

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA DO OSSO QUE UTILIZA DESMINERALIZAÇÃO POR SOLUÇÃO DE EDTA SEM PULVERIZAÇÃO.

Bruno Celerino Da Fonseca¹; Hellen De Souza Pereira¹; Thatielly Soares De Barros Queiroz¹; Valéria Almeida De Freitas¹; Eduardo Rodrigues Alves Junior².

1- Discentes do curso de graduação em biomedicina. | 2- Docente do curso de graduação em biomedicina.

A utilização do tecido ósseo como substrato na obtenção do DNA é bastante útil na genética forense, principalmente na identificação humana de restos mortais em avançado estado de decomposição, carbonizados, desastres em massa e na maioria das vezes, ossos e dentes são as únicas fontes de DNA viáveis para análise. Para cada tipo de amostra, vários protocolos podem ser testados, adaptados e otimizados, de maneira a se conseguir DNA de boa qualidade. O objetivo do presente estudo é padronizar uma nova técnica de extração de DNA a partir de secções ósseas por desmineralização com solução EDTA. Foram utilizados 3 fêmures de 3 indivíduos não identificados de ossadas antigas já em estado de decomposição e realizadas secções transversais de 0,3 milímetros de espessura em cada fêmur. As amostras foram divididas em 3 grupos: cada grupo terá uma secção femoral de cada um dos 3 indivíduos, uma amostra de ossada recente foi incluída como controle positivo, totalizando 10 amostras. Todas as secções femorais foram submetidas à desmineralização em 20 mL de solução de EDTA 0,5 M, pH 8 utilizando coletores universais. Cada grupo terá sua solução trocada em intervalos de tempo diferentes: 12 em 12 horas, 24 em 24 horas, até 12 dias, 5 em 5 dias até 15 dias, e a amostra jovem 48 em 48 horas. Das 10 amostras, foram realizadas a extração de DNA de acordo com o protocolo descrito por Rohland & Hofreiter (2007), para quantificação de DNA foi utilizado o método de PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500), e o método por espectrofotometria (GE Global Research). Após extração e quantificação do DNA extraído, este foi submetido a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para o Gene da Beta Globina Humana, de acordo com o protocolo descrito por Bell et al (1993), e a reação foi realizada utilizando termociclador Veriti da Applied, em seguida foi realizada eletroforese em gel de agarose para visualização do material genético amplificado. Respectivamente para as amostras com trocas de EDTA de 12 horas, 24 horas e 5 dias, a quantificação de DNA extraído médio por espectrofotometria foram 19, 24 e 24 ng/μL, e para a quantificação de DNA extraído médio por Real Time foram 0,024, 0,012, 0,067 ng/μL. Após a realização da PCR para beta globina as amostras amplificadas foram quantificadas por espectrofotometria obtendo 347, 344 e 349 ng/μL. Em eletroforese, o gel de agarose apresentou positividade, ou seja bandas de material genético amplificado para na de 2 das 3 amostras com trocas de 12 em 12 horas na desmineralização, 2 das 3 amostras com trocas da solução EDTA de 24 horas em 24 horas, e 1 das 3 amostras com trocas de EDTA de 5 em 5 dias. No total das 10 amostras 6 foram positivas a amplificação. Com 60% de resultado positivo a técnica proposta nesta pesquisa, apresenta resultados satisfatórios em relação a extração de DNA pelo método proposto. As amostras ósseas doadas para a pesquisa foram amostras consideradas difíceis pelos peritos locais por serem amostras antigas e já em estado de decomposição. Não foi possível identificar uma maior eficiência em relação ao período de troca das soluções EDTA para desmineralização de 12h, 24h e 5 dias. A amostra óssea recente utilizada como controle positivo apresentou resultados altos de concentração de DNA o que demonstra a eficiência da técnica.