



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO



MESTRADO PROFISSIONAL EM FORMAÇÃO PARA PESQUISA  
BIOMÉDICA

GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO

COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE  
DNA DE TECIDOS ÓSSEOS

Rio de Janeiro

2023

GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO

COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO  
DE DNA DE TECIDOS ÓSSEOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito à obtenção do título de Mestre em Formação de Pesquisa Biomédica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. RODRIGO SOARES DE MOURA NETO

COORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ROSANE SILVA

Rio de Janeiro

2023

Evangelio, Giselle Lindolfo Affonso.

Comparação da eficiência de métodos de extração de DNA de tecidos ósseos. / Gisele Lindolfo Affonso Evangelio. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2023.

94 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Rodrigo Soares de Moura Neto.

Coorientadora: Rosane Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica, 2023.

Referências: f. 70-76.

1. DNA. 2. Osso e Ossos. 3. Genética Forense. 4. Antropologia Forense. 5. Repetições de Microsatélites. 6. Reação em Cadeia da Polimerase. 7. Impressões Digitais de DNA. - Tese. I. Moura Neto, Rodrigo Soares de. II. Silva, Rosane. III. UFRJ, CCS, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Roberta Cristina Barboza Galdencio CRB - 7 /5662

"COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDOS ÓSSEOS"

**GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO**

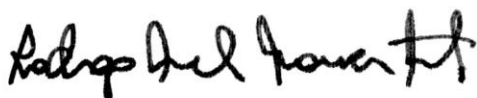
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

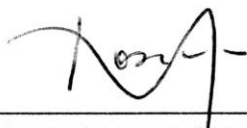
Rio de Janeiro, 06 de novembro de 2023.



\_\_\_\_\_  
DRA. FLAVIA FONSECA BLOISE (DOUTORA – UFRJ)  
(COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)



\_\_\_\_\_  
DR. RODRIGO SOARES DE MOURA NETO (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR



\_\_\_\_\_  
DRA. ROSANE SILVA (DOUTORA – UFRJ) – COORIENTADORA



\_\_\_\_\_  
DR. FRANCISCO MEIRELLES BASTOS DE OLIVEIRA (DOUTOR- UFRJ)



\_\_\_\_\_  
DRA. MARIANA BOECHAT DE ABREU (DOUTORA – UFRJ)



\_\_\_\_\_  
DR. RODRIGO GRAZINOLI GARRIDO (DOUTOR – FND)



\_\_\_\_\_  
DRA. FLAVIA FONSECA BLOISE (DOUTORA – UFRJ) - REVISORA

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família por todo apoio e incentivo, por acreditarem nas minhas decisões e no meu potencial para concluir esta etapa. Agradeço meu pai, Wanderson Evangelio, minha avó, Margarida Lindolfo, e meu namorado, Felipe Nascimento, pelo auxílio, carinho e pelas palavras de confiança durante todo o processo.

Agradeço em especial a minha mãe, Rachel Affonso, que proporcionou todos os meios, me orientou continuamente e foi o principal suporte emocional e financeiro. Você é figura fundamental no meu progresso enquanto pessoa e estudante, e sempre será o grande exemplo de mulher, mãe, amiga e profissional para mim.

Agradeço ao meu orientador Dr Rodrigo Soares de Moura Neto, que já era uma inspiração profissional para mim e só confirmou o exemplo vivo de dedicação, competência e comprometimento à ciência. Obrigada por todos os ensinamentos e por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar em uma nova área e de meu grande interesse.

Agradeço a Dr<sup>a</sup> Adriana Cabral, que admiro por ser tão empenhada, atenciosa e prestativa. Obrigada pela sua paciência e auxílio sempre que precisei de ajuda, sou muito grata por ter tido a chance de dividir seus conhecimentos e experiências na área da biologia molecular comigo, foi enriquecedor trabalhar e compartilhar todo o meu projeto com você.

Agradeço a minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Rosane Silva e ao grupo de pesquisa do Laboratório de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro por todo o conhecimento científico compartilhado e pelo suporte técnico e prático para a realização desse projeto.

## RESUMO

A genética forense tem avançado e progredido amplamente nos últimos anos, se tornando de grande interesse em diversos países e um ramo essencial nas resoluções de casos criminais das ciências forenses. Nas diversas situações que se necessita da identificação humana: casos de pessoas desaparecidas, desastres em massa, nas investigações de DNA antigo e em crimes recentes, as amostras de tecido ósseo são frequentemente o único material biológico possível para tipagem do DNA. Esta tipagem é realizada através de marcadores genéticos de repetições curtas em tandem, os STRs (*Short Tandem Repeats*), que aliados a técnica de PCR são comumente utilizados em casos de identificação forense. O método de extração do DNA de ossada é uma etapa essencial para obtenção de material em quantidade e qualidade adequada. Atualmente, na maioria dos protocolos utilizados se torna uma variável pouco controlada e desafiadora. Visto isso, o objetivo desse trabalho é determinar um método de extração de DNA de alta qualidade a partir de tecido ósseo, para o desenvolvimento de um protocolo operacional padrão (POP), para aplicação no Laboratório de Biologia Forense do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Através da realização e comparação de três diferentes protocolos já descritos na literatura: o protocolo de extração avançada; de extração orgânica; e de desmineralização completa. É pertinente a escolha de um protocolo baseado na amostra disponível, no estado de sua degradação e no método de genotipagem que será aplicado. Visando melhorias e aprimoramentos das técnicas de extração de DNA para maior eficiência da resolução de casos que envolvam a identificação humana a partir de material ósseo e agregando ao trabalho da comunidade científica forense, em especial da área da genética forense. A partir da análise dos resultados obtidos, foi possível definir que o protocolo de extração avançada apresentou maior rendimento, qualidade, amplificação e eficiência, com um menor desperdício de material genético. Sendo assim, foi estabelecido como o método de preparo da molécula de DNA ideal para realização das análises genéticas de tecidos ósseos.

**Palavras-chave:** Extração de DNA; Tecido Ósseo; Identificação Forense; STR; PCR

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Ciências e Genética Forense .....	9
1.2 Ácido desoxirribonucleico.....	10
1.3 Identificação humana pelo DNA .....	13
1.4 Tecido ósseo .....	17
1.5 Obtenção de DNA de ossos humanos: métodos de extração .....	18
1.6 Metodologia da análise genética .....	22
1.6.1 PCR em tempo real .....	22
1.6.2 Eletroforese Capilar e Eletroferograma .....	24
2. JUSTIFICATIVA .....	29
3. OBJETIVO.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos .....	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1 Protocolo de Extração Avançada .....	32
4.2 Protocolo de Extração Orgânica .....	33
4.3 Protocolo de Desmineralização Completa .....	34
4.4 Rendimento do grau de pureza .....	39
4.5 Quantificação, índice de degradação e monitoramento de inibição .....	39
4.6 PCR e tipagem STR .....	41
4.7 Eletroforese Capilar .....	42
4.8 Análise estatística.....	45
5. RESULTADOS .....	46
5.1 Resultados da Pureza e Quantificação do DNA.....	46
5.2 Resultados da Eletroforese Capilar e Eletroferograma.....	49
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÃO.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70

## LISTA DE SIGLAS

- DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*
- EDTA - ácido etilenodiaminico tetra-acético
- IPC – do inglês *Internal PCR Control*
- LCN – do inglês *Low Copy Number*
- LOD - do inglês *Limit of Detection*
- PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction*
- PHR - do inglês *Peak Height Ratio*
- PEA – Protocolo de Extração Avançada
- PEO - Protocolo de Extração Orgânica
- PDC - Protocolo de Desmineralização Completa
- PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*
- qPCR – do inglês *quantitative Polymerase Chain Reaction*
- RFLP - do inglês *Restriction Fragmente Length Polymorphism*
- RFU - do inglês *Relative Fluorescence Unit*
- SDS – do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*
- STR - do inglês *Short Tandem Repeats*
- VNTR - do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*



## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Ciências e Genética Forense**

Nos mais diversos países ao redor do mundo o propósito principal das investigações das autoridades policiais é definir a identidade daqueles indivíduos responsáveis por cometer crimes, sendo esse objetivo cada vez mais alcançado com a ajuda e avanço da ciência. Durante o processo de investigação, a ciência forense ajuda a reconstruir o decorrer dos fatos envolvidos no crime cometido, através de vestígios e indícios encontrados nos locais de crimes. Essas evidências, podem ser comparadas com material colhido de suspeitos e resultar em um laudo que será apresentado e julgado no tribunal (KOWALCZYK et al, 2018).

Há muitos anos, a área da ciência forense vem buscando e fazendo uso de novas tecnologias e métodos, o que a torna cada vez mais interdisciplinar, com o uso de novas ferramentas, como a biotipologia, datiloscopia, botânica, veterinária, computação e genética (KOWALCZYK et al, 2018). Visto isto, um ponto em destaque é que essa ciência vem se renovando, sobretudo, a partir da utilização de exames para identificação humana através do DNA. Como por exemplo: situações de identificação e vinculação de suspeitos com locais de crimes; inocentar pessoas vítimas de falsas acusações; identificar paternidade civil ou não, como em casos com vítimas de estupros; identificar pessoas desaparecidas ou vítimas de desastres em massa, a partir de restos mortais para comparação com familiares que buscam parentes desaparecidos (SOPRAN et al, 2019). Desse modo, os resultados das novas tecnologias dos exames genéticos vêm sendo cada vez mais empregados pelo sistema judiciário criminal. Este realiza analogias e ligações diretas entre amostras encontradas em locais de crimes com suspeitos envolvidos, favorecendo o esclarecimento e conclusão de diversos delitos.

Um dos ramos mais recente que surgiu no âmbito da ciência forense é a genética forense, que fornece maior confiabilidade nos resultados quando comparados aos métodos utilizados anteriormente, como o grupo sanguíneo (ABO). Esta análise acaba não sendo muito informativa e serve mais como um critério de exclusão do que de inclusão de um indivíduo suspeito de relação com um crime (ABIDULLAH, 2023). Além disso, outras análises comumente

utilizadas são as características morfológicas e/ou impressões digitais, porém podem sofrer com interferências naturais e climáticas que aceleram sua decomposição nos locais de crimes (ABIDULLAH, 2023).

Existem fatores que favorecem e justificam o aumento do uso da genética no âmbito forense. Um deles é devido ao fato de que uma única célula oriunda de um indivíduo contém a informação genética completa sobre ele (BUTLER, 2005). Já outro fato, é a teoria da troca, formulada em 1923 pelo cientista forense Edmond Locard, que funciona como um pilar da criminalística (LOCARD, 1923). Este princípio considera que o contato entre dois itens sempre ocasionará em uma troca de informações entre eles, e, desse modo, no âmbito criminal, essa teoria defende que a pessoa que intervém em um local de crime leva algo para esse ambiente. Portanto, ele conclui que cada contato deixa seu rastro (LOCARD, 1923; KOWALCZYK et al, 2018).

As análises e os resultados gerados através da utilização de exames genéticos não resolvem todos os casos policiais e não são a primeira opção dentre todos os tipos de identificação de indivíduos (FILHO et al, 2020). Apesar desse fato, existe uma grande relevância no seu uso em casos específicos, de forma a agregar e auxiliar cada vez mais na conclusão de diversos crimes. Tanto em casos antigos, que ainda não haviam sido concluídos, como em casos mais recentes, de forma a contribuir para o um maior avanço e desenvolvimento das ciências forenses.

## **1.2 Ácido desoxirribonucleico**

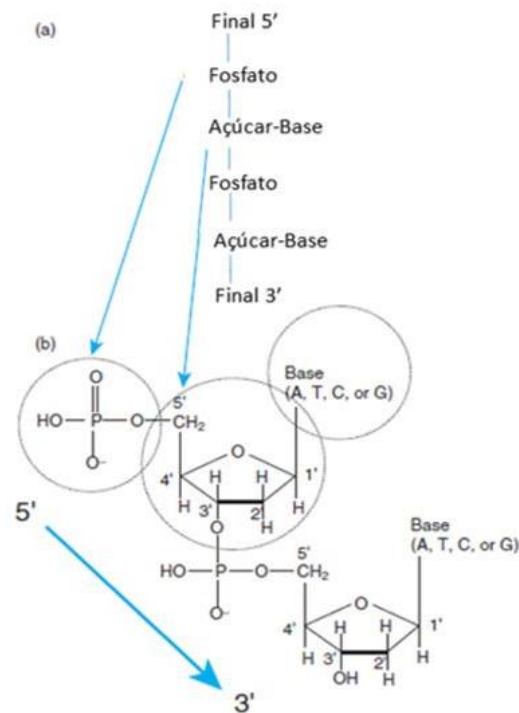
Um indivíduo adulto é formado em média por aproximadamente 100 trilhões de células, sendo que todas apresentam a mesma informação genética em seus núcleos, pois originam de uma única célula progenitora (BUTLER, 2005). A unidade celular contém em seu núcleo o ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid* - DNA), uma macromolécula responsável pela operação e manutenção da sobrevivência da célula, pois é o local que se encontra o código de informação para síntese de todas as proteínas necessárias para o organismo. Também, é através do DNA que é possível o armazenamento de informação necessária para a transmissão genética nas gerações futuras, de forma que metade das informações ali contidas são oriundas da mãe e a outra

metade oriundas do pai, fator essencial para a perpetuação humana na terra (ALBERTS et al, 2007). Sendo assim, quando a célula realiza mitose para o crescimento ou reparação do organismo, ela consegue manter as mesmas informações genéticas e carrega consigo as instruções sobre como produzir proteínas essenciais que determinam as características únicas de cada indivíduo (GRIFFITHS et al, 2007).

A molécula de DNA é considerada extensa, porém existem segmentos individuais da sequência inteira que contém as diversas informações para codificar diferentes proteínas, sendo esses segmentos chamados de genes (ALBERTS et al, 2007). Estes genes são formados por nucleotídeos, que são moléculas compostas por uma pentose, que no caso do DNA é a desoxirribose, um grupo fosfato e uma base nitrogenada (Figura 1) (GRIFFITHS et al, 2007). O fosfato e a porção de açúcar formam a estrutura principal da molécula, enquanto que a variação em cada unidade de nucleotídeo ocorre na mudança das bases nitrogenadas. Elas podem ser classificadas em púricas, quando apresentam dois anéis aromáticos em sua estrutura, ou em pirimídicas, quando apresentam um anel aromático somente em sua estrutura. As bases nitrogenadas púricas são compostas pela adenina (A) e a guanina (G), enquanto que as bases nitrogenadas pirimídicas são compostas pela timina (T) e citosina (C) (KREBS et al, 2017). Para a formação dos pares de bases, elas interagem entre si, de forma que a adenina realiza pontes de hidrogênio somente com a timina, e vice-versa, enquanto que a guanina realiza pontes de hidrogênio somente com a citosina, e vice-versa (Figura 2). As diferentes combinações entre esses quatro nucleotídeos produzem as diversas diferenças biológicas entre os seres humanos (BUTLER, 2005; KREBS et al, 2017).

A interação química que os nucleotídeos realizam entre si são diferentes, já que podem ocorrer variações conforme suas posições na estrutura da dupla fita de DNA. Cada filamento é formado de unidades alternadas de fosfato e desoxirribose, que são conectadas por ligações fosfodiéster. Enquanto que os dois filamentos de nucleotídeos são mantidos juntos por ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas de cada filamento. Nesse último caso, quando é uma interação entre uma timina com adenina ocorrem duas ligações de hidrogênio, já na interação entre uma citosina e uma guanina ocorrem três

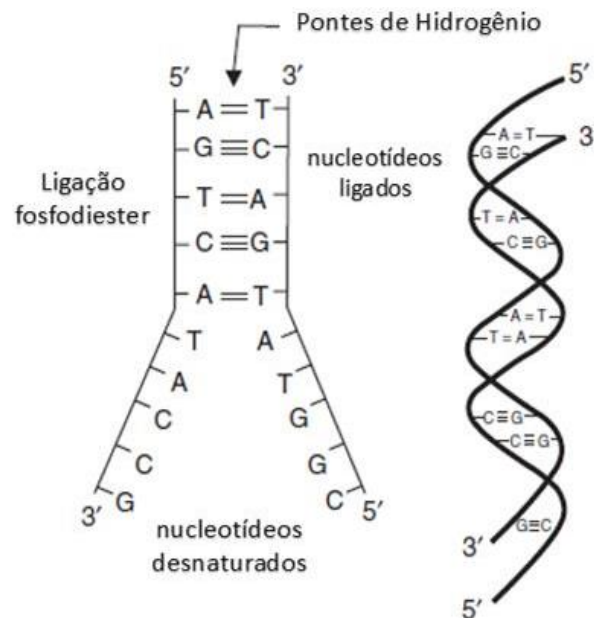
ligações de hidrogênio (BUTLER, 2005).



**Figura 1:** (a) Modelo simplificado mostrando os componentes básicos de uma cadeia de nucleotídeos: grupo fosfato, açúcar e as bases nitrogenadas. (b) Um diagrama químico de uma fita de DNA, apresentando a interação fosfato, açúcar e as bases nitrogenadas. As pontas 5' e 3' são denominadas pela orientação dos átomos de carbono 5' e 3' dos anéis da açúcar. (BUTLER, 2005).

A conexão dos nucleotídeos entre as duas fitas de DNA gera a formação de uma estrutura similar a uma escada em espiral, denominada dupla hélice (KREBS et al, 2017). Os átomos de carbono dos grupamentos açúcar são numerados de 1' a 5' (ALBERTS et al, 2007). A ligação fosfodiéster conecta o átomo de carbono 5' de uma desoxirribose ao átomo de carbono 3' da desoxirribose adjacente. Dessa forma, cada ligação açúcar-fosfato apresenta uma extremidade 5' e outra extremidade 3'. Devido a essa característica, essas fitas estão em orientações opostas e apresentam polaridade inversa (Figura 2) (ALBERTS et al, 2007). Outro ponto importante, é que a duplas fitas de DNA, além de antiparalelas, são complementares, visto a interação química entre os nucleotídeos que formam os pares de bases, sempre interagindo timina com adenina e vice-versa, e guanina com citosina e vice-versa. Esses conjuntos de

pares de bases e suas interações formam os genes, que apresentam pequenos pedaços de sequências codificantes, chamadas de sequências expressas ou éxons, intercaladas com sequências longas não codificantes, chamadas de sequências intervenientes ou íntrons (ALBERTS et al, 2007). Ambas sequências são transcritas em RNA, porém os íntrons são removidos durante o processo chamado de *splicing* do precursor do RNA mensageiro (ou pré-mRNA). Somente após essa etapa e o processamento das extremidades 5' e 3' esse RNA é denominado como mRNA (ALBERTS et al, 2007). Todo o conjunto de genes contidos no DNA de uma única célula são chamados de genoma (BUTLER, 2005).



**Figura 2:** Modelo simplificado mostrando a dupla fita de DNA e sua estrutura helicoidal. As pontes de hidrogênio representam a ligação dos pares de bases de diferentes cadeias e as ligações fosfodiéster representam o arcabouço açúcar-fosfato de cada uma das cadeias com polaridades inversas (BUTLER, 2005).

### 1.3 Identificação humana pelo DNA

A utilização do DNA na ciência forense só foi possível devido a uma importante e revolucionária descoberta, as regiões hipervariáveis do genoma (BUKYYA et al, 2021). A partir desse momento, foi possível demonstrar que indivíduos diferentes possuíam um perfil genético único que o individualizava

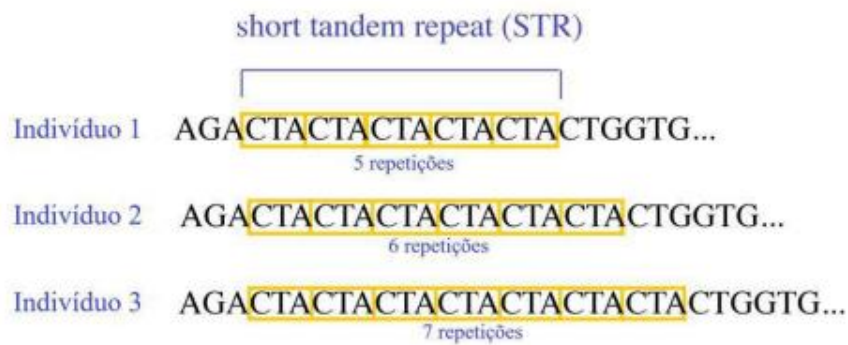
perante os demais na população mundial (FILHO et al, 2020). Essas regiões representam porções da fita de DNA não codificantes ou regiões intrônicas, sendo sequências repetitivas, altamente polimórficas e similares entre pessoas que possuem algum grau de parentesco (BUKYA et al, 2021). Entretanto, apresentam um certo grau de variação e divergência suficiente para que seja possível realizar uma diferenciação entre indivíduos da população, sendo dificilmente comum humanos pouco relacionados apresentarem algum tipo de grau de parentesco (BUTLER, 2023).

As sequências hipervariáveis se estabelecem como bons marcadores moleculares para utilização em testes de identificação, principalmente por apresentarem um padrão de herança Mendeliana, no qual os alelos dos filhos são oriundos dos genitores (JEFFREYS et al, 1985; BUKYYA et al, 2021).

A primeira região hipervariável foi chamada de região minissatélite, composta por 9-80 nucleotídeos, sendo descoberta pelo geneticista *Alec Jeffreys* em 1985 (JEFFREYS et al, 1985). Esta região aliada a técnica de RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), desenvolvida pelo biólogo *David Botstein* em 1980 (BOTSTEIN et al, 1980), possibilitou um método de identificação humana a partir da tipagem do DNA presente nas células. A RFLP envolve o uso de enzimas de restrição, com a função de cortar as regiões do DNA em torno dos minissatélites (BUTLER, 2005), permitindo, assim, a visualização dessas regiões. Logo em seguida, o geneticista *Yusuke Nakamura* denominou a sigla VNTR (do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*) para essa região hipervariável (NAKAMURA et al, 1987). Os VNTRs geralmente se agrupam próximos aos telômeros e nas extremidades cromossômicas (RAMEL et al, 1997). Foi através da utilização de sequências VNTR e da técnica de RFLP em combinação com a técnica de hibridização, que a tipagem do DNA auxiliou pela primeira vez no desfecho de um crime nas ciências forenses, conseguindo obter uma impressão digital genética individual única, chamada de *DNA fingerprinting*. A hibridização consiste em um método que envolve o uso de sequências complementares a regiões de interesse, como os VNTRs, podendo ser chamadas também por sondas radioativas, que dessa forma irão interagir e possibilitar a visualização dessas regiões (BUTLER, 2005).

Posteriormente, com o avanço científico e tecnológico, na década de 90,

uma outra região hipervariável foi descoberta, a região microsatélite ou também chamada de STR (do inglês *Short Tandem Repeats*) (Figura 3) (BUKYA et al, 2021). Os STRs são compostos por 1-7 nucleotídeos, portanto, são bem menores quando comparadas aos VNTRs (KIMPTON et al, 1994; KOWALCZYK et al, 2018). Os STRs se tornaram altamente popular no ambiente forense devido ao seu alto grau de polimorfismo, fornecendo resultados que constituem evidências consideradas muito fortes (BUTLER, 2023).



**Figura 3:** Diferença no número das repetições de um marcador STR autossômico em um dos cromossomos de diferentes indivíduos. O indivíduo 1 apresenta 5 repetições, o indivíduo 2 apresenta 6 repetições e o indivíduo 3 apresenta 7 repetições da sequência (UNIVERSITY OF LEICESTER, 2022).

Um outro fato inovador e essencial para o avanço dos métodos forenses, foi o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia de polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction - PCR*), criada pelo bioquímico Kary Mullis em 1983 (MULLIS et al, 1986). A PCR envolve a amplificação de sequências pré-determinadas de DNA rapidamente e em milhares de vezes, reproduzindo *in vitro* o processo de replicação a partir de um pequeno fragmento de DNA que se deseja amplificar (MULLIS et al, 1986; ZHU et al, 2020). Essa técnica acontece contendo o DNA alvo e mais alguns componentes necessários, como o DNA iniciadores, que são sequências de nucleotídeos complementares à parte específica do DNA que se deseja amplificar. Além de desoxirribonucleotídeos e da enzima DNA polimerase, responsável pela replicação do material genético (ZHU et al, 2020). A facilidade de amplificação e análise, visto que as regiões STR são sequências de pares de bases pequenas, possibilitou sua utilização em estudos evolutivos e antropológicos, na elaboração de mapas gênicos, em

estudos populacionais, no diagnóstico de doenças e monitoramento de transplantes, em identificação de espécies e determinação do parentesco evolutivo (SAAD et al, 2005; BUTLER, 2023).

Desse modo, nos últimos anos, os kits contendo marcadores microssatélites vêm sendo comercializadas e altamente utilizados nos laboratórios forenses (BUKYA et al, 2021). Visto que, eles representam um conjunto de marcadores moleculares usados para a identificação humana previamente validados e amplificados pela PCR, técnica que apresenta resultados com alta sensibilidade (FILHO et al, 2020).

O método de identificação individual baseado nas regiões de polimorfismo VNTRs apresenta um poder maior de discriminação em comparação com os STRs, já que os VNTRs são regiões com maiores quantidades de pares de bases (BERNYCK et al, 2021). Apesar disso, há algumas desvantagens, como o uso de isótopos radioativos e a necessidade de uma grande quantidade de material não degradado. O que dificulta a prática de coleta de amostras em locais de crime, visto que, na grande maioria dos casos, as amostras oriundas dessas regiões estão em quantidades bem pequenas e apresentam um DNA altamente degradado (FILHO et al, 2020). Desse modo, o uso das regiões STRs aliada a técnica de PCR favoreceu a análise de amostras degradadas e em pequenas quantidades, evitou a hibridização e o contato com isótopos radioativos, e promoveu maior rapidez (BERNYCK et al, 2021). Anteriormente, com o uso dos VNTRs, eram necessárias em média de 6 a 8 semanas para realizar a análise de uma amostra e obter resultado, enquanto que a partir das regiões STRs e da técnica de PCR são necessárias somente algumas horas (BUTLER, 2005). Portanto, as regiões STRs e a técnica de PCR passaram a ser amplamente utilizadas e se tornaram atualmente o principal marcador genético e a principal técnica nas análises forenses (KOWALCZYK et al, 2018).

Devido a descoberta de diferentes tipos de marcadores genéticos, a identificação humana pelo DNA, nas ciências forenses, pode ser realizada a partir de diferentes tipos de amostras. É necessário somente que o material biológico contenha células nucleadas, portanto, evidências como sangue, saliva, sêmen, cabelo e restos mortais, como ossos e dentes, encontradas em locais de crimes ou que necessitem de uma identificação posteriormente, podem ser analisadas



e comparadas pelos métodos atuais para análise do DNA (BUTLER, 2009).

#### **1.4 Tecido ósseo**

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado constituído por três tipos celulares: os osteoblastos, osteoclastos e os osteócitos, além de uma matriz extracelular mineralizada, chamada de matriz óssea (SILVA et al, 2015). Os osteoblastos são responsáveis pela síntese da matriz orgânica extracelular, importante na formação e controle da mineralização do novo tecido e responsável, também, pela síntese de algumas proteínas, como o colágeno tipo I. Já os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, desempenhando função fagocitária, destruindo e reabsorvendo a matriz calcificada do osso no processo de remodelação. E, por fim, os osteócitos, que são células importantes para a manutenção da matriz óssea, realizando troca de íons e nutrientes (MANZINO et al, 2021).

No processo inicial do desenvolvimento desse tecido, encontra-se uma matriz orgânica não-mineralizada, com grande concentração de colágeno tipo I e pequena concentração de proteínas não colagenosas, como as glicosaminoglicanas. Com o avanço do desenvolvimento tecidual, ocorre mineralização da matriz orgânica através da secreção de íons fosfato e cálcio pelos fibroblastos do tecido conjuntivo, tornando as fibras colágenas endurecidas. Os íons cálcio e fosfato formam a porção inorgânica do tecido, que junto com as fibras colágenas formam cristais que promovem a rigidez e resistência óssea. Porém, também são encontrados outros tipos de íons em menor quantidade, como fluoreto de cálcio, bicarbonato, potássio, sódio e magnésio (SILVIA et al, 2015). Devido a essa mineralização óssea, a principal função do osso é proporcionar uma estrutura de suporte, proteção e auxiliar na locomoção do organismo (MANZINO et al, 2021).

Em diversos casos forenses, o estudo de amostras de ossada é a única maneira de se chegar à identificação de um indivíduo (FILHO et al, 2020). Principalmente em condições extremas, como em desastres naturais, por exemplo terremotos, tsunamis, vulcões em erupção e avalanches, e também em desastres ocasionados pelo homem, como guerras, terrorismo, crises políticas, bombardeios e acidentes de aviões (FILHO et al, 2020). O grau de destruição

que se encontra essas vítimas é muito alto, já que nessas condições o nível de decomposição é avançado, além de estarem em péssimo estado de conservação, como ossos queimados e expostos as condições ambientais. Esse fato, impossibilita o uso de qualquer outro tipo de amostra para análise do material genético que não seja os resquícios de tecido ósseo. Os Institutos de Medicina Legal e Criminalística, realizam, comumente, exames antropológicos e uma avaliação da arcada dentária no intuito de identificação. Entretanto, em situações extremas, um meio para obtenção do reconhecimento dos cadáveres é através da utilização dos marcadores genéticos, como as regiões STRs, e posterior identificação pela tipagem do DNA (SIRIBOONPIPUTTANA et al, 2018).

A grande vantagem do uso do tecido ósseo, é a possibilidade maior de preservação do material genético por períodos de tempo mais longos do que outros tecidos (FINAUGHTY et al, 2023). Já é bem descrito na literatura que o DNA pode persistir em restos mortais devido sua estrutura da matriz óssea ser compactada e mineralizada. Isto permite que o material genético ali contido seja mais resistente a quaisquer condições climáticas extremas químicas e/ou físicas do ambiente (SIRIBOONPIPUTTANA et al, 2018). Portanto, nas situações em que não se tem mais a presença de outros tipos de tecidos, os ossos são considerados uma fonte valiosa de DNA para identificação humana, pois, não existe nenhuma outra opção de amostra que contenha informação genética para análise. (FINAUGHTY et al, 2023).

### **1.5 Obtenção de DNA de ossos humanos: métodos de extração**

A partir do desenvolvimento das técnicas utilizando o DNA, houveram aumentos nas práticas dos variados métodos de extração e purificação desse material de ossada (FINAUGHTY et al, 2023). Principalmente, pela etapa da extração ser a responsável por eliminar os contaminantes e inibidores da técnica de PCR, portanto, um ponto crítico durante o processo de análise (FINAUGHTY et al, 2023; BUTLER, 2009).

A obtenção do DNA através de restos mortais humanos, mais especificamente do tecido ósseo, é um processo desafiador. Esse fato acontece devido a alguns componentes encontrados naturalmente na estrutura desse

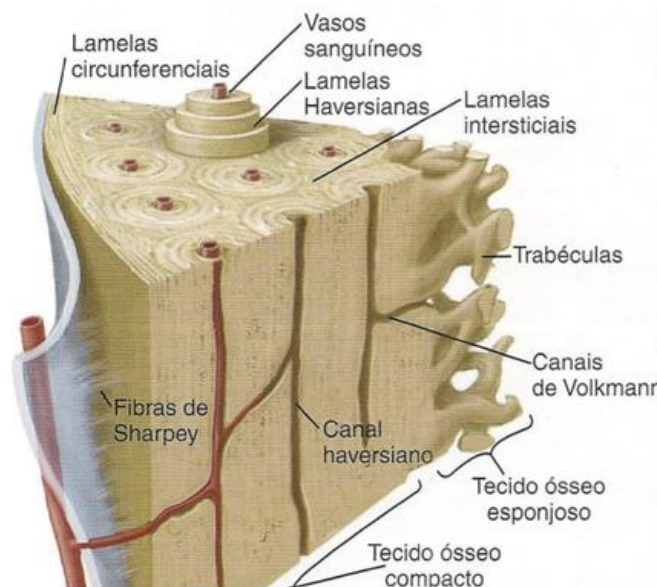
tecido que formam a matriz mineral e que dificultam o acesso às poucas células ali existentes, como o íon cálcio e o colágeno. Além disso, dependendo das condições em que esse material se encontra e como é armazenado, o DNA pode sofrer danos oxidativos, causando modificações nas bases nitrogenadas, ou danos hidrolíticos, acarretando na desaminação das bases nitrogenadas (FILHO et al, 2020).

Outros fatores podem dificultar a qualidade do perfil genético obtido a partir de amostras oriundas de cadáveres esqueletizados, como a presença de substância interferentes ou inibidoras, contaminação por microrganismos que promovam a degradação do DNA, degradação do DNA resultante de altas temperaturas ou ação enzimática e diluição do DNA presente nessas amostras. (FILHO et al, 2020; LOREILLE et al, 2007). Já foi descrito na literatura como é recorrente o aparecimento de material genético não humano, como artefatos microbianos, e a sua interferência negativa durante uma interpretação precisa do resultado do perfil STR (SMAJLOVIĆ-SKENDERAGIĆ et al, 2021). Essas condições são um obstáculo na obtenção de um perfil genético em quantidade e qualidade significativa e em condições de análise.

O osso mais comumente utilizado em diferentes estudos é o fêmur, compondo em média 38% das amostras ósseas analisadas (FINAUGHTY et al, 2023). Já a fração do osso que é utilizada nas análises genéticas se encontra na parte mais densa do tecido, chamado de tecido ósseo compacto, onde se localizam as células que ficaram contidas nessa região durante o processo de mineralização, sendo descartada a parte porosa, chamada de tecido ósseo esponjoso, que é o local com maiores concentrações das fibras colágenas (Figura 4) (FILHO et al, 2020; IRENA et al, 2016).

Para a solubilização da molécula de DNA, é incorporado ao processo uma etapa inicial de descalcificação do tecido ósseo, pré-etapa já descrita na literatura como fundamental para a obtenção de concentrações adequadas de DNA e de sucesso do perfil genético (FINAUGHTY et al, 2023). A descalcificação é tipicamente realizada por tampões de lise da matriz óssea que contém o anticoagulante ácido etilenodiaminico tetra-acético (EDTA), um agente quelante que dissolve hidroxipatita por meio do sequestro de íons cálcio e desmineraliza o tecido ósseo. Além disso, também é comumente utilizada a proteinase K, uma

enzima que digere colágeno e outras proteínas, e inativa nucleases (FILHO et al, 2020). Essa etapa permite uma maior recuperação do DNA e gera pouca degradação do material genético (HOFREITER et al, 2021).



**Figura 4:** Corte do tecido ósseo com algumas de suas estruturas destacadas (SILVA et al., 2015).

Após a descalcificação é necessário que se realize técnicas de isolamento e purificação. A extração do DNA é o primeiro passo para realizar a identificação humana a partir dos marcadores genéticos, esse início tem como objetivo liberar o material genético do interior do núcleo celular e das proteínas em que ele se encontra aderido, as histonas, realizando assim seu isolamento. A partir disso, é possível o sucesso da tipagem do DNA, uma vez que essa molécula deve ser encontrada isolada, em suficiente quantidade, qualidade e pureza (PHUA et al, 2022; LOREILLE et al, 2007).

Nos últimos anos, diversos kits e novas tecnologias de isolamento e purificação de material genético foram desenvolvidas e amplamente utilizadas, como o uso de coluna de sílica, *beads* magnéticas, *EZI DNA Investigator* (QIAGEN), *IQ Casework Pro* (Promega), entre outros (FINAUGHTY et al, 2023). Apesar da extração de DNA em fase líquida não ser o método mais inovador, ele rende significativamente maiores quantidades de DNA por grama de osso processado, em comparação a extração de fase sólida (FINAUGHTY et al, 2023). Outro ponto em destaque, são os gastos dos kits e reagente utilizados

durante o processo de extração. Visto que, métodos que utilizam fase sólida são mais custosos quando comparados aos métodos de fase líquida (FINAUGHTY et al, 2023).

Dentro do âmbito da extração de DNA de ossada de fase líquida, os protocolos mais utilizados envolvem a trituração do osso, seguido pelo método de extração orgânica tradicional: incubação desse material em pó em um tampão de lise celular e coleta do sobrenadante (LOREILLE et al, 2007). Assim que esse sobrenadante é colhido, o pó da ossada que não foi completamente dissolvido e, portanto, ainda contém material genético que não foi totalmente extraído, acaba sendo descartado. Dessa forma, ocorre um desperdício de amostra de DNA, o que mostra que reter o sobrenadante após o processo de descalcificação resulta em um maior rendimento na quantidade de DNA, comparado à quando esse sobrenadante é colhido (MCKINNON et al, 2021). Outro protocolo também comumente utilizado, envolve a lavagem excessiva das amostras de pó de ossada através de grandes volumes de EDTA durante a primeira etapa da extração. Entretanto, toda vez que ocorre essa lavagem e o EDTA é desprezado, acaba sendo descartado também nessa solução uma quantidade de DNA considerável, devido a não realização de uma lise total das células, havendo da mesma forma um desperdício de material. Já foi demonstrado na literatura que uma desmineralização completa do material ósseo fornece melhores resultados quando comparado a uma desmineralização parcial (HOFREITER et al, 2021). Outro ponto, também, já analisado, foi a quantidade em gramas de pó de osso usado em relação a quantidade de tampão de extração. No intuito de render maior acúmulo de DNA extraído, ocorre a tentativa de aumentar a quantidade de gramas de pó de osso e manter a quantidade de tampão de extração utilizado, prática prejudicial para o processo, pois não gera resultados satisfatórios (LOREILLE et al, 2007; HOFREITER et al, 2021).

De forma geral, a extração é uma etapa crítica e trabalhosa durante a preparação do DNA, uma vez que esse tipo de amostra é bastante comum nos laboratórios forenses (PHUA et al, 2022). Décadas de pesquisas já foram realizadas sobre métodos de extração de DNA para ossos, porém não há um consenso definido sobre qual deles alcança melhores desempenhos (FINAUGHTY et al, 2023). É preciso realizar uma elaboração minuciosa, com

amostras adequadas e protocolos eficientes, que promovam maior recuperação e evitem agressões a molécula de DNA, para que, assim, as etapas seguintes não apresentem tantos problemas. Entretanto, a eliminação de interferentes e da lise celular durante a extração do material genético de ossada não deixam de ser obstáculos. O desenvolvimento e avaliação de diferentes protocolos que realizam esse procedimento é essencial, no intuito de se definir um protocolo de extração ideal, que sirva para a maioria das amostras, seja de simples execução e possua baixo custo ao laboratório. Para que, assim, seja eficiente a amplificação dos marcadores moleculares almejados nessas análises (PHUA et al, 2022; XAVIER et al, 2021).

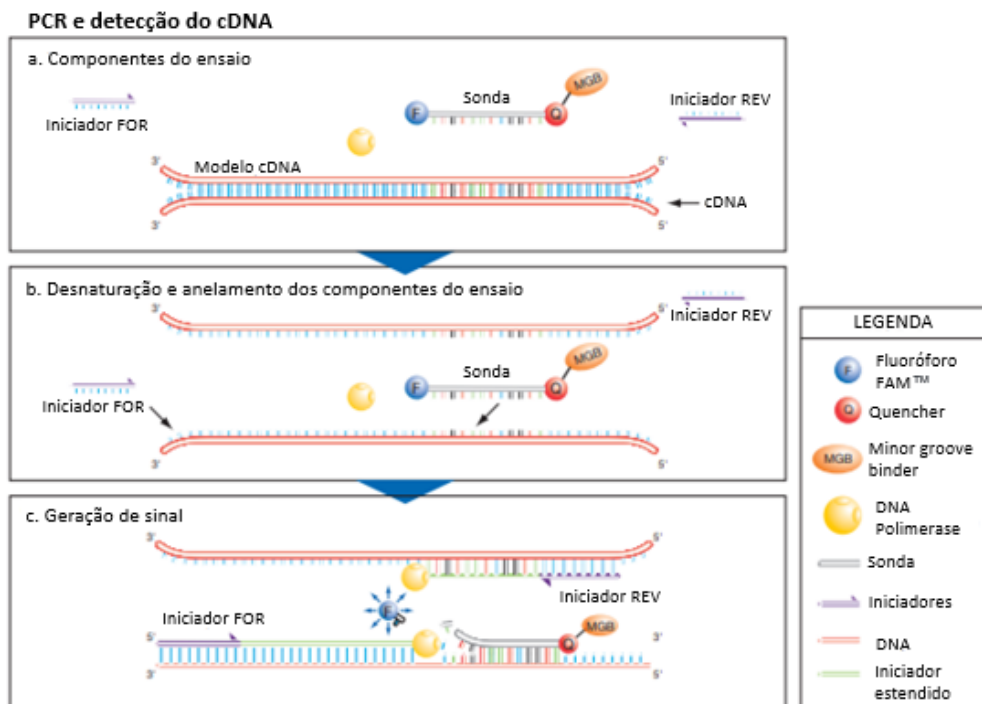
## **1.6 Metodologia da análise genética**

### **1.6.1 PCR em tempo real**

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR - do inglês *quantitative Polymerase Chain Reaction*) foi descrita pela primeira vez por Higuchi et al (HIGUCHI et al, 1993), sendo uma variação da técnica de PCR convencional, já que apresenta o mesmo princípio básico da amplificação de fragmentos alvos de DNA em milhões de vezes, passando a ser amplamente utilizada na biologia molecular (MULLIS et al, 1986; ZHU et al, 2020). Sua realização é possível através da manutenção das condições ideais para que a reação ocorra, como a variação da temperatura, pH e concentrações de sais e reagentes. Para isso, é necessário na solução o DNA molde que será replicado, a enzima DNA polimerase, os nucleotídeos, os iniciadores, o cofator da DNA polimerase, um íon bivalente, que normalmente é o magnésio, e, diferentemente do PCR convencional, ainda apresenta uma molécula fluorescente intercalante de DNA, como exemplo o corante SYBR® Green, ou uma sonda específica para a sequência alvo com um fluoróforo e um quencher, que irá inibir o fluoróforo enquanto eles estiverem ligados e próximos na sonda (BOWYER, 2007; KNIGHT et al, 2023). Essa diferença para a técnica de PCR convencional possibilita quantificar e acompanhar a amplificação da amostra ao mesmo tempo que ela está sendo realizada.

A reação a partir da utilização de sondas específicas, acontece através de um termociclador, que aumenta a temperatura em torno de 95°C, levando a

desnaturação das fitas de DNA, seguido por uma diminuição da temperatura em torno de 60°C, para a fase de anelamento da sonda, que reconhece especificamente sua sequência complementar nos locais de iniciação direta e reversa na fita molde, e em seguida para o anelamento dos iniciadores nas extremidades do DNA molde. Logo após, a temperatura se mantém para a fase da extensão, em que a DNA polimerase sintetiza a nova fita de DNA. Esta enzima, adiciona os nucleotídeos complementares até encontrar a sonda, ocorrendo a clivagem e liberação do fluoróforo, que, sem o quencher associado, irá gerar a fluorescência que permitirá a análise (Figura 5). O aumento do sinal da fluorescência ocorre apenas se a sequência alvo é complementar a sonda e é amplificada durante a qPCR, e, devido a isso, a amplificação não específica não é detectada. Todo o processo de desnaturação, anelamento e extensão varia na média de 40 ciclos e não interfere no acúmulo exponencial da produção, portanto, a quantidade de fluorescência gerada ao longo da reação é proporcional a quantidade de DNA que está sendo formado ao longo dos ciclos da qPCR (ZHU et al, 2020).



**Figura 5:** Técnica de qPCR para detecção do DNA complementar *Applied Biosystems ViiA™ Real-Time PCR* (Applied Biosystems, 2017). (a) Componentes do ensaio: Iniciador *FOR*, iniciador *REV*, sonda, *minor groove binder*, cDNA. (b) Etapa de desnaturação e anelamento dos componentes do ensaio. (c) Etapa de extensão e geração de sinal.

Grandes ou pequenas concentrações de material genético podem levar a uma inibição da amplificação durante a técnica de PCR convencional, ou ainda, a influência de grandes quantidades de DNA podem exceder a linearidade dinâmica do instrumento de genotipagem. Desse modo, vale ressaltar a necessidade de uma quantidade conhecida e pré-estabelecida de DNA em cada amostra, que acontece através da quantificação pela qPCR, para que, assim, as técnicas realizadas em seguida não sejam afetadas por essa variável (BOWYER, 2007; KNIGHT et al, 2023).

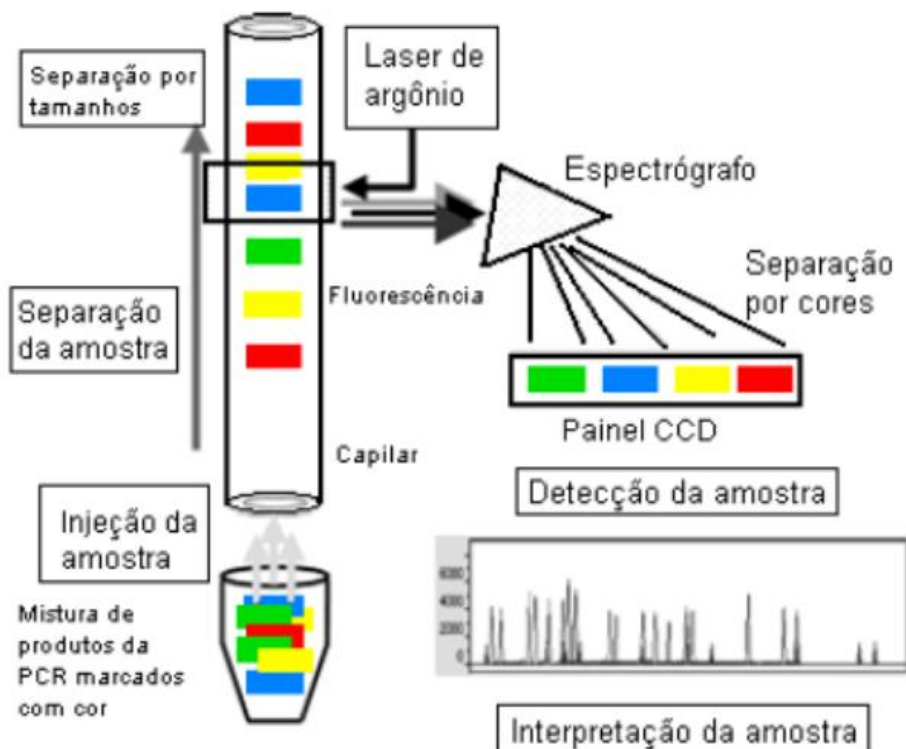
### **1.6.2 Eletroforese Capilar e Eletroferograma**

A técnica de Eletroforese Capilar (EC) é realizada pelos capilares presentes no interior do equipamento, sendo preenchidos por polímeros, uma fonte de tampão, um suprimento de energia, um laser excitatório, um detector de fluorescência e um computador associado ao equipamento para controlar a detecção e injeção das amostras (SHEWALE et al, 2012; SHETH, 2021). Após as moléculas de DNA serem amplificadas pela PCR, são carregadas negativamente e migram pelo polímero do capilar em direção ao polo positivo. Junto com as amostras, é importante adicionar o padrão de tamanhos moleculares, chamado de escada alélica ou *ladder*, que apresenta o tamanho das moléculas de DNA já estabelecido e conhecido, portanto, é um conjunto de todos os alelos possíveis de se encontrar na análise dos STRs. Além disso, é importante adicionar, também, em cada uma das EC o DNA de padrão interno, que normaliza e aumenta a precisão das análises (BUTLER, 2015).

Primeiramente, os nucleotídeos são marcados com fluorescência pela PCR, através de iniciadores alvos STRs marcados com fluoróforos (SHEWALE et al, 2012). Já na EC, ao final do capilar, esses nucleotídeos encontram o laser excitatório, e, assim, é possível realizar a detecção da fluorescência dos fragmentos menores e mais rápidos, que passam pelo feixe antes dos fragmentos maiores e mais lentos (HONG et al, 2020). Dessa forma, acontece a relação da velocidade com o parâmetro de diferença de tamanho do fragmento ou número de pares de base (HONG et al, 2020). A luz emitida é detectada e a informação é processada através de um software específico que traduz a informação em uma sequência de picos apresentados na forma de eletroferograma (BUTLER, 2015) (Figura 6). Os iniciadores STRs são



desenvolvidos de modo que os alelos dos loci amplificados por eles e marcados com o mesmo fluoróforo, não se sobreponham no eletroferograma (SHEWALE et al, 2012).



**Figura 6:** Esquema das etapas da eletroforese capilar em sequenciador automático, para detecção dos marcadores STRs. As amostras seguem através dos capilares, por diferença de polaridade, e os fragmentos do DNA se separam por diferença de tamanho. A detecção acontece a partir da fluorescência emitida pelos fragmentos marcados durante a PCR, em cada um dos canais de fluorescência do equipamento. Ao final, é obtido o eletroferograma para interpretação da amostra. (PENA, 2010).

A partir da formação do eletroferograma é possível obter alguns dados essenciais para análise do perfil genético. Um desses dados, é a quantidade de repetições de cada sequência STR, que define então o número do(s) alelo(s) para aquele marcador (SHEWALE et al, 2012). Outro dado, é o tamanho dos marcadores, que é determinado a partir da curva de calibração gerada através da escada alélica (SHEWALE et al, 2012). Por fim, mais um dado importante é a altura do sinal da intensidade relativa da câmara de detecção do equipamento, emitido através da excitação dos fluoróforos, que é convertido para Unidade de

Fluorescência Relativa (do inglês *Relative Fluorescence Unit - RFU*) (SHEWALE et al, 2012). A RFU é proporcional à quantidade de DNA marcado que foi injetado ao capilar, portanto quanto maior for a altura dos picos, maior é quantidade de DNA encontrada na amostra (SHEWALE et al, 2012). Sendo que, já foi bem definido pela literatura que a altura dos picos são usadas e apresentam bom resultados em diversos laboratórios para avaliação e definição dos alelos pelo eletroferograma (PHUA, 2022; SHETH, 2021; BUTLER, 2005).

Quando as amostras se encontram com o material genético degradado, ocorrem mudanças na estrutura da molécula de DNA que podem inviabilizar o anelamento dos iniciadores, assim como, o funcionamento da enzima DNA polimerase. Esse fato influencia diretamente na análise do eletroferograma, pois é possível observar a perda de locos gênicos, como perdas alélicas, também chamadas de *drop-out*, além de um desbalanço nas alturas dos picos e ocorrência de artefatos da PCR, como os *stutters*, que ocorrem na amplificação dos marcadores STRs durante a PCR (BUTLER, 2009). Os *stutters* são amplicons, subprodutos da amplificação dos STRs, que apresentam uma unidade de repetição menor em tamanho quando comparada ao pico do alelo verdadeiro. Ou em alguns casos, duas unidades de repetições menores, ou ainda, uma unidade de repetição maior em tamanho quando comparada ao pico do alelo verdadeiro, devido ao resultado de um deslize da enzima DNA polimerase na fita de DNA (BOAVIDA, 2018; MCCAUGHAN et al, 2023). A ocorrência dessa perda de alelos dificulta a análise e pode induzir a uma falsa homozigose, de forma que a amplificação preferencial não detecta um dos alelos (BOAVIDA, 2018).

É importante ressaltar a necessidade da obtenção de limiares, para auxiliar durante as análises de amostras que apresentam excessivos efeitos estocásticos resultantes de amostras com baixa qualidade ou com *drop-out* e/ou com pouca quantidade de DNA. A altura dos picos em RFU é aproximadamente proporcional ao número de moléculas de DNA contido na amostra, entretanto, no caso de alíquotas replicadas de material genético extraído de uma mesma amostra podem apresentar variações nas alturas dos picos (TAYLOR et al, 2016; BUTLER, 2005).

Além disso, a altura dos picos em RFU tem um papel essencial e considerável para a definição dos picos verdadeiros, entretanto, ela não é um indicador único nessa avaliação. É importante elencar outros parâmetros que também apresentam tamanha importância na análise dos picos. Assim, cada vez mais essa análise se mantém coerente e reproduzível, visto que muitas das vezes nos casos de amostras com baixas concentrações de DNA podem ocorrer dúvidas, o que leva a incertezas no momento de avaliação e confirmação dos reais picos (COWELL et al, 2018). Primeiramente, é necessário avaliar se a *ladder* correu como esperado e não apresentou nenhum tipo de problema. A partir disso, é possível realizar a comparação com a amostra para conferir se os alelos detectados estão coerentes com a escada alélica, no intuito de considerar se eles realmente existem ou não. Nas situações em que os alelos não concordam com a *ladder*, chamamos de alelo *off-ladder* (BUTLER, 2005). Caso ainda haja incertezas, é possível pesquisar através do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) a presença e frequência dos alelos na população brasileira (COWELL et al, 2018).

Outro parâmetro envolvido na definição dos picos verdadeiros é a localização dos alelos no eletroferograma. Neste existe a presença dos *bins*, que são as posições esperadas em que esses alelos devem aparecer, portanto os picos, tanto da *ladder* quanto das amostras, devem coincidir exatamente com o posicionamento dos *bins* (BUTLER, 2005).

Por fim, mais um fator importante é o formato dos picos, já que para serem considerados picos verdadeiros é necessário, além da altura, que eles se apresentem com a base mais larga e o ápice estreito. É defendido cada vez mais pela literatura a necessidade do cálculo da área dos picos, do inglês *Peak Height Ratio* (PHR), por acabar demonstrando dados mais confiáveis do que quando comparado somente a análise da altura e formato dos picos, que podem apresentar variações (SHETH, 2021; BUTLER, 2005). O PHR é calculado para cada um dos marcadores genéticos STR através de uma divisão, sendo que no numerador encontra-se a altura do pico com RFU mais baixo e no denominador a altura do pico com RFU mais alto. Em seguida, esse valor é multiplicado por 100 para ser expresso em porcentagem, como mostra a fórmula abaixo:

$$\text{PHR} = \frac{\text{MENOR PICO}}{\text{MAIOR PICO}} \times 100$$

Essa razão só pode ser calculada para os marcadores heterozigostos, dessa forma, avalia se os alelos existem nas mesmas quantidades no genoma e se eles amplificam igualmente. O valor do PHR sempre deve ser menor ou igual a 100% (BUTLER et al, 2021; GILL et al, 2015; WORD et al, 2010). Quanto mais perto de 100% significa que os alelos tem alturas mais parecidas, já no caso em que as alturas dos alelos são muito divergentes o valor tende a ser menor (BUTLER et al, 2021). O valor definido como uma combinação genotípica de boa qualidade do PHR é acima de 60% (BUTLER et al, 2021).

As alturas dos picos variam de amostras para amostras, mesmo que sejam oriundas da mesma fonte de DNA amplificada mais de uma vez. Porém, quando ocorre um desbalanço expressivo pode ser indício de que a amostra se apresenta com baixas concentrações de DNA, inibidas, degradadas, ou ainda com amplificação preferencial (BUTLER et al, 2021). Dessa forma, uma consequência notável que acontece na avaliação do equilíbrio das alturas dos picos heterozigotos é que a variabilidade na diferença da razão das alturas dos picos aumenta, enquanto que a concentração de DNA nas amostras diminui. Além disso, nos casos de amostras com baixas concentrações de DNA, há a possibilidade do *stutter* estar mais elevado do que o esperado para esse tipo de artefato, o que gera dúvidas sobre a definição do alelo verdadeiro (GILL et al, 2015; WORD et al, 2010).

Uma série de desafios envolvem a tentativa de obter resultados no eletroferograma de amostras que se encontram com DNA em baixas concentrações, sendo essas chamadas em inglês de amostras *Low Copy Number* (LCN). As análises de resultados obtidos nessa situações devem ser abordados com cautela, devido a possibilidade da aparição de alelos adicionais, o que é frequentemente observado em casos de contaminação, sendo referido como alelos *drop-in* (BUTLER, 2006; JIANG et al, 2020). Além disso, existe a possibilidade da não aparição de alelos, são casos referidos como alelos *drop-out*, normalmente afetados pelos efeitos estocásticos, e também, casos da aparição de *stutters* mais altos do que os típicos 5% a 15% do tamanho do alelo verdadeiro. Outra situação que pode ser percebida e influenciada durante a análise de material com baixa concentração de DNA é o aparecimento de artefatos, também chamados de *spikes*. Estes são picos oriundos de pequenas

alterações de tensão que passam pelo laser durante a eletroforese capilar e podem causar dúvidas quando comparados aos alelos verdadeiros (SKENDERAGIC et al, 2021). Esses artefatos podem aparecer em um único filtro de fluorescência, mas geralmente são facilmente identificados em mais de um filtro (BOAVIDA, 2018; MCCAUGHAN et al, 2023).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Ocorrem diariamente crimes, desaparecimentos e acidentes em massa em diversos países que são compartilhadas pelos noticiários e redes sociais, alcançando todo o mundo através da facilidade e rapidez no compartilhamento de informações. Casos assim, necessitam de identificação, esclarecimento e conclusão perante a sociedade, através do trabalho conjunto da medicina forense e da criminalística. Nesse âmbito, a identificação humana a partir da genética forense teve um crescimento mundial potencializado nos últimos anos (BUTLER, 2023).

O tecido ósseo é considerado uma fonte valiosa de DNA em inúmeros casos em que não se têm mais a presença de outros tipos de tecido e, portanto, não existe nenhuma outra opção de método ou de amostra passível para a realização da identificação (FINAUGHTY et al, 2023). Desse modo, é pertinente um plano de estudo que leve em consideração a escolha do método de extração baseado na amostra disponível, no estado de sua degradação e no método de genotipagem que será aplicado. No intuito de favorecer e agregar no trabalho da comunidade científica forense, em especial da área da genética forense.

## **3. OBJETIVO**

### **3.1 Objetivo geral**

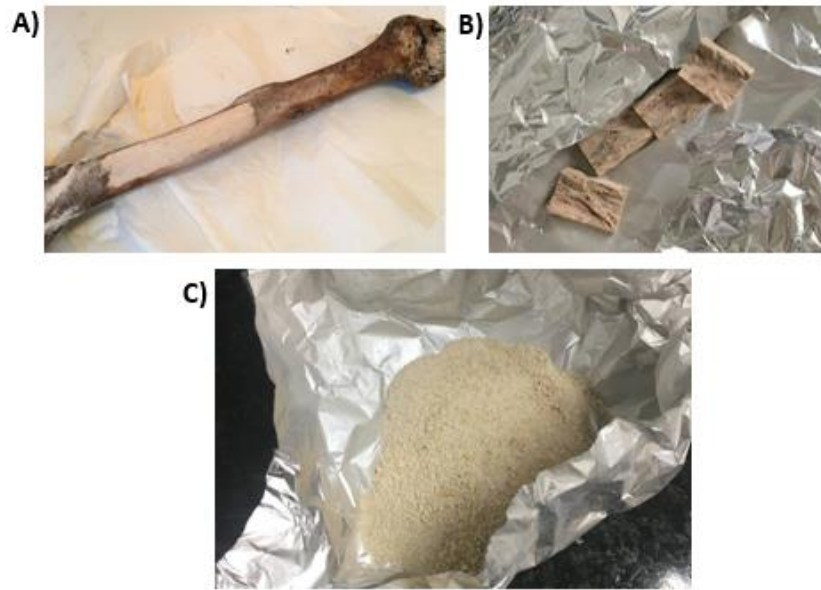
Comparar a eficiência de três diferentes protocolos de extração de DNA de ossada, para determinar o que melhor apresente uma preparação de DNA de alta qualidade.

### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o rendimento em gramas da extração de cada um dos protocolos em relação a massa de DNA obtida.
- Avaliar se a desmineralização prévia do osso tem efeito no rendimento em gramas da extração de DNA.
- Avaliar se a solubilização completa do tecido com tiocianato de guanidina e fenol (Trizol®) tem efeito no rendimento em gramas da extração de DNA.
- Avaliar se a extração orgânica de uma solução contendo DNA tem efeito no rendimento em gramas da extração de DNA.
- Avaliar a capacidade de amplificação das regiões de STR das amostras, usando um sistema comercial de uso rotineiro nas análises forenses (Fusion 6C), e geração de perfil genético em Eletroforese Capilar.
- Comparar a eficiência da amplificação, quantitativamente, através da fluorescência incorporada (RFU) e, qualitativamente, a partir da análise da existência do declínio de material amplificado em relação ao DNA padrão.
- Construir um protocolo operacional padrão (POP) do método que apresente o melhor preparo de DNA de alta qualidade, para utilização no Laboratório de Biologia Forense do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### 4. METODOLOGIA

O material biológico utilizado nesse trabalho é um fêmur oriundo de doação para o Laboratório Forense do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sendo a amostra de cadáver não identificado. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com o número do Parecer 5.195.105 (Anexo 2). Antes de iniciar o processamento desse material é necessário realizar uma primeira etapa de preparação, o pré tratamento do tecido ósseo. Ele envolve uma lavagem e limpeza para retirada de elementos aderidos a superfície externa do osso, através de água, esponja de aço e, por fim, uma última lavagem com água Milli-Q, na tentativa de diminuir o potencial de DNA exógeno. Em seguida, com auxílio da microretífica Dremel 300, o osso foi lixado até formar uma canaleta na média de 2 cm de altura e 8 cm de comprimento. Desse modo, uma camada de aproximadamente 1 mm foi removida da superfície, no intuito de reduzir a contaminação da face externa desse material, que ficou branco e liso. Utilizando a mesma microretífica, inicia-se o processo de corte dessa canaleta já delimitada, de forma a dividi-la em 4 pequenos pedaços, em média 2 cm de altura e 2 cm de comprimento. Também foram lixados na face interna, proporcionando a limpeza das trabéculas ósseas. A pulverização aconteceu através do equipamento SPEX® Sample Prep 6750 Freezer Mill (Metuchen, New Jersey, EUA) (Figura 7). Após esse tratamento inicial no fêmur, foi preparado 4 g de pó de osso e divididas em 20 alíquotas de 200 mg. Portanto, foi destinado 5 alíquotas para cada um dos 3 diferentes protocolos de extração de DNA de ossada (Quadro 1) e mais 5 amostras como reserva técnica. Desta forma, a mesma massa de amostra foi distribuída para os diferentes protocolos, totalizando 15 amostras.



**Figura 7:** Etapas do pré tratamento do tecido ósseo. A) Osso lixado na superfície externa e a delimitação da canaleta para o corte. B) Pedacos de ossos cortados. C) Pó de osso obtido no final do processo.

#### 4.1 Protocolo de Extração Avançada

O Protocolo de Extração Avançada (PEA), foi adaptado de Edson et al (2004). Em cada um dos 5 microtubos contendo aproximadamente 200 mg de pó de osso, foi adicionado 600  $\mu$ L de tampão de lise 1, contendo: 10 mM de Tris pH 8; 100 mM de NaCl; 50 mM de EDTA pH 8; e 0,5% de SDS (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*). Em seguida, também foi adicionado a cada microtubo mais 20  $\mu$ L de 20 mg/mL de proteinase K (Promega), enzima responsável pela degradação do colágeno. Os microtubos permaneceram em agitação intermitente de 1000 xg por 48h a 56°C. Esta etapa inicia a descalcificação do material, com intuito de remover além dos íons  $Ca^{2+}$ , os inibidores que compõe a matriz óssea.

Após a solubilização e descalcificação ocorreu a extração e purificação do DNA. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 5000 xg, após o sobrenadante foi transferido para novos microtubos. Foi adicionado, em cada amostra, um volume equivalente de fenol (Exodo Científica) e clorofórmico (Fraction X) (25:24), misturando por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 xg, para assim, transferir a fase aquosa para novos microtubos. A seguir, foi concentrado até 500  $\mu$ L da fase aquosa usando



o tubo micro concentrador Microcon 100, através da centrifugação por 15 minutos a 14000 xg a temperatura ambiente. Em seguida, ocorreu o processo de lavagem dessa membrana 3 vezes com 250 µL de água Milli-Q, que foi centrifugada por 5 minutos a 14000 xg a temperatura ambiente. Ao final, o DNA foi eluído em 15µl de água Milli-Q em cada amostra, através da centrifugação do tubo micro concentrador Microcon 100 de forma invertida por 15 minutos a 1000 xg a temperatura ambiente. O DNA foi guardado no congelador a -20°C para as futuras análises (EDSON et al, 2004).

#### **4.2 Protocolo de Extração Orgânica**

O Protocolo de Extração Orgânica (PEO), foi adaptado de Betancor et al (2010). Em cada um dos 5 microtubos contendo aproximadamente 200 mg de pó de osso, foi adicionado 1,0 ml de TRIzol® (Invitrogen™), solução com tiocianato de guanidina e fenol, responsável pelo processo de isolar, solubilizar, extrair e purificar o DNA dessas amostras. Em seguida, os microtubos foram mantidos em agitação por 1000 xg intermitentemente por 48h a temperatura ambiente.

As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5000 xg e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos. A concentração desse material foi realizada pela adição de 0,9 mL de etanol 100% (Invitrogen™), misturando e invertendo lenta e cuidadosamente o microtubo 6 vezes e mantendo as amostras em incubação por 3 minutos. Logo após, ocorreu a centrifugação dessas amostras por 5 minutos a 2000 xg a temperatura ambiente. Caso o DNA não precipite, pode ser realizada mais uma etapa de centrifugação por 5 minutos a 800 xg a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado através da inversão do microtubo com cuidado, e, em seguida, o DNA foi lavado com 1,5 mL de etanol a 70% (Invitrogen™) e incubado por 3 minutos. Os microtubos foram centrifugados por mais 5 minutos a 2000 xg a temperatura ambiente e o etanol foi desprezado invertendo o microtubo novamente com cuidado. Esse processo foi repetido por mais 3 vezes. Logo após, os microtubos foram mantidos abertos para secagem por 15 segundos. Caso não seque, é possível utilizar o concentrador a vácuo por 5 minutos a 60°C. Foram adicionados 100 µL de NaOH 8 mM para desmanchar completamente o pellet de DNA e, logo após, ocorreu uma centrifugação por 10 minutos a 12.000 xg a

temperatura ambiente, para remover possíveis materiais insolúveis presentes na amostra. Em seguida, o pH da solução foi ajustado a partir da adição de 100 µL de 0,1 M de HEPES, pH 7,8. Por fim, até 500 µL dessas amostras foram concentradas usando o tubo micro concentrador Microcon 100, seguido da centrifugação por 15 minutos a 14000 xg a temperatura ambiente. O processo de lavagem dessa membrana foi feito 3 vezes com 250 µL de água Milli-Q, seguido de uma centrifugação por 5 minutos a 14000 xg a temperatura ambiente. O DNA foi eluído em 15 µL de água Milli-Q em cada amostra, através da centrifugação do tubo micro concentrador Microcon 100 de forma invertida por 5 minutos a 1000 xg a temperatura ambiente. Ao final, o DNA foi guardado no congelador a -20°C para as futuras análises (BETANCOR et al, 2010).

### **4.3 Protocolo de Desmineralização Completa**

O Protocolo de Desmineralização Completa (PDC), foi adaptado de Loreille et al (2007). Em cada um dos 5 microtubos contendo aproximadamente 200 mg de pó de osso, foi adicionado 1,0 mL de tampão de lise 2, contendo: 0,5 M EDTA (Ambion®), e 1% de N-Lauroylsarcosine (Merk). No intuito de uma desmineralização completa, remoção dos íons Ca<sup>2+</sup> e inibidores que compõe a matriz óssea. Logo em seguida, foi adicionado 40 µL de 20 mg/mL de proteinase K (Promega), enzima responsável pela degradação do colágeno. Após essa etapa, as amostras foram mantidas por 48h a 56°C em um agitador por 1000 xg intermitentemente.

Após a solubilização e descalcificação ocorreu a extração e purificação do DNA. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 5000 xg, após o sobrenadante foi transferido para novos microtubos. Em seguida, ocorreu a adição, em cada amostra, de um volume equivalente de fenol (Exodo Científica) e clorofórmico (Fraction X) (25:24). Os microtubos foram misturados por 3 minutos, seguido da centrifugação por 10 minutos a x5000 g a temperatura ambiente. Por fim, ocorreu a transferência da fase aquosa para novos microtubos. Logo após, até 500µL fase aquosa foi concentrada usando o tubo micro concentrador Microcon 100, a partir da centrifugação por 15 minutos a 14000 xg a temperatura ambiente. Em seguida, ocorreu o processo de lavagem dessa membrana 3 vezes com 250 µL de água Milli-Q e centrifugação por 5 minutos a

14000 xg a temperatura ambiente. O DNA foi eluído em 15µl de água Milli-Q em cada amostra, através da centrifugação do tubo micro concentrador Microcon 100 de forma invertida por 5 minutos a 1000 xg a temperatura ambiente. O DNA foi guardado no congelador a -20°C para as futuras análises (LOREILLE et al, 2007).

**Quadro 1:** Comparação direta dos protocolos por etapa realizada. Os três protocolos de extração de DNA de ossada: Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC).

	<b>PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO AVANÇADA (PEA)</b>	<b>PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO ORGÂNICA (PEO)</b>	<b>PROTOCOLO DE DESMINERALIZAÇÃO COMPLETA (PDC)</b>
<b>ETAPA 1</b>	Uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) necessários: jaleco, luvas e óculos de proteção.		
<b>ETAPA 2</b>	<b>Preparação do tecido ósseo</b>		
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lavar a fração do osso que será utilizada com água e esponja de aço, esfregando a superfície externa para limpeza de impurezas. Realizar a última lavagem com água Milli-Q.</li> <li>2. Lixar o osso com auxílio da microretífica Dremel 300. Retirar aproximadamente 1 mm da camada externa desse material, que ficará branco e liso. Fazer duas canaletas paralelas, de 2 cm de altura e 8 cm de comprimento, que facilitará o corte transversal.</li> <li>3. Cortar em 4 pequenos pedaços a canaleta já delimitada, em média 2 cm de altura e 2 cm de comprimento e lixar a face interna para limpeza das trabéculas ósseas.</li> <li>4. Pulverizar as amostras através do equipamento SPEX Sample Prep 6750 Freezer Mill (Metuchen, New Jersey, EUA).</li> <li>5. Dividir 4 g de pó de osso em 20 alíquotas de 200 mg, destinando 5 alíquotas para cada um dos 3 diferentes protocolos de extração de DNA de ossada e mais 5 amostras como reserva técnica.</li> <li>6. Armazenar as amostras a 4º C por até 12 meses.</li> </ol>		
<b>ETAPA 3</b>	<b>Solubilização da molécula de DNA</b>		
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Em cada um dos 5 microtubos, contendo ~200 mg de pó de osso, adicionar 600 µL de tampão de lise 1 (10</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Em cada um dos 5 microtubos, contendo ~200 mg de pó de osso, adicionar 1,0 ml de TRIzol®.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Em cada um dos 5 microtubos, contendo ~200 mg de pó de osso, adicionar 1,0 mL de tampão de lise 2</li> </ol>

	<p>mM de Tris pH 8, 100 mM de NaOAc, 50 mM de EDTA pH 8 e 0,5% de SDS).</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Adicionar 20 µL de 20 mg/mL de proteinase K.</li> <li>Manter por 48h a 56°C em agitação (1000 xg) intermitente.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Manter por 60h em agitação (1000 xg) intermitente a temperatura ambiente.</li> </ol>	<p>(0,5 M EDTA e 1% de N-Lauroylsarcosine).</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Adicionar 40 µL de 20 mg/mL proteinase K.</li> <li>Manter por 48h a 56°C em agitação (1000 xg) intermitente.</li> </ol>
<b>ETAPA 4</b>	<b>Extração e purificação do DNA</b>		
	<ol style="list-style-type: none"> <li>Centrifugar as amostras por 15 minutos a 5000 xg.</li> <li>Transferir o sobrenadante para novos microtubos.</li> <li>Adicionar a amostra um volume equivalente de fenol e clorofórmio (25:24) em cada microtubo.</li> <li>Misturar por 3 minutos.</li> <li>Centrifugar as amostras por 10 minutos a 5000 xg e transferir a fase aquosa para um novo microtubo.</li> </ol> <p>OBS: As amostras podem ficar guardadas até 1 semana a 4°C.</p>		<ol style="list-style-type: none"> <li>Centrifugar as amostras por 15 minutos a 5000 xg.</li> <li>Transferir o sobrenadante para novos microtubos.</li> <li>Adicionar a amostra um volume equivalente de fenol e clorofórmio (25:24) em cada microtubo.</li> <li>Misturar por 3 minutos.</li> <li>Centrifugar as amostras por 10 minutos a 5000 xg e transferir a fase aquosa para um novo microtubo.</li> </ol> <p>OBS: As amostras podem ficar guardadas até 1 semana a 4°C.</p>

ETAPA 5	Concentração do DNA		
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Concentrar, através do tubo micro concentrador Microcon 100, até 500 µL da fase aquosa. Centrifugar por 15 minutos a 14.000 xg.</li> <li>2. Lavar a membrana 3 vezes com 250µL de água Milli-Q. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 xg.</li> <li>3. Eluir em 15 µl água Milli-Q o DNA de cada amostra. Centrifugar o tubo micro concentrador de forma invertida por 5 minutos a 1.000 xg.</li> <li>4. Guardar as amostras a -20°C para as futuras análises.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Centrifugar as amostras por 5 minutos a 5.000 g e colher o sobrenadante.</li> <li>2. Adicionar 0,9 ml de Etanol 100%.</li> <li>3. Misturar invertendo lenta e cuidadosamente o microtubo 6 vezes.</li> <li>4. Incubar as amostras por 3 minutos.</li> <li>5. Centrifugar por 5 minutos a 2.000 xg.</li> <li>6. Caso o DNA não precipite, centrifugar por mais 5 minutos a 800 xg.</li> <li>7. Despreze o sobrenadante invertendo o microtubo com cuidado.</li> <li>8. Lavar o DNA com 1,5 ml de etanol a 70%. Misturar por 10 segundos. Incubar por 3 minutos.</li> <li>9. Centrifugar por mais 5 minutos a 2000 xg.</li> <li>10. Desprezar o etanol invertendo o microtubo com cuidado.</li> <li>11. Repetir esse processo mais 3 vezes.</li> <li>12. Secar por 15 segundos</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Concentrar, através do tubo micro concentrador Microcon 100, até 500 µL da fase aquosa. Centrifugar por 15 minutos a 14.000 xg.</li> <li>2. Lavar a membrana 3 vezes com 250 µL de água Milli-Q. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 xg.</li> <li>3. Eluir em 15 µl água Milli-Q o DNA de cada amostra. Centrifugar o tubo micro concentrador de forma invertida por 5 minutos a 1.000 xg.</li> <li>4. Guardar as amostras a -20°C para as futuras análises.</li> </ol>

		<p>(microtubo aberto). Caso não seque, utilizar um concentrador a vácuo por 5 minutos a 60°C.</p> <p><b>13.</b> Dissolver em 100 µL de NaOH 8 mM, pipetando a solução até o pellet de DNA se desmanchar completamente. Misture por 30 segundos.</p> <p><b>14.</b> Centrifugar por 10 minutos a 12.000 xg para remover materiais insolúveis.</p> <p><b>15.</b> Transferir o sobrenadante para um novo microtubo e ajustar o pH da solução através da adição de 100 µL de 0,1 M de HEPES, pH 7,8.</p> <p><b>16.</b> Através do tubo micro concentrador Microcon 100, concentrar até 500µL da amostra. Centrifugar por 15 minutos a 14.000 xg.</p> <p><b>17.</b> Lavar a membrana 3 vezes com 250 µL de água Milli-Q. Centrifugar por 5</p>	
--	--	--	--

		<p>minutos a 14.000 xg.</p> <p><b>18.</b> Eluir em 15µl de água Milli-Q o DNA de cada amostra. Centrifugar o tubo micro concentrador de forma invertida por 5 minutos a 1.000 xg.</p> <p><b>19.</b> Guardar as amostras a -20°C para as futuras análises.</p>	
--	--	---	--

#### 4.4 Rendimento do grau de pureza

O nanofotômetro de bancada Implen NP80™ é capaz de determinar as concentrações médias dos ácidos nucléicos presente nas amostras, assim como sua pureza. Esses parâmetros são medidos a partir da quantidade de luz absorvida pelo DNA da amostra em solução no comprimento de onda de 260nm, de forma que quanto maior for a absorção de luz nesse feixe, maior é a concentração de DNA na solução. Após a extração, é comum que as amostras de DNA não estejam isoladas completamente de outras moléculas encontradas na célula, como proteínas e compostos orgânicos. Portanto, é importante determinar a pureza dessas amostras através do cálculo da razão da absorbância 260nm/280nm, que expressa a proporção entre a quantidade de DNA, medida no comprimento de onda 260nm, e quantidade de proteínas, medida no comprimento de onda 280nm, e outros resíduos extraídos.

#### 4.5 Quantificação, índice de degradação e monitoramento de inibição

A quantificação do DNA contido nas amostras é determinada através da realização da técnica de PCR quantitativo (qPCR), utilizando o equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems™). O kit Quantifiler Trio

Applied Biosystems foi utilizado, indicando a concentração de DNA humano contida na amostra, para assim, dar prosseguimento com as análises dos STRs. O ensaio possui alvos gênicos específicos para melhorar a sensibilidade da detecção, sendo três alvos gênicos específicos para o DNA humano: o DNA autossômico que gera produtos de PCR de baixo peso molecular (*Small Autosomal* (SA) (80 pb); de alto peso molecular (*Large Autosomal* (LA)) (214 pb); e também o alvo gênico para DNA humano masculino (*Y chromosome targets*), que gera um produto de PCR de 75 pb. Além disso, o kit detecta se há presença de inibidores na solução através do uso de um controle da PCR interno (*Internal PCR Control* - IPC). Além disso, o kit também detecta se a molécula de DNA se encontra íntegra ou não, indicando o nível de degradação, através dos dois primeiros loci alvos, *Small Autosomal* (SA) e *Large Autosomal* (LA), que é calculado de forma que:

$$\text{Índice de Degradação} = \frac{\text{Concentração de DNA SA (ng/}\mu\text{l)}}{\text{Concentração de DNA LA (ng/}\mu\text{l)}}$$

Quando o resultado é <1 indica que o DNA não está degradado nem inibido. Enquanto que resultados que se encontram entre 1 e 10 indicam que o DNA está ligeiramente a moderadamente degradado e que a presença de inibidores é possível, mas não suficiente para suprimir significativamente a amplificação. Por fim, resultados >10 indicam que a amostra contém um material genético significativamente degradado e com possível presença de inibidores.

Já o terceiro loci alvo do kit, *Y chromosome targets*, visa definir o gênero sexual da amostra, pois está presente em múltiplas cópias no cromossomo Y, indicando, assim, se é amostra masculina ou não. O último loci alvo, Controle interno da PCR (IPC), avalia a presença de inibidores nas amostras, de forma que uma amplificação positiva apresenta um CT<40.

O marcador indicado pelo kit para avaliar a concentração de DNA e realizar as análises de índice de degradação e presença de inibidores é o *Small Autosomal* (SA).

As sondas utilizadas são a TaqMan MGB, que contém o fluoróforo (FAM ou VIC) ligado a extremidade 5' da sonda e na extremidade 3' apresenta um *quencher* (NFQ) e um *minor groove binder* (MGB). Enquanto que, a outra sonda é a TaqMan QSY, que contém um fluoróforo (ABY ou JUN) ligado a extremidade

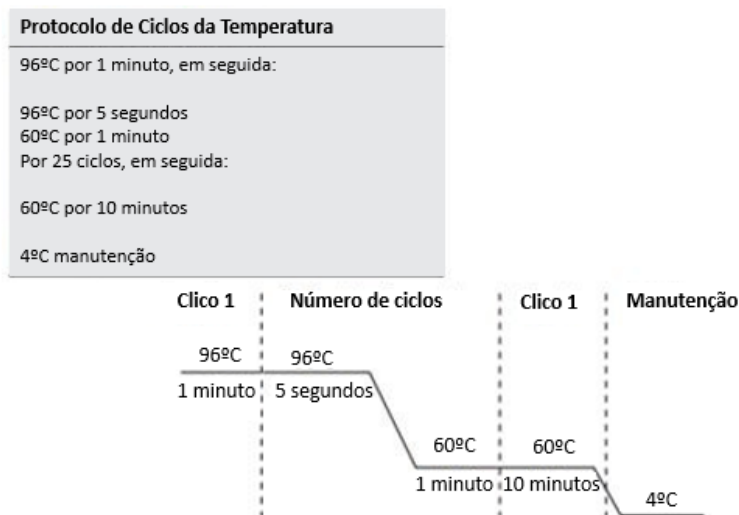


5' da sonda e na extremidade 3' apresenta um *quencher* (QSY) (Applied Biosystems, 2017).

#### 4.6 PCR e tipagem STR

A amplificação do DNA extraído foi realizada pela técnica de PCR, utilizando o kit Promega PowerPlex® Fusion 6C com DNA controle 2800M. Através do termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well, seguindo as recomendações de temperatura e tempo de acordo com o fabricante (Figura 8). O kit é composto por 27 marcadores do tipo STR autossômicos (D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, FGA, D22S1045, SE33, Penta E, Penta D), um marcador do cromossomo Y (DYS391) e a amelogenina que determina o gênero sexual. Além de 2 loci de mutações Y-STR (DYS570 e DHS576). Esses marcadores permitem a amplificação e detecção de fluorescência de 18 loci autossômicos que estão identificados no *Combined DNA Index Systems* (CODIS), o banco de dados de perfis genéticos utilizado pelo *Federal Bureau of Investigation* (FBI) (MCCAUGHAN et al, 2023).

Antes de iniciar a técnica de PCR as amostras foram concentradas. Os microtubos foram centrifugados a vácuo no equipamento SpeedVac™ por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a secagem dos microtubos, o DNA foi ressuspenso em 5µL de água Mili-Q e se manteve em agitação de 300 RPM por 30 minutos a temperatura ambiente. A próxima etapa seguiu pelo preparo do mix da PCR e da utilização dos 5µL de amostra, seguindo o protocolo do fabricante.



**Figura 8:** Protocolo da temperatura dos ciclos do manual técnico do kit Promega PowerPlex® Fusion System for use on the Applied Biosystems™ Genetic Analyzers.

#### 4.7 Eletroforese Capilar

Os produtos da PCR foram submetidos a Eletroforese Capilar no equipamento ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer, com as seguintes propriedades do protocolo do instrumento: capilar 50 cm; POP 7; matriz de fluoróforos J6; temperatura de corrida 60°C; voltagem da injeção 1.6 kVolts; voltagem da corrida 19.5 kVolts; pré voltagem da corrida 15 kVolts; tempo injeção de 8 segundos; tempo de corrida de 1995 segundos; e tempo de pré corrida de 180 segundos.

As análises aconteceram em três EC diferentes, de forma que em cada uma das vezes as amostras dos três protocolos foram adicionadas a placa em diferentes poços, no intuito de não haver possíveis variações oriundas dos capilares. Em seguida, o resultado foi obtido e analisado através do eletroferograma pelo programa Genemapper™ IDX.

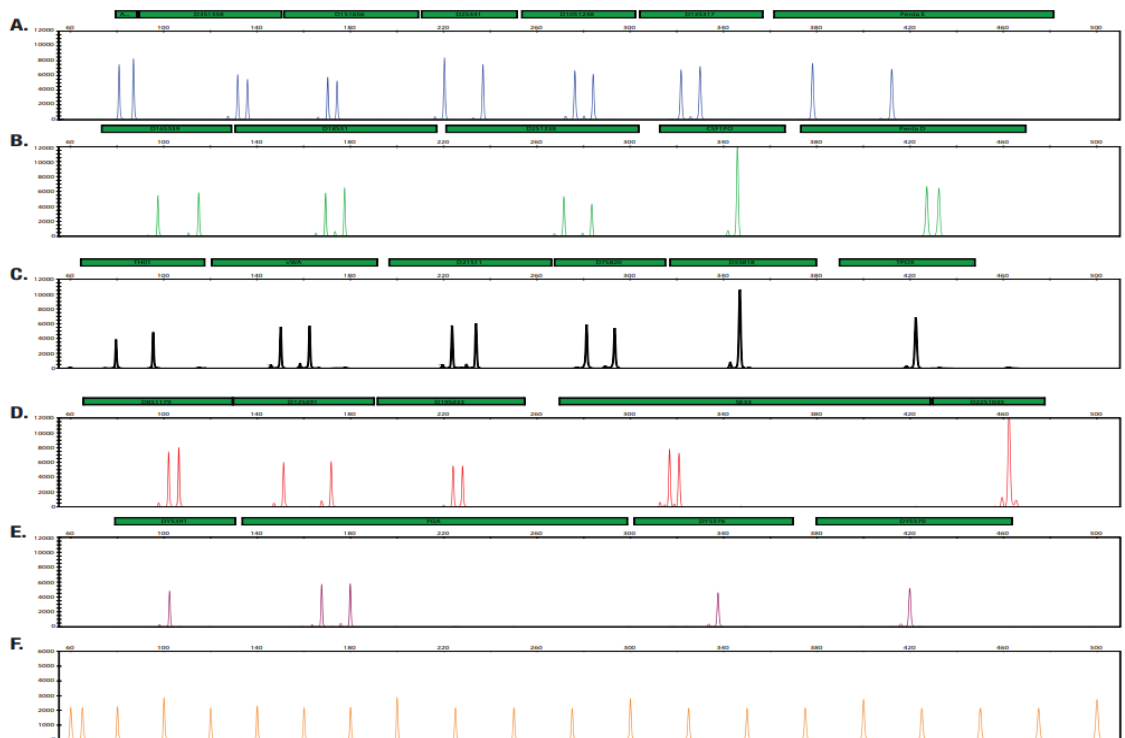
Para a definição do limite de detecção (do inglês *Limit of Detection* – LOD) foi realizado o cálculo do limiar analítico (LA) para determinar um *thresholds* e, assim, a validação para as alturas dos picos. Esse cálculo foi elaborado de forma que os ajustes de RFU foram estabelecidos como 1 para todos os canais de fluorescência (azul, verde, amarelo, vermelho e roxo) nas 5 amostras de cada um dos 3 protocolos, em que se realizou 3 diferentes corridas. Dessa forma,

foram gerados 15 dados de análises para cada um dos 3 protocolos, totalizando 45 dados a serem analisados nos 5 diferentes canais de fluorescência. A partir do cálculo da média e o desvio padrão de 50 alturas randômicas dos ruídos basais dos diferentes canais e amostras, foi possível calcular o limiar analítico separadamente de cada amostra, de forma que, ele seja igual a média mais três vezes o desvio padrão (BUTLER, 2006), como mostra a fórmula abaixo:

$$LA=MÉDIA+(3*DP)$$

Isso possibilitou calcular uma média geral para os protocolos nas 3 corridas e definir o limiar analítico de todos os canais para os 3 protocolos separadamente (BUTLER, 2006).

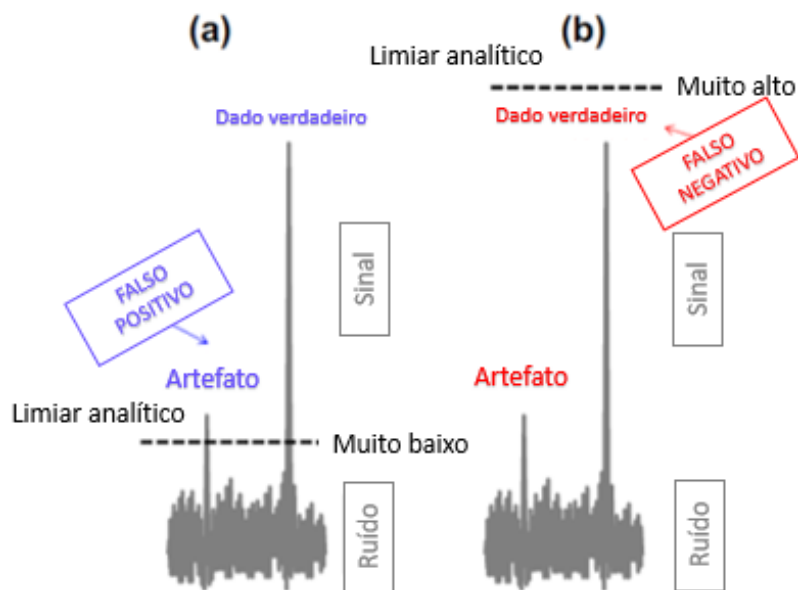
Desse modo, é possível analisar qualitativamente o perfil genético dos marcadores moleculares STRs, como exemplo a imagem abaixo de um eletroferograma do controle de DNA 2800M que acompanha o kit de Eletroforese Capilar (Figura 9). Essa análise qualitativa acontece através da avaliação das alturas e formatos dos picos, como também se está condizente com a ladder e os bins. Além disso, é possível avaliar a quantidade de DNA amplificado através da quantidade de fluorescência incorporada (RFU), que é mensurado através da altura dos picos.



**Figura 9:** Eletroferograma completo do controle de DNA 2800M, mostrando os marcadores e seus respectivos alelos. A) Eletroferograma mostrando os picos dos locis: Amelogenina, D3S1358, D1S1656, D2S441, D13S317 e Penta E. B) Eletroferograma mostrando os picos dos locis: D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, Penta D. C) Eletroferograma mostrando os picos dos locis: TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX. D) Eletroferograma mostrando os picos dos locis: D8S1179, D12S391, D19S433, SE33 E D22S1045. E) Eletroferograma mostrando os picos dos locis: DYS391, FGA, DYS576 e DYS570. F) Eletroferograma mostrando os fragmentos de 60 a 500 pares de bases do padrão interno WEN 500 (PROMEGA, 2018).

É importante definir um limite de detecção durante a análise dos dados obtidos no programa Genemapper™ IDX, através da definição de um limiar analítico, com a finalidade de separar, de forma mais segura e afirmativa, o que são picos reais de DNA presente na amostra e o que são ruídos basais do equipamento. Para isso, é necessário uma validação interna no intuito de definir parâmetros e padrões de qualidade de interpretação de resultados, que podem ser variáveis entre diferentes laboratórios. Sendo que, o objetivo principal nessa validação é definir o limiar analítico dos picos de fluorescência para excluir dados

inconsistentes e destacar os dados reais (MCCAUGHAN et al, 2023) (Figura 10).



**Figura 10:** Definição do limiar analítico para interpretação dos picos. a) Limiar analítico definido com valor muito baixo, não distinguindo os ruídos do equipamento, gerando dados falso-positivos. b) Limiar analítico definido com valor elevado, resultado dados falso-negativos (BUTLER, 2015).

#### 4.8 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo Microsoft Excel 2019 e pelo programa estatístico BioEstat. A realização do teste de outliers foi feita através do teste de Grubbs e para o teste de normalidade foi realizado o teste Shapiro-Wilk. Já para a análise da variância, os resultados foram analisados utilizando o teste One Way Anova e teste de Tukey, para comparação múltipla entre as médias. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  e os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Alguns parâmetros foram considerados, como a massa de DNA por grama de tecido preparado, para análise de rendimento do grau de pureza, e a quantidade de DNA amplificado por massa de DNA adicionado, visando avaliar os inibidores presentes, o índice de degradação, o rendimento em gramas, qualidade geral do DNA e o perfil genético completo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados da Pureza e Quantificação do DNA

Logo após a realização dos três diferentes protocolos de extração de DNA de ossada, o primeiro resultado obtido é a concentração de ácidos nucleicos contidos nas amostras e o rendimento do grau de pureza, através da relação A260nm por A280nm, ambos medidos através da leitura do equipamento nanofotômetro Implen NP80™ (Quadro 2).

**Quadro 2:** Valores medidos através da leitura pelo nanofotômetro IMPLEN NP80™ após a etapa de extração das amostras do Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC). PEA vs PEO ns; PEA vs PDC  $p < 0,01$ ; PEO vs PDC  $p < 0,01$ .

Leitura Nanofotômetro						
PROTOCOLO	AMOTRA	ng/ul	A260/A280	MÉDIA [ng/ul]	DESVIO PADRÃO	MÉDIA A260/A280
PEA	1	56,50	1,34	53,70	13,80	0,89
	2	69,50	0,89			
	3	59,00	0,86			
	4	32,00	0,63			
	5	51,50	0,76			
PEO	1	130,50	1,59	145,48	117,28	1,54
	2	335,25	1,60			
	3	155,70	1,55			
	4	25,00	1,52			
	5	80,95	1,44			
PDC	1	743,25	2	909,16	117,21	1,57
	2	1.019,10	1			
	3	941,50	2			
	4	932,80	2			
	5	N/A	N/A			

N/A: Não aplicável.

Em seguida, foram obtidos, através da quantificação por qPCR, os resultados relacionados ao IPC, sendo assim, referentes a análise da presença de inibidores (Quadro 3). Portanto, foi possível avaliar que os CTs para o alvo

gênico IPC apresentam uma média <40 em todos os protocolos.

**Quadro 3:** Valores obtidos do Controle Interno da PCR (IPC) das amostras do Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC). PEA vs PEO  $p < 0,01$ ; PEA vs PDC  $p < 0,01$ ; PEO vs PDC ns.

IPC								
PROTOCOLO	AMOTRA	1	2	3	Média por Amostra	Desvio Padrão por Amostra	Média por Protocolo	Desvio Padrão por Protocolo
PEA	1	29,3	29,37	29,25	29,37	0,06	29,18	0,13
	2	29,14	28,95	29,35	29,15	0,20		
	3	29,29	29,3	29,09	29,23	0,12		
	4	29,1	29,07	N/A	29,09	0,02		
	5	29,08	29,21	29,03	29,11	0,09		
PEO	1	28,74	28,74	28,87	28,78	0,08	28,74	0,07
	2	28,74	N/A	28,69	28,72	0,04		
	3	28,85	28,72	28,69	28,75	0,09		
	4	28,72	28,68	28,67	28,69	0,03		
	5	28,65	28,81	28,56	28,67	0,13		
PDC	1	29,01	28,9	29,11	29,01	0,11	28,89	0,13
	2	28,87	29,02	29,11	29,00	0,12		
	3	28,75	28,82	28,97	28,85	0,11		
	4	28,73	28,72	28,85	28,77	0,07		
	5	28,82	28,73	28,87	28,78	0,07		

N/A: Não aplicável.

Já os resultados obtidos durante a análise do índice de degradação (Quadro 4), demonstram que so protocolos PEA, PEO e PDC apresentam uma média de resultados entre 1 e 10, embora o PEO tenha apresentado um alto desvio padrão e vários resultados outliers, sendo esses removidos das análises.

**Quadro 4:** Valores do cálculo para o Índice de Degradação das amostras do Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC). PEA vs PEO ns; PEA vs PDC  $p < 0,01$ ; PEO vs PDC ns.

Índice de Degradação								
PROTOCOLO	AMOSTRA	1	2	3	Média por Amostra	Desvio Padrão por Amostra	Média por Protocolo	Desvio Padrão por Protocolo
PEA	1	N/A	3,79	N/A	3,79	N/A	2,34	1,23
	2	N/A	3,61	2,83	3,22	0,55		
	3	0,94	4,44	1,67	2,35	1,85		
	4	1,81	0,59	1,43	1,28	0,62		
	5	2,67	1,92	N/A	2,30	0,53		
PEO	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4,96	3,50
	2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
	3	2,48	2,33	N/A	2,41	0,11		
	4	9,83	5,18	N/A	7,51	3,29		
	5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
PDC	1	5,35	8,46	8,65	7,49	1,85	6,87	1,95
	2	10,87	8,38	6,79	8,68	2,06		
	3	5,43	6,85	4,97	5,75	0,98		
	4	7,56	3,40	8,1	6,35	2,57		
	5	5,04	6,37	N/A	5,71	0,94		

N/A: Não aplicável.

Por fim, foram obtidas as concentração de DNA nas amostras pela técnica de qPCR, média e desvio padrão dos 3 protocolos (Quadro 5).



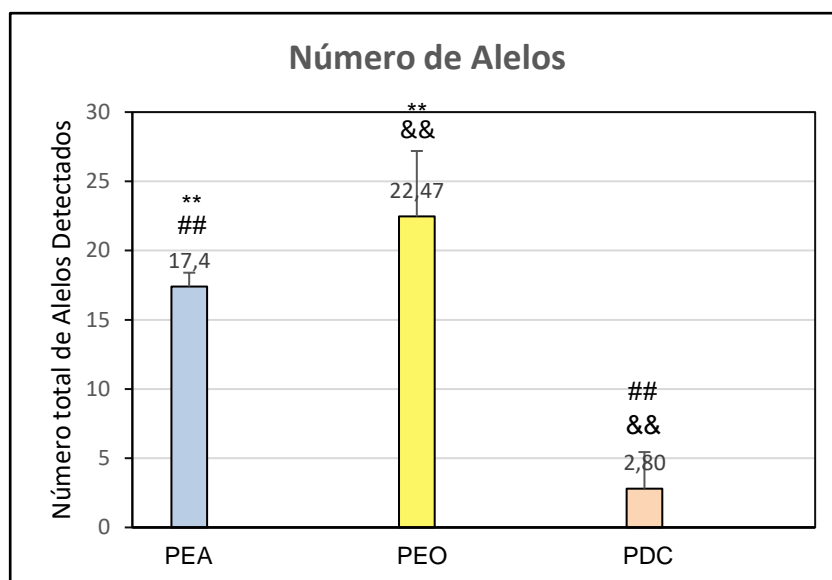
**Quadro 5:** Valores da concentração de DNA nas amostras do Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC). PEA vs PEO ns; PEA vs PDC  $p < 0,01$ ; PEO vs PDC ns.

Concentração DNA pg/ul								
PROTOCOLO	AMOSTRA	1	2	3	Média por Amostra	Desvio Padrão por Amostra	Média por Protocolo	Desvio Padrão por Protocolo
PEA	1	1,56	0,57	0,96	1,03	0,50	0,89	0,75
	2	2,32	1,86	2,14	2,11	0,23		
	3	0,65	0,42	0,32	0,46	0,17		
	4	0,37	0,32	0,12	0,27	0,13		
	5	N/A	0,43	0,36	0,40	0,05		
PEO	1	4,393	N/A	N/A	4,39	N/A	5,93	5,81
	2	1,889	10,68	5,414	5,99	4,42		
	3	N/A	14,365	17,912	16,14	2,51		
	4	3,979	1,784	1,71	2,49	1,29		
	5	N/A	0,219	2,837	1,53	1,85		
PDC	1	5,314	7,82	5,76	6,30	1,34	6,76	1,41
	2	5,727	7,51	4,00	5,75	1,76		
	3	7,435	5,72	7,66	6,94	1,06		
	4	7,624	6,61	N/A	7,12	0,72		
	5	N/A	7,40	9,36	8,38	1,39		

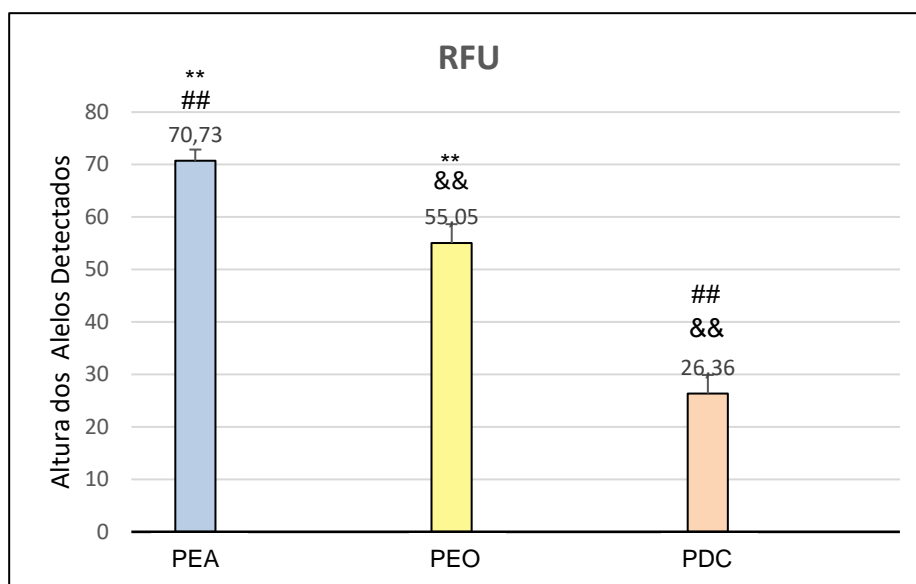
N/A: Não aplicável.

## 5.2 Resultados da Eletroforese Capilar e Eletroferograma

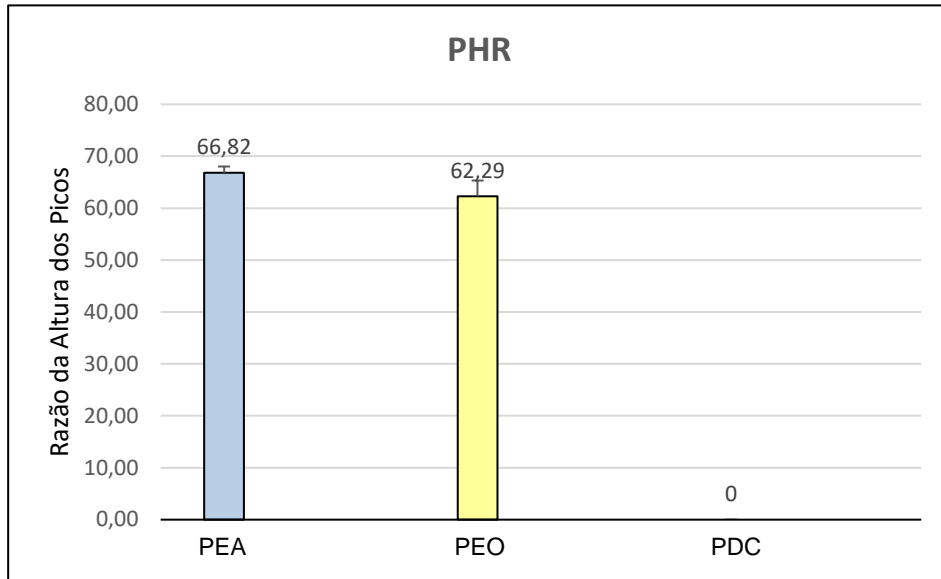
A partir da definição do limiar analítico, os alelos foram avaliados e definidos a partir de algumas parâmetros, como a altura e o formato dos picos, além do fato deles estarem concordantes com a ladder e os bins. Dessa forma, foi possível calcular a média e desvio padrão para o número total de alelos detectados (Figura 11), assim como, a altura dos alelos detectados (Figura 12), a razão da altura dos picos (Figura 13) e, por fim, a quantidade de artefatos encontrados (Figura 14) no Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC).



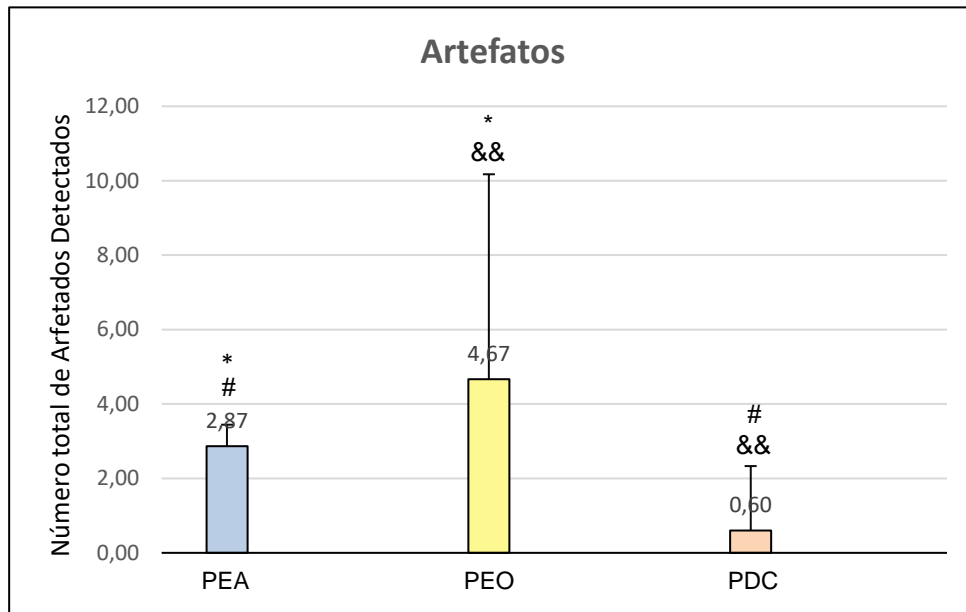
**Figura 11:** Número total de alelos detectados no Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC). O símbolo \* é referente a comparação entre o PEA e o PEO; # é referente a comparação entre o PEA e o PDC; & é referente a comparação entre o PEO e o PDC. \* # &  $p < 0,05$ , \*\* ## &&  $p < 0,01$ , \*\*\* ### &&&  $p < 0,0001$ . PEA vs PEO  $p < 0,01$ ; PEA vs PDC  $p < 0,01$ ; PEO vs PDC  $p < 0,01$ .



**Figura 12:** Altura dos alelos detectados medida pela Unidade de Fluorescência Relativa (do inglês *Relative Fluorescence Unit* - RFU), no Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC). O símbolo \* é referente a comparação entre o PEA e o PEO; # é referente a comparação entre o PEA e o PDC; & é referente a comparação entre o PEO e o PDC. \* # &  $p < 0,05$ , \*\* ## &&  $p < 0,01$ , \*\*\* ### &&&  $p < 0,0001$ . PEA vs PEO  $p < 0,01$ ; PEA vs PDC  $p < 0,01$ ; PEO vs PDC  $p < 0,01$ .



**Figura 13:** Razão da altura dos picos (do inglês *Peak Height Ratio* - PHR) heterozigotos no Protocolo de Extração Avançada (PEA) e no Protocolo de Extração Orgânica (PEO). O Protocolo de Desmineralização Completa (PDC) não apresentou amostras em que foram detectados marcadores com mais de 1 alelo e, portanto, não foi possível realizar o cálculo da razão da altura dos picos. O símbolo \* é referente a comparação entre o PEA e o PEO; # é referente a comparação entre o PEA e o PDC; & é referente a comparação entre o PEO e o PDC. \* # & p<0,05, \*\* ## && p<0,01, \*\*\* ### &&& p<0,0001. PEA vs PEO ns.



**Figura 14:** Número total de artefatos detectados no Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC). O símbolo \* é referente a comparação entre o PEA e o PEO; # é referente a comparação entre o PEA e o PDC; & é referente a comparação entre o PEO e o PDC. \* # &  $p < 0,05$ , \*\* ## &&  $p < 0,01$ , \*\*\* ### &&&  $p < 0,0001$ . PEA vs PEO  $p < 0,05$ ; PEA vs PDC  $p < 0,05$ ; PEO vs PDC  $p < 0,01$ .

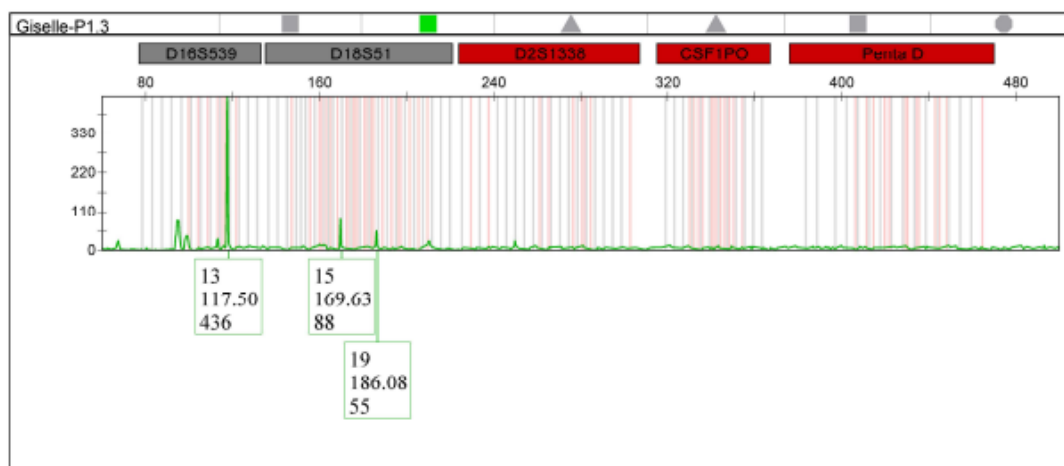
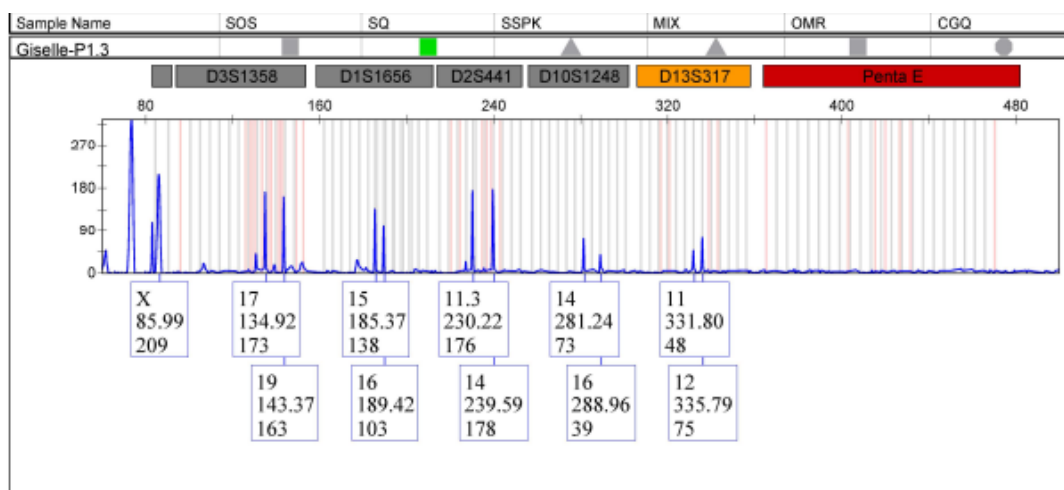
Além disso, foi possível calcular a média e desvio padrão após a avaliação das alterações dos tamanhos dos marcadores especificadamente dos 3 diferentes protocolos, que foram diferenciados através da quantidade de pares de bases (Quadro 6).

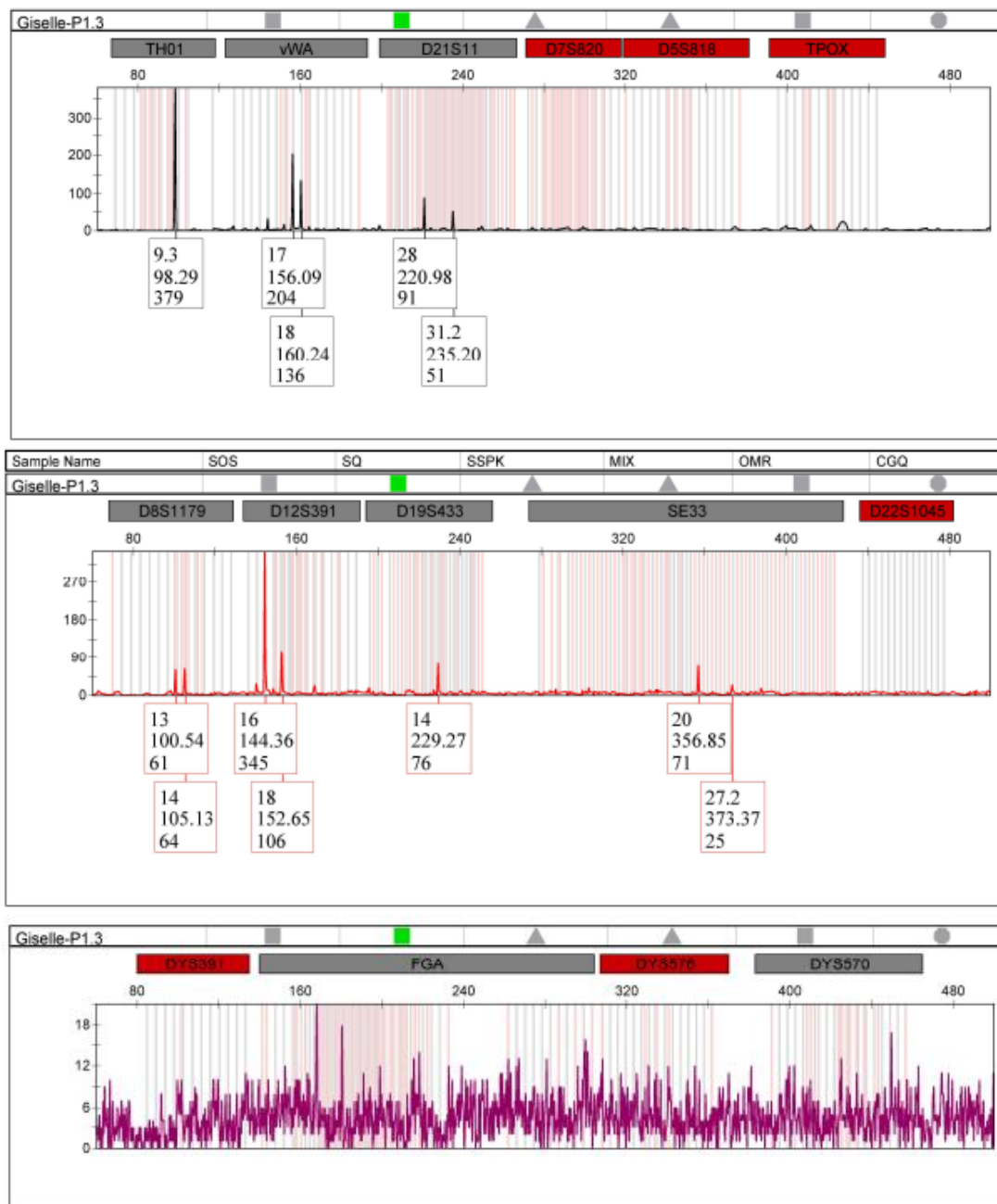
**Quadro 6:** Valores para comparação do tamanho dos marcadores que foram detectados no Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC).

TAMANHO DOS MARCADORES							
MARCADORES	ALELOS	PEA		PEO		PDC	
		MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Amelogenina	X	85,62	0,90	84,44	1,27	84,78	0,90
CSF1PO	10	-	-	339,15	0,08	339,08	0
D10S1248	14	281,18	0,13	281,22	0,12	-	-
	16	288,92	0,11	288,94	0,09		
D12S391	16	144,36	0,14	144,38	0,10	-	-
	18	152,69	0,11	152,67	0,10		
D13S317	11	331,72	0,11	331,81	0,09	-	-
	12	335,78	0,10	335,86	0,08		
D16S539	7,5	-	-	7,5	0	-	-
	13	117,53	0,30	117,48	0,11		
D18S51	15	169,64	0,09	169,65	0,10	-	-
	19	186,15	0,15	186,18	0,12		
D19S433	13	227,26	0	225,28	0,06	-	-
	14	229,24	0,07	229,27	0,07		
D1S1656	15	185,39	0,11	185,44	0,11	186,56	0
	16	189,39	0,10	189,49	0,09	-	-
D21S11	28	221,36	1,15	220,94	0,08	224,06	0
	31,2	235,04	0,18	235,12	0,11	-	-
D22S1045	16	-	-	464,93	0,08	-	-
D2S1338	16	249,61	0,07	249,64	0,13	-	-
D2S441	11,3	230,12	0,12	230,18	0,11	-	-
	14	239,55	0,11	239,60	0,12		
D3S1358	17	134,85	0,12	134,89	0,12	135,38	0
	19	143,37	0,12	143,63	0,58		
D5S818	10	-	-	340,19	0,07	-	-
	12	349,36	0,07	348,59	0,52		
D7S820	10	297,47	3,68	291,98	0,12	-	-
	12	299,24	0,06	299,84	0,54		
D8S1179	13	100,57	0,17	100,56	0,21	-	-
	14	105,10	0,25	105,12	0,12		
FGA	19	168,10	0,05	168,13	0,11	-	-

	22	180,54	0,08	180,62	0,05		
PENTA E	10	-	-	394,31	0,12	-	-
SE33	20	356,79	0	343,03	1,70	-	-
	27,2	373,37	0,01	373,34	0,06		
TH01	9,3	98,18	0,17	98,24	0,16	97,77	0,01
TPOX	5	399,41	0,01	399,45	0,06	399,45	0,06
	8	411,41	0,04	411,44	0,05	-	-
vWA	17	156,11	0,11	156,10	0,12	-	-
	18	160,22	0,10	160,22	0,11		

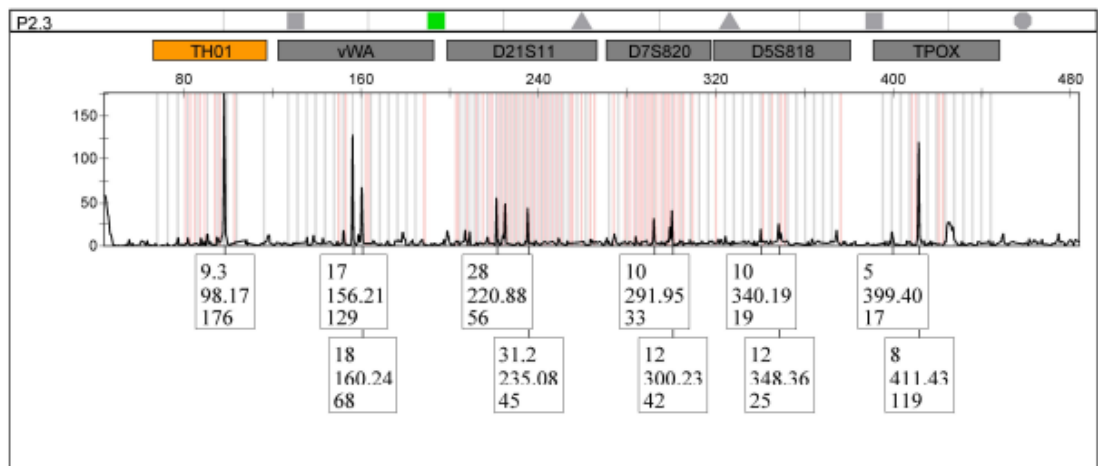
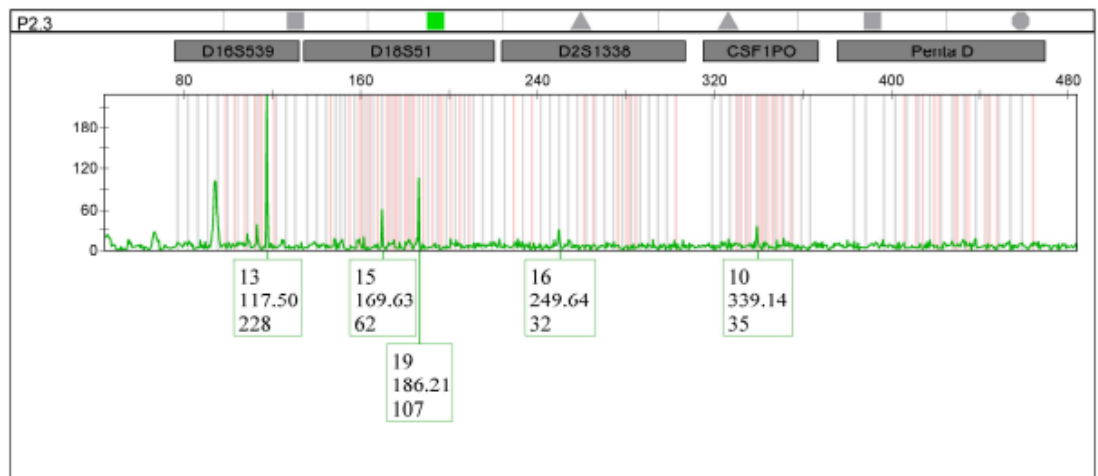
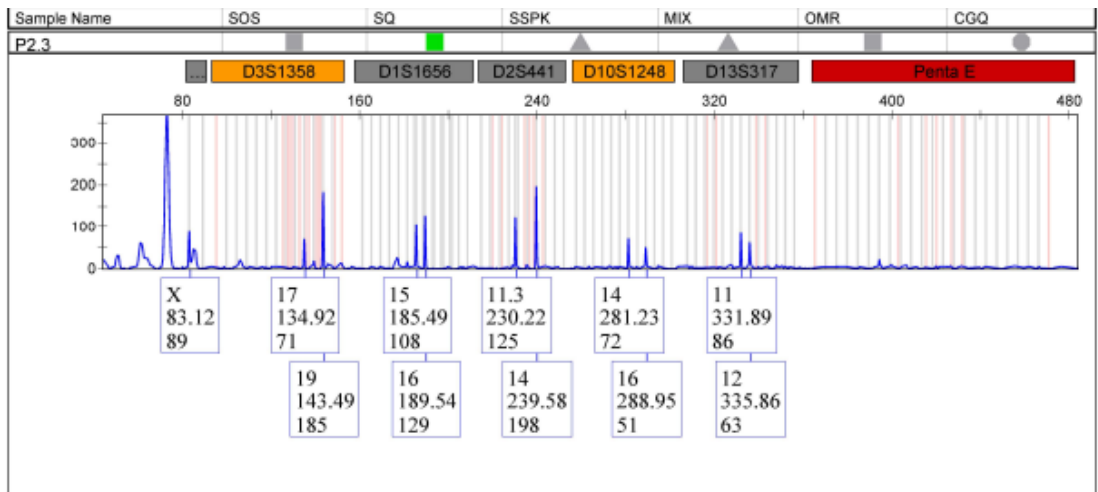
Os perfis genéticos representativos através do eletroferograma do Protocolo de Extração Avançada (PEA) (Figura 15); Protocolo de Extração Orgânica (PEO) (Figura 16); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC) (Figura 17) também foram obtidos.

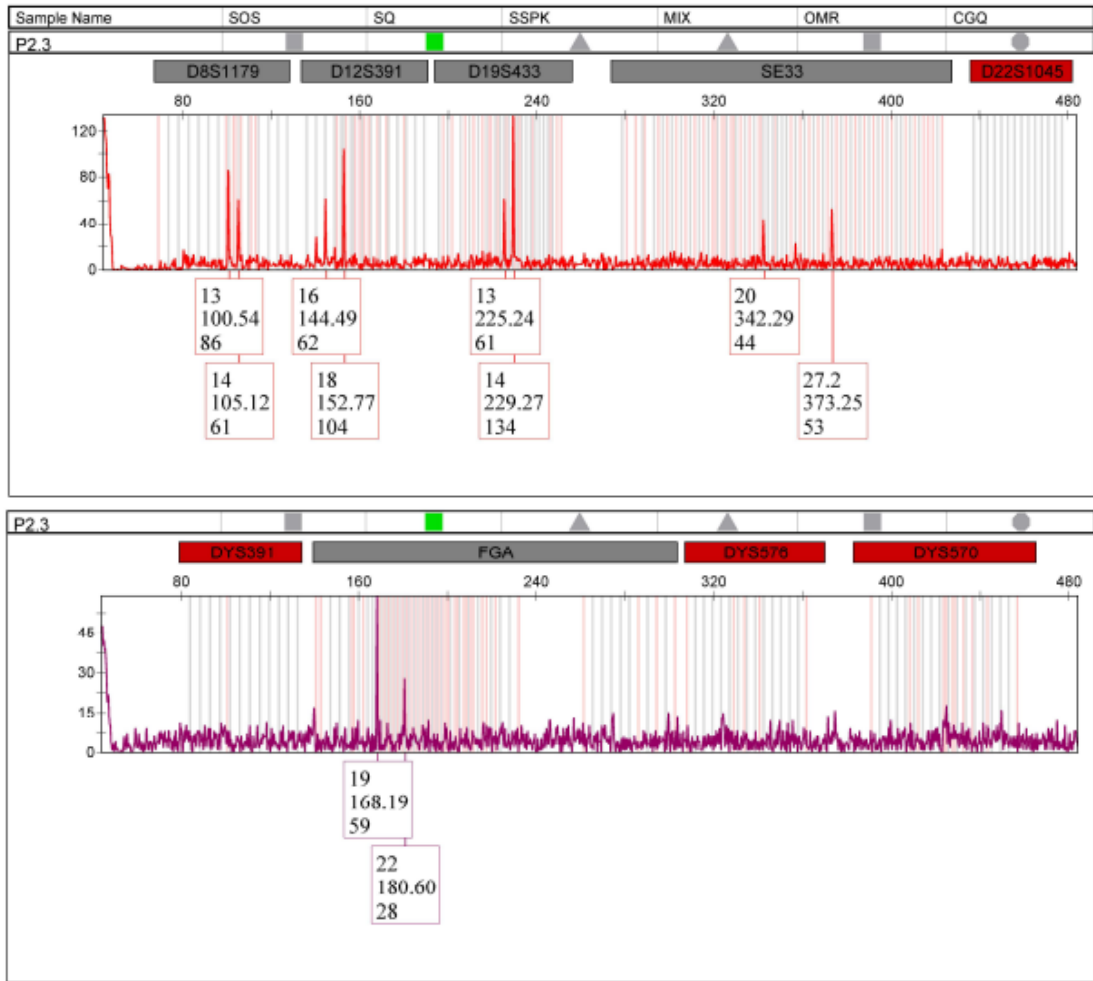




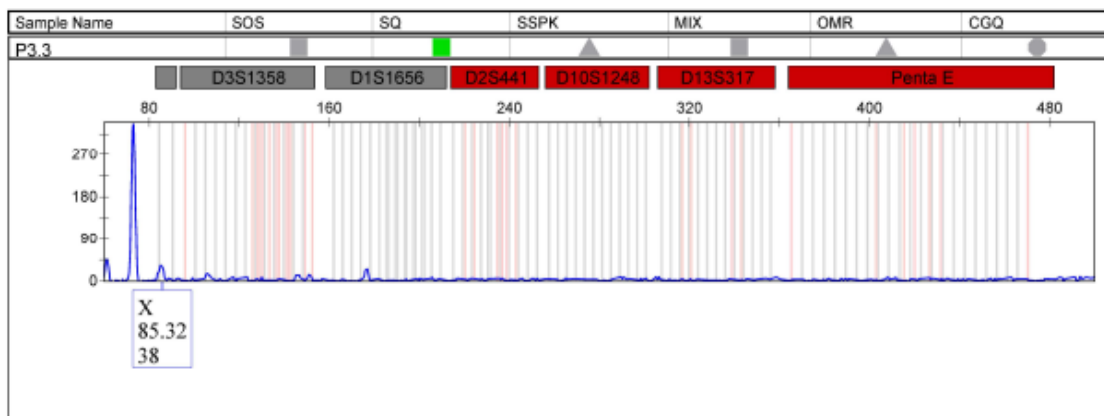
**Figura 15:** Perfil genético representativo obtido da amostra de tecido ósseo a partir do Protocolo de Extração Avançada (PEA). O programa Genemapper™ IDX fornece o eletroferograma que mostra a detecção dos 5 capilar do equipamento ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer, com canais de fluorescência em azul, verde, amarelo, vermelho e roxo. É possível avaliar no eixo vertical a altura dos picos em RFU e no eixo horizontal o(s) número(s) do(s) alelo(s) e o tamanho dos marcadores em pares de bases.

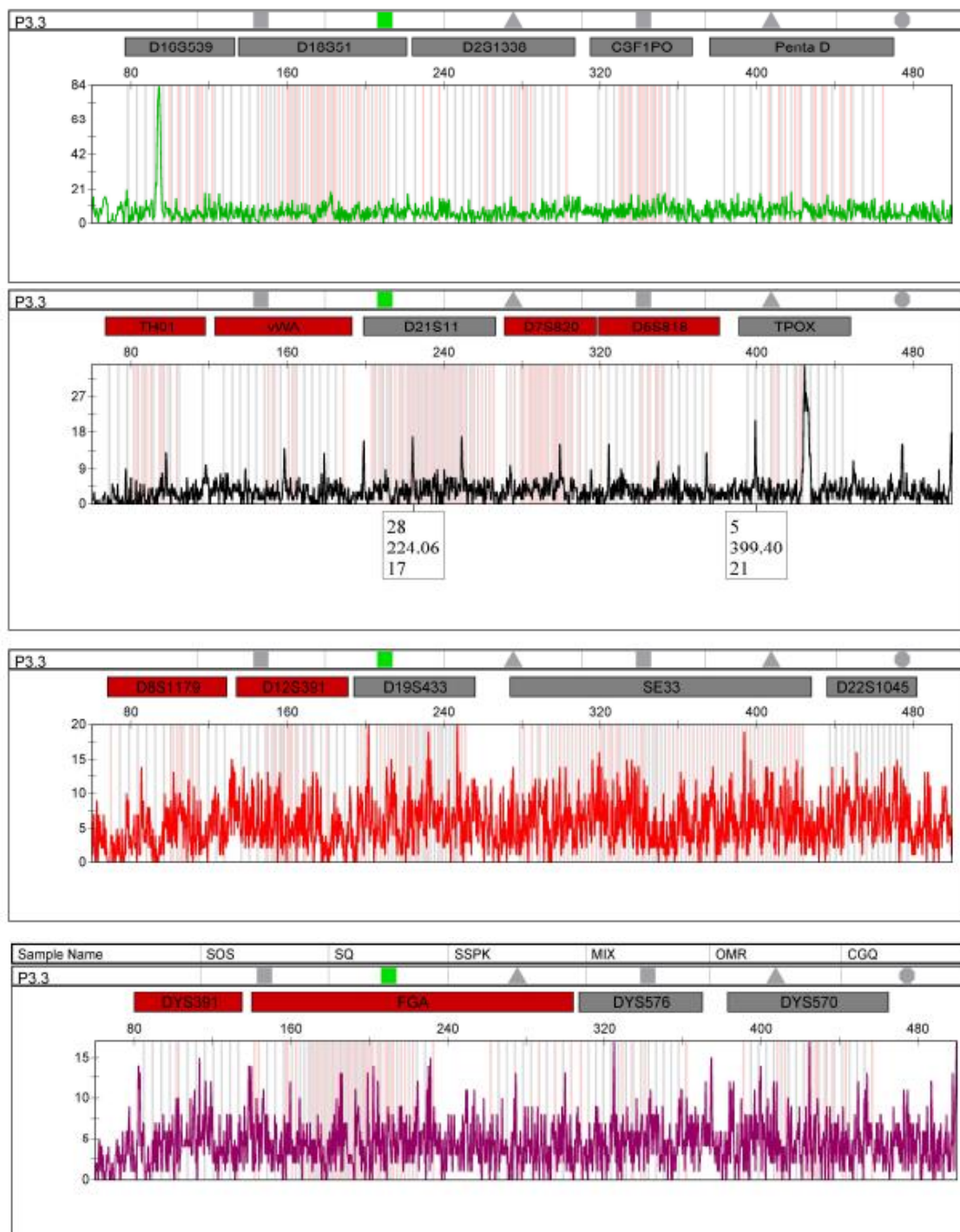






**Figura 16:** Perfil genético representativo obtido da amostra de tecido ósseo a partir do Protocolo de Extração Orgânica (PEO). O programa Genemapper™ IDX fornece o eletroferograma que mostra a detecção dos 5 capilar do equipamento ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer, com canais de fluorescência em azul, verde, amarelo, vermelho e roxo. É possível avaliar no eixo vertical a altura dos picos em RFU e no eixo horizontal o(s) número(s) do(s) alelo(s) e o tamanho dos marcadores em pares de bases.





**Figura 17:** Perfil genético representativo obtido da amostra de tecido ósseo a partir do Protocolo de Desmineralização Completa (PDC). O programa Genemapper™ IDX fornece o eletroferograma que mostra a detecção dos 5 capilar do equipamento ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer com canais de fluorescência em azul, verde, amarelo, vermelho e roxo. É possível avaliar no eixo vertical a altura dos picos em RFU e no eixo horizontal o(s) número(s) do(s) alelo(s) e o tamanho dos marcadores em pares de bases.

## 6. DISCUSSÃO

A primeira análise obtida após a extração das amostras é o resultado da espectrofotometria (Quadro 2). Sendo assim, resultados entre 1,8 e 2,0 indicam que a molécula de DNA se encontra pura, enquanto que valores abaixo de 1,5 indicam que há presença de proteínas ou outros resíduos junto a molécula de DNA (MASAGO et al, 2021; MANCHESTER et al, 1995). Portanto, foi possível observar que o Protocolo de Extração Avançada (PEA) apresentou o resultado para o grau de pureza 0,89, sendo assim, um indicativo de que a molécula de DNA não se encontra pura. Já o Protocolo de Extração Orgânica (PEO) e o Protocolo de Desmineralização Completa (PDC) apresentam um grau de pureza respectivamente 1,54 e 1,57, logo a molécula de DNA após essas extrações se apresentou mais pura quando comparada ao PEA. Resultado parecido foi avaliado em outro estudo que também utiliza uma extração similar ao PDC, e obtém um DNA puro e passível de análise utilizando o mesmo kit para a qPCR (ZENG et al, 2019). Em contra partida, diferentemente do que foi avaliado neste trabalho, já foi descrito na literatura que o PDC não fornece um DNA puro (JAKUBOWSKA et al, 2012). Além disso, foi possível avaliar que o PDC obteve uma concentração significativamente maior de ácidos nucleicos extraídos quando comparado ao PEA e PEO, similar aos dados encontrados por Loreille et al e Xavier et al (LOREILLE et al, 2007; XAVIER et al, 2021).

Após a realização do qPCR, foi visto que os CTs do alvo gênico para o IPC (Quadro 3) apresentam uma média <40 em todos os protocolos, indicando que a presença de inibidores não é significativa em nenhum dos protocolos. Entretanto, somente quando comparados o PEA com o PEO e o PDC podemos avaliar que a realização dos diferentes protocolos interferem significativamente no processo de extração de um material genético sem inibição para o qPCR. Visto que, nessas comparações houveram diferenças significativas, enquanto que na comparação somente dos PEO e o PDC não há. Portanto, um CT menor indica que há menor presença de inibidores, enquanto que CT maiores indica que a presença de inibidores é maior (KNIGHT et al, 2023). Dessa forma, após a análise estatística, foi avaliado que o PEO e o PDC apresentam uma inibição significativamente menor quando comparado ao PEA. Já havia sido descrito na literatura que a realização da extração de DNA de amostras de tecido ósseo com alto índice de inibidores, através do protocolo de desmineralização completa

especificamente, fornece uma eficiência para o preparo da molécula de DNA quantificável com pouca ou nenhuma inibição detectada (LOREILLE et al, 2007; ZENG et al, 2018).

Os resultados referentes ao índice de degradação (Quadro 4), demonstram que o todos os protocolo apresentam uma média de resultados entre 1 e 10, indicando que o DNA está levemente a moderadamente degradado, porém esse fato não seria suficiente para interferir na amplificação da PCR. Em especial, o índice de degradação do PEO apresentou resultados em que não foi possível mensurar a concentração do loci alvo *Large Autosomal* (LA), que visa o aprimoramento da sensibilidade da detecção da amplificação e sua mensuração. Esse fato, interferiu e limitou a realização do cálculo do índice de degradação para somente duas amostras, devido a aparição de dados outliers, sendo essa uma situação que envolve algumas das limitações desse trabalho.

Um fato que é relacionado ao cálculo do índice de degradação é a amplificação preferencial dos fragmentos de DNA menores, o que é perceptível nos três protocolos, já que há uma diminuição na altura e quantidades dos picos conforme ocorre um aumento no comprimento do fragmento de DNA em pares de bases. Betancor et al (2010) já havia sugerido que a realização da extração utilizando DNAzol gera a obtenção da molécula de DNA mais degradada quando comparado a outros métodos (BETANCOR et al, 2010), similar aos dados encontrados nesse trabalho,.

Quando se avalia casos de amostras com índices de degradação fora do intervalo considerável de um material não degradado, há a possibilidade da utilização de kits com marcadores miniSTRs. Esses marcadores apresentam iniciadores mais próximos da região STR, diminuindo a região de anelamento e gerando amplicons menores, normalmente apresentam de 60 a 200 pares de bases, enquanto que os kits com marcadores STR geram amplicons que apresentam de 100 a 450 pares de bases (WANG et al, 2018). Os miniSTRs foram desenvolvidos para aprimorar ainda mais as performances das amplificações de materiais que apresentam DNA altamente degradado, além de também melhorar a genotipagem das amostras que possuem presenças de inibidores da PCR (BOELENIS et al, 2021). Portanto, um meio alternativo para avaliar novamente o PEO seria a utilização de kits com marcadores miniSTR na qPCR, no intuito de aumentar a sensibilidade da análise dos resultados.

O kit de PCR em tempo real Quantifiler Trio Applied Biosystems™ desenvolve diversos mecanismos para que seja possível quantificar simultaneamente as concentrações de DNA amplificáveis contido nas amostras, mesmo que elas sejam ainda menores que 5 pg/ul. Entretanto, quando a amostra apresenta pouca quantidade de DNA, os efeitos estocásticos podem produzir variabilidade significativa nos resultados dos ensaios (APPLIED BIOSYSTEMS, 2017). Esse caso envolve o material avaliado nesse estudo, já que em algumas amostras houveram outliers, que foram retirados das análises, mas que, ainda assim, a ausência de dados influencia em alterações tanto no cálculo do índice de degradação, quanto na concentração. Putkonen et al (2010) demonstraram em seu trabalho, que a quantidade de DNA nuclear e a sua degradação foram os fatores mais importantes que afetaram o sucesso da PCR a partir de ossos mal conservados (PUTKONEN et al, 2010). Nessas condições, o indicado para solucionar essas variações é realizar uma nova extração ou concentrar as amostras e realizar a análise através do qPCR utilizando o kit Quantifiler Trio Applied Biosystems™ novamente. Além disso, é possível utilizar outro kit para análise de STR que visa permitir maior entrada de volume de DNA (APPLIED BIOSYSTEMS, 2017).

O osso processado e avaliado nesse estudo é caracterizado como uma amostra LCN, já que entre os três protocolos de extração de DNA a média das concentrações obtidas foram respectivamente para o protocolo PEA, PEO e PDC: 0,89 pg/ul; 5,93 pg/ul; 6,76 pg/ul. Sendo que, é possível ocorrer diferenças nos resultados das concentrações de DNA após a medição no espectrofotômetro e na amplificação por qPCR, já que na espectrofotometria ocorre a detecção de qualquer ácido nucléico que tenha sido extraído e esteja presente na amostra, como DNA ou RNA de contaminantes. Enquanto que na qPCR, ocorre uma amplificação específica de material genético somente do alvo contido no kit. Apesar desse fato, foi observado que o padrão de concentração se repetiu em ambas as análises, já que o PDC se manteve com maior quantidade significativa de material genético comparado aos demais protocolos. Resultado semelhante foi visto por Xavier et al (2021), em que a realização do PDC obteve um aumento geral de ganho de DNA quando utilizado quantidade suficiente de tecido ósseo (XAVIER et al, 2021).

Portanto, o DNA encontrado nessas amostras estão em baixas

quantidades, fato que justifica que enquanto em um protocolo há a falta de alguns alelos, em outro há a aparição de mais do que dois alelos por marcador. Apesar dessa amostra ser LCN, existem limites na quantidade de material a ser extraído e amplificado conforme o kit utilizado, visto que o PowerPlex Fusion 6C indica 1ng de amostra de DNA para realização de seu protocolo de PCR (PROMEGA, 2018). Dessa forma, o intuito de aumentar a quantidade de material extraído para aumentar a concentração de DNA a ser amplificado, não significa um resultado de amplificação com qualidade.

Uma possibilidade para facilitar as análises das amostras LCN é aumentar o número de ciclos da PCR, no intuito de aumentar a amplificação, já que mais cópias das moléculas de DNA serão geradas. Porém, é necessário ter cautela durante essa alteração, pois há a chance de acontecer *drop-in* e/ou *drop-out* de alelos, como também uma maior chance de contaminação (JIANG et al, 2020; BUTLER, 2009). Apesar dessa possibilidade, a probabilidade da aparição de alelos extras não excede 5%, de forma que quando se repete a reação da PCR a chance desse alelo *drop-in* aparecer mais de uma vez cai para 1% (SKENDERAGIC et al, 2021). Desse modo, acaba sendo necessário na rotina de trabalho com amostra LCN a necessidade de pelo menos duas ou três amplificações pela PCR do mesmo material para mais de uma análise na eletroforese capilar, no intuito de avaliar se realmente o aparecimento de um ou mais alelos extras estão presentes em pelo menos duas vezes dessas repetições (SKENDERAGIC et al, 2021; BUTLER, 2009).

Outras alternativas são a redução do volume da PCR para obtenção de um produto da PCR mais concentrado, e até a adição de mais produto amplificado na preparação da reação para a eletroforese. Além disso, existe a possibilidade de filtrar esse produto para remover íons que competem com os amplicons STR no momento da injeção no capilar, como também o uso de formamida que apresente uma menor condutividade, e/ou ainda, aumentado o tempo de injeção no instrumento da eletroforese capilar (SKENDERAGIC et al, 2021; BUTLER, 2009).

Um desafio a mais nessa análise, é a deleção de alguns alelos, sendo uma situação característica de um perfil com baixa concentrações de material genético, visto o desequilíbrio nos picos. Esse quadro ocorre especialmente nos marcadores genéticos heterozigotos, que acabam apresentando um sinal

alélico com baixo RFU e não atingem o limiar de detecção definido, podendo gerar falsos marcadores homozigotos ou ainda dificultando a análise de ocorrência de mutações devido a incerteza dos alelos verdadeiros (HADDRILL et al, 2021; GILL et al, 2015). Nessa situação, os sinais e os ruídos acabam não sendo possíveis de serem diferenciados e acontece a perda de informações importantes para a definição do perfil genético, situação que foi observada no PDC, em que todos os marcadores apresentaram somente um alelo, como mostra a figura 16.

Diferentemente dos resultados obtidos nesse trabalho, foi descrito na literatura que a realização de métodos que envolvam uma desmineralização completa (PDC) podem apresentar muito pouco drop-out de alelos (ZENG et al, 2018) e uma melhora na tipagem do DNA e na análise dos marcadores STR, quando comparado ao Protocolo de Extração Orgânica (PEO) (EDSON, 2019; JAKUBOWSKA et al, 2012; LOREILLE et al, 2007). Fato que se relaciona diretamente com o aumento do uso desse tipo de método nas rotinas das análises forenses, já que foi avaliado que entre 2016 e 2021 54% dos artigos publicados e que trabalham nessa linha de pesquisa aderiram esse protocolo em seus laboratórios (FINAUGHTY et al, 2023).

Em contra partida, semelhante ao que foi avaliado nesse projeto, outro estudo de comparação de métodos de extração que também analisa protocolos similares ao PEA e PDC, indica que o Protocolo de Extração Avançada (PEA) é mais efetivo no rendimento de DNA e na formação de alelos, do que o Protocolo de Desmineralização Completa (PDC) (PAGAN et al, 2011). Ainda na comparação entre o PEA e PDC, foi avaliado que a extração de DNA realizada a partir do PDC se mostrou mais eficaz, também utilizando o kit PowerPlex Fusion, em comparação ao PEA, porém utilizando outras amostras de tecidos ósseos, como ossos do crânio e dentes (EDSON, 2019). Além disso, já foi sugerido na literatura, que o método de desmineralização completa (PDC) seja mais indicado nos casos em que a degradação do DNA não seja crítica ou situações em que a preservação da amostra de tecido ósseo não seja um problema (XAVIER et al, 2021).

Ambos os protocolos fazem o uso de reagentes tóxicos, cancerígenos e perigosos para a saúde humana, tanto o fenol clorofórmio nos protocolos PEA e PDC, quanto o TRIzol no PEO. Portanto, é de extrema importância a



preocupação e o uso dos EPIs e fluxos apropriados nas áreas de trabalho com esses tipos de reagentes. Apesar do uso desses componentes tóxicos, foi avaliado que o método com fenol clorofórmico gera uma obtenção mais eficiente tanto na quantificação do DNA, quanto na geração do perfil genético, atingindo em média o maior número de alelos, quando comparado a outros métodos mais recentes, como coluna, suspensão em sílica e automatizados (HAARKOTTER et al, 2023).

Além disso, juntamente com a eficácia, outros pontos são relevantes para serem considerados durante a escolha e realização dos protocolos, como o tempo e o custo. Nesse estudo, o custo dos insumos não varia consideravelmente entre os três métodos de extração, sendo o TRIzol o reagente mais custoso. Já na questão do tempo gasto para a execução de cada método, é possível avaliar que o PEO é o mais longo, com 12 horas a mais do que os protocolos PEA e PDC. Sendo assim, considerando o valor e tempo gasto, o PEO se torna menos vantajoso em vista dos outros dois protocolos.

Portanto, existem diversos desafios enfrentados para definir um perfil genético de amostras críticas, como as oriundas de uma extração de DNA de tecidos ósseos, sendo avaliado por Haarkotter et al (2023) que na literatura há poucas publicações em que se comparam métodos de extração de DNA para restos humanos (HAARKOTTER et al, 2023). Outro estudo de revisão que apresenta em média 100 registros, sugere que não existe uma abordagem sistemática ou um consenso para esse tipo de pesquisa na comunidade forense, sobre quais métodos de extração de DNA apresentam melhor desempenho ou quais protocolos funcionam com tipos específicos de amostras. Pelo contrário, grande parte das análises consistem em tentativa e erro, no intuito de definir o que melhor funciona para cada uma das realidades de diferentes amostras e laboratórios (FINAUGHTY et al, 2023).

Apesar disso, o uso dos marcadores STRs tem a capacidade de amplificar os fragmentos longos ou curtos de DNA, pois os iniciadores apresentam grande chance de encontrar fitas intactadas para a amplificação. Além do que, a ocorrência de *drop-out* de alelos por amplificação preferencial pelo menor alelo é menos provável de acontecer, visto que em indivíduos heterozigotos ambos os alelos são semelhantes em tamanho (BUTLER et al, 2021). Sendo assim, os marcadores STRs apresentam grande potencial para análise de amostras com

material genético degradado, principalmente quando comparado aos antigos marcadores utilizados nas pesquisas forenses, pois são muito mais sensíveis do que as técnicas antigas, como sondas RFLP e marcadores VNTRs, e também muito mais discriminatórios. Logo, seja em amostras degradadas e/ou com baixa concentração de DNA, ou ainda com presença de inibidores, que acabam gerando análises de difícil execução, os marcadores STRs proporcionam um eletroferograma passível de análise e interpretação.

Dessa forma, resumidamente os resultados obtidos demonstraram que o Protocolo de Extração Avançada (PEA) apresentou um grau de pureza do DNA menor quando comparado aos outros protocolos. Porém, durante o qPCR foi possível avaliar que as amostras extraídas por este método apresentaram uma amplificação positiva, com baixa presença de inibidores e com um índice de degradação baixo, sendo um método de recuperação de DNA favorável para análise de perfil genético. Dessa forma, após a quantificação foi observado uma baixa concentração de DNA, porém, apesar dessa fato, houve a detecção dos alelos, da área (PHR) e altura dos picos, em RFU, nos padrões estabelecidos para uma preparação da molécula de DNA de alta qualidade. Além disso, o tamanho dos picos detectados comparados aos outros protocolos foram similares e não demonstraram valores distoantes. Por fim, foi possível observar que houve a presença de artefatos, porém nada que comprometesse a análise geral do perfil genético. Dessa forma, esse protocolo demonstrou uma preparação do DNA com uma boa qualidade e alto rendimento geral e, além disso, proporcionou a obtenção do perfil genético quase completo.

Enquanto que, os resultados obtidos a partir do Protocolo de Extração Orgânica (PEO) apresentaram um DNA puro e após a realização do qPCR, analisou-se que as amostras extraídas também apresentaram uma amplificação positiva, com baixa presença de inibidores. No entanto, apesar do cálculo do índice de degradação estar dentro do intervalo considerado como material genético ligeiramente a moderadamente degradado, a detecção de um dos alvos gênicos ficou comprometida em algumas amostras e ocorreu grande aparição de dados outliers. Além disso, a concentração de DNA, apesar de maior do que os resultados do protocolo PEA, ainda é baixa e com alto desvio padrão, caracterizando uma amostra LCN. Entretanto, houve uma maior detecção no número de alelos, além da área (PHR) e altura dos picos, em RFU, sendo dados

que caracterizam uma preparação do DNA de boa qualidade para análise do perfil genético. Foi possível avaliar que a solubilização completa do tecido com tiocianato de guanidina e fenol (Trizol®) tem efeito positivo para o rendimento da extração dessa molécula. Já o tamanho dos picos detectados comparados aos outros protocolos foram similares e não demonstraram valores distoantes. Por fim, houve maior presença de artefatos do que nos dados dos outros 2 protocolos, portanto, da mesma forma que ocorre uma maior detecção de alelos, esse fato abrange também maior detecção de artefatos, sendo assim, esse protocolo se demonstrou o mais informativo. Esse método de extração apresentou uma interferência na análise do parâmetro do índice de degradação e no desempenho do rendimento geral pela concentração da molécula de DNA, porém, apesar disso, foi o que proporcionou um perfil genético mais completo entre todos os protocolos.

Já os resultados obtidos a partir do Protocolo de Desmineralização Completa (PDC) apresentou, assim como o PEO na análise do grau de pureza, um DNA puro. Além disso, após o qPCR, da mesma forma que os outros protocolos, as amostras extraídas tiveram uma amplificação positiva, com baixa presença de inibidores e similar ao PEA, o índice de degradação foi baixo, demonstrando, até então, ser um método de recuperação de DNA favorável para análise do perfil genético. Além disso, a concentração de DNA, mesmo que maior quando comparada ao PEA, ainda é baixa, caracterizando uma amostra LCN. Entretanto, alguns dados distoaram totalmente dos outros 2 protocolos após a eletroforese capilar e durante a elaboração do eletroferograma, pois foi possível avaliar que a quantidade de alelos detectados foi extremamente baixa. Não somente, mas a altura dos alelos detectados, em RFU, foi mínima de forma que não foi possível realizar o cálculo da área dos picos, o que proporcionou a falta de dados para esse parâmetro. Devido a isso, o número de artefatos também foi baixo, já que esse método se demonstrou pouco informativo. O tamanho dos poucos picos que foram detectados e seus valores comparados aos outros protocolos foram similares e não demonstraram valores distoantes. Dessa forma, foi possível classificar que o método que envolve a desmineralização prévia do osso interfere no desempenho do rendimento geral, assim como na qualidade geral da extração da molécula de DNA, promovendo um perfil genético incompleto.

Os diferentes parâmetros avaliados possuem pesos distintos para as análises e considerações referentes a performance e eficiência de cada um dos protocolos. Entretanto, de forma resumida, os resultados foram assumidos com pesos semelhantes para um apanhado dos resultados obtidos, a fim de possibilitar uma comparação semiquantitativa entre os métodos de extração (Quadro 7).

**Quadro 7:** Resumo dos resultados de cada um dos parâmetros avaliados no Protocolo de Extração Avançada (PEA); Protocolo de Extração Orgânica (PEO); e Protocolo de Desmineralização Completa (PDC).

<b>RESUMO DOS RESULTADOS</b>			
	<b>Protocolo de Extração Avançada (PEA)</b>	<b>Protocolo de Extração Orgânica (PEO)</b>	<b>Protocolo de Desmineralização Completa (PDC)</b>
<b>Grau de Pureza</b>	+	++	++
<b>Presença de Inibidores</b>	+++	+++	+++
<b>Índice de Degradação</b>	++	+	++
<b>Concentração de DNA</b>	+	++	+++
<b>Nº de Alelos</b>	++	+++	+
<b>RFU</b>	+++	++	+
<b>PHR</b>	+++	+++	-
<b>Tamanho dos Alelos</b>	+++	+++	+++
<b>Perfil Sem Artefatos</b>	++	+	+++
<b>Rendimento geral do DNA</b>	+++	+++	+
<b>Qualidade geral do DNA</b>	+++	++	+
<b>Perfil Completo</b>	++	+++	+
<b>Tempo</b>	+++	++	+++
<b>Custo</b>	+++	++	+++

+ pouco satisfatório; ++ médio satisfatório; +++ satisfatório; - sem resultados.

## **7. CONCLUSÃO**

Portanto, após a execução e comparação da eficiência dos três diferentes protocolos de extração de DNA de ossada é possível determinar que o protocolo que melhor desenvolve um preparo do material genético a partir de tecido ósseo é o Protocolo de Extração Avançada (PEA). Devido ao fato, de que na maioria dos parâmetros avaliados ele se manteve com padrões de resultados eficazes nesse tipo de análise, com custo e tempo ideal e de simples execução, gerando um perfil genético completo, com alto rendimento e qualidade geral da molécula de DNA. Dessa forma, foi estabelecido o protocolo operacional padrão (POP) do protocolo de extração avançada (PEA) (Anexo I), para utilização no Laboratório de Biologia Forense do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abidullah Mohammed. "Triad of Cheiloscopy, Dactyloscopy, and Blood Groups: Does it Signify Anythin?". J Pharm Bioallied Sci. 15(1): S27-S30 (2023).

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. "Molecular Biology of the Cell". 5th edition: Garland Science (2007).

Applied Biosystems. "PowerPlex Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems Genetic Analyzers". Promega Corporation, Madison USA (2018).

Bernyck A, Cussion M and Kebede T. "Forensic DNA Analysis: Developments in Technology and Statistics to Complement Genetic Advancement". Voices of Forensic Science; (5): 81-96 (2021)

Betancor E, Fregel R, Suárez NM, Cabrera VM and Pestano J. "Na Efficient Method of Extracting DNA from Bona Remains from the Spanish Civil War – A Comparative Study of Two Methods: PrepFilter BTA and DNAzol". AB applied biosystems (2010).

Boavida A, Bogas V, Sampaio L, Gouveia N, Porto MJ and Corte-Real F. "Powerplex fusion 6C system: internal validation study." Forensic Sci Res; 3(2): 130-137 (2018).

Boelens D, Mariot R F, Ghemrawi M, Kloosterman A D and McCord B R. "The development of miniSRTs as a method for high-speeds direct PCR". Electrophoresis; 42(12-13):1352-1361 (2021).

Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW. "Construction of a Genetic Linkage Map in Men Using Restriction Fragment Length Polymorphisms". Am J Hum Genet; 32: 314-331 (1980).

Bowyer VL. "Real-time PCR." Forensic Sci Med Pathol; 3(1):61-3 (2007).

Bukyya JL, Tejasvi MLA, Avinash A, Chanchala HP, Talwade P, Afroz MM, Pokala A, Neela PK, Shyamilee TK and Srisha V. "DNA Profiling in Forensic Science: A Review." Glob Med Genet; 8(4): 135-143 (2021).

Butler JM. "Recent advances in forensic in forensic biology and forensic DNA typing: INTERPOL review 1029-2022." National Institute of Standards and Technology: Synergy 6 (2023).

Butler JM, Lyer Hari, Press Rich, Taylor K. Melissa, Vallone M. Peter and Willis Sheila. "DNA Mixture Interpretation: A NIST Scientific Foundation Review". National Institute of Standards and Technology – U.S. Departmente of Commerce; NISTIR 8351-DRAFT (2021).

Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. Estados Unidos: Elsevier (2005).

Butler JM. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Estados Unidos: Elsevier (2009).

Butler JM. Advanced Topic in Forensic DNA Typing: Interpretation. San Diego; Elsevir (2015).

Butler JM. "Introduction to Low Copy Number (LNC) DNA Testing Issues". MAAFS LNC Workshop (2006).

Cowell RG. "Computation of marginal distributions of peak-heights in electropherograms for analysing single source and mixture STR DNA samples". Forensic Sci Int Genet; 35:164-168 (2018).

Edson SM. "Extraction of DNA from Skeletonized Postcranial Remains: A Discussion of Protocols and Testing Modalities." Journal of Forensic Sciences (2019).

Edson SM. "Getting Ahead: Extraction of DNA from Skeletonized Cranial Material and Teeth." Journal of Forensic Sciences (2019).

Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parson TJ, Barritt SM. "Naming the dead - Confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains". Forensic Sci. Rev.; 16: 63–90 (2004).

Filho CRD, Rodrigues EL, Malaghini M, Francez PAC, Garrido RG, et al. "Introdução à Genética Forense". Millennium Editora (2020).

Finaughty C, Laura J Heathfield, Victoria K and Nicholas MG. "Forensic DNA extraction methods for human hard tissue: A systematic literature review and meta-analysis of technologies and sample type." Forensic Science International: Genetics; 63: 102818 (2023).

Gill P, Haned Hinda, Bleka Oyvind, Hansson Oskar, Dorum Guro and Egeland Thore. "Genotyping and interpretation of STR-DNA: Low-template, mixtures and database matches – Twenty years of research and development". *Forensic Science International Genetics*; 18:P100-117 (2015).

Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC and Carrol SB. "Introduction to genetic analysis". 9th edition: W. H. Freeman and Company (2007).

Haddrill PR. "Developments in forensic DNA analysis". *Emerging Topics in Life Sciences*; 5:381-393 (2021).

Haarkutter C, Xiomara Gálvez, Diana C Vinueza-Espinosa, Maria I Medina-Lozano, María Saiz, José A Lorente eand Juan C Álvarez. "A comparision of five DNA extraction methods from degraded human skeletal remains." *Forensic Science International*; 348: 111730 (2023).

Higuchi R et al. "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." *Biotechnology*; 10:413-417 (1992).

Hofreiter M, Jiri S, Martin P and Daniel V. "Progress in forensic bone DNA analysis: Lessons learned from ancient DNA". *Forensic Science Internacional: Genetics*; 54 (2021).

Hong T, Lin Qiu, Shuwen Zhou, Zhiqiang Cai, Pengfei Cui, Ronghui Zheng, Jianhao Wang, Songwen Tan and Pengju Jiang. "How does DNA 'meet' capillary-based microsystems?". *Royal Society of Chemistry* (2020).

Irena ZP. "Extraction of DNA from Human Skeletal Material". *Forensic DNA Typing Protocols, Methods in Molecular Biology*; 1420: 89-108 (2016).

Jakubowska J, Agnieszka M and Ryszard P. "Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation". *Int J Legal Med*; 126:173-178 (2012).

Jeffreys AJ, Wilson V and Thein SL. "Individual-specific 'fingerprints' of human DNA". *Nature*; 316: 76–79 (1985).

Jiang E, Siyi Zhang and Hao Pang. "Genotyping genetic markers from LNC and degraded DNA by HRM and their application in hair shaft". *International Journal of Legal Medicine*; 134(1):31-37 (2020).

Kimpton C, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J and Gill P. "Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci". *International Journal of Legal Medicine*;



106(6):302-11 (1994).

Knight KL, Mauriello A, Williams G. "Quantitation of DNA Using the Applied Biosystems Quantifiler Trio DNA Quantification Kit". *Methods Mol Biol*; 2685:175-188 (2023).

Kowalczyk M et al. "Molecular markers used in forensic genetics". *Medicine, Science and the Law*; 1-9 (2018).

Krebs JE, Goldstein ES and Kilpatrick ST. "Lewin's Genes XII". Jones&Bartleet Publishers: 12th edition (2017).

Locard D Edmond. *Manuel de techniques policière*. Paris: Payot (1923).

Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD and Parsons TJ. "High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization". *Forensic Science International*; 1-5 (2007).

Manchester KL. "Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids". *BioTechniques*; 19:208-211 (1995).

Manzini BM, Machado LMR, Noritomi PY, Silva JVL. "Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review". *Journal of Biosciences*; 46:17 (2021).

Masago K, Shiro Fujita, Yuko Oya, Yusuke Takahashi, Hirokazu Matsushita, Eiichi Sasaki and Hiroaki Kuroda. "Comparasion between Fluorimetry (Qubit) and Spectrophotometry (NanoDrop) in the Quantification of DNA and RNA Extracted from Frozen and FFPE Tissues from Lung Cancer Patients: A Real-World Use of Genomic Tests". *Medicina (MDPI)*; 17:57(12):1375 (2021).

McCaughan C and Lenz KA. "DNA Amplification Using Promega's PowerPlex Fusion Systems (5C and 6C)." *Methods Mol Biol*; 2685: 207-226 (2023).

Mckinnon M and Higgins D. "Comparision of bone demineralisation procedures for DNA recovery from burned remains". *Forensic Science International: Genetics*; 51 (2021).

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H. "Specific enzymatic

amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.” Cold Spring Harb Symp Quant Biol: 1:253-73 (1986).

Nakamura Y et al. “Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping”. Science; 235: 1616-1622 (1987).

Pagan F, Cindy L, Mojca K and Dennis MN. “Comparison of DNA extraction methods for identification of human remains”. Australian Journal of Forensic Sciences; 44(2): 117-127 (2011).

Pena LS. “Frequência Alélica de 14 locos do cromossomo X de indivíduos da região sul do Brasil”. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências Médias – UFGRS (2010).

Phua CH, Thitika Kitpipit, Jintana Pradutkanchana, Porsawan Duangsuwan, Wirachai Samai, Phuvadol Thanakiatkrai. “Direct STR typing from human bones”. Forensic Science International; 330:111099 (2022).

Putkonen MT, Palo JU, Cano JM, Hedman M, Sajantila A. “Factors affecting the STR amplification success in Pooled preserved bone samples. Investigative Genetics; 1:1-7 (2010).

Ramel C. “Mini and Microsatellites”. Environmental Health Perspectives; 105(4): 781-789 (1997).

Saad R. “Discovery, development, and current applications of DNA identity testing”. BUMC Proceedings; 8: 130-133 (2005).

Sheth N, Harish Swaminathan, Amanda J. Gonzalez, Ken R. Duffy, Catherine M. Grgicak. “Towards developing forensically relevant single-cell pipelines by incorporating direct-to-PCR extraction: compatibility, signal quality, and allele detection.” Int J Legal Med; 135(3):727-738 (2021).

Shewale JG, Qi L, Calandro LM. “Principles, Practice, and Evolution of Capillary Electrophoresis as a Tool for Forensic DNA Analysis.” Forensic Sci Rev;

24(2):79-100 (2012).

Silva RF, Sasso GRS, Cerri ES, Simões MJ and Cerri PS. "Biology of Bone Tissue: Structure, Function and Factors That Influence Bone Cells". *BioMed Research International*; 1-17 (2015).

Siriboonpiputtana T, Rinthachai T, Shotivaranon J, Peonim V and Rerkamnuaychoke B. "Forensic genetic analysis of bone remain samples". *Forensic Science International*; 284: 167-175 (2018).

Smajlović-Skenderagić L, Idrizbegović S, Brkanić L, Bilić A, Huel R and Parsons TJ. "Challenges with co-amplification of microbial DNA in interpretation of STR profiles obtained from human skeletal remains". *Forensic Science International: Genetics*; 51:102452 (2021).

Sopran J and Bonfim FRC. "The Use of Epigenetic Markers in the Forensic Area". *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics*; 8(2): 43-60 (2019).

Taylor D, John Buckleton and Jo-Anne Bright. "Factors affecting peak height variability for short tandem repeat data". *Forensic Sci Int Genet*; 21:126-33 (2016).

Wang X, Chen W Z, Zhang J, Li J H, Sun Y P, Shi Y J, Zhang L, Chen L L, Zhou X and Zhou R H. "Application of mini STR Loci and Its Detection System for Degraded Materials in Forensic Medicine". *Journal of Forensic Medicine*; 34(5):532-537 (2018).

Word CJ. "Peak Height Ratios". 21st International Symposium on Human Identification - Mixture Interpretation Workshop: Principles, Protocols, and Practice; Module 6 (2010).

Xavier C, Eduardoff M, Bertoglio B, Amory C, Berger C, Casas-Vargas A, Pallua J and Parson W. "Evaluation of DNA Extraction Methods Developed for Forensic and Ancient DNA Applications Using Bone Samples of Different Age". *Gene*;


12(146) (2021).

Zeng X, Kyleen E, Carrie M, Maiko T, Jonathan LK, David G, Bruce B and Sheree HS. "Assessment of impact of DNA extraction methods on analysis of human remain samples on massively parallel sequencing success." *International Journal of Legal Medicine*; 133: 51-58 (2018).

Zhu H, Haoqing Zhang, Ying Xu, Sona L, Marie K and Pavel N. "PCR past, presente and future". *BioTechniques*; 69(4): 1-9 (2020).

## ANEXO 1

### PROTOCOLO OPERACIONAL PADRÃO (POP): PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO AVANÇADA

	Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo: <i>Protocolo para extração de DNA de tecido ósseo</i>		
Objetivo Estratégico: <i>Realização de um protocolo de extração de DNA de ossada que determine uma preparação dessa molécula de alta qualidade</i>		
Campo de aplicação: <i>Laboratório de Biologia Forense da Universidade Federal do Rio de Janeiro</i>		
Unidade responsável:	Versão:	Número de páginas:
<i>Laboratório de Biologia Forense</i>	<i>1</i>	<i>1/6</i>

#### 1- OBJETIVO

Descrever as orientações e recomendações para a realização da extração de DNA de tecidos ósseos a partir do Protocolo de Extração Avançada.

#### 2- APLICAÇÃO

Este POP aplica-se ao Laboratório de Biologia Forense do Instituto de Biologia – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.


#### 3- PALAVRAS-CHAVE

Extração de DNA; Tecido Ósseo; Identificação Forense; STR; PCR

#### 4- DICIONÁRIO DE TERMOS E SIGLAS

Termo/Sigla	Significado
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminico Tetra-Acético
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	Do inglês <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RFU	Do inglês <i>Relative Fluorescent Units</i>
SDS	Do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
STR	Do inglês <i>Short Tandem Repeats</i>

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
<i>Giselle Lindolfo Affonso Evangelho</i>	<i>Rodrigo Soares de Moura Neto</i>	<i>10/07/2023</i>

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
<i>Protocolo para extração de DNA de tecido ósseo</i>			
Objetivo Estratégico:			
<i>Realização de um protocolo de extração de DNA de ossada que determine uma preparação dessa molécula de alta qualidade</i>			
Campo de aplicação:			
<i>Laboratório de Biologia Forense da Universidade Federal do Rio de Janeiro</i>			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
<i>Laboratório de Biologia Forense</i>		<i>1</i>	<i>2/6</i>


## 5- RESULTADO FINAL DO PROCESSO

O resultado final do processo envolve a extração do DNA de tecido ósseo a partir do Protocolo de Extração Avançada, que apresenta uma preparação em alta qualidade da molécula de DNA. Sendo assim, é obtido uma extração ideal, com simples execução e baixo custo ao laboratório, sendo eficiente na amplificação dos marcadores genéticos alvos nessa análise, os STRs.

## 6- PARÂMETROS PARA MEDIÇÃO DO DESEMPENHO DO PROCESSO

Os parâmetros aferidos para a medição do desempenho do Protocolo de Extração Avançada envolvem a massa de DNA por grama de tecido ósseo preparado, para a análise do rendimento de grau de pureza, e quantidade de DNA amplificado por massa de DNA adicionado. Essa segunda avaliação é possível através dos parâmetros da concentração do DNA obtidos pela quantificação das amostras de tecidos ósseos, através da técnica de PCR em tempo real (qPCR), para a análise da presença de inibidores e do índice de degradação. Além disso, também há a avaliação da amplificação dos marcadores moleculares STRs, durante a técnica de PCR, seguida pela Eletroforese Capilar, que gera a quantidade de fluorescência incorporada, medida em RFU. Portanto, a partir desse resultado, é possível observar o desempenho do método de extração avançada através do número total de alelos detectados, a altura dos alelos detectados, a razão da altura dos picos dos alelos detectados, o tamanho dos alelos detectados e o número total de artefatos detectados.


Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
<i>Giselle Lindolfo Affonso Evangelho</i>	<i>Rodrigo Soares de Moura Neto</i>	<i>10/07/2023</i>

		<b>Universidade Federal do Rio de Janeiro</b> <b>Procedimento Operacional Padrão (POP)</b>	
<b>Nome do Processo:</b>			
<i>Protocolo para extração de DNA de tecido ósseo</i>			
<b>Objetivo Estratégico:</b>			
<i>Realização de um protocolo de extração de DNA de ossada que determine uma preparação dessa molécula de alta qualidade</i>			
<b>Campo de aplicação:</b>			
<i>Laboratório de Biologia Forense da Universidade Federal do Rio de Janeiro</i>			
<b>Unidade responsável:</b>		<b>Versão:</b>	<b>Número de páginas:</b>
<i>Laboratório de Biologia Forense</i>		<i>1</i>	<i>3/6</i>

## 7- PROCEDIMENTOS

<b>PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO AVANÇADA</b>	
<b>ETAPA 1</b>	<b>Uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) necessários: jaleco, luvas e óculos de proteção</b>
<b>ETAPA 2</b>	<b>Preparação do tecido ósseo</b>
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lavar a fração do osso que será utilizada com água e esponja de aço, esfregando a superfície externa para limpeza de impurezas. Realizar a última lavagem com água Milli-Q.</li> <li>2. Lixar o osso com auxílio da microretífica Dremel 300. Retirar aproximadamente 1 mm da camada externa desse material, que ficará branco e liso. Fazer duas canaletas paralelas, de 2 cm de altura e 8 cm de comprimento, que facilitará o corte transversal.</li> <li>3. Cortar em 4 pequenos pedaços a canaleta já delimitada, em média 2 cm de altura e 2 cm de comprimento e lixar a face interna para limpeza das trabéculas ósseas.</li> <li>4. Pulverizar as amostras através do equipamento SPEX Sample Prep 6750 Freezer Mill (Metuchen, New Jersey, EUA).</li> <li>5. Dividir 4 g de pó de osso em 20 alíquotas de 200 mg, destinando 5 alíquotas para cada um dos 3 diferentes protocolos de extração de DNA de ossada e mais 5 amostras como reserva técnica.</li> <li>6. Armazenar as amostras a 4º C por até 12 meses.</li> </ol>
<b>ETAPA 3</b>	<b>Solubilização, extração e purificação da molécula de DNA</b>
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Em cada um dos 5 microtubos, contendo ~200 mg de pó de osso, adicionar 600 µL de tampão de lise 1 (10 mM de Tris pH 8, 100 mM de NaOAc, 50 mM de EDTA pH 8 e 0,5% de SDS).</li> <li>2. Adicionar 20 µL de 20 mg/mL de proteinase K.</li> <li>3. Manter por 48h a 56ºC em agitação (1000 xg) intermitente.</li> </ol>


<b>Elaborado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>	<b>Data aprovação:</b>
<i>Giselle Lindolfo Affonso Evangelio</i>	<i>Rodrigo Soares de Moura Neto</i>	<i>10/07/2023</i>

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
<i>Protocolo para extração de DNA de tecido ósseo</i>			
Objetivo Estratégico:			
<i>Realização de um protocolo de extração de DNA de ossada que determine uma preparação dessa molécula de alta qualidade</i>			
Campo de aplicação:			
<i>Laboratório de Biologia Forense da Universidade Federal do Rio de Janeiro</i>			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
<i>Laboratório de Biologia Forense</i>		<i>1</i>	<i>4/6</i>

<b>ETAPA 4</b>	<b>Extração e purificação do DNA</b>
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Centrifugar as amostras por 15 minutos a 5000 xg.</li> <li>2. Transferir o sobrenadante para novos microtubos.</li> <li>3. Adicionar a amostra um volume equivalente de fenol e clorofórmio (25:24) em cada microtubo.</li> <li>4. Misturar de 3 minutos.</li> <li>5. Centrifugar as amostras por 10 minutos a 5000 xg e transferir a fase aquosa para um novo microtubo.</li> </ol> <p>OBS: As amostras podem ficar guardadas até 1 semana a 4°C.</p>
<b>ETAPA 5</b>	<b>Concentração do DNA</b>
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Concentrar, através do tubo micro concentrador Microcon 100, até 500 µL da fase aquosa. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 xg.</li> <li>2. Lavar a membrana 3 vezes com 250µL de água Milli-Q. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 xg.</li> <li>3. Eluir em 15 µl água Milli-Q o DNA de cada amostra. Centrifugar o tubo micro concentrador de forma invertida por 5 minutos a 1.000 xg.</li> <li>4. Guardar as amostras a -20°C para as futuras análises.</li> </ol>

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
<i>Giselle Lindolfo Affonso Evangelio</i>	<i>Rodriqo Soares de Moura Neto</i>	<i>10/07/2023</i>

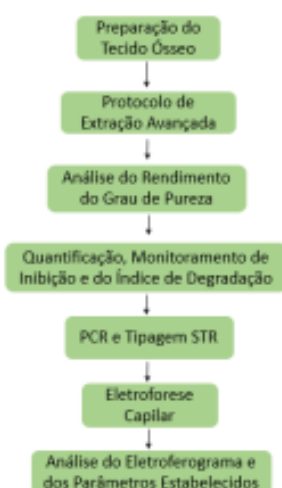


		<b>Universidade Federal do Rio de Janeiro</b> <b>Procedimento Operacional Padrão (POP)</b>
<b>Nome do Processo:</b>		
<i>Protocolo para extração de DNA de tecido ósseo</i>		
<b>Objetivo Estratégico:</b>		
<i>Realização de um protocolo de extração de DNA de ossada que determine uma preparação dessa molécula de alta qualidade</i>		
<b>Campo de aplicação:</b>		
<i>Laboratório de Biologia Forense da Universidade Federal do Rio de Janeiro</i>		
<b>Unidade responsável:</b>	<b>Versão:</b>	<b>Número de páginas:</b>
<i>Laboratório de Biologia Forense</i>	<i>1</i>	<i>5/6</i>


## 8- CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

O nível de biossegurança biológica adequado para o laboratório que trabalha com esse tipo de amostra óssea humana é nível 1 (NB - 1), já que esse grau de contenção é o ideal para laboratórios que não envolvem agentes com algum potencial de risco para a equipe e nem para o meio ambiente. Dessa forma, são necessárias boas práticas laboratoriais, como a paramentação adequada de cada sala, através do uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), treinamento e supervisão dos iniciantes na equipe, cuidados na manipulação e no descarte das soluções e dos reagentes, e um planejamento espacial e organizacional adequado as necessidades do laboratório.

## 9- FLUXOGRAMA



<b>Elaborado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>	<b>Data aprovação:</b>
<i>Giselle Lindolfo Affonso Evangelho</i>	<i>Rodrigo Soares de Moura Neto</i>	<i>10/07/2023</i>

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
<b>Nome do Processo:</b>			
<i>Protocolo para extração de DNA de tecido ósseo</i>			
<b>Objetivo Estratégico:</b>			
<i>Realização de um protocolo de extração de DNA de ossada que determine uma preparação dessa molécula de alta qualidade</i>			
<b>Campo de aplicação:</b>			
<i>Laboratório de Biologia Forense da Universidade Federal do Rio de Janeiro</i>			
<b>Unidade responsável:</b>		<b>Versão:</b>	<b>Número de páginas:</b>
<i>Laboratório de Biologia Forense</i>		<i>1</i>	<i>6/6</i>

### 10- DOCUMENTO DE REFERÊNCIA

Referência	Descrição
Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parson TJ, Barritt SM. "Naming the dead -Confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains". Forensic Sci. Rev.; 16: 63–90 (2004).	Método de preparo da molécula de DNA para uma extração avançada do tecido ósseo.

### 11- CONTROLE DAS ALTERAÇÕES

Nº da versão	Data	Tipo de alteração	Itens revisados	Responsável pela revisão
1	10/07/2023	Elaboração inicial	Todos os itens	Giselle Lindolfo Affonso Evangelio

### 12- CONTROLE DE APROVAÇÃO PARA USO

Data da aprovação	Nome do responsável pela aprovação	Unidade/subunidade aprovadora:
10/07/2023	Rodrigo Soares de Moura Neto	Instituto de Biologia

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
<i>Giselle Lindolfo Affonso Evangelio</i>	<i>Rodrigo Soares de Moura Neto</i>	<i>10/07/2023</i>

## ANEXO 2

### QUADRO DE RESULTADOS

**Quadro 1:** Número total de alelos detectados no Protocolo de Extração Avançada (P1); Protocolo de Extração Orgânica (P2); e Protocolo de Desmineralização Completa (P3).

PROTOCOLOS	ALELOS			Média por protocolo	Desvio Padrão por protocolo
	1	2	3		
P1	17,6	17,2	17,4	17,4	0,2
P2	21,4	22,8	23,2	22,47	0,95
P3	3	2,2	3,2	2,80	0,53

**Quadro 2:** Altura dos alelos detectados medida pela Unidade de Fluorescência Relativa (do inglês *Relative Fluorescence Unit* - RFU), no Protocolo de Extração Avançada (P1); Protocolo de Extração Orgânica (P2); e Protocolo de Desmineralização Completa (P3).

PROTOCOLOS	RFU			Média por protocolo	Desvio Padrão por protocolo
	1	2	3		
P1	68,27	71,87	72,05	70,73	2,13
P2	58,65	55,04	51,46	55,05	3,60
P3	22,87	26,27	29,93	26,36	3,53

**Quadro 3:** Razão da altura dos picos (do inglês *Peak Height Ratio* (PHR)) heterozigotos no Protocolo de Extração Avançada (P1) e no Protocolo de Extração Orgânica (P2). O Protocolo de Desmineralização Completa (P3) não apresentou amostras em que foram detectados marcadores com mais de 1 alelo e, portanto, não foi possível realizar o cálculo da razão da altura dos picos.

PROTOCOLOS	PHR			Média por protocolo	Desvio Padrão por protocolo
	1	2	3		
P1	65,75	68,13	66,57	66,82	1,21
P2	63,33	58,87	64,66	62,29	3,03
P3	-	-	-	-	-

**Quadro 4:** Número total de artefatos detectados no Protocolo de Extração Avançada (P1); Protocolo de Extração Orgânica (P2); e Protocolo de Desmineralização Completa (P3).

PROTOCOLOS	ARTEFATOS			Média por protocolo	Desvio Padrão por protocolo
	1	2	3		
P1	2,8	2,8	3	2,87	0,12
P2	5,4	5,2	3,4	4,67	1,10
P3	0,4	0,4	1	0,60	0,35

## ANEXO 3

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDOS ÓSSEOS

**Pesquisador:** GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 50336821.7.0000.5257

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.195.105

##### Apresentação do Projeto:

Protocolo 192-21. Respostas recebidas em 16/10/2021.

As informações colocadas nos campos denominados "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1768816.pdf", postado em 16/10/2021

##### Introdução

Nos mais diversos países ao redor do mundo o propósito das investigações das autoridades policiais é, principalmente, definir a identidade daqueles indivíduos responsáveis por cometer crimes, sendo esse objetivo cada vez mais alcançado com a ajuda e avanço da ciência. Durante o processo de investigação, a ciência forense ajuda a reconstruir o decorrer dos fatos envolvidos quando um crime foi cometido, através de vestígios e indícios encontrados nos locais de crimes que podem ser comparados com material colhido de suspeitos, resultando em um laudo que será

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 5.195.105

apresentado e julgado no tribunal (KOWALCZYK, 2018). Há muitos anos a área da medicina forense e criminalística vem buscando e fazendo uso de novas tecnologias e métodos, tornando a ciência forense cada vez mais interdisciplinar, com o uso de novas ferramentas, como a biotipologia, datiloscopia, botânica, veterinária, computação e genética (KOWALCZYK, 2018). Visto isso, um ponto em destaque é que a ciência forense vem se renovando, sobretudo, a partir da utilização de exames para identificação através do DNA, elucidando tanto a identificação de grau de parentesco entre indivíduos, quanto em casos de delitos e identificação de cadáveres, visando, assim, um melhor desempenho nas suas funções perante a sociedade (SOPRAN, 2019). Desse modo, os resultados das novas tecnologias no âmbito dos exames genéticos vêm sendo cada vez mais empregados pelo sistema judiciário criminal, de forma a realizar analogias e ligações diretas entre amostras encontradas em locais de crimes com suspeitos envolvidos, favorecendo o esclarecimento e conclusão de diversos delitos. A genética forense, um dos ramos mais recente que surgiu no âmbito da ciência forense, fornece uma maior confiança nos resultados comparados aos métodos utilizados anteriormente, como o grupo sanguíneo (ABO), que não é muito informativo, servindo mais como um critério de exclusão do que de inclusão de um indivíduo suspeito de relação com um crime, além das características morfológicas ou impressões digitais, que normalmente acabam sendo decompostas rapidamente nas cenas criminais (KOWALCZYK, 2018). Os estudos com o DNA vêm sendo utilizado de várias formas, sendo de grande valia para situações como na identificação e vinculação de suspeitos com locais de crimes, inocentar pessoas vítimas de falsas acusações, identificar paternidade civil ou não, como em casos com vítimas de estupros, e identificar pessoas desaparecidas ou vítimas de desastres em massa a partir de restos mortais e de comparação com familiares. Os fatos que favorecem e justificam o aumento do uso da genética no âmbito forense é que uma única célula de uma pessoa contém a informação genética completa sobre ela, além também, da descoberta de diferentes tipos de marcadores genéticos, em consequência de um grande avanço científico e tecnológico, o que proporciona a identificação humana pelo DNA a partir de diferentes tipos de amostras, sendo necessário somente que o material biológico contenha células nucleadas (BUTLER, 2005). A grande vantagem do uso do tecido ósseo é que ele consegue preservar o material genético por períodos de tempo bem mais longos do que outros tecidos, já é bem descrito na literatura que o DNA pode persistir em restos mortais devido sua estrutura da matriz óssea ser compactada e mineralizada, o que

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 5.195.105

permite que o material genético ali contido seja mais resistente a quaisquer condições climáticas extremas químicas e físicas do ambiente (SIRIBOONPIPUTTANA, 2018). Sendo assim, nesses casos desde que sejam mais abundantes comparados aos restos de tecidos moles, os ossos são considerados as melhores amostras para identificação. Portanto, as análises e os resultados gerados através da utilização de exames genéticos, apesar de não resolverem todos os casos policiais, tem sua grande relevância e vêm agregando e auxiliando cada vez mais na conclusão de diversos crimes, tanto casos antigos, que ainda não haviam sido fechados, como em casos mais recentes, contribuindo para o um maior avanço e desenvolvimento das ciências forenses.

**Hipótese:** Esse trabalho tem como propósito realizar diferentes protocolos de extração de DNA de ossada, e em seguida, promover análises e comparações entre os resultados de cada protocolo, em razão da necessidade de se obter DNA de ossos e dentes por um método simples e eficaz.

**Metodologia Proposta:** O tecido ósseo que será utilizado nesse trabalho é um fêmur de cadáver não identificado doado para o Laboratório Forense do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O pré tratamento do tecido ósseo, envolve uma lavagem e limpeza para retirada de elementos aderidos a superfície externa do osso, que será lixado até ficar branco e liso. Logo após, será preparado 4g de pó de osso, divididas em 20 alíquotas de 200 mg, portanto, destinando 5 alíquotas para cada um dos 3 diferentes protocolos de extração de DNA de ossada e mais 5 amostras como reserva técnica. Os protocolos são o Protocolo de Extração Avançada; de Desmineralização Completa; e de Extração Orgânica. O primeiro, descrito por Edson et al adaptado, acontece através dos 5 microtubos de 2 ml contendo 200 mg de pó de osso em cada, seguido da adição de 600 µL de tampão de lise 1, que contém 10 mM de Tris pH 8, 100 mM de NaCl, 50 mM de EDTA pH 8 e 0,5% de SDS em cada microtubo. Posteriormente, também é adicionado a cada microtubo mais 20 µL de 20 mg/mL de proteinase K, que permanecerá em agitação intermitente por 12-24h a 56°C (EDSON, 2004). O segundo, descrito por Loreille et al adaptado, com a quantidade de 200 mg de pó de osso em cada um dos 5 microtubos, ocorre através da incubação desse pó em 1,8 mL de tampão de lise 2, contendo 0,5 M EDTA e 1% de sarcosil, além também da adição de 40 µL de 20 mg/mL de proteinase K. Após essa etapa, as amostras são mantidas por 12-24h a 56°C em um agitador intermitentemente (LOREILLE, 2007). Ambos os protocolos, após a etapa de descalcificação, passam para a etapa da extração e purificação do DNA, a partir da adição, em cada amostra, de um volume equivalente de fenol,

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 5.195.105

clorofórmico e álcool isoamílico (25:24:1), misturando por 1-3 minutos, e, por fim, centrifugando e transferindo a fase aquosa para um novo microtubo. Já o terceiro protocolo, descrito por Betancor et al adaptado, ocorre de forma que em cada um dos 5 microtubos contendo 200 mg de pó de osso é adicionado 1,8 ml de DNazol e essas amostras são mantidas em agitação (900 rpm) intermitente por dois dias e meio (60h) a temperatura ambiente. A concentração desse material é realizada pela adição de 0,9 ml de etanol 100%, misturando e invertendo lenta e cuidadosamente o microtubo 3-6 vezes. Logo após, ocorre a centrifugação dessas amostras por 2 minutos a 400 g e caso o DNA não precipite, ocorre mais uma centrifugação por mais 2 minutos a 400 g. O sobrenadante é desprezado através da inversão do microtubo com cuidado, para a partir desse ponto, lavar o DNA com 1,8 ml de etanol a 75%, centrifugando por mais 2 minutos a 400 g, desprezando o etanol através da pipeta e repetindo esse processo por mais 3 vezes. Logo após, os microtubos são mantidos abertos para uma secagem por 5-15 segundos e para desmanchar completamente o pellet de DNA são adicionados 100 L de NaOH 8 mM através da pipeta, seguido do ajuste do pH da solução a partir da adição de 10 L de 0,1 M de HEPES, pH 7,8 (BETANCOR, 2010). Ao final, em todos os protocolos, concentra-se a fase aquosa usando o tubo micro concentrador Microcon 100, lavando essa membrana 2 vezes com igual volume de tampão TE-3 (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 7,5). Ocorre também, uma eluição do DNA de cada amostra com 20 L de tampão TE-4 (Tris 10 mM; EDTA 0,1 mM; pH 7,5) e, por fim, o DNA é guardado a 4°C. Em seguida, as amostras serão analisadas por quantificação em tempo real, PCR e tipagem STR a partir da eletroforese capilar, e desse modo, será possível analisar qualitativamente os perfis dos marcadores moleculares STRs e se existe um declínio do material amplificado em relação ao DNA padrão. Como também, avaliar a quantidade de DNA amplificado através da quantidade de fluorescência incorporada (RFU), que será mensurado através da altura dos picos

Critério de Inclusão: Não informado

Critério de Exclusão: Não informado

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: Realizar três diferentes protocolos de extração de DNA de ossada, para determinar qual o melhor protocolo para extração de DNA de alta qualidade a partir de tecido ósseo. Objetivo Secundário: Testar diferentes métodos de extração de DNA a partir de amostras de

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br



Continuação do Parecer: 5.195.105

tecidos ósseo; quantificar as amostras extraídas através da técnica de qPCR; amplificar as amostras através da técnica de PCR; realizar a tipagem das amostras através da técnica de Eletroforese capilar; e comparar a eficiência da amplificação quantitativamente através da quantidade de fluorescência incorporada (RFU) e qualitativamente através da análise da existência de declínio do material amplificado em relação ao DNA padrão.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo a Pesquisadora: Riscos: Os riscos encontrados nesse estudo são nulos, já que a amostra é de cadáver não identificado e oriunda de doação para o Laboratório Forense do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), e, portanto, não há nada que interfira ou prejudique o indivíduo, e nem a necessidade de seu um consentimento. Benefícios: A etapa da extração de DNA de ossada é crucial para o andamento do exame de identificação genética e para a obtenção de resultados satisfatórios em identificação humana, uma vez que esse tipo de amostra de tecido ósseo é bastante comum nos laboratórios forenses. Entretanto, a etapa de eliminação de interferentes e de lise celular para a extração do material genético são obstáculos para obter o DNA de ossada. Portanto, é de grande relevância o desenvolvimento e comparação de diferentes protocolos que realizam esse procedimento, para que se defina um protocolo de extração ideal, que sirva para a maioria das amostras, seja de simples execução e possua baixo custo ao laboratório, e que assim, seja bem-sucedida a amplificação dos marcadores moleculares almejados nessas análises, trazendo benefícios durante a resolução de casos criminais que devem ser esclarecidos para a população, aprimorando as técnicas para extração de DNA de ossada e agregando no trabalho da comunidade científica forense, em especial da área da genética forense.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma resposta ao parecer CEP no 4.978.797, datado em 16 de setembro de 2021.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

1. São esperados 15 participantes de pesquisa no Brasil (1 centro) e 00 em outros 00 países, como consta no arquivo intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1768816.pdf", postado em 30/07/2021.

2. Não haverá armazenamento de material biológico, como consta no arquivo intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1768816.pdf", postado em 30/07/2021.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 5.195.105

3. A duração do estudo se estenderá até março de 2022, como consta no arquivo intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1768816.pdf", postado em 30/07/2021.

4. O Orçamento se encontra no arquivo intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1768816.pdf", postado em 30/07/2021.

5. Os links para os currículos dos pesquisadores se encontram no arquivo intitulado "CURRICULO\_DOS\_PESQUISADORES.pdf", postado em 12/07/2021.

**Recomendações:**

1.2. O Campo da Instituição Proponente deve ter o preenchimento dos itens e assinatura do gestor da Unidade. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: o Campo da Instituição Proponente está preenchido e com a assinatura do gestor da Unidade no documento Folha de Rosto anexada.

ANÁLISE: o campo está preenchido pelo professor Rodrigo Soares de Moura Neto, orientador do estudo, e não pelo diretor da Unidade, professor Sérgio Bonecker. Solicita-se adequação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

1. Quanto à Folha de Rosto (arquivo intitulado "FOLHA\_DE\_ROSTO.pdf", postado em 21/06/2021):

1.1. A Resolução CNS N° 466 de 2012, item II.11, estabelece patrocinador como "pessoa física ou jurídica, pública ou privada que apoia a pesquisa, mediante ações de financiamento, infraestrutura, recursos humanos ou apoio institucional". A definição do patrocinador do estudo é manifesta na Folha de Rosto, no campo "Patrocinador Principal". O pesquisador deverá indicar, nesse campo, a instituição, o órgão, a agência ou a empresa que proverá os recursos financeiros para a pesquisa. No caso específico de agências de fomento nacionais (como, por exemplo, CNPq, FINEP, FAPs, etc.), aceita-se que os campos nome, cargo/função, CPF, assinatura e data estejam em branco na parte reservada ao patrocinador, desde que o órgão financiador esteja expressamente identificado na Folha de Rosto e que seja apresentado documento comprobatório

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco N°255, 7º andar, Ala E  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 5.195.105

do financiamento. No caso de o pesquisador não ter recursos próprios para a pesquisa e a Instituição Proponente não fornecer aporte financeiro específico para essa, ainda assim, a instituição deverá ser considerada como patrocinadora principal do estudo, já que apoia o estudo por meio de recursos humanos e materiais. Portanto, estudos de iniciativa do investigador, sem recursos financeiros especificamente destinados a eles, devem ter o campo do patrocinador principal da Folha de Rosto assinado pelo representante institucional. Nesse caso, o Patrocinador Principal deve ser o Instituto de Biologia. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: folha de Rosto atualizada em anexo.

ANÁLISE: pendência atendida.

1.2. O Campo da Instituição Proponente deve ter o preenchimento dos itens e assinatura do gestor da Unidade. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: o Campo da Instituição Proponente está preenchido e com a assinatura do gestor da Unidade no documento Folha de Rosto anexada.

ANÁLISE: o campo está preenchido pelo professor Rodrigo Soares de Moura Neto, orientador do estudo, e não pelo diretor da Unidade, professor Sérgio Bonecker. Ver Recomendações..

2. Quanto às Informações Básicas do Projeto (arquivo intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1768816.pdf", postado em 30/07/2021.

2.1. Na pág. 5 de 7, item "Cronograma de Execução", verifica-se que a coleta de dados se iniciou no dia 05/07/2021. O CEP não aprova projetos de pesquisa já iniciados. Solicitam-se esclarecimentos.

RESPOSTA: o projeto de pesquisa titulado "Comparação da Eficiência de Métodos de Extração de DNA de Tecidos Ósseos", sob minha responsabilidade, será realizado através da utilização de amostra do tecido ósseo de um fêmur. A coleta de dados foi iniciada devido ao fato de já ter ocorrido a doação da amostra ao Laboratório Forense do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Esse material é oriundo de um cadáver não identificado, portanto, recebido no Instituto Médico Legal (IML) sem documentos que o identifica, como nome, endereço e

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3938-2480 Fax: (21)3938-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 5.195.105

filiação. Dessa forma, apesar da amostra de fêmur já ter sido doada e recebida, ela está guardada e sendo mantida nas condições ideais para as futuras análises, após o parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

ANÁLISE: pendência atendida.

2.2. Na pág. 5 de 7, item "Orçamento Financeiro", lê-se "Verbas do próprio laboratório". O Orçamento financeiro apresentado não está de acordo com o solicitado pela Norma Operacional CNS n° 001 de 2013 item 3.3.e. Solicita-se que seja apresentado orçamento financeiro detalhado, que especifique todos os recursos, fontes do recurso e destinação, em especial os custos operacionais (recursos humanos e materiais).

RESPOSTA: orçamento financeiro detalhado preenchido na plataforma.

ANÁLISE: pendência atendida.

3. Quanto ao Protocolo de Pesquisa, solicita-se inserir, na Plataforma Brasil, declaração em que o pesquisador se compromete a:

3.1. Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto (Resolução CNS n° 466 de 2012, item XI.g).

RESPOSTA: Declaração de encaminhamento do projeto para publicação em anexo.

ANÁLISE: pendência atendida.

3.2. Divulgar os resultados para os participantes da pesquisa e para as instituições onde os dados foram obtidos (Norma Operacional CNS n° 001 de 2013, item 3.4.14).

RESPOSTA: Declaração da divulgação dos resultados em anexo.

ANÁLISE: pendência atendida.

3.3. Anexar os resultados da pesquisa na Plataforma Brasil, garantindo o sigilo relativo às propriedades intelectuais e patentes industriais (Norma Operacional CNS n° 001 de 2013, item 3.3).

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco N°255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

**UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ**



Continuação do Parecer: 5.195.105

c).

RESPOSTA: Declaração do anexo dos resultados da pesquisa na Plataforma Brasil em anexo.

ANÁLISE: pendência atendida.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1768816.pdf	16/10/2021 11:58:07		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	16/10/2021 11:53:14	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_ATUALIZADO.pdf	16/10/2021 11:51:24	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_ENCAMINHAMENTO_DO_PROJETO_PARA_PUBLICACAO.pdf	16/10/2021 11:50:55	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DO_ANEXO_DOS_RESULTADOS_DA_PESQUISA_NA_PLATAFORMA_BRASIL.pdf	16/10/2021 11:45:04	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DA_DIVULGACAO_DOS_RESULTADOS.pdf	16/10/2021 11:44:31	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	16/10/2021 11:35:12	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_DE_APRESENTACAO.docx	30/07/2021 21:59:06	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_DE_APRESENTACAO.pdf	30/07/2021 21:58:08	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_AUTORIZACAO_E_EXISTENCIA_DE_INFRAESTRUTURA.pdf	12/07/2021 20:08:40	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Declaração de	TERMO_DE_ANUENCIA.pdf	12/07/2021	GISELLE LINDOLFO	Aceito

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 5.195.105

Pesquisadores	TERMO_DE_ANUENCIA.pdf	20:07:48	AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CURRICULO_DOS_PESQUISADORES.pdf	12/07/2021 20:06:51	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO_DO_PROJETO_AO_CEP.pdf	12/07/2021 20:04:25	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO.pdf	10/06/2021 21:03:02	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CARTA_DE_REQUERIMENTO_DE_DISPENSA_DÔ_TCLE.pdf	10/06/2021 20:56:27	GISELLE LINDOLFO AFFONSO EVANGELIO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 07 de Janeiro de 2022

Assinado por:

Carlos Alberto Guimarães  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco N°255, 7º andar, Ala E  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br