

MÉTODOS DE AUTOMAÇÃO EM EXTRAÇÃO DE DNA DE OSSO HUMANO

Ian Marques Cândido, Laryssa Silva de Andrade Bezerra, Mariana Flavia da Mota, Rhonan Ferreira da Silva,

Solon Diego Santos Carvalho Mendes, Rejane da Silva Sena Barcelos
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM GENÉTICA

Introdução

O exame de DNA tem se mostrado uma ferramenta eficaz e por isso muito utilizado nas ciências forenses. A identificação humana de restos mortais em avançado estado de decomposição, carbonizados, desastres em massa e esqueletizados pode ser realizada pela Genética Forense e na maioria das vezes ossos e dentes são as únicas fontes de DNA viável para análise. A quantidade e a qualidade do DNA extraído das amostras de osso são determinantes no sucesso da identificação genética. A demanda dos laboratórios forenses é imensa e há um acúmulo de corpos a serem identificados. O objetivo do presente trabalho é comparar as técnicas de extração para osso humano, com possibilidade de automação, avaliando: - quantidade absoluta de DNA extraído em cada amostra - percentual de perfis genéticos completos de STR autossômico considerando 16 marcadores.

Métodos, procedimentos e materiais

Foram selecionados randomicamente no Laboratório de Biologia e DNA Forense da Polícia Científica de Goiás vinte e cinco (25) casos de identificação humana que possuem fêmur como amostra questionada, independente da idade ou sexo do desaparecido, do tempo de desaparecimento e das condições de conservação que se encontrava o material. Estes ossos foram recebidos no laboratório entre 2006-2011. Todas as amostras de osso foram lixadas na superfície externa e interna utilizando microrretífica, foi obtido por corte um fragmento ósseo com massa próxima de três gramas, que foi posteriormente congelado em freezer -80°C/24horas e triturado em moinho mineralógico. 25 alíquotas de 100mg da amostra pulverizada tiveram o DNA extraído por duas técnicas diferentes: a de partículas magnética com o kit Prepfiler®BTA® com robô Automate Express® e a outra por coluna de sílica as amostras foram manipuladas manualmente kit QIAamp® DNA Investigator. Os procedimentos de ambas metodologias foram realizados conforme orientações dos fabricantes. Todos os extratos de DNA foram quantificados por PCR em tempo real, usando o kit Plexor HY®. A presença de inibidores da reação de PCR foi avaliada utilizando o Internal PCR Control (IPC). Após a normalização as amostras foram amplificadas com kit Identifiler Plus®, NGM® e/ou MiniFiler®. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese capilar no equipamento ABI® 3130 Genetic Analyser, utilizando polímero POP 4® e software Genemapper®.

Resultados e discussão

O kit Prepfiler®BTA® (com automação) teve um tempo de análise de 3 horas para 12 amostras e com o kit QIAamp® DNA Investigator (manual) este tempo foi de 27 horas para 4 amostras. 22 das 25 amostras testadas tiveram uma quantificação de DNA (pg/uL) maior pela técnica de partículas magnéticas que de coluna de sílica. Na avaliação do IPC em nenhuma das amostras foi encontrado um valor acima do esperado o que indica que as duas metodologias são eficientes frente a presença de inibidores de PCR recuperando um DNA purificado. 10 perfis genéticos completos (16 loci amplificados) foram obtidos com Prepfiler®BTA® enquanto que com QIAamp® DNA Investigator foram obtidos apenas 5. Foram obtidos nove ou mais loci amplificados em 68% casos (17/25) das extrações que utilizaram partículas magnéticas, enquanto que com coluna de sílica o índice foi de apenas 36% (9/25). Em ossos não foram obtidos produtos amplificados pela técnica de coluna de sílica e com partículas magnéticas nos dois ossos o resultado foi de perfil completo (16 loci amplificados).

Conclusão e referências

Prepfiler®BTA® recuperou uma quantidade superior de DNA e produziu uma quantidade de loci amplificados maior se comparada à metodologia que utiliza partículas magnéticas. Prepfiler®BTA® se demonstrou eficiente frente a inibidores de PCR, visto que não foram detectados níveis altos de IPC em nenhuma das amostras e se demonstrou mais seguro que as metodologias tradicionais de extração por não utilizar fenol-clorofórmio. A técnica de extração que utiliza partículas magnéticas necessita de uma quantidade de pó de osso (100 mg) cerca de dez vezes menor que as metodologias tradicionais por fenol-clorofórmio, o que possibilita trabalhar com fragmentos ósseos pequenos. A quantidade de perfis completos (16 loci) pelo kit Prepfiler®BTA® foi o dobro do kit QIAamp® DNA Investigator, ampliando assim a possibilidade de identificação genética destas ossadas. A automação do método de extração do DNA otimiza os procedimentos eliminando interferências de erro humano e reduz o tempo de análise.

J. Davoren , D. Vanek , R. Konjhodzic , J. Crews , H. Edwin , T.J. Parsons, Highly Effective DNA Extration Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves, Croat Med J. 48 (2007) 478-85. A.Z. Mundorff , E.J. Bartelink , E. Mar-Cash, DNA Preservation in Skeletal Elements from the World Trade Center Disaster: Recommendations for Mass Fatality Management, J Forensic Sci. 54 (2009) 739-745. I.Z. Pajnic, B.G. Pogorelc, J. Balazic, Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second War Konfin I mass grave in Slovenia, Int J Legal Med. 124 (2010) 307-317. O.M. Loreille, T.M. Diegoli, J.A. Irwin, M.D. Coble, T.J. Parsons, High efficiency DNA extration from bone by total demineralization, Forensic Sci Int Genet.1 (2007) 191-195. A. Milos, A. Selmanovic, L. Smajlovic, R.L.M. Huel, C. Katzmarzyk , A. Rizvic , T.J. Parsons, Success Rates of Nuclear Short Tandem Repeat Typing from Different Skeletal Elements, Croat Med J. 48 (2007) 486-4.

Palavras-chave: Genética Forense; Extração de DNA; Automação; Osso.

Fomento: FAPEG

Contato: imarquescandido@gmail.com