

## **Aprimoramento de técnica de Extração de DNA de Ossos Enhancement technique for extraction of DNA from bones**

**Bruna Graziella Berto da Penha Bizerril<sup>a</sup>; Rogéria Maria Ventura<sup>a</sup>**

a: Faculdade de Biomedicina, Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas; Av. Santo Amaro, 1239, Vila Nova Conceição, São Paulo, Brasil. CEP: 04505-001.

### **RESUMO**

A identificação humana *post-mortem* se faz necessária não só por razões humanitárias, mas também por questões judiciais. A identificação de um cadáver recente pode ser realizada pelos traços, feições, tatuagens ou outras características corpóreas do indivíduo sem maiores dificuldades. Porém, quando se trata de cadáveres em avançado estado de decomposição, corpos carbonizados ou de achados de fragmentos corpóreos, a identificação visual se torna impraticável, sendo necessário o uso da Biologia Molecular para tal finalidade. A extração do DNA a partir de amostras de tecidos do corpo é o passo inicial dentre as técnicas de Biologia Molecular, empregadas para estabelecer a identidade genotípica do indivíduo. Os tecidos rígidos, como ossos e dentes, constituem boas fontes de amostras biológicas para as análises moleculares pela conservação das estruturas celulares durante o período pós-morte, em contra partida aos tecidos moles que degradam-se num curto período de tempo. A aplicação da análise do DNA nas Ciências Forenses é substancial. Para tal se faz necessário protocolos adequados de extração de DNA, que ofereçam baixos custos, rapidez em sua execução e eficiência. Este trabalho visou aprimorar a técnica de *Salting-out* para extração de DNA de ossos e verificar, por técnicas de Biologia Molecular, a viabilidade do material obtido para os ensaios de identificação genética de indivíduos.

Palavras Chaves: Ossos, Análises de DNA, Salting-Out, Identificação humana, Ciências Forenses.

### **SUMMARY**

Human postmortem identification is necessary not only for humanitarian reasons, but also by judicial issues. The recent identification of a corpse can be performed by traits, features, tattoos or other bodily characteristics of the individual without difficulty. But when it comes to corpses in an advanced state of decomposition, charred or findings of tangible fragments, bodies visual identification is impractical, the use of molecular biology for that purpose is required. DNA extraction from samples of body tissues is the initial step among molecular biology techniques, employed to establish the genotypic identity of the individual. Hard tissues such as bones and teeth are good sources of biological samples for molecular analyzes the preservation of cellular structures during the postmortem period, starting from the soft tissues that degrade in a short period of time. Application of DNA analysis in forensic sciences is substantial. Needed for such protocols suitable for DNA extraction, which offer low cost, speed and efficiency in implementation is done. This work aims to improve the technique of *salting -out* for DNA extraction from bones and verify by molecular biology techniques, the viability of the material obtained for testing for the genetic identification of individuals.

## Introdução

A identificação humana através de análise de DNA extraído de ossos humanos tem contribuído para identificação de cadáveres em varias situações, como quando há restos humanos não identificados ou em desastres em grande escala<sup>1</sup>. Este é um evento inesperado que causa sérios danos e mortes a um grande número de pessoas. Esses eventos podem ter causas naturais como enchentes, terremotos e tsunamis; causas acidentais como incêndios, queda de aeronaves, descarrilamentos ou causas terroristas<sup>2</sup>. Os desastres em massa são definidos pela Associação Médica Mundial como a ocorrência súbita de um evento calamitoso, normalmente instantâneo e violento, que tem como resultado dano material significativo, mobilização considerável de pessoas, um numero grande de vítimas e perturbação significativa da sociedade, ou uma combinação dessas situações<sup>3</sup>. Como o acontecido em 1974 onde um curto circuito em um ar condicionado deu início ao incêndio que acometeu o Edifício Joelma, localizado na Av. Nove de julho no Coração da Capital paulista, totalizando 191 óbitos<sup>4</sup>. Ou em 2004 quando um terremoto com magnitude sísmica de 9.1 abalou a costa da província da Indonésia de Aceh em dezembro. Este desencadeou um Tsunami no oceano Índico causando a morte de cerca de 226.303 mil pessoas, onde 37.087 na Indonésia, 23.231 no Sri Lanka, 12.405 na Índia, 5.395 na Tailândia, 164 no leste da África, 82 nas Maldivas, 69 na Malásia, 61 em Mianmar e 2 em Bangladesh<sup>5</sup>. Em 2006 o Boeing 373 (Voo 1907) da empresa aérea Gol, em 29 de Setembro decolou de Manaus com destino a Brasília colidiu com o Jato particular Galacy com 157 vítimas fatais que viajavam a bordo, foi o segundo acidente aéreo mais grave no Brasil em número de vítimas<sup>6</sup>. Em maio de 2009 um Airbus da companhia aérea Air France que fazia o voo AF 447, do Rio de Janeiro para Paris, caiu no Oceano Atlântico com 228 pessoas a bordo após ter decolado do Rio de Janeiro. Não houve sobreviventes<sup>7</sup>. Recentemente uma festa universitária acabou em tragédia. Na madrugada de 27 de Janeiro de 2013 na Boate Kiss em Santa Maria (RS), o incêndio resultou na morte de mais de 240 pessoas, a maioria asfixiada<sup>8</sup>.

A identificação forense de vítimas de desastres de massa é essencial por razões não apenas humanitárias, mas também devido à necessidade de investigação civil e/ou criminal, e é essencialmente baseada em técnicas de antropologia, odontologia e patologia forense utilizando análises de radiografias, de tomografias e de perfil genético do DNA<sup>2</sup>. Porém, esta apresenta uma série de desafios físicos e legais, envolvendo a degeneração dos restos humanos e os obstáculos legais para exames forense<sup>9</sup>.

Antropologia forense atua em casos de mortes humanas quando os tecidos moles estejam degradados a ponto de que os outros especialistas não tenham mais recurso para determinar informações sobre o indivíduo ou a causa da morte. Através da comparação da análise das ossadas realiza-se a estimativa do sexo, ancestralidade, idade, estatura, destreza manual<sup>10</sup>. Recriando características fenotípicas realizando a identificação facial através do retrato falado, ou mais recentemente o novo Laboratório de Arte Forense do Departamento Estadual de Homicídios e de Proteção à Pessoa (DHPP) através de poucas características com uso de computação gráfica realizaram a reconstituição facial reproduzindo um retrato 3D da cabeça encontrada na Praça da Sé em 27 de março deste mesmo ano e que faz parte do corpo esquartejado encontrado em Higienópolis no dia 23<sup>11</sup>. Os dentes por terem uma grande durabilidade oferecem uma grande virtude para identificação humana pela análise dos arcos dentais<sup>12</sup>. Através dos dados e registros radiográficos contidos no prontuário odontológico o odontologista legal faz comparações *ante-mortem* com os *post-mortem*, comparando-se o prontuário com a situação dentária atual do cadáver<sup>13</sup>.

A análise do DNA na maioria das vezes é a única técnica capaz de fornecer informações da identidade de qualquer tipo de tecido, desde que a amostra possua uma quantidade suficiente de material. Esta condição é crucial em acidentes em que a fragmentação corpórea é severa<sup>14</sup>. A velocidade da recuperação e da preservação das amostras afetará as taxas de sucesso da tipagem do DNA. Amostras coletadas no local do desastre devem seguir os princípios de coleta de provas forenses que incluem a documentação, rótulos adequados, e uma cadeia de custódia<sup>15</sup>.

As técnicas de tipagem de DNA representam um avanço na identificação humana <sup>16</sup>. A análise do DNA tem desempenhado um papel muito importante na identificação de restos humanos, e particularmente para corpos altamente decompostos e restos fragmentados. Para os casos que envolvem mortes de massa e/ou corpos altamente fragmentados, o DNA proporciona um componente essencial do processo de identificação <sup>17</sup>.

A melhor fonte para obtenção de amostras de DNA não degradadas em desastres de massa são os ossos e dentes. Os procedimentos para extração de DNA de ambas as amostras são bem estabelecidos, laboriosos e demorados <sup>2</sup>.

Para detecção do indivíduo é necessário à utilização de vestígios de fluidos biológicos, como sangue, esperma, saliva, secreções, restos mortais fragmentados e Ossos<sup>18</sup>. Uma vez que os ossos são a única fonte de material genético em muitos cenários catastróficos, protocolos robustos para a extração de DNA são necessários. Sendo assim, um grande número de procedimentos descrevendo a extração de DNA de ossos humanos antigos ou recém-obtidos para análise do DNA nuclear ou mitocondrial foram publicados. Variações nos rendimentos de DNA de fragmentos de ossos foram observadas, o que pode ser atribuído à heterogeneidade entre ossos e condições de inumação. Portanto, não é possível prever o rendimento do DNA através da aparência macroscópica do osso. Características de um protocolo de extração de DNA de ossos ideais devem incluir quantidades reduzidas do material de partida, bons rendimentos de DNA adequado para a obtenção de perfis genéticos, baixo custo e rapidez<sup>19</sup>.

Pela importância da identificação humana nos desastres em grande escala, e pela dificuldade às vezes encontrada, onde na maioria dos casos os ossos são a única fonte de material genético de boa qualidade, este trabalho objetivou a tentativa de padronizar a técnica de *Salting Out* para extração de DNA através de ossos de mamíferos, disponibilizando uma opção alternativa de Extração de DNA.

## Métodos

### Extração do DNA

Para realização da maioria das metodologias empregadas na Biologia molecular previamente se faz necessário à extração dos ácidos nucleicos. A extração de DNA com precipitação em solução salina, ou *Salting Out* foi descrito em 1988 por Polesky e colaboradores<sup>20</sup>. Para realização deste estudo foi necessário modificações, adequando assim a técnica para finalidade proposta.

Os ossos humanos antigos e de suínos foram macerados separadamente em pistilo até se tornarem pó. Após, foram pesadas amostras de 500g, 300g e 100g, e divididas de acordo com cada peso em P500, P300 e P100 no caso dos suínos, e os humanos em H500, H300 e H100. Estas amostras foram transferidas para tubos cônicos. Para o início da lise das membranas e manutenção do pH foi acrescido 3mL do Buffer "A", composto por EDTA 0,5 M, Tris 1 M, NaCl 5 M. Para o rompimento das membranas foi utilizado 200µL do detergente SDS 10%. A protease utilizada foi a Pronase E, dela foi adicionada 200µL em cada amostra. Seguiu-se incubação em banho Maria à 65° C em Overnight. Passado o tempo de ação da Pronase E, em cada amostra foi adicionado 1000µL de NaCl 5 M, estas foram agitadas vigorosamente por 10 minutos e em seguida centrifugadas à 8.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante formado foi transferido para microtubos tipo Eppendorffs, em cada amostra foi adicionado Clorofórmio igual volume para desproteinização, estes foram homogeneizados por inversão por 3 minutos, em seguida foram centrifugados à 8.000 rpm por 5 minutos. Após, cuidadosamente a fase aquosa foi transferida para novos microtubos, a precipitação foi feita com 300µL de Isopropanol gelado. Foi feita uma nova centrifugação a 8.000 rpm por 8 minutos, o sobrenadante formado foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de Etanol 70% gelado. Na sequência as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram deixadas no fluxo laminar até estarem

totalmente secas, então o DNA foi diluído em 100 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Pode-se observar o fluxograma com as etapas na figura 1.

### **Quantificação do DNA genômico obtido dos ossos**

Para verificar a eficiência do DNA extraído foi realizada a leitura pela densidade óptica (DO) em espectrofotômetro, onde as amostras foram diluídas com água Mili-Q em diluição 1:200 (5 $\mu$ L DNA em 995 $\mu$ L de água Milli-Q). A concentração estimada de DNA de cada amostra foi obtida pelo seguinte cálculo: Leitura DO 260nm x Fator de Diluição (200) x 50. O resultado da concentração é dado em ng/ $\mu$ L. O grau pureza das amostras foi avaliado através da medida da razão entre a DO 260nm e 280nm.

Foi realizada a estimativa da quantificação através da Eletroforese em gel de Agarose 1%, onde utilizamos 25 mL do tampão TE1x com 25mg da Agarose e 3 $\mu$ L de Brometo de Etídeo(EtBr). Antes da aplicação as amostras de DNA devem ser preparadas com tampão de amostra que é um corante reagente que facilita a aplicação das amostras nos poços do gel e acrescentam cor. A quantidade foi estimada através da comparação do tamanho e intensidade da banda das amostras com a do peso molecular Low utilizado como mostra a figura 3.

## **Resultados**

### **Espectrofotometria**

Os resultados obtidos por espectrofotometria com relação à concentração e a pureza das amostras em relação a metabólitos secundários e componentes do tampão do DNA extraído foram analisados, calculados e comparados. Observou-se que as amostras apresentaram concentrações média de DNA, porém a pureza do DNA resultante da aplicação dos métodos não foi satisfatória. As amostras foram divididas de acordo com a extração em primeira e segunda. Da primeira extração P500 e P300 obtiveram um bom rendimento com um elevado grau de pureza perante as outras. Já na segunda extração todas as amostras obtiveram um bom rendimento, porém o grau de pureza não foi satisfatório. Como pode ser observado na figura 2.

## **Corrida Eletroforética**

Como pôde ser observado na figura 3 as amostras de DNA puderam ser observadas no gel, porém estas não se mostraram em abundância, sendo necessário posterior amplificação.

## **Discussão**

A identificação de restos mortais normalmente exige uma abordagem multidisciplinar onde as diversas áreas das ciências atuam conjuntamente contribuindo para obtenção de resultados fiáveis. A utilização da molécula de DNA se faz imprescindível principalmente quando as outras áreas estão inutilizadas por falta de fontes como arcada dentária, características, impressões das polpas digitais, entre outros.

Existem vários métodos protocolados para extração de DNA de ossos. Dentre eles incluem os que utilizam como base para precipitação do DNA o Isopropanol<sup>22, 23</sup>, ou protocolos que utilizam um pré-tratamento dos ossos onde há remoção da camada externa dos ossos para retirar o DNA exógeno, o que aumenta consideravelmente o rendimento do DNA, porém demonstrou-se ser um método bastante laborioso<sup>24</sup> Ou que exigem a total descalcificação das amostras, porém não se observou a influência da total descalcificação nos resultados obtidos da extração<sup>23</sup>.

O presente estudo verificou que a utilização de ossos antigos humanos e recentes suínos possibilitou comparação de forma quantitativa e qualitativa do DNA recuperado a partir de quantidade inicial de amostras diferentes.

A utilização de componentes chaves como o clorofórmio por ser um desnaturador facilita a remoção de proteínas, o que facilita na remoção de contaminante.

O protocolo utilizado mostrou uma relação custo benefício em comparação com métodos já publicados, além de ser um método que consome um menor tempo para realização das análises, é simples, de fácil manuseio com obtenção de DNA de boa qualidade para utilização nas demais técnicas envolvidas na biologia molecular.

## **Conclusão**

Com o aprimoramento da técnica de Salting-out utilizada protocola-se uma opção alternativa para extração de DNA concluindo que há obtenção de DNA de boa qualidade com quantidade suficiente para uso nas demais técnicas da Biologia molecular.

## **Referências Bibliográficas**

1. Iwamura ESM, Soares-Vieira JA, Muñoz DR. Human Identification and analysis of DNA in bones. Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 2004;59(6): 383-8.
2. Funabashi KS, Monteiro AC, de Moraes DA, Rocha MR, Moreira PCF, Iwamura ESM. A importância da identificação humana nos desastres de massa naturais, acidentais ou provocados: uma abordagem multidisciplinar. Saúde, Ética & Justiça 2009;14(2):54-64.
3. Velho JA, Geiser GC, Espindula A Ciências Forenses: Uma introdução às principais áreas da Criminalística Moderna, 2ª impressão, Campinas/SP: Millennium; 2012.p.392-85.
4. Portal da Aviação de Segurança Pública e Defesa Civil. O incêndio do Edifício Joelma – Um breve relato. [citado 17 abr 2014] Disponível em: <http://www.pilotopolicial.com.br/o-incendio-do-edificio-joelma-um-breve-relato/>
5. Organizações Globo. Relembre como foi o tsunami de 2004 no oceano Índico. [citado 17 abr 2014] Disponível em: <http://g1.globo.com/mundo/noticia/2011/03/saiba-mais-como-foi-o-tsunami-de-2004-no-oceano-indico.html>
6. Discovery Channel. Tragédia do Vôo 1907: A pior tragédia da história aérea do Brasil. [citado 17 abr 2014] Disponível em: <http://discoverybrasil.uol.com.br/amazon/?cc=US>



7. Associação dos Familiares das Vítimas do Vôo 447. O Acidente. [citado 17 abr 2014] Disponível em: <http://www.afvv447.org/o-acidende/>

8. Organizações Globo. Tragédia em Santa Maria. [citado 18 abr 2014] Disponível em: <http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/tragedia-incendio-boate-santa-maria/platb/>

9. Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dirnhofer R. Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *Journal of Forensic Science* 1991;36(6):1649–61.

10. Velloso AP, Francisco RA, Guimarães MA. Ciências Forenses: Uma introdução às principais áreas da Criminalística Moderna, 2ª impressão, Campinas/SP: Millennium; 2012.p.392-57.

11. Secretaria da Segurança Pública do Estado de São Paulo. Laboratório recria face de vítima em 3D para facilitar identificação. [citado 04 abr 2014] Disponível em: <http://www.ssp.sp.gov.br/noticia/lenoticia.aspx?id=33851>

12. Araújo LG, Biancalana RC, Terada AS, Paranhpos LR, Machado CE, Silva RH. Identificação humana de vítimas de desastres em massa: A importância e o papel da Odontologia Legal. *Revista da Faculdade de Odontologia- UFP* 2013;18(2):224-9.

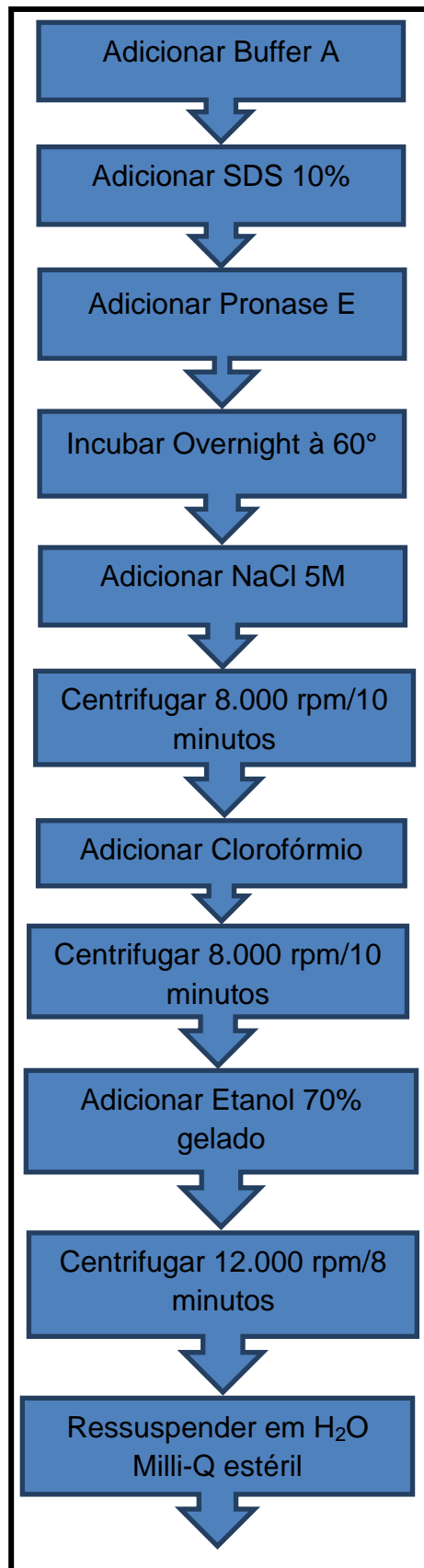
13. Frari P, Iwashita ARFG, Caldas JC, Scanavini MA, Daruge JE. A importância do odontologista no processo de identificação humana de vítima de desastre em massa. Sugestão de protocolo de exame técnico-pericial. *Revista Odonto Metodista*. 2008;16(31):38-44.

14. Leclair B. Large-scale Comparative genotyping and kinship analysis: evolution in its use for human identification in mass fatality incidents and missing persons databasing. Internal Congress Series. 2004;126:42-4.
15. Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons T J, Sajantila A, *et al.* DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). Forensic science international. Genetics 2007;(1)3-12.
16. Jeffreys AJ, Brookfield JFY, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test case using human DNA fingerprints. Nature Journal 1985;317(640):818-9.
17. Caenazzo L, Tozzo P, Rodriguez D. Ethical issues in DNA identification of human biological material from mass disasters. Prehospital and Disaster Medicine 2013; 28(4):393-396.
18. Soares-Vieira J, Billerbeck AL, Iwamura ESM, Cardoso LA, Muñoz DR, Post-mortem forensic identity testing: application of PCR to the identification of fire victim. São Paulo Medical Journal 2000;118(3):75-77.
19. Caputo M, Maximiliano I, Alechine E, Corach D. A DNA extraction method of small quantities of bone for high-quality genotyping. Forensic Science International Genetics 2013;(7) 488–493.
20. Miller SA, Dykes DD, Polesky HFA. Simple Salting Out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 1988;16(3),1215.
21. Hanni C, Brousseau T, Laudet V, Stehelin, D. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. Nucleic Acids Research 1995;23(5):881–2.

22. Kalmar T, Bachrati CZ, Marcsik A, Rasko I. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Research* 2000;28(12):67

23. Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization *Forensic Science International Genetics* 2007;1(2):191–5.

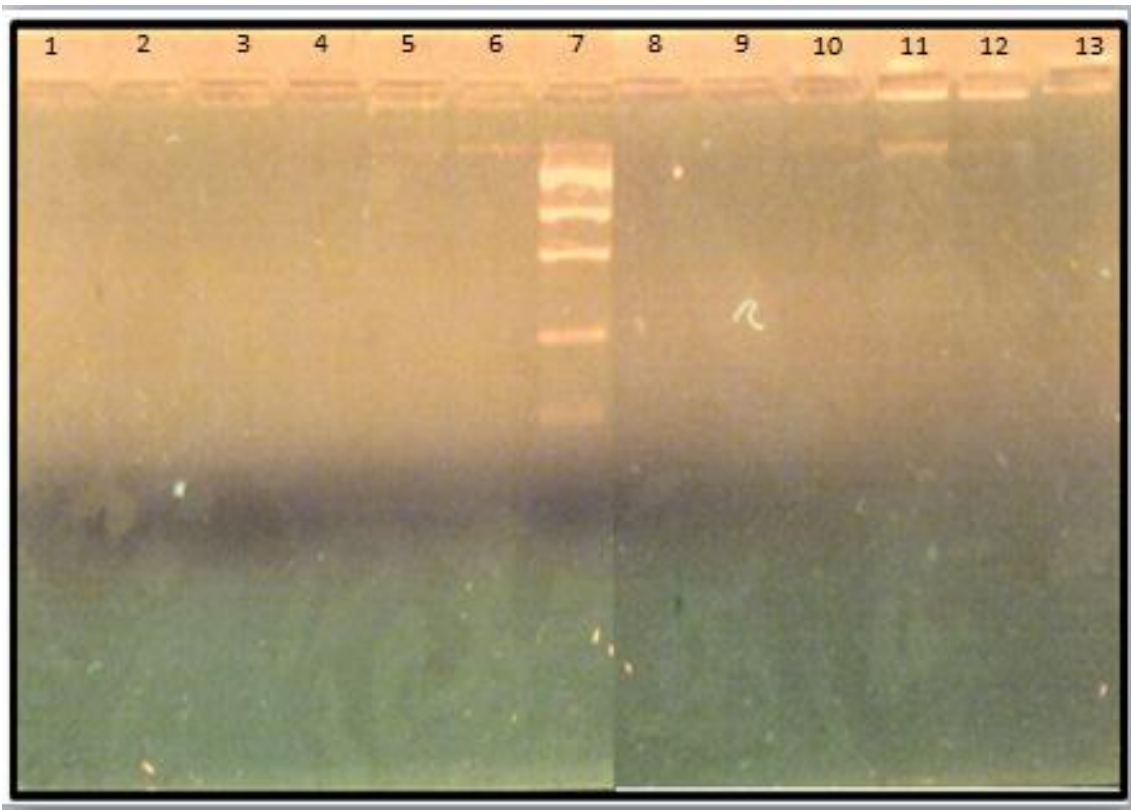
24. Salamon M, Tuross N, Arensburg B, Weiner S. Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proceedings of the National Academy Sciences* 2005;102(39):13783–8.



**Figura 1.** Fluxograma com as etapas da extração do DNA Genômico a partir de ossos humanos e de suínos.

1ª Extração	Concentração ng/μL	Grau de Pureza
P500	670μL	1,9
P300	840μL	1,8
P100	850μL	5,3
H500	370μL	0,6
H300	340μL	11,3
H100	690μL	2,6
2ª Extração		
P500	1420μL	1,2
P300	5970μL	9,95
P100	140μL	0,1
H500	120μL	0,8
H300	460μL	0,6
H100	270μL	0,2

**Figura 2:** Tabela com quantificação obtida através da espectrofotometria. Amostras em diluição 1:200, lidas em luz UV com comprimento de onda 260/280nm.



**Figura 3:** Gel de agarose 1% após corrida Eletroforética: 1 amostra de porco 100g = p100; 2 amostra de porco 300g = p300; 3 amostra de porco 500g= p500; 4 amostra humana 100g= h100; 5 amostra humana 300g=h300; 6 amostra humana 500g = H500; 7 Peso Molecular; 8 amostra de porco 100g = p100; 9 amostra de porco 300g = p300; 10 amostra de porco 500g= p500; 11 amostra humana 100g= h100; 12 amostra humana 300g=h300; 13 amostra humana 500g = H500