite STR. Fonte: Francez, 2016.

A principal vantagem da utilização desses marcadores em análises forenses está no maior potencial em gerar resultados a partir de amostras altamente degradadas, uma vez que os produtos de PCR gerados são de tamanho inferior (região alvo com apenas um único nucleotídeo) aos gerados pelo sistema de *loci* STRs. Apesar das vantagens, a utilização de SNPs em análises Forenses apresenta alguns desafios, como a dificuldade de criar ensaios para PCR multiplex com uma quantidade suficiente de SNPs. Devido ao fato de os marcadores SNPs fornecerem menos informação quando comparados aos marcadores STRs, faz-se necessária a análise em um grande número daqueles marcadores para se obter um poder de discriminação equivalente aos STRs (FERREIRA *et. al.*, 2013)

Os marcadores genéticos de polimorfismos de Inserção/Deleção (INDELS), que se situam em promotores, intrões e exões, podendo até, alguns terem impacto

na função de genes e conseqüentemente em doenças humanas, são polimorfismos bi-alélicos, de tamanho, que se caracterizam pela Inserção ou Deleção, de um segmento de DNA específico que varia de 4 a 22 nucleotídeos, e que se encontram divididos em inserção e/ou deleção pelo genoma. Apesar da aparente ligação deste tipo de polimorfismo com algumas doenças, no âmbito da Genética Forense os marcadores de Inserção/Deleção utilizados não são associados com quaisquer doenças. A figura 4 representa um exemplo de polimorfismo de Inserção/ Deleção (MARTÍNEZ-CORTÉS *et al.*, 2015).

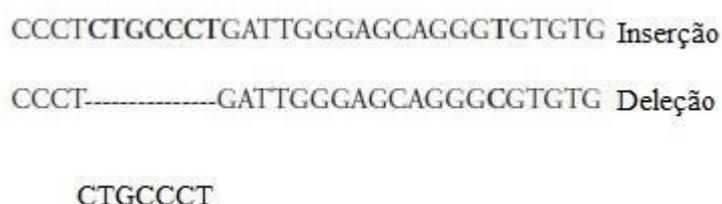


Figura 4. Imagem ilustrativa de um polimorfismo de Inserção ou deleção, evidenciando a região que se encontra inserida ou deletada. Adaptado de <http://www.scielo.org.ar/img/revistas/invet/v12n2/a05fig1.jpg> (consultado em 7 de junho de 2017).

Além da tipagem genética por meio dos marcadores já citados, há também a tipagem por *Low Copy Number* – LCN (baixo número de cópias), que se refere à análise de qualquer amostra que contém menos que 200 pg de DNA molde, ou seja, amostras de DNA, cujo resultado esteja abaixo do limiar estocástico, para uma interpretação confiável (BUDOWLE *et al.* 2009). LOREILLE *et al.*, 2007, utilizaram em seu experimento os marcadores LCN para tipar amostras de ossos antigo (entre 5 a 100 anos pós-morte) que apresentaram baixo rendimento de DNA.

Após a reação de PCR Multiplex é necessário separar os componentes amplificados de modo a obter um resultado na forma de eletroforegrama. Para tal procede-se a uma eletroforese capilar (CE) num sequenciador automático, no qual as amostras são injetadas em um capilar, que contém um polímero de acrilamida, que recebe a aplicação de voltagem. Essa voltagem faz com que as moléculas negativas, nomeadamente o DNA e o marcador interno, migrem pelo capilar, do polo negativo (cátodo) para o polo positivo (ânodo). As moléculas de DNA migram de acordo com o seu tamanho, sendo que as moléculas maiores migram mais lentamente que as menores, atingindo assim a câmara de passagem de laser mais tarde que as moléculas pequenas. Ao atingirem a câmara de passagem de laser, as

moléculas marcadas com fluoróchromos, são excitadas por um laser de argon a 488 nm e emitem fluorescência. Essa fluorescência é então detectada por um aparelho acoplado a uma câmara, sendo esta informação armazenada no software de recolha na unidade RFU (*Relative Fluorescence Units*) (MATOS, 2013).

De acordo com GARRIDO & RODRIGUES (2014), para a realização da eletroforese capilar, é necessária a aplicação de um agente químico desnaturante (comumente, a formamida), um padrão interno de peso molecular e uma alíquota da amostra de DNA amplificado. Juntamente com as amostras, corre a escada alélica (reagente que contém os alelos descritos para os *loci* do sistema alélico de escolha). Após o preparo da reação, a escada alélica e as amostras são desnaturadas a 95°C. A forma desnaturada do DNA (fita simples) possibilita uma melhor separação com base no tamanho, no decorrer da eletroforese capilar.

Após a recolha dos dados, o software GeneMapper™ *ID* remove a sobreposição dos espectros e calcula o tamanho dos fragmentos amplificados. Esta técnica permite analisar fragmentos de DNA que se sobrepõem em tamanho, desde que estes estejam marcados com fluoróchromos diferentes. Para que seja possível detectar o tamanho dos produtos de PCR é corrido em conjunto o marcador interno que contém fragmentos de DNA com tamanhos conhecidos e marcados com fluoróchromos. É então feita uma curva de calibração que compara os picos de amostras desconhecidas com os picos do marcador interno. O último passo deste processo de detecção é a atribuição de designações aos alelos dos produtos amplificados e para tal é necessário a presença, na corrida de eletroforese, do ladder alélico. Assim, o pico desconhecido é comparado com o ladder alélico, processo esse que é feito com todos os picos do eletroforegrama de forma a obter um perfil genético (MATOS, 2013).

A forma como a comparação do pico desconhecido, com os picos do ladder alélico é feita, está exemplificado na figura 5.

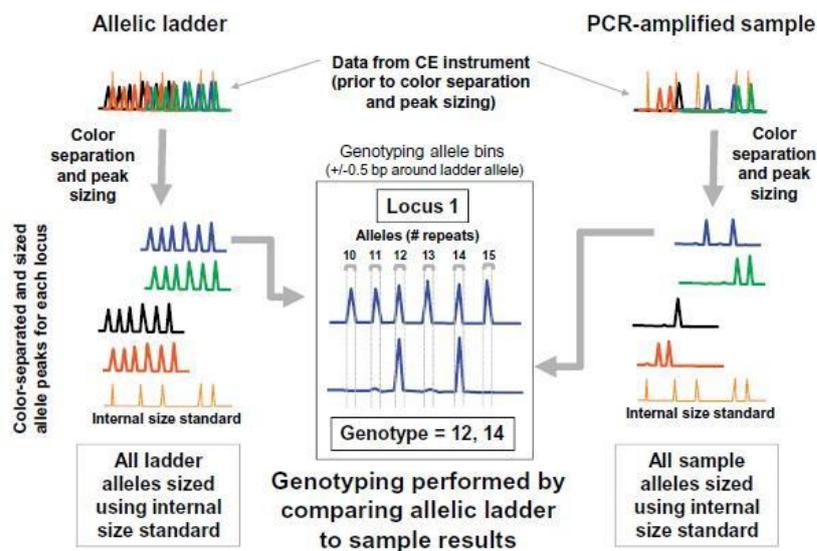


Figura 5. Imagem ilustrativa do processo pelo qual um determinado alelo adquire o número de repetições que tem na sua constituição. Fonte: Mattos, 2013.

Para que os marcadores genéticos sejam eficientes na identificação humana em todo o mundo, eles devem apresentar uma configuração padrão, de maneira que os resultados possam ser reproduzidos e comparados em diversos laboratórios. Os *loci* atualmente utilizados nas análises de vínculo genético foram inicialmente caracterizados e desenvolvidos no laboratório do Dr. Thomas Castey, no *Baylor College of Medicine* e no *Forensic Science Service* (FSS) na Inglaterra, permitindo a utilização atual em kits comerciais (RODRIGUES *et al.*, 2016)

Atualmente, duas grandes corporações multinacionais continuamente desenvolvem novos kits, apresentando maior quantidade de marcadores, o que os tornam cada vez mais eficientes na obtenção de resultados a partir de amostras oriundas de locais de crime. Esses kits funcionam com base na PCR multiplex⁶. O primeiro kit multiplex foi um quadruplex criado no *Forensic Science Service*, que possuía quatro *loci*: TH01, FES/FPS, vWA e F13A1, com probabilidade de identidade de 1 em 10.000 aproximadamente. Esse quadruplex foi aprimorado pelo FSS, surgindo como *second generation multiplex – SGM* e apresentando seis STRs polimórfico; TH01, vWa, FGA, D8S1179, D18S51 e D21S11, além de um identificador de gênero (amelogenina). Esse kit apresentava uma probabilidade de

⁶ Reação de polimerização em cadeia que permite amplificar simultaneamente vários locais do genoma.

identificação de 1 em 50 milhões. A empresa Promega Corporation disponibilizou o primeiro kit comercial capaz de amplificação multiplex por DNA em 1994. Esse kit apresentava 3 marcadores (CSF1PO, TPOX e TH01) e foi denominado CTT, em referência as letras iniciais dos marcadores (GOODWIN *et al.*, 2011).

Em 1999 o *European Standard Set* (ESS) designou que o Conselho da União Europeia definisse um conjunto de 7 *loci* como sendo o conjunto de *loci* ideal para identificação humana. Esse conjunto era composto pelos STR autossômicos D3S1358, FIBRA, D8S1179, TH01, vWA, D18S51 e D21S11. Em 2009, o Conselho da União Europeia redefiniu o conjunto dos *loci* que fazem parte do ESS acrescentando 5 miniSTR (D2S441, D10S1248, D22S1045, D12S391, D1S1656), o que fez com que o ESS ficasse com 12 *loci* mínimos para a identificação humana (MATOS, 2013).

Até janeiro de 2017, os Estados Unidos da América utilizavam os 7 *loci* do ESS e mais 6 *loci*, perfazendo um total de 13 *loci* que são designados como painel de STR do *Combined DNA Index System* (CODIS), cujos *loci* autossômicos são: TPOX, D3S1358, FIBRA ou FGA, D5S818, CSF1PO, D7S820, D8S1179, TH01, vWA, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, mais o gene homólogo da amelogenina (X e Y), que determina o sexo. Dos 13 *loci* presentes no sistema CODIS, os mais polimórficos são o FGA, D18S51 e D21S11, enquanto que aquele que apresenta menor variação é o TPOX. Em janeiro de 2017, o FBI adicionou sete *loci* aos 13 originalmente existentes no CODIS Core Loci, são eles: D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 e D22S1045. Agora o CODIS Core Loci é composto por 20 *loci* ou marcadores (FBI, 2017).

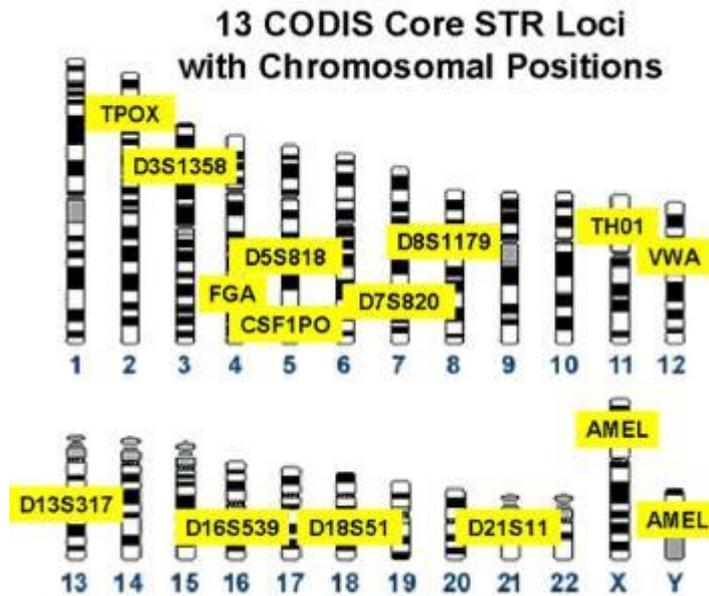


Figura 6. Imagem ilustrativa dos 22 cromossomos autossômicos e 2 cromossomos sexuais humanos, mostrando os 15 loci utilizados pelo CODIS até janeiro de 2017. Fonte: FBI, 2018.

Conforme exposto, a genotipagem de microssatélites autossômicos do tipo STR, com detecção dos produtos marcados com fluoróforos por eletroforese capilar, tem sido uma ferramenta amplamente utilizada nos laboratório de análise forense do DNA, porém quando o objetivo é identificar cadáveres em adiantado estado de decomposição, já na fase de esqueletização, tendo decorrido um grande tempo de morte, esse método não tem se mostrado muito eficiente, pois vários agentes pós-morte contribuem para a degradação do DNA, não sendo possível traçar um perfil genético completo, onde devem estar presentes todos os *loci*, recomendados pela comunidade científica forense. Por esse motivo, muitas vezes parte-se para a análise do DNA mitocondrial (mtDNA), que é um marcador de linhagem uniparental, que expressa a herança exclusivamente materna, uma vez que apenas as mitocôndrias do gameta materno estão presentes no embrião e, conseqüentemente, no indivíduo adulto. A análise o mtDNA é muito útil em investigações criminais, uma vez que oferece uma maior chance das cópias de DNA suportarem a degradação a que a amostra é submetida, sendo esse tipo de análise muitas vezes, o único possível, quando a análise de STRs não é exitosa. A desvantagem desses marcadores é o baixo poder de discriminação, além de tratar-se de uma análise cara e trabalhosa (RODRIGUES *et al.*, 2016).

2.1 O Tecido Ósseo como Fonte de DNA para Identificação Humana

Para DESMYTER *et al* (2017), a extração de DNA de ossos pode ser desafiadora, já que muitos fatores como, intervalo post-mortem, tipo de osso (longo, esponjoso, elevada capacidade de carga), grau de decomposição, tipo de degradação (mumificação, putrefação, saponificação) e condições de conservação post-mortem (ar aberto, enterrado, água (do mar), temperatura, carbonização), influenciam a eficácia da recuperação do DNA

De acordo com JUNQUEIRA & CARNEIRO (2013), o tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado pela associação de fibras proteicas e cristais minerais. A parte proteica, que é formada essencialmente de colágeno, dá flexibilidade e forma a matriz dentro da qual os cristais minerais vão se desenvolvendo. A matriz óssea é formada por uma parte orgânica, composta principalmente por fibras de colágeno, e por uma parte inorgânica, onde os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio, que formam cristais de hidroxiapatita (mineral presente em ossos e dentes), que são formados por fosfato de cálcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$) e representam um depósito de 99% do cálcio do organismo humano. O cálcio e o colágeno são os mais importantes inibidores de PCR presentes em amostras ósseas.

Ao observar-se superficialmente um osso serrado, constata-se que ele é formado por um tecido sem cavidades visíveis, que é o osso compacto, e por partes com muitas cavidades intercomunicantes, que é o osso esponjoso (Figuras 7). O tecido ósseo é formado por células e material extracelular calcificado, chamado matriz óssea. Os ossos são recobertos na sua face interna (endóstio) e externa (perióstio) por uma camada de tecido que possui células osteogênicas.

As células ósseas podem ser de três tipos: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Não há grandes diferenças entre esses tipos, que são, na realidade, mudanças da forma de uma mesma célula, em diferentes estágios (Figura 8) (MONTANARI, 2016).

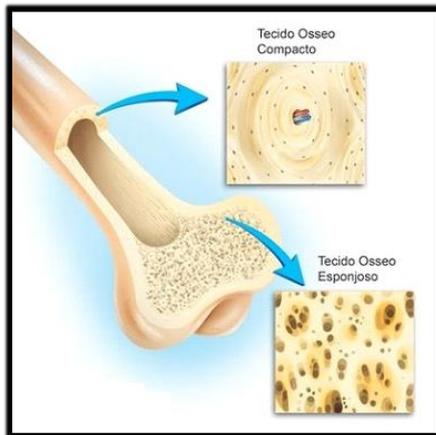


Figura 7. Composição do osso com os tecidos compacto e esponjoso. Fonte: MORET, 2009.

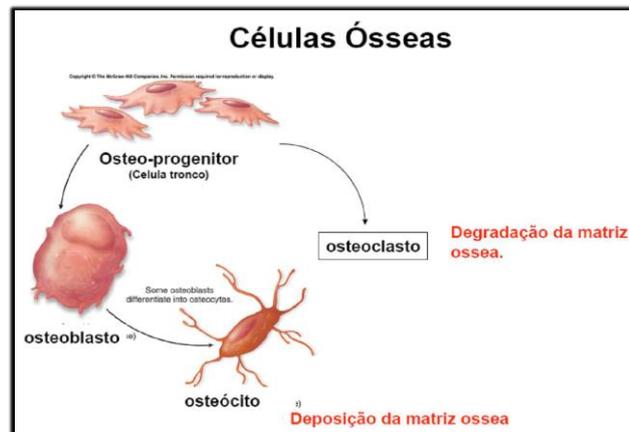


Figura 8. Principais células encontradas nos tecidos ósseos. Fonte: MORETI, 2009.

Na fase pós-morte, o DNA encontra-se melhor preservado no interior dos osteócitos, já que estes estão depositados sob fosfato de cálcio, aprisionados em cristais de hidroxiapatita, e ainda resguardados pela cobertura de colágeno produzida por eles mesmos, que foi solidificada com fosfato de cálcio, ficando muito mais protegidos, sendo uma fonte com DNA melhor conservado que os osteoblastos e osteoclastos que se localizam em uma camada na superfície do osso, porém o DNA se encontra escasso, na matriz dura e calcificada, requerendo procedimentos especiais para sua obtenção e purificação (MORETI, 2009).

2.2 Métodos de Extração de DNA em Tecido Ósseo

A recuperação e análise de DNA de tecidos de esqueletos humanos, como dentes e ossos tem se tornado a ferramenta central de pesquisa em campos científicos que vão de DNA antigo à Ciência Forense e Médica (ADLER *et al.*, 2011).

Nesse sentido, a etapa mais importante num exame de identificação genética humana é a extração e purificação do DNA. Nessa etapa do exame, o principal objetivo é a separação do material genético das outras moléculas presentes no interior da célula e no núcleo celular, propiciando assim o seu isolamento. Por meio desse processo, todas as macromoléculas e conteúdo celular são descartados, permitindo o isolamento do DNA, visando obter DNA em quantidade, qualidade e pureza, necessárias ao sucesso da genotipagem, que é o objetivo da análise (BUDOWLE & BROW, 2001).

Essas etapas de extração e purificação de DNA em ossos têm sido a etapa mais difícil e trabalhosa para a identificação humana por meio desse tecido em laboratórios forenses. A escassez e a degradação do DNA de ossos inumados ou abandonados em terrenos diversos se dá pelo contato com fungos, bactérias, ácidos húmicos e fúlvicos, que são componentes abundantes em solos e podem ser co-extraídos juntamente com o DNA humano, causando a inibição da reação de PCR. Devido a esse fato, são gastos dias ou, às vezes, semanas no processo de extração do DNA, diferentemente de análises realizadas em laboratórios que apenas trabalham com investigação de paternidade em vivo, onde o material utilizado é sangue ou saliva, que se apresenta em grande quantidade e em ótimo estado de conservação (MOLLY, 2014).

De acordo com DESMYTER *et al* (2017), a escolha do método aplicado é um resultado do equilíbrio entre os três grandes princípios que podem estar em conflito entre si: combinar o maior rendimento de DNA endógeno com a menor purificação de outros componentes químicos, o menor tempo e relação custo/benefício, de maneira eficiente. De uma perspectiva de gestão do laboratório, o protocolo final deve ser capaz de lidar com uma grande quantidade de amostras em um curto período de tempo, o que implica a necessidade de automação das manipulações.

Já acordo com BUDOWLE & BROW (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 maioria dos métodos de extração de DNA genômico de ossos utiliza solventes orgânicos como fenol/clorofórmio, adicionados ao pó desses ossos, pulverizados em moinhos mecânicos ou moinhos criogênicos (HASAN *et al.*, 2014).

Dentre os métodos comumente utilizados pelos laboratórios forenses para a preparação da amostra óssea, estão os métodos de lixamento e corte destas amostras, ou a utilização de nitrogênio líquido e moinhos criogênicos para a pulverização das amostras, visando a transformar o osso em pó. Alguns laboratórios também utilizam meios automatizados para a extração de DNA de ossos, porém estes são bastante dispendiosos, tendo em vista que requerem a aquisição de reagentes da empresa fornecedora do equipamento.

CARVALHO (2009) relata que nos últimos anos foram disponibilizados comercialmente, métodos de extração de DNA humano baseados em resinas

magnéticas, que ao mesmo tempo em que extraem o DNA, purificam-no, livrando-o de impurezas e material biológico sem interesse. Esses sistemas limitam a quantidade de material genético purificado e extraído, pois, a resina magnética capta um número determinado de moléculas e, além disso, possuem elevado custo.

Na área forense o método mais comumente utilizado para a extração de DNA de ossos é o método orgânico, no qual são utilizados solventes orgânicos, como fenol, associado ao clorofórmio. Esse método remove as proteínas aderidas ao DNA, fazendo com que este tenha melhor qualidade e pureza (BUTLER, 2005).

Atualmente, a extração de DNA deste tipo de amostra envolve a incubação prévia de fragmentos do osso em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), por um período de cinco dias, que têm por objetivo remover os íons de cálcio, posteriormente são usados solventes orgânicos e uma variedade de filtrações utilizando sílica, para remover outros inibidores, todos baseados em rotinas forenses para casuística de identificação. MARINI (2014).

O protocolo fenol/clorofórmio estabelece a adição à amostra, de um tampão de lise celular, contendo SDS, Tris-HCl, NaCl, DTT, EDTA e proteinase K. O objetivo dessa solução é desestabilizar a membrana das células, liberando seu conteúdo, para destruir as proteínas que circundam o DNA. Em seguida os solventes orgânicos fenol/clorofórmio são adicionados, visando separar o material genético das outras macromoléculas celulares, fundamentado no princípio da solubilidade (BUDOWLE & BROW, 2001).

Em alguns laboratórios, faz-se a utilização de álcool isoamílico juntamente com clorofórmio, para remover vestígios de fenol remanescentes. Em seguida, a amostra é centrifugada, para que o DNA solubilizado nesses solventes seja separado dos demais conteúdos celulares. O DNA será precipitado na fase aquosa (sobrenadante) e as proteínas ficarão na interface das fases aquosa e fenólica. O sobrenadante é retirado com micropipetador e colocado em filtro de membrana de sílica para lavagem, sendo no final recuperado com água ultrapura (BUTLER, 2005).

2.2.1 Descalcificação do Tecido Ósseo

Considerando o tempo necessário para a decomposição de um osso, este é o tecido mais resistente de um organismo animal, onde 65 a 70% da matriz óssea é constituída de hidroxiapatita, que é composto por fostato de cálcio, carbonato de cálcio, fluoreto de cálcio e hidróxido de cálcio. Essa constituição óssea preserva o material genético contra a degradação causada pelo meio ambiente, entretanto, essa proteção representa uma barreira física à extração de do DNA desses tecidos, uma vez que esses minerais dificultam o acesso e ação dos reagentes químicos utilizados nas metodologias de extração (CARVALHO, 2009)

Visando evitar esse problema, muitos protocolos de extração indicam a utilização de agentes químicos que retiram os minerais do tecido ósseo, principalmente os íons de cálcio, fazendo com que o tecido fique mais permeável. A descalcificação é fundamentada na destruição da fase inorgânica do tecido ósseo, para remoção do cálcio, que possibilitará chegar-se à porção orgânica do osso. Para este fim, as técnicas mais usualmente empregadas são as que utilizam ácidos fortes, que formam sais de cálcio solúveis e agentes quelantes, que sequestram os íons cálcio deixando a porção orgânica mais maleável e de fácil remoção (BALAYAN et al., 2015).

Dentre os ácidos com propriedades descalcificantes, os mais utilizados nesses protocolos são o ácido nítrico, o ácido clorídrico, o ácido fórmico e alguns outros ácidos hidrocloreídricos. Embora esses ácidos descalcifiquem o osso rapidamente, não podem ser usados por período prolongado, pois provocam a hidrólise ácida do DNA, comprometendo sua estabilidade (SINGH *et al.*, 2013). Em estudos experimentais, SANSFIELD *et al.* (2000) constataram que o ácido fórmico degradava o DNA, uma vez que nenhum DNA era visualizado na eletroforese, após o uso do referido ácido nas amostras.

Atualmente, a maioria dos protocolos de descalcificação da área de Genética e Histologia está fundamentada na utilização de EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético), que 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^{++} . A descalcificação pelo EDTA tem se mostrado a melhor técnica de recuperação do DNA de tecidos de ossos, quando comparada a outras técnicas que utilizam outros

ácidos, pois o EDTA possui alta capacidade de retirar os íons de cálcio da matriz óssea, dissociando os cristais formados (BALAYAN et al., 2015).

O EDTA descalcifica apenas a matriz mineralizada do osso, não comprometendo nenhum outro tecido, principalmente o material genético contido no núcleo das células. Devido a esse fato, são preferíveis as técnicas que utilizam esse agente descalcificante àquelas que utilizam outros agentes descalcificantes que modificam ou degradam o DNA, sendo, portanto, inadequados para análises que têm por objetivo a obtenção de DNA (SINGH et al., 2013).

A primeira utilização de EDTA para a descalcificação de tecido ósseo, com o objetivo de se obter DNA, foi realizada por Hagelberg & Clegg (1991), tendo eles observado que pequenas lavagens nos fragmentos de osso com EDTA removiam contaminantes solúveis do pó do osso, anteriormente a adição do tampão de extração tradicional. Desde então, vários pesquisadores incorporaram este ácido quelante em seus protocolos de extração de DNA de restos mortais, como tratamento prévio das amostras, pelo seu alto poder de desmineralização (CARVALHO, 2009).

2.2.2 Pulverização versus não Pulverização do material ósseo

Em sua maioria, as amostras de ossos são enviadas ao laboratório de genética forense em grandes fragmentos e, às vezes, em peças ósseas inteiras. Dessa forma, para que se possa iniciar a extração do DNA presentes nesses materiais biológicos, faz-se necessário o corte dessas peças e/ou fragmentos, em tamanhos menores, que caibam nos tubos utilizados rotineiramente nos laboratórios.

Até bem pouco tempo, os laboratórios forenses procediam à pulverização dos fragmentos de ossos antes da descalcificação, que era realizada incubando-se as amostras em um tampão de lise contendo EDTA.

ADLER *et al.*, (2011) afirmam que amostras de esqueletos são geralmente pulverizadas e descalcificadas para permitir a eficiente digestão proteolítica de componentes celulares, independentemente do método utilizado para extrair o DNA. Entretanto salienta que o método físico e/ou material utilizado para pulverizar restos

de esqueletos têm o potencial de influenciar na quantidade e qualidade do DNA recuperável, não tendo tal constatação sido adequadamente investigada.

MORETI (2009) avaliou nove métodos de extração de DNA de ossos em 19 ossos de 07 indivíduos, dos quais, 02 provieram de exumação; 03, de deposição em solo de terra; e 02, de ambiente aquático. Dos nove métodos avaliados, oito foram processados com a pulverização dos fragmentos das amostras e apenas um, processado com os fragmentos das amostras intactas (não pulverizadas), tendo-se obtido DNA de quase todas as amostras, porém, a maioria do DNA detectado não se apresentou íntegro. Obteve-se êxito na extração do DNA de apenas uma amostra não pulverizada (corpo depositado em solo de terra), para a qual houve a amplificação e genotipagem de 9 *loci* STRs autossômicos mais o *locus* sexual no eletroferograma.

CARVALHO (2009) avaliou dois métodos de extração de DNA de ossos em seis amostras de fêmur de duas ossadas humanas expostas por um período de três meses a condições ambientais diversas, como calor, chuva e umidade. As amostras processadas pelo método orgânico, com descalcificação prévia sem pulverização resultaram em amplificação e genotipagem de 15 *loci* STRs autossômicos mais o *locus* sexual no eletroferograma. As amostras que foram submetidas à extração de DNA pelo método orgânico tradicional (com pulverização) não resultaram na obtenção de DNA que possibilitasse a amplificação de nenhum *loci* no eletroferograma, não gerando um perfil genético.

HASAN *et al.* (2014) analisaram 52 amostras de ossos de remanescentes de corpos vítimas de desabamento de um prédio em Dhaka, Bangladesh, coletadas no período de 7 a 15 dias após o desastre. Essas amostras foram incubadas sem pulverização em solução de EDTA (0,5M, pH 7,5), por 15 dias, sendo a solução trocada a cada 24 horas. Após PCR e genotipagem do DNA extraído, a maioria das amostras apresentou perfil completo em 15 *loci* STR, mais a amelogenina.

Em alguns casos, versões modificadas desses protocolos, ou passos adicionais são necessários para obter um resultado satisfatório.

2.3 DNA de Toque

O DNA de toque está presente em células epiteliais (da pele) que são depositadas em substratos diversos quando uma pessoa toca ou entra em contato com diferentes objetos. Esse material biológico presente no DNA de toque é invisível a olho nu e geralmente é depositado em menores quantidades do que o DNA encontrado em manchas de sangue ou outros fluidos corporais. Para obtenção de bons resultados de DNA de toque, são necessários adequados coleta e armazenamento desse material, bem como, a utilização subsequente de uma técnica de extração ideal para se recuperar o maior número de cópias de DNA possível (MINOR, 2013).

Quando um crime é cometido, o autor pode depositar algumas células da pele em um objeto presente na cena de crime. Se o objeto tocado é coletado, possíveis evidências ali existentes podem ser identificadas por meio da análise do DNA de toque, possibilitando-se ligar o criminoso à cena do crime. Para a coleta de DNA de toque em cenas de crime ou em laboratórios forenses de testes para DNA, é usado o esfregaço molhado/seco ou métodos de corte. Quando é utilizado o método de esfregaço, a superfície do item normalmente é friccionada com uma haste de algodão (tipo cotonete) molhado, seguido por um cotonete seco, em um esforço para coletar o maior número de células possíveis (LIU, 2015).

De acordo com NUMM *et al.* (2013), dentre as técnicas inovadoras de extração de DNA, encontra-se a técnica extrativa de "Touch DNA" ou "Contact Trace DNA". O DNA de toque é recuperado de células epiteliais deixado em superfícies diversas quando uma pessoa toca ou entra em contato objetos como roupas, móveis, armas, equipamentos, dentre outros. Cerca de 400.000 células da pele de uma pessoa são soltas por dia, mas são as células da pele mais interna que proporcionam o melhor perfil de DNA. Essas células são normalmente recuperadas quando é usada força de atrito, como por exemplo na roupa de uma vítima ou na arma de um crime, encontrados onde o fato ocorreu.

Geralmente, em superfícies rígidas não porosas como metal, vidro ou plástico as amostras biológicas contendo o DNA de toque são coletadas por meio de esfregaços molhado/seco, que pode ser facilmente executado na cena do crime com

risco limitado de contaminação com DNA exógeno (por exemplo, a partir da pessoa que está coletando a amostra ou superfícies próximas / objetos); já em vestes e objetos maleáveis, é utilizado o método de corte de fragmentos destes, que são submetidos diretamente a tampões de extração para isolamento do DNA ali presente. Essas duas abordagens podem ser bem sucedidas em muitos itens de provas; no entanto, ambos têm a limitação de colocação de substrato desnecessário (o algodão cotonete em si ou os cortes de tecido) no tubo de pequeno processamento de DNA. Há uma quantidade limitada de substrato que pode ser colocado em um tubo, e o próprio substrato pode "reter" algumas células durante o processamento, diminuindo a probabilidade de obtenção de resultados (WILLIAMSON, 2012).

Além do esfregaço comumente utilizados e métodos de corte, vários laboratórios também usam métodos de raspagem e fita adesiva levantadora, em que a superfície de itens macio/poroso são raspados com uma lâmina de bisturi estéril ou amostradas com um pequeno pedaço de fita adesiva, ou a parte adesiva de um papel auto adesivo é usada para coletar possíveis células da pele.

WILLIAMSON (2012) relata três casos em que o DNA de toque foi a única prova que ligou os suspeitos às vítimas de crimes. No primeiro caso, em meados da década de 1990, uma jovem mulher foi abusada sexualmente no caminho de casa à escola, onde o suspeito arrancou pedaços da camisa da vítima, com os quais a amordaçou. A vítima sobreviveu ao ataque e contou detalhes do crime à polícia. Um suspeito foi identificado, mas não havia nenhuma evidência física ligando-o ao crime. As provas oferecidas pela vítima foram testadas várias vezes, mas nenhum sêmen ou DNA masculino foi detectado. O caso foi revisitado no final de 2008 e as provas foram testadas para DNA de toque. O teste focava em itens com os quais o suspeito poderia ter mais contato durante o ataque, incluindo o cós do shorts da vítima, as áreas danificadas e rasgados além do pedaço da camisa usado para amordaçar a vítima. Esses elementos de prova foram amostrados e na área que o suspeito poderia ter tocado para criar o nó foi obtido um perfil que consistia de dois indivíduos, vítima e suspeito não poderiam ser excluídos desta amostra. A evidência do DNA de toque foi a evidência física que ligou o suspeito ao crime. O suspeito foi posteriormente encontrado e condenado a duas prisões perpétuas.

No segundo caso, uma mulher adulta foi sexualmente agredida e estrangulada até a morte. Ela foi amarrada com vários materiais, incluindo tiras de couro. Testes iniciais revelaram que o DNA de uma mancha de sêmen na camisola da vítima correspondia ao perfil de um criminoso condenado. No entanto, isto não era prova suficiente para condená-lo porque o suspeito tinha conhecido a vítima e alegou que eles tinham tido uma relação sexual consensual. Realizou-se a técnica de raspagem sobre as tiras de couro para coletar as possíveis células de pele nesse material, tendo sido encontrado DNA do suspeito, o que forneceu evidências convincentes de que o ato sexual não tinha sido consensual. O suspeito declarou-se culpado após a apresentação da evidência do DNA no julgamento e está cumprindo uma sentença.

No terceiro caso, uma mulher adulta foi abusada sexualmente por um homem desconhecido. Ela lutou com o agressor, sobreviveu e forneceu uma descrição detalhada aos investigadores. A vítima conseguiu agarrar a camisa do suspeito e a polícia foi informada que ela tinha tocado a área frontal do peito do agressor vestido na camisa. Então, foi coletado e extraído o DNA presente na área interna da gola da camisa (para identificação do suspeito) e na área externa da camisa (para identificação do DNA da vítima), tendo sido constatado ambos os DNAs na veste. Os resultados da análise ligaram o suspeito à cena do crime e confirmaram a versão da vítima para o fato.

DALY *et al.* (2011) conduziram um estudo com 300 voluntários, que manusearam vários objetos, não tendo sido levado em conta se os voluntários eram bons ou maus eliminadores, nem as atividades que estavam realizando antes de se submeterem ao teste, pois nos casos forenses, o perito raramente terá essas informações. Antes de serem tocados os objetos foram esterilizados para excluir qualquer DNA que pudesse haver neles. O toque aos objetos durou 3 dias e a cada dia, 100 objetos (copos, fragmentos de tecidos de algodão e pedaços de madeira) eram tocados, cada um, por 50 homens e 50 mulheres. Cinco unidades de cada objeto foram usados como controle negativo. Os objetos testados eram segurados por 60s por apenas uma das mãos (sem preferência de mão). Os objetos foram guardados em temperatura ambiente e amostrados após duas semanas. O DNA presente nos objetos foi coletado com pedaços de fita adesiva de acetado, sendo em seguida, extraído e quantificado, tendo apresentado uma variação de 0 a 169 ng.

Os valores significativos para a quantidade de DNA recuperado foi: para madeira, 5,85 ng; para tecido, 1,23 ng e para copos, 0,52. A variação das quantidades de DNA total estimado de todos os três tipos de objetos foi 0 – 5,2 ng para copos, 0 – 14,8 ng para tecidos e 0 – 169ng para madeira. A quantificação mais alta foi obtida com um voluntário masculino, que ao pegar um objeto de madeira depositou 169 n de DNA, tendo sido obtido um perfil de DNA completo dessa amostra. Esse estudo demonstrou que a natureza do objeto interferirá na quantidade de DNA transferida durante o contato e que não há diferença significativa entre a quantidade de DNA transferida por homens e mulheres durante o contato.

Pesquisas realizadas nos últimos anos sobre a coleta e extração do DNA de toque para utilização em Genética Forense, para a identificação de vítimas e autores de crimes têm mostrado que essa ferramenta científica vem conduzindo a resultados bastante significativos, visando reduzir a violência crescente em todo o mundo.

Em pesquisa realizada em endereços de busca específicos, foram encontradas apenas dois registros de patentes de equipamentos metodologias para coleta e extração de DNA de toque.

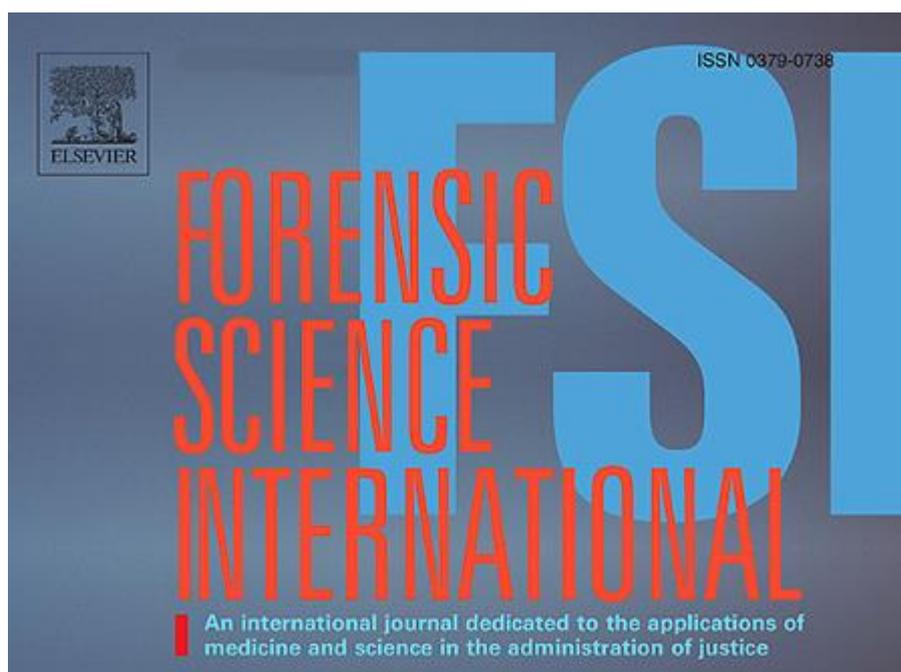
O documento de patente WO2018053191 (A1), intitulada APPARATUS AND METHOD FOR COLLECTING TOUCH DNA, refere-se a dispositivos e métodos para a coleta e armazenamento de DNA de baixo número de cópias, como DNA de toque, para posterior análise. O coletor possui uma matriz coletora com um suporte não-reactivo e não poroso em forma de espuma. A matriz é impregnada com uma composição química capaz de lisar células e desnaturar proteínas. Os ácidos nucleicos são depositados diretamente na matriz coletora e estabilizados para armazenamento a longo prazo, eliminando a necessidade de transferir o DNA que pode diminuir o rendimento total do DNA.

O documento de patente WO2011050086 (A2), intitulada COLLECTION OF TRACE CHEMICALS, BIOLOGICAL FLUIDS, FIBERS, AND TOUCH DNA, refere-se a uma fonte de vácuo manual com vários acessórios em um kit, para coletar amostras difíceis de coletar na forma líquida ou seca. Nesse equipamento, existe um cabeçote de coleta de amostras, com acoplamento liberável para uma fonte de vácuo manual e o cabeçote de coleta de amostras tem uma entrada de amostras. Esse cabeçote de coleta da amostra pode ser uma ponta ou uma ponta em combinação com um adaptador de vácuo.

Existem hoje no mercado, suabes (hastes flexíveis, com extremidade de algodão) que são utilizados umedecidos com água ultrapura (livre de DNase), para a coleta de DNA de Toque em, superfícies rígidas não porosas como metal, vidro ou plástico. Por meio desses suabes, as amostras biológicas contendo o DNA de toque são coletadas por esfregaços de um suabe umedecido, seguido por esfregaço de um suabe seco. Esse método geralmente é ineficiente, pois não possibilita a coletar uma boa quantidade de células, que permitam a tipagem de um perfil genético completo, pois a água por si só não todas as células, uma vez que é necessário que haja uma solução com reagentes atrativos do DNA.

Considerando o que foi exposto, e devido ao fato de as amostras de DNA de toque serem suscetíveis à degradação e/ou contaminação por condições ambientais ou pela própria manipulação durante a recuperação antes da extração do DNA, todas as amostras devem ser coletadas e manipuladas cuidadosamente, com técnicas que maximizem a estabilidade e recuperação do material genético, de forma a possibilitar a geração de um perfil de DNA utilizável.

Artigo Submetido à Revista Qualis B1 da Biotecnologia



Alternative Methodology for Extraction of High Quality DNA from Ancient Bones by Demineralization without Pulverization

Rosana CF Silva^{1,2*}, Adenildo R dos Santos³, Silvana MC do Monte⁴, Sarah G de Castro⁴, Antonio C de Souza⁵, Marek HF Ekert¹, Alessandro L do Nascimento Santos², Cícero E Ramalho-Neto²

¹Laboratório de Genética Forense, Instituto de Criminalística, Perícia Oficial de Alagoas – POAL – Maceió – AL, Brasil.

²Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica – GEMPRO, Universidade Federal de Alagoas – Maceió – AL, Brasil.

³Instituto Federal de Alagoas – Maceió – AL, Brasil

⁴ Gerência Operacional de Análise em DNA – Instituto de Polícia Científica da Paraíba, Brasil

⁵Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense – Polícia Científica de Pernambuco, Brasil

***Corresponding:**

Perícia Oficial de Alagoas

Instituto de Criminalística – Rua do Sol, 290, Centro.

Maceió – AL - Brasil

CEP: 50670-901

Phone: + 55 82 99917 8942

E-mail:rosanacfs24@gmail.com

Abstract

The robustness of the DNA molecule, coupled with the fact that it contains digital information, makes it ideal as a source of identification which resists weather and environmental aggressions imposed on samples found in crime scenes, but these same factors make these samples exhibiting low DNA concentration and with degradation in your chemical structure. The recovery of remaining genetic material of human skeletons is essential part human forensic identification, because the genetic identification by DNA is a method that outperforms all other existing methods, including the identification fingerprints and dental records identification. In order to succeed in obtaining DNA from bone samples degraded and produce an eletroferograma with the minimum amount of markers recommended by the scientific community forensic, it is imperative that the most modern techniques of extraction and DNA purification. Among these techniques, we have the bone and tooth demineralization sprayed in specific Mills, followed by traditional organic extraction, in that you don't get the total cell lysis, which often generates incomplete electrophoretic profiles. Considering that in forensics, is the imminent need for obtaining DNA from bones and teeth by using simple and effective protocols, this work is intended to improve the decalcification method of these biological materials in order to achieve a high quality DNA samples from ancient bones, in the first attempts of extraction, generating eletroferogramas with the detection of alleles in all markers recommended by forensic community. In this sense, our alternative extraction protocol proved to be efficient because it allowed the isolation of high quality DNA from the bone of 17 years of buried and another 3 years of buried, in order to present a complete genetic profiles with PowerPlex Fusion 6C ® system and PowerPlex Fusion ® system, both from company Promega Corporation and with the GlobalFiler ® system of company Life Technologies.

Keywords: Forensic DNA, Bones DNA, Bones Decalcification

1 Introduction

One of the biggest challenges to public security and judicial area has been the identification of corpses in advance state of decomposition or skeletonization and it has generated a lot of anguish for the professionals and, above all, to the relatives of these victims, who lost their relatives and are entitled to answers of the governmental entity.

For Moreti (2009), in corpses, whose time of death is more than two years, the biological material of choice are the bones, soft tissues no longer exist, the teeth get lost easily and the hairs, if any, still have meager quantities and degraded DNA. Already the extraction of hard tissues such as bones, provide more satisfactory results, because they become a natural deposit of nucleic acids protected the environment. However, after the death, is the balancing of the repair process, which leads to progressive and cumulative damage, which is why nucleic acids will gradually, being degraded through hydrolysis and oxidation processes.

The steps of extraction and purification of DNA in bones have been the most difficult and cumbersome for human identification through this fabric in forensic laboratories. The scarcity and degradation of the DNA of bones buried or abandoned in various terrains get along by contact with fungi, bacteria, humic acids and fulvic acids, which are abundant in soils and can be coextracted along with human DNA, causing the inhibition of the PCR reaction.

Due to that fact, are spent days or sometimes weeks in extraction process of DNA, unlike analyses carried out in laboratories that only work with paternity investigation in alive, where the material used is blood or saliva, that presents itself in large quantity and in great condition (Molly, 2014).

In order to succeed in obtaining DNA from bone samples degraded and produce an eletroferograma with the minimum amount of recommended by the scientific community forensic markers, it is imperative that the most modern techniques of extraction and DNA purification.

One of the methods commonly used by forensic laboratories for sample preparation, are the methods of cutting and sanding of these samples, or the use of liquid nitrogen and cryogenic mills for pulverization of the samples, in order to turn the powdered bone. Some laboratories also use automated means for extracting DNA from bones, but these are rather expensive, considering that require the purchase of the equipment supplied by specialized company (Hasan *et al.*, 2014).

Descaling is based on inorganic phase destruction of bone tissue, to calcium removal, that will get to the organic portion of the bone. To this end, the techniques more usually employed are those which use strong acids, which form soluble calcium salts and chelating agents, who kidnap the calcium ions leaving the organic portion more pliable and easy removal (Balayan *et al.*, 2014).

One of the acids with decalcifying properties, the most used in these protocols are nitric acid, hydrochloric acid, formic acid and some other hydrochlorides acids. Although these acids decalcify the bone quickly, cannot be used for extended period of time, because they cause the acid hydrolysis of DNA, compromising your stability (Singh *et al.*, 2013). In experimental studies, Sarsfield *et al.* (2000) found that the formic acid degrade the DNA, since no DNA was previewed on electrophoresis, after using the acid in the samples referred to.

Currently, most of the decalcification protocols in the area of Genetics and Histology is based on the use of EDTA (Tetra-acetic Etilenodiamino Acid), which is a low molecular weight organic acid, which demineralize bone and inactivates DNAses enzymes, by chelating bivalent cations like the MG ++ and Ca ++. The decalcification by EDTA has been shown to be the best technique of recovering DNA from bone tissue, when compared to other techniques that use other acids, because EDTA has high ability to remove calcium ions from bone matrix by abstracting the crystals formed (BALAYAN *et al.*, 2014).

EDTA acts only in the mineralized bone matrix, not committing any other fabric, especially the genetic material contained in the nucleus of cells. Due to that fact, are preferable to use techniques that descaling agent to those that use other descaling agents that modify or degrade the DNA, and therefore unsuitable for analyses that are intended to obtain DNA (Singh *et al.*, 2013).

After this pretreatment, organic extraction is performed, in which are used organic solvents, like phenol, associated with chloroform. This method removes the proteins attached to DNA, causing this has better quality and purity (Butler, 2005).

After this pretreatment of demineralização, organic extraction is performed, in which are used organic solvents, like phenol, associated to chloroform, with subsequent centrifugation and filtration in silica columns. This method removes the proteins attached to DNA, causing this has better quality and purity (BUTLER, 2005).

According to Budowle & Brow (2001), the ideal extraction protocol is that for the vast majority of the samples is of simple implementation and has low cost for the lab.

Whereas in forensics, is the imminent need for obtaining DNA from bones and teeth by using simple and effective protocols, the present work aims at the development of alternative protocol for demineralization without pulverition at extraction and purification of DNA from ancient human forensic samples and degraded for forensic identification.

2. MATERIALS AND METHODS

The analysis of biological samples in the context of Forensic Genetics, both in forensic biological affiliation and identification of bodies and human remains is developed in two phases: laboratory testing and biostatistics analysis of results, having been analyzed in this study, the following samples:

2.1 Samples

For development of alternative protocol of demineralization and DNA extraction of ancient bones degraded, 08 were analyzed samples of 01 fragment of a femur of corpse (named MTS), that was buried for 17 years. As reference sample, we used 02 samples of 04 teeth of corpse, which was buried for 3 years (named MS), being this, supposed biological son of corpse buried for 17 years.

2.1.2 Demineralization

A fragment of the femur, 2 cm by 3.7 cm in diameter, was cleaned with ultra-pure water and gauze and then incubated in 20 ml of acid etilenodiamínico tetra-acetic- solution – EDTA 0,5M, pH 8, by 30 days at room temperature – between 25 and 30°C. The four teeth were also incubated in the same solution, but for only 15 days, also at room temperature.

2.1.3 Extraction, isolation and recovery of DNA

After demineralization, the fragment of the femur was washed with ultra-pure water and clean with gauze, after that, were remove, with the aid of a scalpel, splinters of demineralized femur fragment, having been placed about of 0.3 g of these splinters in eight micro tubes capacity 1.5 mL Eppendorf type. Similarly, 0.3 g of the splinters of the demineralized teeth were placed in two other microtubes of same capacity. Each of the sample, were added 600 uL of extraction buffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl;; 10 mM EDTA; 2% SDS, pH 8.0), 60 uL of Proteinase K and 40 uL of DTT, having been incubated overnight these to 56° C.

After the incubation period, 600uL were added phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1, v/v/v) in each of the samples, which were subject to unrest in vortex, until the formation of a milky solution. Then, the samples were subjected to centrifugation for 7 minutes at 12,000 rpm, for the formation of the supernatant (aqueous phase) separating the DNA of proteins. About 500 uL of the supernatant of each sample was transferred to a membrane filter tube with silica Microcon ® brand.

All 10 samples were centrifuged for 9 minutes at 12,000 rpm and the filtered liquid was disposed one by one, being the filter with the DNA, reattached the tube. After that were added in the filter, 500 uL of ultra-pure water for washing of the DNA, and then centrifuged for 9 minutes at 12,000 rpm. The filtered liquid was dropped and added again, two more times, 500 uL of ultra-pure water for washing. Recovery of DNA joined the silica membrane was made with the addition of 50uL ultra-pure water, with the reversal of the filter on a new Microcon ® tube.

2.1.4 DNA amplification and Genotyping

The polymerase chain reaction (PCR) of all samples were conducted in thermal cycler Proflex brand, the company Life Technologies for amplification cycles 29, with two phases, the first being with two stages and the second, with only one stage.

The samples analyzed in the present work were amplified and genotyped for STRs markers, which are the most commonly used by the forensic community.

The DNA extracted from teeth samples was submitted to amplification, using the commercial multiplex kit PowerPlex Fusion 6C of the company Promega Corporation, which owns 27 markers. The amplification product of this sample was genotyped to the *loci* D1S1656, D3S1358, D2S441, D10S1248, D13S317, D16S539, D18S51, Penta E, D2S1338, CSF1PO, Penta D, TH01, D21S11, D7S820, vWA, TPOX, D5S818, D8S1179, D12S391, D19S433, D22S1045, SE33, DYS391, FGA, DYS576 and DYS570, besides the amelogenin, to identify the gender.

The DNA extracted from the bone samples were submitted to amplification, using the commercial multiplex PowerPlex Fusion kit the company Promega Corporation, which has 25 markers, not possessing just two markers present in the commercial kit PowerPlex Fusion 6C (DYS576, DYS570). The amplification products of these samples were genotyped to the *loci* D1S1656, D3S1358, D2S441, D10S1248, D13S317, D16S539, D18S51, Penta E, D2S1338, CSF1PO, Penta D, TH01, D21S11, D7S820, vWA, TPOX, D5S818, DYS391, D8S1179, D12S391, D19S433, SE33, D22S1045, FGA, in addition amelogenin, to gender identification.

The DNA extracted from the bone samples were also submitted to amplification, using the commercial multiplex kit GlobalFiler® of company Life Technologies, which has 24 markers. The amplification product of this sample was genotyped to the *loci* D3S1358, vWA, TPOX, D16S539, CSF1PO, D8S1179, D21S11, D18S51, DYS391, D2S441, D19S433, FGA, TH01, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, D10S1248, D1S1656, SE33, D2S1338, D12S391 and Y indel, beyond amelogenin, for gender identification.

Capillary electrophoresis procedures were performed on sequencing platform ABI 3500 Genetic Analyzer, with POP-4 polymer and 36 cm capillary (Applied Biosystems).

2.2 Statistical Analysis

According to Arenas *et al.* (2017), the identification of individuals can be obtained through a number of sufficient markers to enable a high power of discrimination, and it is important to check the quality of the profiles before analyzing the results. After that, the genetic information obtained are compared with other database information or reference samples, performing the statistical analysis.

To establish the link between the samples is calculated the likelihood ratio - LR, which is the ratio of the probability of obtaining an identity of genetic profiles if the DNA in the sample questioned and suspect come from the same person, and the probability of a DNA come from different people. The LR is the reciprocal of the probability of random combination and a value of 1000 means that is 1000 times more likely to get an identity, if DNA samples are from the same person, than if they came from two individuals any chosen randomly in the population (Conselho Nacional de Pesquisa *In* Pacheco, 2010).

According to Arenas *et al.* (2017), for identification of human beings, are used preferentially the autosomal STRs, which are analyzed with a Bayesian approach (prior probabilities are combined with probabilities of genotype observations, assuming alternative hypotheses).

In this work, for analysis of the results of the samples of bones and teeth, was used the statistical program FAMILIES, version 3.2.1, which analyzes the index of parental relations according to allele frequencies reported of shared alleles.

Statistical calculations were tested two probabilities: 1) the body of MS is a biological child of the corpse of MTS; 2) the body of MS is a biological child of another person chosen at random in the Brazilian population.

3. Results

3.1 Samples of teeth

The DNA extracted from the teeth sample with demineralization without pulverization presented a male genetic profile complete with all 27 amplification system markers PowerPlex Fusion 6C of the company Promega Corporation, with 23 markers autosomal, 03 male line markers and marker for the identification of gender – amelogenin (fig. 1).

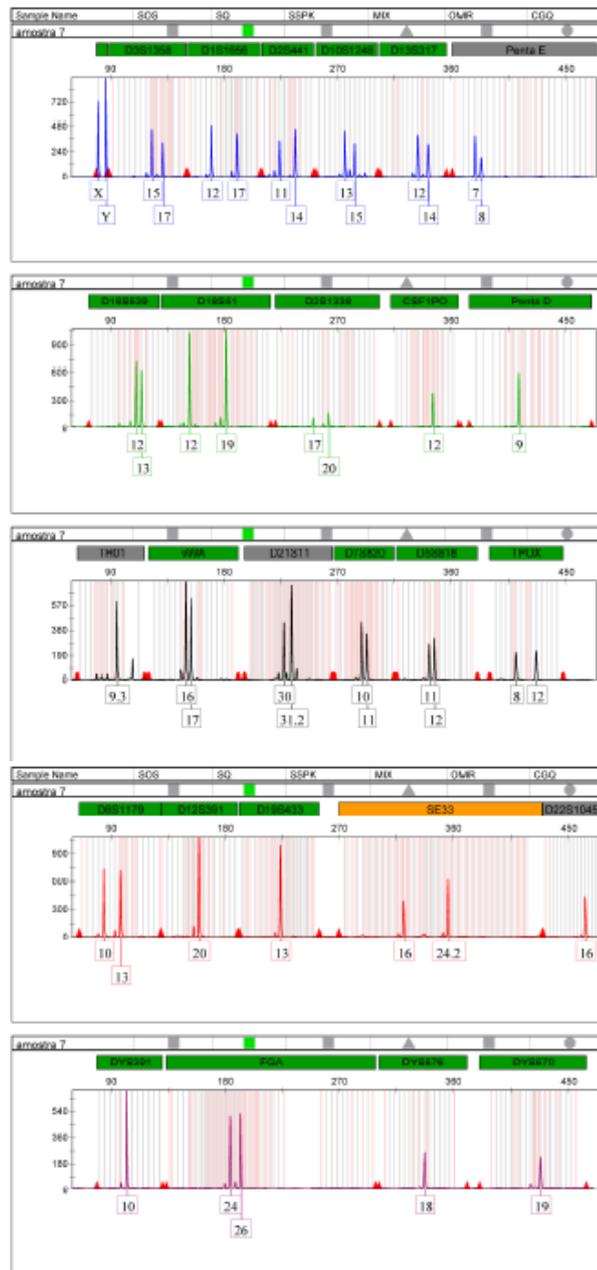


Figure 1:: Eletropherogram extracted DNA amplification of the sample of teeth, with the PowerPlex Fusion 6C system of the company Promega Corporation.

3.1 Samples of bones

The DNA extracted from the sample of bone with demineralization without pulverization presented a male genetic profile complete with amplification of all 25 markers PowerPlex Fusion system of company Promega Corporation, and autosomal markers 23, 01 male line marker and the marker for the identification of gender – amelogenin amelogenin, having been found a triallelic pathern on TH01 (fig. 2).

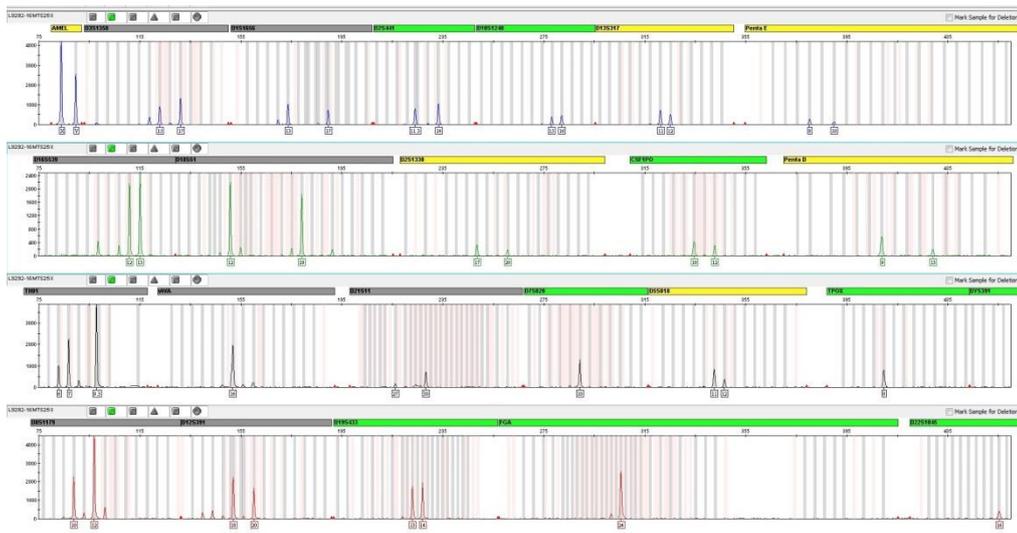


Figure 2:: Eletropherogram DNA extracted amplification from the sample of bone with the PowerPlex Fusion system of company Promega Corporation.

The DNA extracted from the sample of bone with demineralization without pulverization presented a male genetic profile complete with all 24 amplification system GlobalFiler[®] markers of company Life Technologies, being autosomal 21, 01 to lineage male, male sexual confirmation 01 (Y indel), besides the amelogenin, for identifying the gender (fig. 3).

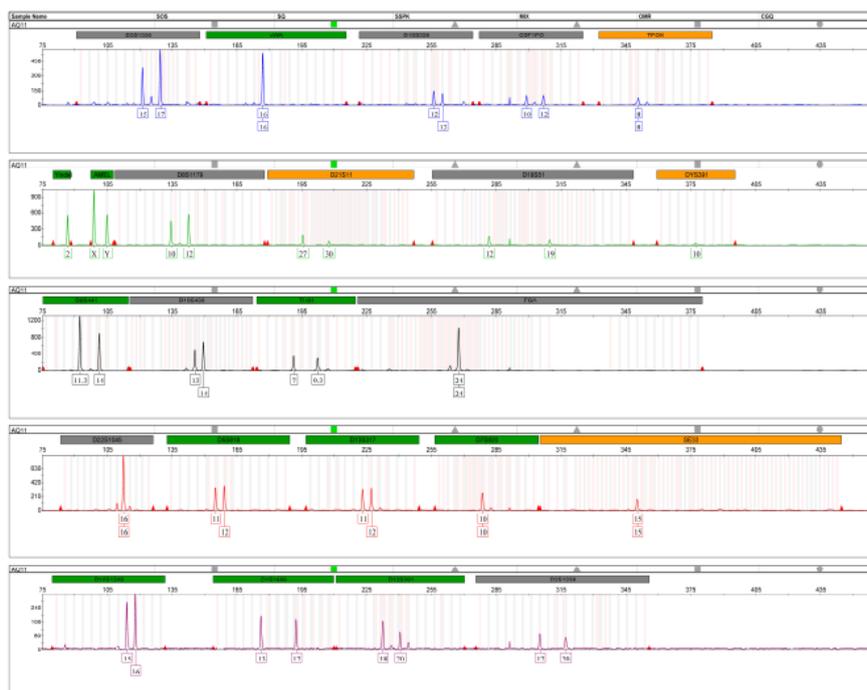


Figure 3: Eletropherogram DNA extracted amplification of bone sample with GlobalFiler® system of company Life Technologies.

4 Statistical analysis of the data

In the evaluation of the results of Forensic Genetics, statistical analysis shows a predominant role, because it is necessary to evaluate how particular individual may or may not be related to certain genetic evidence.

In this sense, the estimative of statistical parameters forensics aims to ascertain whether the genetic markers used in forensic genetics are sufficiently discriminatory and ultimately to calculate with great credibility which the probability of an individual being related to given process (criminal or civil) compared to another individual in the population.

It is important to stress that these are comparative analysis, by means of which will be inferred conclusions based on joint analysis of reference samples and questioned samples.

The study of nuclear DNA polymorphisms of the autosomal chromosomes, in this study allowed determining genetic profiles of two males, where there is sharing

of alleles at all *loci* analyzed bone samples of MTS and of the teeth sample of MS, establishing paternity inclusion of that condition in relation to this.

Once the genetic link compatibility and based on the values of allele frequencies published for the Brazilian population has made the statistical calculations using the statistical program 3.2.1 version FAMILIES, aiming to estimate the weight of the evidence.

Statistical analysis of genetic profiles in question allowed estimate is 23,061,412 times more likely that the body of MS is a biological child of the corpse of MTS, than another person chosen randomly in the Brazilian population, with probability of 99.99999%.

5 Discussion and conclusion

The traditional protocols of extracting DNA from bones and teeth through the traditional organic method, establish the demineralization of these materials prior to incubation in a solution of 0,5 M EDTA, pH 8.0, for a period of five days for up to 2 years of bone death. For these materials with smaller postmortem interval, uses the traditional organic extraction and subsequent amplification and genotyping of type STR markers, which allow to discriminate against an individual in genetically a gene pool of a trillion people.

For bones and teeth with more than 2 years of death, is also recommended prior demineralization, but most studies show that satisfactory results of genetic identification only been obtained through DNA sequencing mitochondrial, which presents itself less degraded in ancient bones and teeth.

Moreti (2009), assessed nine extraction methods of DNA from bones in 19 bones of 07 individuals, of whom, 02 were originate from exhumation; 03 came from ground deposition of earth; and 02 came from aquatic environment. Of the nine methods evaluated, eight were processed with the spraying of the fragments of the samples and only one, rendered with the fragments of the intact samples (not pulverized), having obtained DNA from almost all the samples, however, most of the DNA detected not was intact. Success was obtained in extraction of DNA from only a sample not pulverized (body deposited in soil of earth), for which there was

amplification and genotyping of 9 loci autosomal STRs more sexual *locus* in the eletroferograma.

Carvalho (2009) evaluated two methods of extracting DNA from bones in six samples of femur of two human bones exposed for a period of three months to various environmental conditions, such as heat, rain and humidity. The samples processed by the organic method, with prior descaling without spraying resulted in amplification and genotyping of 15 loci autosomal STRs more sexual *locus* in the eletroferograma. The samples were submitted for DNA extraction at traditional organic method (with pulverization) does not result in obtaining DNA that allow amplification of any *loci* in the eletroferograma, not generating a genetic profile.

Hasan *et al.*, (2014) analyzed 52 samples of remaining bones of bodies of victims of a building collapse in Dhaka, collected in the period from 7 to 15 days after the disaster. These samples were incubated without spraying in EDTA solution (0, 5 m, pH 7.5), for 15 days, being the solution changed every 24 hours. After PCR and genotyping of extracted DNA, most of the samples presented on 15 STR loci full profile, plus amelogenin.

Loreille *et al.*, (2007) analyzed the efficiency of extraction of DNA from bones sprayed with total demineralization, and obtained good results with just the sequencing of mtDNA and with Low Copy Number analysis, also suitable for samples containing little DNA. Another study of Adler *et al.*, 2011, also made use of mtDNA sequencing to identify human bones, with powdering, obtaining satisfactory results.

Other studies that used STRs markers for old bones and teeth, showed amplification and genotyping of alleles in up to 15 bullets, as verified on HASAN *et al.*, 2014 and Balayan, *et al.*, 2015.

In some cases, modified versions of these protocols, or additional steps are required to obtain a satisfactory result, for this reason, our alternative extraction protocol proved to be efficient because it allowed the isolation of DNA from high quality of a 17-year bone buried, in order to present a complete genetic profile of 27 markers, including the sexual marker (amelogenin), with the PowerPlex system Fusion 6C of the company Promega Corporation and a complete genetic profile of 24 markers, including sexual (amelogenin) marker, and the Y Indel marker, with the GlobalFiler® system of company Life Technologies.

Acknowledgements

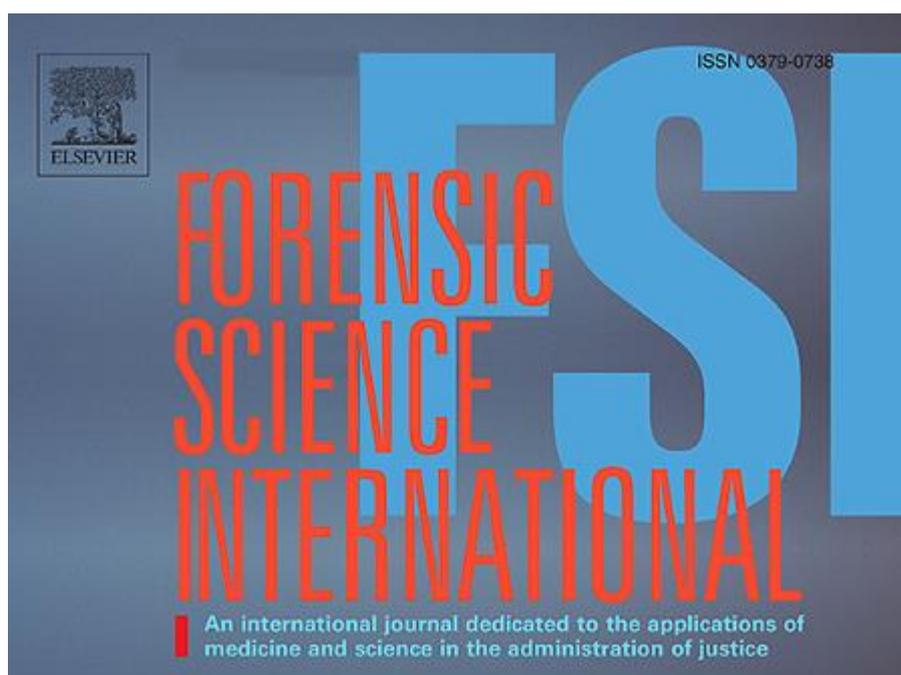
To Expertise Official of State of Alagoas, Brazil; Laboratory of Molecular Genetics, Genomics and Proteomics at the Federal University of Alagoas, Brazil, and Operational Management of DNA Analysis of the Institute of Scientific Police of Paraíba, Brazil for the collaboration and the support given to this study.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, C. J.; HAAK, W.; DONLON, D.; COOPER, A.; **Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones.** Journal of Archaeological Science. 38 (2011) 956-964
2. ARENAS, M.; PEREIRA, F.; OLIVEIRA, M.; PINTO, N.; LOPES, A. M.; GOMES, V.; CARRACEDO, A.; AMORIM, A. **Forensic genetics and genomics: Much more than just a human affair.** PLoS Genet 13(9): e 1006960 (2017).
3. BALAYAN, Ajay.; KAPOOR, Abhilasha.; CHAUDHARY, Garima.; RAINA, Anupuma. **Evaluation of techniques for human bone decalcification and amplification using sixteen STR markers.** Egyptian Journal of Forensic Sciences. (2015) 5, 30–35
4. BUDOWLE, B.; BROWN, B. L. **The use of DNA typing for forensic identification, Forensic Science**, v.1, n.1, p.23-37, 2001.
5. BUTLER, J. M. **Forensic DNA Typing.** 2. Ed. London: Elsevier Academic Press, 2005.
6. CARVALHO. Hérica Geovânia de Araújo. **Extração de DNA de ossos humano, sem pulverização, para uso em identificação forense.** Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2009.
7. GARRIDO, Rodrigo Grazinoli; RODRIGUES, Eduardo Leal; FRANCEZ, Pablo Abdon da Costa. Genética Forense. *In*: DIAS FILHO, Claudemir Rodrigues & FRANCEZ, Pablo Abdon da Costa. (org). **Introdução à Biologia Forense.** Campinas: Millennium, 2016.
8. HASAN, M.; HOSSAIN, T.; MAJUMDER, A. K.; MOMTAZ, P.; SHARMIN, T., AKHTERUZZAMAN, A.; AKHTERUZZAMAN, S. **An efficient DNA extraction method from bone and tooth samples by complete demineralization followed by the use of silica-based columns.** Dhaka Univ. J. Biol. Sci. 23(2): 101-107, 2014.

- 14 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.
- 15 MOLLY, Fitzgerald-Hayes.; Reichsman, Frieda. **DNA and Biotechnology.** 3. ed. San Diego: Elsevier. 2014.
- 16 MORETI, Tiago. **Uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.
- 17 PACHECO, Ana Cláudia. **Emprego de mini-STRs “non-CODIS” em amostras biológicas de DNA forense.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2010.
- 18 RAMALHO NETO, Cícero Eduardo. **Pesquisa e Desenvolvimento de Kits Industriais/In House para o Processamento de Touch DNAs/Next Generations Sequencing em Genética Forense e Utilização de DNA Barcoding/mtDNA e PCR/RFLPs em Saúde Pública, Visando à Identificação de Animais (Produtos e Subprodutos).** Projeto submetido à CAPES para o Edital Ciências Forenses n.º 25/2014. Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2014.
- 19 SARFIELD, P.; WICKHAM, C. L.; JOYNER, M. V.; ELLARD, S.; JONES, D. B.; WILKINS, B. S. **Formic acid decalcification of bones marrow 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.
- 20 SINGH, Veena M.; SALUNGA, Ranelle C.; HUANG, Vivian J.; TRAN, Yen.; ERLANDER, Mark.; PLUMLEE, Pam.; Peterson, Michael R. **Analysis of the effects of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies.** *Annals of Diagnostic Pathology.* Elsevier: 2013.

Artigo Submetido à Revista Qualis B1 da Biotecnologia



Occurrence of tri-allelic pattern in hydroxylase tyrosine locus - TH01

Rosana CF Silva^{1,2*}, Marek HF Eker¹, Marina L Mazanek¹, Carmélia S Miranda¹, Adenildo R dos Santos³, Silvana MC do Monte⁴, Sarah G de Castro⁴, Antonio C de Souza⁵, Alessandro LN Santos², Cícero E Ramalho-Neto²

¹Laboratório de Genética Forense, Instituto de Criminalística, Perícia Oficial de Alagoas – POAL – Maceió – AL, Brasil.

²Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica – GEMPRO, Universidade Federal de Alagoas – Maceió – AL, Brasil.

³Instituto Federal de Alagoas – Maceió – AL, Brasil

⁴ Gerência Operacional de Análise em DNA – Instituto de Polícia Científica da Paraíba, Brasil

⁵Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense – Polícia Científica de Pernambuco, Brasil

***Corresponding:**

Perícia Oficial de Alagoas

Instituto de Criminalística – Rua do Sol, 290, Centro.

Maceió – AL - Brasil

CEP: 50670-901

Phone: + 55 82 99917 8942

E-mail:rosanacfs24@gmail.com

ABSTRACT

The occurrence of two alleles in a human individual comes from the fact that one of them was inherited from the mother and the other from the father. Through molecular PCR technology, both alleles inherited by an individual can be amplified and identified. When occurs three alleles in a genetic marker this is named tri-allelic pattern. There are two types of tri-allelic pattern: type1, more common, where there is an imbalance in the size of the peaks and the type 2, where the peaks have intensity balancing. The locus TH01 seems particularly stable in any type of rearrangement considered, however, during the routine forensic cases in our laboratory, detected a tri-allelic pattern type 1 in the locus TH01, in genetic profile of a fragment of a femur received for the identification of an individual. The occurrence of tri-allelic pattern to the locus TH01 had not been reported in the literature of forensic science to the time that this article was written. Only on the site of the NIST STRBase (<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>) seven records of tri-allelic pattern for the locus TH01, being the tri-allelic pattern more often: 7, 8 and 9, which was found in 3 cases, in the absence of any description for the standard 6, 7 and 9.3. This lack of information is mainly due to the rarity of occurrence of rearrangement of alleles at this locus.

Keywords: Forensic DNA, tri-allelic pattern, TH01, STR

1 Introduction

The occurrence of two alleles in a human individual comes from the fact that one of them was inherited from the mother and the other from the father. Through molecular technology of polymerase chain reaction (PCR), both alleles inherited by an individual can be amplified and identified. After PCR, by means of the capillary electrophoresis, is held the nomenclature derived from automated reading of fragments of DNA, so that the alleles with changes in size are displayed as two heterozygous and alleles of the same size, as a single peak homozygous. In this reading, after extracted the artifacts, the extra peaks would show the presence of extra alleles, which, being a third allele, present themselves as a tri-allelic pattern (Zamir *et al.*, 2002).

There are two types of tri-allelic pattern: type 1, more common, where there is an imbalance in the size of the peaks, the sum of the maximum intensity of the affected allele variants being equivalent to the intensity of the non-mutant allele; and type 2, where the peaks have intensity balancing. Tri-allelic patterns of type 1 indicate a somatic mutation of one allele at one *locus* heterozygous during development of the individual, resulting in chimerism. Usually the mutational event is the addition or loss of a repeating unit. Tri-allelic patterns of type 2 indicate duplication event located on the same chromosome or translocated or aneuploidy chromosomal (trisomy). When it comes to duplication in, it is likely that the two alleles are inherited together because they will be strongly linked (Picanço, 2014).

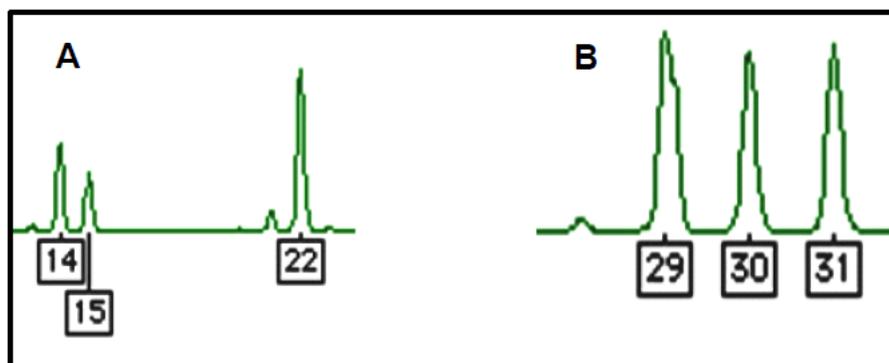


Figure 1 - Schematic representation of the profile of the two types of tri-allelic pattern when they appear in capillary electrophoresis analysis. Type A-1 standard: three alleles showing imbalance signs of intensities; B type 2 pattern: three alleles with the same signal strength. Retrieved from https://strbase.nist.gov/tri_tab.htm accessed April 2018.

The occurrence of tri-allelic pattern usually due to genetic duplications in tandem or dispersion of a small region of chromosome (partial trisomies); or incorrect segregation caused by a chromosomal meiotic or mitotic nondisjunction which leads to a full trisomy. For these reasons, the occurrence of tri-allelic pattern can give in only a few cell-groups and not in every cell of the organism – due to mosaicism and/or chimerism (Birolo, 2012).

TH01, also called TC11 or HUMTH01, is a *locus* tetrameric short tandem repeat, located in intron 01 tyrosine hydroxylase gene, which regulates gene expression and production of catecholamines with 9.3 allele exercising a particularly effect strong on the production of noradrenaline. Tyrosine hydroxylase catalyzes the hydroxylation of L-tyrosine to L-dopa and is the speed limiting enzyme in the synthesis of catecholamines such as noradrenaline or adrenaline, which are crucial in the regulation of arterial pressure (Klitschar *et al.*, 2005)

TH01 marker is part of the 20 loci STR panel of the Combined DNA Index System (CODIS), whose autosomal *loci* are: TPOX, D3S1358, D5S818, FIBER or FGA, D7S820, D8S1179, CSF1PO, TH01, D13S317, D16S539, vWA, D18S51, D21S11, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 and D22S1045, plus amelogenin gene homolog of (X and Y), that determines the sex (FBI, 2017). To be included in CODIS, the locus TH01 is widely used for analysis of human identification.

A tri-allelic pattern is a rare phenomenon and according to Clayton *et al* (2004) the locus TH01 seems particularly stable in any type of rearrangement. In a study on allelic variation, tri-allelic patterns and punctual mutations observed in nuclear STRs typing of the populations of Bosnia and Serbia, Huel *et al* (2007) observed a total of 15 tri-allelic patterns involving the following nine loci: TH01, D21S11, D18S51, PentaE, CSF1PO, PentaD, D8S1179, vWA, FGA and TPOX. For the locus TH01, was observed only a tri-allelic pattern with the alleles (7/8/9).

Although the locus TH01 is stable, the NIST STRBase database contains described 7 cases of tri-allelic patterns for TH01 locus. The tri-allelic pattern most frequent to the locus TH01 is (7, 8 and 9), having been found in a total of 3 cases, in the absence of any description with the pattern (6, 7 and 9.3). This data is available

in the database of STRs: <https://strbase.nist.gov/tri_tab.htm> and are updated often by the National Institute of Justice of the United States of America.

Table 1 describes the different tri-allelic pattern TH01 locus genotypes already identified, registering the tri-allelic pattern and the number of times that the genotype was found by analysis of STRs genotypes. In highlight the most frequent pattern (7, 8 and 9).

TH01Tri-allelic Genotypes	Genotypes number ¹
6, 8, 9	1
6, 9, 10	1
7, 8, 9	3
7, 9, 9.3	1
8, 9,10	1

¹ Represents the number of times that the genotype was detected by analysis STRs genotypes

Table 1 - Representation tri-allelic genotypes of locus TH01 and their respective frequencies. Retrieved from https://strbase.nist.gov/tri_tab.htm accessed September 2018.

2 Materials and Methods

During the routine forensic cases, fragments of a femur and dental elements of two individuals were received to determine whether there was a genetic link to fatherhood among them being the individual 1 (femur), supposed father of the individual 2 (teeth).

The DNA of the samples of these biological materials was extracted through the organic method, with phenol/chloroform and prior total demineralization. The extracted DNA was submitted to amplification, using the commercial kit Promega Corporation company PowerPlexFusion, which is used in the work routine of our laboratory. The polymerase chain reaction (PCR) of all samples were conducted in thermal cycler Proflex brand, of the company Life Technologies for amplification cycles 29, with two phases, the first being with two stages and the second, with only one stage.

The amplification products samples were genotyped for the following loci STR: CSF1PO, TH01, TPOX, D5S818, D7S820, vWA, D13S317, D16S539,

D21S11, FGA, D8S1179, D21S11, D3S1358, D18S51, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, Penta D, Penta E and the male-specific DYS391, In addition to the amelogenin gender identification.

Approximately 1 ng/μL of DNA was subjected to capillary electrophoresis in ABI 3500 Genetic Analyzer 3500 with POP-4 polymer and 36 cm capillary (Applied Biosystems). The data were analyzed in GeneMapper ® ID-X program version 1.5.

3 Results and Conclusion

The profile obtained from the individual 1 was compared with the profile of the individual 2 and there was a paternity between them. Table 1 presents the results of STR analysis of the individual 1 and the individual 2. It was observed a tri-allelic pattern type 1 in the locus TH01, with 6, 7 and 9.3 alleles.

Locus	Individual 1	Individual 2
Amelogenin	X/Y	X/Y
D3S1358	15/17	15/17
D1S1656	13/17	12/17
D2S441	11.3/14	11/14
D10S1248	15/16	13/15
D13S317	11/12	12/14
Penta E	8/10	7/8
D16S539	12/13	12/13
D18S51	12/19	12/19
D2S1338	17/20	17/20
CSFIPO	10/12	12
Penta D	9/13	9
TH01	6/7/9.3	9.3
VWA	16	16/17
D21S11	27/30	30/31.2
D7S820	10	10/11
D5S818	11/12	11/12
TPOX	8	8/12
DYS391	10	10
D8S1179	10/12	10/13
D12S391	18/20	20
D19S433	13/14	13
FGA	24	24/26
D22S1045	16	16

Table 2 – Comparison between the genetic profile between two individuals for determination of paternity

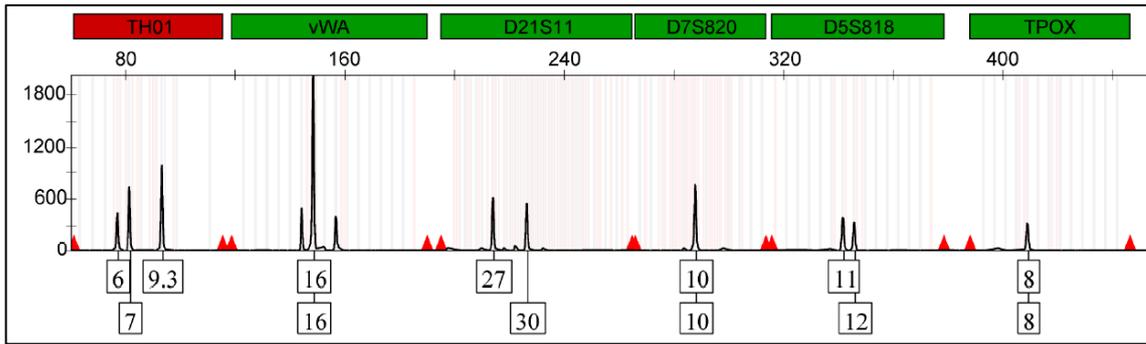


Figure 2 - Electropherogram of individual 1, showing the three peaks at the TH01 locus

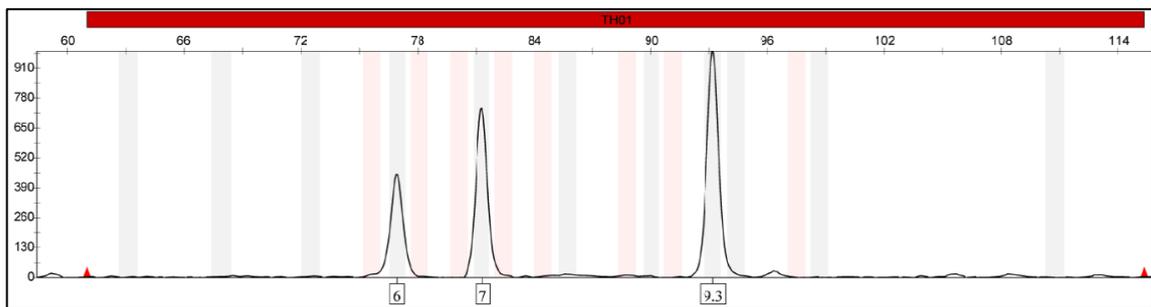


Figure 3 - Trilelelic pattern of type 1 found at locus TH01 of individual 1

The analysis was performed again in forensic laboratory of the Forensic Institute of Paraíba, having been confirmed the same tri-allelic pattern (Figure 4).

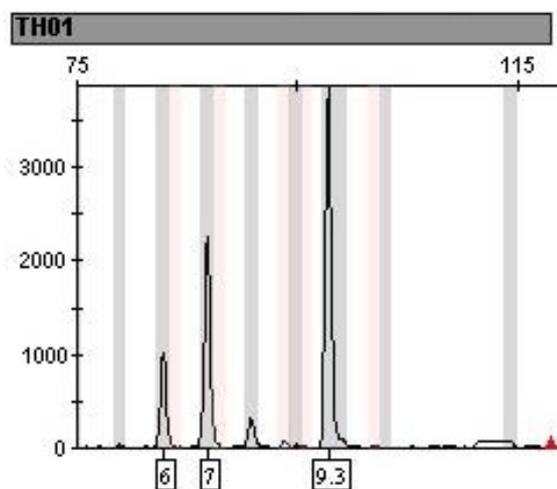


Figure 4 - Electropherogram of individual 1 realized in Instituto de Polícia Científica da Paraíba confirming the three peaks at the TH01 locus

It is considered a rare phenomenon, of a tri-allelic pattern STRs in a single locus. The occurrence of tri-allelic pattern to the locus TH01 had not been reported in the literature of forensic science to the time that this article was written. Only on the site of the NIST STRBase (strbase <http://www.cstl.nist.gov/biotech/>) seven records of tri-allelic profile standards for locus TH01, being the tri-allelic pattern more often: 7, 8 and 9, which was found in 3 cases, not having yet any description for the pattern 6, 7 and 9.3.

To calculate the statistical probability of this tri-allelic event within the profile, often uses the default $2pq$ for heterozygous and pick the two most common allele frequencies of the three for a value for p and q (Hessab et al., 2018). A second approach avoids any statistical calculations in the report about the frequency of these three alleles at this locus due to the rarity of occurrence. Due to the fact we've never encountered previously such phenomenon in locus TH01 or any other loci in our lab, we take a more conservative approach and include the locus TH01 in the results, but do not include statistical calculations . We calculate the statistical probability of paternity link using only twenty-two loci, of the 23 analyzed, resulting a frequency of approximately 1 in 30 million, according to the brazilian population using a theta correction of 2%.

Due to the fact that our report is a routine forensic case, a deeper analysis of family could not be performed. We believe that the lack of scientific information and data on the tri-allelic patterns in the locus TH01 presents a challenge to the analysis of the reasons that make this pattern occurs. This lack of information is mainly due to the rarity of occurrence of rearrangement of alleles at this locus.

Acknowledgements

To Expertise Official of State of Alagoas, Brazil; Laboratory of Molecular Genetics, Genomics and Proteomics at the Federal University of Alagoas, Brazil, and Operational Management of DNA Analysis of the Institute of Scientific Police of Paraíba, Brazil for the collaboration and the support given to this study.

4 References

1. Birolo, L. M. B. 15 STRs autosomal loci analysis on population of the State of Acre, northern Brazil. (2012). Dissertação. University of Porto.
2. Clayton TM, Guest JL, Urquhart AJ, Gill PD. A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling (2004) *J. Forensic Sci.* 49, 1207–1214.
3. FBI - Federal Bureau of Investigation. <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis>. (Accessed in 05/10/2018)
4. Hessab, T., Aranha, R.S., Moura-Neto, R.S., Balding, D.J., Schrago, C.G. Evaluating DNA evidence in a genetically complex population. *Forensic Science International-Genetics* 36 (2018) 141-147.
5. Huel, R. L. M., Bašić, L., Madacki-Todorović, K., Smajlović, L., Eminović, I., Berbić, I., Miloš, A., Parsons, T. J. Variant Alleles, Triallelic Patterns, and Point Mutations Observed in Nuclear Short Tandem Repeat Typing of Populations in Bosnia and Serbia. *Croat Med J.* 2007 Aug; 48(4): 494–502.
6. Klintschar, M., Immel, Uta-Dorothee, Stiller D., Kleiber, M. TH01, a tetrameric locus of short tandem repeats in the tyrosine hydroxylase gene: Association with myocardial hypertrophy and death from myocardial infarction?. *Germany Disease Markers* 21 (2005) 9–13 IOS Press.
7. Lukka, M., Tasa, G., Ellonen, P., Moilanen, K., Vassiljev, V., & Ulmanen, I. (2006). Triallelic patterns in STR loci used for paternity analysis: Evidence for a duplication in chromosome 2 containing the TPOX STR locus. *Forensic Science International*, 164(1), 3-9.
8. Picanço JB, Raimann PE, Paskulin GA, Alvarez L, Amorim A, dos Santos SEB, Alho CS. Tri-allelic pattern at the TPOX locus: A familial study (2014) *Gene* 535 (2014) 353–358.
9. STRBase. Available in: http://www.cstl.nist.gov/strbase/tri_tab.htm. (Accessed in 05/09/2018)
10. Zamir, A., Shpitzen, M., Oz, C., Motro, U., Meiner, V., & Gafny, R. (2002). Presentation of a Three-Banded Allele Pattern—Analysis and Interpretation. *Journal of Forensic Science*, 47(4), 1-3.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A maioria dos protocolos forenses tradicionais de extração de DNA de ossos e dentes por meio preveem a pulverização prévia desses ossos e dentes, seguida da desmineralização desses materiais com a incubação numa solução de EDTA 0,5M, pH 8,0, por um período de cinco dias para ossos de até 2 anos de morte. Para esses materiais de menor intervalo pós-morte, procede-se à extração orgânica tradicional (fenol/clorofórmio) ou extração automatizada e posterior amplificação e genotipagem de marcadores do tipo STR, que permitem discriminar geneticamente um indivíduo em um *pool* genético de um trilhão de pessoas.

Para ossos e dentes com mais de 2 anos de morte, também é recomendada a pulverização prévia seguida de desmineralização, porém a maioria dos estudos realizados mostram que resultados satisfatórios de identificação genética somente foram obtidos por meio de sequenciamento de DNA mitocondrial (mtDNA), que é o método que apresenta melhores resultados para ossos e dentes antigos degradado.

LOREILLE *et al.*, 2007 analisaram a eficiência de extração de DNA de ossos pulverizados, seguida de total desmineralização, tendo obtido bons resultados apenas com o sequenciamento do mtDNA e com a análise de *Low Copy Number*, também adequado para amostras que contém pouco DNA.

Outro estudo de ADLER *et al.*, 2011, também fez uso de sequenciamento do mtDNA para identificação de ossos humanos, obtendo resultados satisfatórios. O nosso protocolo permitiu a amplificação de marcadores STRs do DNA nuclear, que são bem mais simples de se trabalhar e permitem resultados mais consistentes, uma vez que o DNA mitocondrial determina apenas a linhagem materna, não podendo afirmar se se trata de filho, pai, mãe, irmão etc, já o marcadores STRs do DNA nuclear permitem afirmar que se tratam desses parentes ascendentes, descendentes e colateral, especificamente.

FERREIRA *et al.*, (2013), compararam dois protocolos de extração de DNA de ossos, sendo alguns desses, de cadáveres exumados, que permaneceram enterrados entre os anos de 1993 e 2010 (8 a 25 anos) e outros não enterrados,

encontrados entre os anos de 2002 e 2010 (8 e 15 anos). Durante o tratamento prévio, esses ossos também foram pulverizados, diferentemente do nosso tratamento prévio, que desmineraliza sem pulverização. Depois desse tratamento prévio, as amostras dos ossos foram submetidas à extração do DNA por métodos não automatizados. Nos eletroferogramas, apenas 15 marcadores apresentaram alelos, diferentemente dos nossos eletroferogramas, que apresentaram perfil completo com alelos nos 27 marcadores analisados.

Um estudo de DESMYTER *et al*, (2017) foi eficiente em extrair DNA de ossos antigos, com tratamento prévio com desmineralização sem pulverização, entretanto a extração do DNA foi realizada em plataforma automatizada, o que difere do nosso estudo, no qual o DNA das amostras foi extraído pelo método orgânico fenol/clorofórmio, que é bem mais barato e acessível para os laboratórios forenses que não dispõem de plataformas automatizadas.

Outros estudos que utilizaram marcadores STRs para ossos e dentes antigos, apresentaram amplificação e genotipagem de alelos em até 15 marcadores, como verificado em HASAN *et al.*, 2014 e BALAYAN, *et al*, 2015 e Kitayama *et al*, 2010.

Diante do exposto, o nosso protocolo de extração alternativo mostrou-se eficiente, pois possibilitou a extração de DNA de alta qualidade de um osso exumado, que estava inumado há 17 anos, apresentando um perfil genético completo para os 27 marcadores do sistema *PowerPlex Fusion 6C* da empresa *Promega Corporation* e, um perfil genético completo para os 24 marcadores do sistema *GlobalFiler®* da empresa *Life Technologies*.

Em relação ao DNA de toque, nem todas as técnicas que são utilizadas para coleta de DNA de sangue, esperma e saliva são eficazes para a coleta de DNA de toque. O DNA transferido para um objeto geralmente está presente em quantidades menores na cena do crime quando comparado com o DNA de fluidos corporais. O DNA de toque também é invisível a olho nu e, frequentemente, um cientista forense só pode estimar a sua localização na superfície de um objeto (KIRGIZ & CALLOWAY, 2017).

Existem hoje no mercado, suabes (hastes flexíveis, com extremidade de algodão) que são utilizados umedecidos com água ultrapura (livre de DNase), para a

coleta de DNA de Toque em superfícies rígidas não porosas como metal, vidro ou plástico. Por meio desses sabões, as amostras biológicas contendo o DNA de toque são coletadas por esfregaços de um suabe umedecido, seguido por esfregaço de um suabe seco. Esse método geralmente é ineficiente, pois não possibilita a coleta de uma boa quantidade de células, que permitam a tipagem de um perfil genético completo, pois a água por si só não capta todas as células, uma vez que é necessário que haja uma solução com reagentes atrativos do DNA.

Além de métodos de limpeza (suabe molhado/seco) e de corte, o levantamento de DNA de toque por meio de fitas adesivas tornou-se um importante método para coletar DNA de itens de cena de crime, e muitos laboratórios forenses no mundo, vêm fazendo uso dessa metodologia para a coleta desse tipo de depósito de DNA em tecidos. No entanto, há uma escassez de dados relativos à eficácia dos diferentes tipos de fitas existentes para levantamento de DNA, a quantidade de levantamentos necessários para gerar um perfil útil, e se o levantamento por fita é mais eficaz do que a coleta por limpeza do substrato com suabe umedecido.

O DNA de toque muitas vezes produz somente um perfil parcial que é frequentemente atribuído a um baixo nível de deposição de um doador. No entanto, baixos rendimentos de DNA também podem ser explicados pela aplicação de métodos de coleta ineficazes, que deixam para trás uma porção do DNA depositado no substrato (LIU, 2015).

De acordo com DALY *et al.* (2011), a quantidade de DNA transferido para um substrato durante o manuseio independe do tempo de manuseio, mas depende do manipulador e do substrato manipulado. Substratos porosos aderem, mais facilmente, células epiteliais superficiais do que substratos não porosos. Um estudo de WICKENHEISER & JOBIM (2002) *apud* DALY *et al.* (2011), constatou que indivíduos diferem em sua tendência para depositar DNA quando em contato com um objeto, já SEWELL *et al.* (2008) *apud* DALY *et al.* (2011) não encontraram evidências de que haja uma nítida diferença entre bons e maus eliminadores de células epiteliais, mas que um indivíduo pode agir como ambos os tipos, dependendo de quando eles são amostrados. Dessa forma DALY *et al.* (2011) concluiu que a taxa de sucesso em se conseguir um perfil de DNA de uma superfície

de um objeto tocado dependerá do indivíduo que tocou o objeto, que mão ele usou, das atividades do indivíduo antes de tocar o objeto e a natureza do objeto.

HANSSON et al., (2009), testaram dois tipos de suabes e uma minifita industrializada para coleta de DNA de toque, ficando demonstrado que não houve diferença na performance dos dois tipos de suabe na recuperação dos traços de amostras, porém a minifita mostrou-se mais adequada para a recuperação de amostras de DNA em materiais absorventes.

JOËL et al., 2015, testaram a recuperação de DNA por meio de minifitas da marca Scensafe FAST™ em 10 amostras simuladas de DNA de toque, produzidas em tecido 100% algodão, obtendo resultados satisfatórios na maioria delas.

VERDON et al., (2014), compararam duas fitas de diferente força adesiva, atualmente usadas no tratamento de casos forenses: Scotch® Magic™ e Scenesafe FAST™, para amostragem de depósitos de DNA de toque em quatro diferentes tecidos de roupas, tendo a fita Scenesafe FAST™ se mostrado mais eficiente em relação à quantidade de DNA recuperado, por apresentar maior adesão do que a fita Scotch® Magic™. Além disso, ficou comprovado que há vantagem em se utilizar fita-levantadora ao invés de limpeza por suabe em tecidos,

Nesse sentido, nosso kit de fitas coletoras, mais a solução extratora de DNA de toque, mostrou-se eficiente na extração de DNA da corda elástica “stick”, pois, com o uso desse kit, foram analisadas 10 amostras de 01 (uma) corda elástica usada em bagageiros de motocicletas e bicicletas, denominada popularmente “stick”, que foi utilizada para amarrar uma vítima de homicídio. As amostras referência foram 02 (dois) suabes de esfregaço da mucosa bucal de dois suspeitos do crime e 01 (um) suabe de esfregaço da mucosa bucal da vítima.

O eletroferograma da eletroforese capilar apresentou DNA em quantidade e qualidade suficiente para genotipagem, mostrando um perfil genético de mistura, com a presença de pelo menos um indivíduo do sexo masculino, com amplificação de DNA de mais de dois alelos em alguns marcadores, o que significa a presença de DNA de mais de uma pessoa na amostra, incluindo um dos suspeitos na cena do crime.

Em pesquisa realizada em endereços de busca específicos, foram encontradas apenas dois registros de patentes de equipamentos metodologias para coleta e extração de DNA de toque.

O documento de patente WO2018053191 (A1), intitulada APPARATUS AND METHOD FOR COLLECTING TOUCH DNA, refere-se a dispositivos e métodos para a coleta e armazenamento de DNA de baixo número de cópias, como DNA de toque, para posterior análise. O coletor possui uma matriz coletora com um suporte não-reativo e não poroso em forma de espuma. A matriz é impregnada com uma composição química capaz de lisar células e desnaturar proteínas. Os ácidos nucleicos são depositados diretamente na matriz coletora e estabilizados para armazenamento a longo prazo, eliminando a necessidade de transferir o DNA que pode diminuir o rendimento total do DNA. Essa patente é diferente da nossa, pois a nossa é constituída de fitas adesivas com a solução coletora, onde o DNA fica imobilizado e protegido de proliferação microbiana, preservando-o para a sequência dos procedimentos de extração, isolamento e purificação, por meio da solução extratora.

O documento de patente WO2011050086 (A2), intitulada COLLECTION OF TRACE CHEMICALS, BIOLOGICAL FLUIDS, FIBERS, AND TOUCH DNA, refere-se a uma fonte de vácuo manual com vários acessórios em um kit, para coletar amostras difíceis de coletar na forma líquida ou seca. Nesse equipamento, existe um cabeçote de coleta de amostras, com acoplamento liberável para uma fonte de vácuo manual e o cabeçote de coleta de amostras tem uma entrada de amostras. Esse cabeçote de coleta da amostra pode ser uma ponta ou uma ponta em combinação com um adaptador de vácuo. Essa patente é diferente da nossa, pois se trata de um dispositivo mecânico e a nossa coleta o DNA por meio de fitas adesivas impregnadas da solução coletora, que faz com que o DNA fique imobilizado e protegido de proliferação microbiana, preservando-o para a sequência dos procedimentos de extração, isolamento e purificação, por meio da solução extratora.

Devido à eficiência do nosso kit, aliado ao seu custo/benefício para os laboratórios forenses, bem mais acessível do que as fitas industrializadas e comercializadas atualmente, solicitamos registro patentário no INPI sob número de protocolo BR 10 2018 071232 2.

REFERÊNCIAS

9. ADLER, C. J.; HAAK, W.; DONLON, D.; COOPER, A.; **Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones.** Journal of Archaeological Science. 38 (2011) 956-964
10. BALAYAN, Ajay.; KAPOOR, Abhilasha.; CHAUDHARY, Garima.; RAINA, Anupuma. **Evaluation of techniques for human bone decalcification and amplification using sixteen STR markers.** Egyptian Journal of Forensic Sciences. (2015) 5, 30–35
11. BUDOWLE, B.; BROWN, B. L. **The use of DNA typing for forensic identification, Forensic Science**, v.1, n.1, p.23-37, 2001.
12. BUDOWLE, B.; EISENBERG, Arthur J.; DAAL, Angela van. **Validity of Low Copy Number Typing and Applications to Forensic Science.** Croat Med J. 2009 Jun; 50(3): 207–217.
13. BUTLER, J. M. **Forensic DNA Typing.** 2. Ed. London: Elsevier Academic Press, 2005.
14. CARVALHO. Hérica Geovânia de Araújo. **Extração de DNA de ossos humano, sem pulverização, para uso em identificação forense.** Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2009.
15. DALY, D.J.; MURPHY, C.; McDERMOTT, S. D. **The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood,** Forensic Sci. Int. Genet. (2011), doi:10.1016/j.fsigen.2010.12.016
16. DESMYTER, S.; COCK, G. de; MOULIN, S.; NOËL, Fabrice. **Extração orgânica de osso lisados melhora a purificação de DNA com grânulos de sílica.** Forensic Science International 273 (2017) 96-101.
17. FBI - Federal Bureau of Investigation. <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis>. Acessado em 11 junho 2018.
18. FERREIRA, S.T. G.; PAULA, K. A.; MAIA, F. A.; MORAES, A. V. **A comparative study between two protocols for DNA extraction from bones.** Forensic Science International: Genetics Supplement Series 4 (2013) e374-e375.

19. FRANCEZ, Pablo Abdon da Costa; RODRIGUES, Eduardo Leal; GARRIDO, Rodrigo Grazinoli. *Genética Forense*. In: DIAS FILHO, Claudemir Rodrigues & FRANCEZ, Pablo Abdon da Costa. (org). **Introdução à Biologia Forense**. Campinas: Millennium, 2016.
20. GARRIDO, Rodrigo Grazinoli; RODRIGUES, Eduardo Leal. **Ciência Forense: da Cena do Crime ao Laboratório de DNA**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural/FAPERJ, 2014.
21. GARRIDO, Rodrigo Grazinoli; RODRIGUES, Eduardo Leal; FRANCEZ, Pablo Abdon da Costa. *Genética Forense*. In: DIAS FILHO, Claudemir Rodrigues & FRANCEZ, Pablo Abdon da Costa. (org). **Introdução à Biologia Forense**. Campinas: Millennium, 2016.
22. GOODWIN, W.; LINACRE, A.; HADI, S. **An introduction to forensic genetics**. John Wiley & Sons, 2011.
23. GRIFFITHS, Anthony J. F.; WESSLER, Susan R.; CARROLL, Sean B; DOEBLEY, John. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
24. HASAN, M.; HOSSAIN, T.; MAJUMDER, A. K.; MOMTAZ, P.; SHARMIN, T., AKHTERUZZAMAN, A.; AKHTERUZZAMAN, S. **An efficient DNA extraction method from bone and tooth samples by complete demineralization followed by the use of silica-based columns**. Dhaka Univ. J. Biol. Sci. 23(2): 101-107, 2014.
25. HANSSON, Oskar.; FINNEBRAATEN, Marianne.; Heitmann, Ingebjørg Knutsen.; Merete, Ramse.; Bouzga, Mariam. **Trace DNA collection—Performance of minitape and three different swabs**. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2 (2009) 189–190.
26. JOËL, J.; GLANZMANN, B.; GERMANN, U.; COSSU, C. **DNA extraction of forensic adhesive tapes—A comparison of two different methods**. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 5 (2015) e579–e581.
- 21 JEFFREYS, Alec; WILSON V.; THEIN S. L.; **Hypervariable “minissatellite” regions in Human DNA**. Nature v. 314, p. 68-73, 1985.
- 22 JEFFREYS, Alec; 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.
- 23 JOBIM, Luiz Fernando; COSTA, Luís Renato da Silveira; Silva, Moacyr da. **Identificação Humana**. Campinas: Millennium, 2005

- 24 JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 12 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013.
- 25 KIRGIZ, I. A.; CALLOWAY, C. **Increased recovery of touch DNA evidence using FTA paper compared to conventional collection methods**. Journal of Forensic and Legal Medicine 47 (2017) 9e15
- 26 KITAYAMA, Tetsushi.; OGAWA.,Yoshinori.; FUJII. Koji.; NAKAHARA, Hiroaki.; MIZUNO, Natsuko.; SEKIGUCHI, Kazumasa.; KASAI, Kentaro.; YURINO, Noriko.; YOKOI, Takahide.; FUKUMA, Yoshiya.; YAMAMOTO, Kenji.; OKI, Takahito.; ASAMURA, Hideki.; FUKUSHIMA, Hirofumi. **Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method**. Legal Medicine 12 (2010) 84–89.
- 27 LIU, Jason Y. **PE-swab direct STR amplification of forensic touch DNA samples**. J Forensic SCI, May 2015, vol. 60, no. 3. Disponível online em: onlinelibrary.wiley.com)
- 28 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.
- 29 MARINI, Maria Christina. **Comparação entre métodos de extração de DNA em tecido ósseo - método orgânico com digestão pela proteinase k e método com movimento de precessão - utilizando como parâmetros a eficiência de amplificação de STRs autossômicos**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.
- 30 MATOS, Sara Mulas Sá de, **Identificação genética humana: Estudo de novos marcadores genéticos do tipo STR e Indel**. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular em Saúde, Escola Superior em Saúde. Almada, 2013.
- 31 MARTÍNEZ-CORTÉS, G.; GUSMÃO, L.; Pereira, R.; SALCIDO, V.H.; FAVELA-MENDOZA, A.F.; MUÑOZ-VALLE, J.F.; INCLÁN-SÁNCHEZ, A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, L.B.; RANGEL-VILLALOBOS, H. **Genetic structure and forensic parameters of 38 Indels for human identification purposes in eight Mexican populations**. Forensic Science International. Genetics (Print), v. 17, p. 149-152, 2015.
- 32 MINOR, Joe. **Touch DNA: From the Crime Scene to the Crime Laboratory**. Disponível em: <https://translate.google.com.br/translate?hl=pt-BR&sl=en&u=http://www.forensicmag.com/article/2013/04/touch-dna-crime-scene-crime-laboratory&prev=search> Acesso em 19 abril 2017.

- 33 MOLLY, Fitzgerald-Hayes.; Reichsman, Frieda. **DNA and Biotechnology**. 3. ed. San Diego: Elsevier. 2014.
- 34 MONTANARI, Tatiana. Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas [recurso eletrônico]. 3.ed. Porto Alegre. Edição do Autor, 2016. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodehisto/>. Acessado em 05 junho 2017.
- 35 MORETI, Tiago. **Uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.
- 36 NUNN, Samuel. Touch DNA Collection Versus Firearm Fingerprinting: Comparing Evidence Production and Identification Outcomes. *J Forensic Sci*, May 2013, Vol. 58, No. 3. Disponível online em: onlinelibrary.wiley.com.
- 37 PACHECO, Ana Cláudia. **Emprego de mini-STRs “non-CODIS” em amostras biológicas de DNA forense**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2010.
- 38 RAMALHO NETO, Cícero Eduardo. **Pesquisa e Desenvolvimento de Kits Industriais/In House para o Processamento de Touch DNAs/Next Generations Sequencing em Genética Forense e Utilização de DNA Barcoding/mtDNA e PCR/RFLPs em Saúde Pública, Visando à Identificação de Animais (Produtos e Subprodutos)**. Projeto submetido à CAPES para o Edital Ciências Forenses n.º 25/2014. Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2014.
- 39 RODRIGUES, Eduardo Leal.; FRANCEZ, Pablo Abdon da Costa.; GARRIDO, Rodrigo Grazinoli. Genética Forense. *In*: DIAS FILHO, Claudemir Rodrigues & FRANCEZ, Pablo Abdon da Costa. (org). **Introdução à Biologia Forense**. Campinas: Millennium, 2016.
- 40 SANTOS, Cristina Mamédio da Costa.; PIMENTA, Cibele Andrucio de Mattos.; NOBRE, Moacyr Roberto Cuce. **The PICO strategy for the research question constructio and evidence search**. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* vol.15 no.3 Ribeirão Preto June 2007.
- 41 SANTOS, Sandra Maria dos. **Identificação Humana como Ferramenta de Investigações Criminais: Estudo de Frequências Alélicas de Marcadores de Interesse Forense no Estado de Pernambuco**. Tese de Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014.

- 42 SARSFIELD, P.; WICKHAM, C. L.; JOYNER, M. V.; ELLARD, S.; JONES, D. B.; WILKINS, B. S. **Formic acid decalcification of bones marrow 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.
- 43 SEWELL *et al.* (2008) *apud* DALY. D.J.; MURPHY. C.; McDERMOTT. S. D. **The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood**, Forensic Sci. Int. Genet. (2011), doi:10.1016/j.fsigen.2010.12.016
- 44 SINGH, Veena M.; SALUNGA, Ranelle C.; HUANG, Vivian J.; TRAN, Yen.; ERLANDER, Mark.; PLUMLEE, Pam.; Peterson, Michael R. **Analysis of the effects of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies.** Annals of Diagnostic Pathology. Elsevier: 2013.
- 45 VELHO, Jesus Antônio.; COSTA, Karina Alves, DAMASCENO.; DAMASCENO, Claylton Tadeu Mota. **Locais de Crime: dos vestígios à dinâmica criminosa.** Campinas: Millennium, 2013.
- 46 VERDON, Timothy J.; MITCHELL, R. John.; OORSCHOT, Roland A.H.van. **Evaluation oh tapelifting as a collection method for touch DNA.** Forensic Science International: Genetics, Volume 8, Issue 1, January 2014, Pages 179-186.
- 47 WATSON, James D.; BAKER, Tania A.; BELL, Stephen P.; GANN, Alexander; LEVINE, Michael; LOSICK, Richard. **Biologia Molecular do Gene.** Tradução: Luciane Passagli, Rivo Fischer. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- 48 WICKENHEISER & JOBIM (2002) *apud* DALY. D.J.; MURPHY. C.; McDERMOTT. S. D. **The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood**, Forensic Sci. Int. Genet. (2011), doi:10.1016/j.fsigen.2010.12.016
- 49 WILLIAMSON AL. Touch DNA: **Forensic Collection and Application to Investigations.** J Assoc Crime Scene Reconstr. 2012:18(1);1-5.
- 50 ZEITKIEWICZ, E.; WITT, M.; DACA, P., ZEBRACKA-GALA, J.; GONIEWICZ, M.; JARZAB. B. Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. Journal of Applied Genetics. Maryland: 15 de fevereiro de 2012. 201 53:41-60.

