Faculdade de Medicina

Universidade de Coimbra

Extracção de ADN degradado em peças dentárias:

Aplicação à Genética Forense

Caroline Delgado Veloso

Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses

Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P., Delegação do Centro

Orientador: *Professor Doutor Joaquin Gamero Lucas*

Co-Orientador: *Professor Doutor Francisco Corte-Real*

2011

Agradecimentos

Dedico este pequeno espaço para agradecer a todos os que me ajudaram profissionalmente e pessoalmente, sabendo que muito mais merecem para além dos meus agradecimentos.

Ao Prof. Doutor Joaquín Gamero Lucas por ter aceitado o convite para ser meu orientador, e por me ter proposto este tema interessante e cativante de dissertação de tese de mestrado.

Ao Prof. Doutor Francisco Corte-Real pela ajuda, disponibilidade e paciência que me ajudaram a escrever este trabalho. Agradeço também por ter aceitado ser meu co-orientador, foi um prazer meu.

Agradeço à Dra. Maria João Porto por me ter ajudado a ultrapassar certas dificuldades científicas, e me ter aberto as portas do Serviço de Genética e Biologia Forense de Coimbra. Aprecio muito a paciência que demonstrou para comigo.

Muito apoio científico, a Prof. Doutora Ana Teresa Corte-Real me concedeu, e por isso lhe estou muito grata.

Aos peritos do Serviço de Genética e Biologia Forense de Coimbra (Dr. Armando Serra, Vanessa Bogas, Pedro Brito, Filipa Balsa, Ana Margarida, Marta Bento, Dra. Mónica Carvalho, Dra. Virgínia Lopes, Dra. Lisa Andrade) agradeço pelo apoio que me concederam sempre que precisei. Eles foram os grandes arquitectos da minha tese. À Patrícia, Celeste e Dona Glória pela amizade e boa disposição que me ajudaram nos momentos menos entusiasmantes.

Aos meus chefes (Prof. Doutor Rodrigo Cunha e Prof. Doutora Paula Agostinho) e colegas de trabalho do Centro de Neurociências de Coimbra, que sem a compreensão e dispensa deles, me teria sido impossível deslocar e realizar a parte laboratorial do mestrado.

Por último, mas não os menos importantes, devo muito aos meus pais, Gabriel, Pedro, Elsa, Mariana, Alexandra e Ricardo.

Índice

Resumo I

Abstract II

1. Introdução 1

1.1 A importância da Genética na identificação humana 1

1.2 Marcadores de ADN na Genética Forense 2

1.3 A estrutura da peça dentária e a sua aplicação na Genética Forense 4

1.4 Extracção e amplificação de ADN em dentes 8

1.5 Amostras degradadas – inibidores e consequências na análise genética 10

1.6 Justificação do tema 12

2. Artigo Científico 15

3. Conclusões 32

4. Referências 33

Resumo

A investigação forense depara-se, muitas vezes, com dificuldade na obtenção de material biológico em amostras de reduzida dimensão ou sujeitas a condições ambientais adversas para a preservação do ADN presente. Em situações de desastres de massa, como explosões ou quedas de aviões, a identificação individual de cada vítima torna-se difícil visto os restos cadavéricos se encontrarem muitas vezes esqueletizados, em avançado estado de putrefacção, fragmentados ou até mesmo misturados. Nestes casos, recorre-se à identificação através da análise do DNA existente nos dentes utilizando marcadores genéticos. Esta técnica tem-se provado valiosa, através da comparação de ADN extraído dos restos humanos com o ADN dos seus supostos familiares.

Este trabalho consistiu na tentativa de estabelecer, de forma mais completa, os perfis genéticos de seis dentes enterrados em areia de praia durante três anos e meio. Para isso, utilizaram-se dois kits de extracção para cada amostra: o kit manual QiAamp DNA Investigator Kit da Qiagen e o kit automatizado PrepFiler Express BTA™ da Applied Biosystems. De seguida, ambas as extracções foram sujeitas a duas amplificações com kits diferentes, o de nova geração AmpFℓSTR® NGM™ PCR amplification kit (Applied Biosystems) (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, D2S441 e o locus da Amelogenina) e o PowerPlex® ESI 17 System (Promega) (D22S1045, D2S1338, D19S433, D3S1358, Amelogenina, D2S441, D10S1248, D1S1656, D18S51, D16S539, D12S391, D21S11, vWA, TH01, SE33, FGA e D8S1179).

O objectivo principal deste estudo consistiu em investigar técnicas de extracção de ADN eficazes em dentes humanos submetidos a condições ambientais adversas, de modo a aumentar as possibilidades de obtenção de perfis completos, bem como o de dividir a dentina das peças dentárias na sua parte apical e parte restante para permitir um maior número de análises da mesma amostra.

Abstract

Forensic investigation often faces with difficulties in obtaining biological material of small size or subject to adverse environmental conditions for the preservation of DNA present. In situations of mass disasters such as explosion or airplane crashes, the individual identification of each victim becomes difficult since the skeletal remains are often skeletonized, in an advanced putrefaction state, fragmented or even mixed. In such cases, the identification is made through the analysis of existing teeth using genetic markers of DNA. This technique has proved to be valuable by comparing DNA extracted from human remains to the DNA of their supposed relatives.

This work consisted in an attempt to establish more completely the genetic profiles of six teeth buried in beach sand up to three years and a half. For this, we used two extraction kits for each sample: the manual QiAamp DNA Investigator Kit from Qiagen and the automated PrepFiler Express BTA™ kit from Applied Biosystems. Then, both extraction kits were subjected to amplification with the next generation AmpFℓSTR® NGM™ PCR amplification kit (Applied Biosystems) (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, D2S441 and the gender determination locus Amelogenin) and the PowerPlex® ESI 17 System (Promega) (D22S1045, D2S1338, D19S433, D3S1358, Amelogenina, D2S441, D10S1248, D1S1656, D18S51, D16S539, D12S391, D21S11, vWA, TH01, SE33, FGA e D8S1179).

The main objective of this study was to investigate the effectiveness of DNA extraction methods in human teeth subjected to adverse environmental conditions in order to increase the chances of obtaining full profiles, as well as to divide dental pieces in its apical region and remaining part to allow to allow a greater number of analyzes of the same sample.

1. Introdução

1.1 A importância da genética na identificação humana

A análise do ácido desoxirribonucleico (ADN) tem vindo a destacar-se na resolução de casos forenses, nomeadamente com o estudo de diversos marcadores genéticos, e com o progresso tecnológico para a sua detecção. Pode permitir a identificação humana em casos de desastres de massa ou de desaparecimentos; igualmente é utilizada em investigações de parentesco e abusos sexuais; também pode resolver casos de crimes onde relaciona um determinado suspeito com uma amostra de ADN obtida a partir do sangue, saliva, esperma ou outro tecido biológico. Muitas vezes, a análise genética torna-se no único instrumento de ajuda na identificação humana quando o uso de outros métodos de identificação tradicionais (como por exemplo, as impressões digitais, identificação visual, traços característicos corporais e exames odontológicos) é difícil ou mesmo impossível. Os acontecimentos mais mediáticos e relativamente recentes onde a análise genética do ADN foi crucial para a atribuição de identidade a muitas vítimas, são o caso do World Trade Center nos Estados Unidos da América (2001), o Tsunami na Indonésia (2004) e o atentado terrorista ao metro de Madrid (2004).

Em variados casos forenses o aparecimento de amostras biológicas degradadas é muitas vezes frequente, não existindo material genético suficiente para traçar um perfil genético completo, ou até mesmo parcial. Durante o período *post-mortem*, o ADN pode ter uma durabilidade limitada dependendo de várias condições. A sua própria protecção contra diversos factores destrutivos, assim como, as condições ambientais a que está sujeito são determinantes para a preservação ou não do ADN na amostra. Existem casos onde não é possível estabelecer qualquer perfil genético, e outros em que são recuperados perfis de

restos cadavéricos antigos com milhares de anos. Courts e Madea (2011) recuperaram perfis confiáveis de ossos com 67 anos imersos em água doce.

1.2 Marcadores de ADN na genética forense

A análise de uma amostra forense prende-se com o estudo dos polimorfismos existentes no genoma repetitivo não codificante do ADN, que diferem de pessoa para pessoa, individualizando cada ser humano. Os marcadores autossómicos são a primeira escolha na análise para a identificação humana, e por isso iremos abordá-los e caracterizá-los. O ADN mitocondrial torna-se complementar na análise de um perfil autossómico, mas só iremos referenciá-lo, pois a sua utilização não foi realizada.

O estado de integridade do ADN determina quais os polimorfismos a serem analisados. Os sistemas de *Short Tandem Repeats* (STRs) são os marcadores genéticos mais eficazes e mais usados na genética forense, sendo uma forma importante para a identificação humana devido à sua simplicidade, ao seu grande poder discriminativo e à mínima quantidade de amostra biológica necessária para a sua análise. Diversos kits de amplificação de STRs em reacções multiplex têm sido desenvolvidos para a genotipagem simultânea de até 17 *loci*. Contudo, o sucesso da amplificação dos STRs está limitado pelo grau de degradação do ADN, e pelo comprimento do *amplicon* de amplificação. A degradação do ADN pode causar artefactos, tais como, amplificação preferencial e alelo e/ou *locus drop-out*. Em amostras mais problemáticas, tais como manchas de sangue antigas ou tecidos decompostos, o fragmento de ADN é reduzido a tamanhos menores que 300pb. É por isso que pode ocorrer a perda de informação genética e a amplificação de STR pode falhar devido à falta de cadeias de ADN adequadas (Whitaker *et al*, 1995). Estes *amplicons* de tamanho reduzido podem ser melhor amplificados seleccionando *primers* que estejam localizados mais perto da região de repetição, reduzindo assim o tamanho dos

da região a amplificar, denominados de mini-STRs (Butler, 2009; Senge *et al*, 2011). Porém, estes marcadores possuem as desvantagens de que apenas alguns *loci* podem ser simultaneamente amplificados numa reacção multiplex para evitar o *annealing* não específico dos *primers*, visto que o aspecto diferencial do tamanho foi diminuído.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) são sistemas que se baseiam na variação de uma única base na sequência da cadeia de ADN entre indivíduos diferentes numa particular região do genoma nuclear. Os SNPs encontram-se de uma forma abundante no genoma humano, e por isso podem ser usados para ajudarem a diferenciar indivíduos uns dos outros. São conhecidas algumas vantagens destes marcadores: (1) os produtos da amplificação por *polymerase chain reaction* (PCR) de SNPs podem ser menores que 100pb e, por isso, são capazes de resistir ao ADN degradado de uma melhor forma que os STRs; (2) não há artefactos de bandas *stutter* associados a cada alelo, simplificando a interpretação dos resultados; (3) o processamento da amostra e a análise dos dados podem ser mais completamente automatizados pois uma separação baseada no tamanho não é necessária; e (4) a capacidade de prever a origem étnica e certos traços físicos pode ser possível com uma selecção cuidadosa de SNPs, nomeadamente da região codificante. Uma das maiores desvantagens dos SNPs é de que um único SNP bialélico, por si próprio, proporciona menos informação (apenas dois alelos possíveis) do que um marcador STR multialélico, tornando-se necessária a análise de um maior número de SNPs de forma a obter um elevado poder de discriminação para definir um único perfil. Além disso, análises computacionais mostraram que, em média, são necessários 25 a 45 SNP para se obterem probabilidades equivalentes de correspondência aleatória como os 13 *loci* de STR (Butler, 2009) pertencentes ao CODIS (base de dados de perfis de ADN dos Estados Unidos).

Na maioria dos casos forenses, as amostras biológicas contêm ADN altamente degradado. A qualidade e/ou quantidade de ADN nuclear extraído nestas

amostras degradadas frequentemente impedem uma genotipagem de STR com sucesso, resultando num perfil parcial ou sem nenhum STR. Tais amostras podem então ser analisadas por um método baseado em polimorfismos de toda a região controlo do ADN mitocondrial (técnica utilizada por Alshamali *et al*, 2008 e Cardoso *et al*, 2010, entre outros). Cada célula eucariótica contém centenas de mitocôndrias, cada uma das quais com múltiplas cópias do genoma circular, resultando num elevado número de cópias comparando com o ADN nuclear. Este genoma é herdado por via materna não estando sujeito a eventos de recombinação, mantendo-se coerente através das gerações. Apesar de tudo, esta característica pode tornar-se uma inconveniência. O ADN mitocondrial é passado por inteiro à descendência e a sua análise pode tornar-se ambígua num caso de crime ou desastre de massa, pois todos os indivíduos pertencentes à mesma linhagem materna terão o ADN mitocondrial igual.

1.3 A estrutura da peça dentária e a sua aplicação na Genética Forense

As ciências forenses deparam-se frequentemente com dificuldades na obtenção de identificação positiva de restos humanos. Por vezes, os métodos tradicionais de identificação (radiografias, odontologia, impressões digitais) não são suficientes, pois podem não existir registos de elementos utilizados na comparação. Assim, uma identificação positiva torna-se difícil.

Nestes casos, o recurso ao estudo de ADN presente nos dentes tem-se tornado uma valiosa ferramenta, pois é um tecido resistente aos factores adversos externos, contrariamente a outros tecidos moles que se utilizam na genética forense (cabelos, unhas, sangue, saliva e outros). A sua morfologia e histologia contribuem para a preservação dos componentes celulares, sendo o ADN mais protegido que nos ossos (Woodward *et al*, 1994).

O dente (figura 1) é constituído pela dentina, o maior tecido do dente que forma o eixo estrutural importante do dente. A dentina é um tecido conjuntivo avascular. Na parte da coroa do dente é coberta pelo esmalte, um tecido fortemente mineralizado, sendo uma estrutura sem células nem vasos. Na sua porção radicular é coberta pelo cemento, outro tecido conjuntivo calcificado.

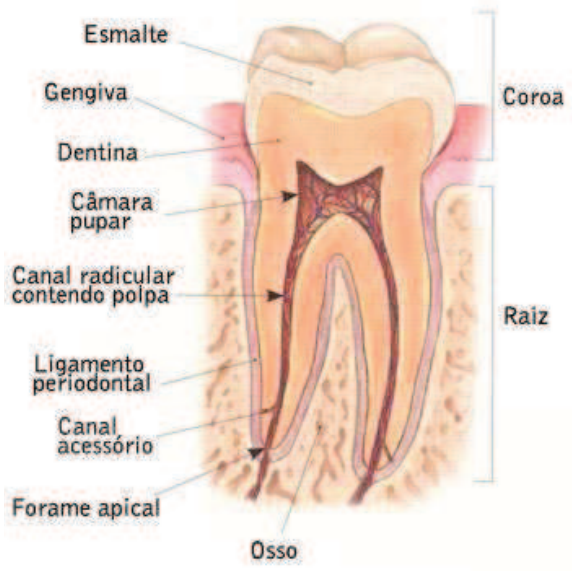

Figura 1: Estrutura do dente. Retirado de http://sorria-estaserobservado.blogspot.com/2010/10/o-dente.html a 07 Set de 2011.

A sua superfície interna delimita a cavidade pulpar onde se aloja a polpa dentária, que contém nervos, sangue e vasos linfáticos. As células da polpa têm uma forma estrelada irregular e contêm um núcleo colocado de forma variável (Pötsch *et al*, 1992). Apesar deste tecido ser protegido pela dentina, é afectado pela putrefacção até à sua total decomposição. Enquanto os dentes estiverem fixos aos ossos alveolares, este tecido encontra-se protegido na cavidade pulpar, mas quando os dentes são extraídos e armazenados a temperatura ambiente, ocorre uma rápida desidratação da polpa (Pötsch *et al*, 1992).

O tecido pulpar tem várias funções: reparadora (produz nova dentina quando necessário), formadora (produz a dentina que o rodeia), nutritiva (nutre a

dentina avascular) e protectora (contém nervos que dão sensibilidade à dentina). As principais células presentes no tecido são os odontoblastos (com as suas ramificações no corpo da dentina) e fibroblastos, entre outras como macrófagos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, mastócitos, etc (Ten Cate AR, 1989).

A dentina é constituída por matéria inorgânica (70%, sendo o principal constituinte as fibras de colagéneo tipo I), matéria orgânica (20%, de cristais de hidroxiapatite) e água (10%). Esta composição vai alterando com a idade do dente devido à sua mineralização progressiva. A dentina é caracterizada pela presença de túbulos dentinais que a atravessam e que contém prolongamentos dos odontoblastos situados na periferia da polpa. Estas duas estruturas formam uma unidade funcional e embriológica, tendo características biológicas comuns (complexo dentino-pulpar). Para além da dentina ser um tecido sensitivo, mais importante é o facto de ser capaz de regenerar, visto que os odontoblastos podem ser estimulados de modo a depositar mais dentina conforme a necessidade de cada circunstância (Ten Cate AR, 1989). A pré-dentina é formada pelos odontoblastos, permanecendo ao longo da vida, e está situada entre a camada de odontoblastos e a dentina mineralizada.

No dente humano são reconhecidos três tipos de dentina (figura 2). A dentina primária forma a maior parte do dente e circunda a câmara pulpar do dente completamente formado. A superfície externa desta, a dentina do manto, difere do resto da dentina primária, a qual é a primeira camada de dentina produzida próxima do esmalte e cemento (Ten Cate AR, 1989).

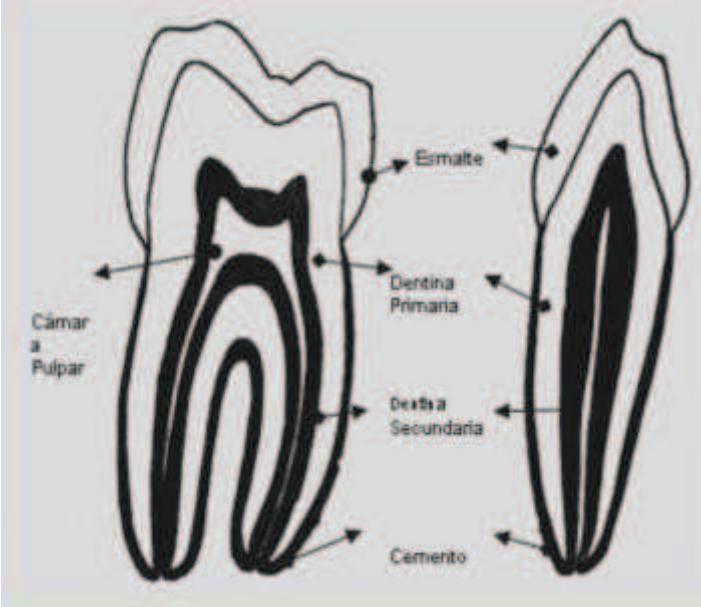

Figura 2: Tipos de dentinas. Retirado de http://www.javeriana.edu.co/academiapgendodoncia/art_revision/revision_2006/i_a_revision21.html a 07 Set de 2011

A dentina secundária representa a deposição secundária de dentina pelos odontoblastos após a geração da raíz se ter completado. Apesar de depositada na periferia do espaço pulpar não está disposta uniformemente, especialmente nos dentes molares. A dentina terciária é produzida em reacção a estímulos nocivos, tais como cáries ou procedimentos dentários restaurativos. Ao contrário da primária e secundária (formadas ao longo de toda a margem polpa-dentina), a dentina terciária é produzida apenas pelos odontoblastos afectados directamente pelos estímulos (Ten Cate AR, 1989).

Pensava-se que a análise genética do dente poderia apenas ser efectuada através do tecido pulpar (Garcia *et al*, 1996). Mas mais tarde, Mörnstad *et al* (1999), Gaytmenn *et al* (2003), Malaver and Yunis (2003) e Corte-Real *et al* (2006) demonstraram que a dentina poderia ser uma fonte valiosa de ADN no estudo do dente. Malaver e Yunis (2003) estudaram a polpa, dentina e cemento de dentes enterrados durante cinco anos (evitando a decomposição da polpa através da remoção cirúrgica). Kaiser *et al* (2008) comparou níveis de degradação de ADN entre diferentes zonas do osso (interior, média e exterior).

Verificaram que a região exterior é significativamente mais afectada pelo contacto directo com solo envolvente, assim como a zona interior é afectada pela medula óssea. A zona média proporcionou o osso melhor preservado com quantidades recuperáveis de ADN adequadas. Relativamente à quantidade de ADN presente em cada uma das partes, a zona intermédia dos ossos foi a que apresentou quantidades adequadas de ADN. Isto poderá comparar-se aos dentes, correspondendo o tecido médio à dentina.

1.4 Extracção e amplificação de ADN em dentes

Nos casos forenses onde a escassez de material genético é um problema, os dentes são uma excelente fonte de bom ADN comparados com outras partes do corpo, conforme Manjunath e seus colaboradores (2011) comprovaram ao cruzarem informação de vários artigos científicos.

A selecção da técnica de extracção depende de diversos factores, entre os quais o tipo de amostra e a quantidade e qualidade do material genético que há disponível, pois é na extracção de ADN que se maximiza a quantidade de material genético recuperado e se purifica de inibidores da PCR possivelmente existentes.

Neste trabalho usaram-se duas técnicas de extracção de fase sólida: uma extracção manual com o QIAamp DNA Investigator kit da Qiagen, e uma extracção automatizada com o PrepFiler™ Express BTA™ da Applied Biosystems. Neste tipo de extracção, o ADN liga-se a um substrato (sílica ou partículas magnéticas, respectivamente) e depois é libertado seguidamente a várias lavagens purificando o ADN de proteínas e outros componentes celulares.

O kit QIAamp DNA Investigator utiliza uma tecnologia avançada para a purificação do ADN genómico de amostras com baixos volumes ou tamanhos. O procedimento laboratorial está planeado de modo a assegurar que não haja

contaminação cruzada entre amostras. Comparado com métodos de extracção mais antigos, esta técnica baseada em sílica tem diversas vantagens, tais como, o facto de ser rápida e fácil de executar, simples de implementar e eficiente na remoção de inibidores da PCR (Rohland e Hofreiter, 2007).

O PrepFiler™ Express BTA™ permite uma extracção de segurança visto ser um sistema fechado, reduzindo o manuseamento das amostras pelo perito e minimizando o risco de contaminação e transposição de erros (Brevnov *et al*, 2009). Este kit contém reagentes e plásticos necessários para a remoção de inibidores presentes nas amostras, e para a sua execução automática no sistema de extracção AutoMate Express™ Forensic DNA (Applied Biosystems).

Relativamente à amplificação do ADN por PCR, esta metodologia foi levada a cabo pelo kit de nova geração da Applied Biosystems, AmpFℓSTR® NGM™, e pelo PowerPlex® ESI 17 System da Promega. O kit AmpFℓSTR® NGM™ é um ensaio em multiplex de short tandem repeats (STRs) que amplifica 16 *loci*, dos quais 3 deles são mini-STR (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, D2S441 e a amelogenina). O kit PowerPlex® ESI 17 permite a co-amplificação dos 16 *loci* presentes no kit anterior incluindo um diferente, o SE33.

O kit de nova geração NGM™ tem um maior poder de discriminação, maior sensibilidade e uma maior robustez do que antigos kits da Applied Biosystems como se pode confirmar no guia do utilizador do kit AmpFlSTR® NGM™, elucidando de melhor forma a presença de misturas ou contaminações por ADN externo. O facto de existir uma alta concentração de *loci* na região de baixo peso molecular (mini-STR têm *amplicon* de menor tamanho) acaba por melhorar o rendimento em amostras altamente degradadas.

A presença de mini-STRs nestes dois kits de amplificação aumenta o número de *loci* genotipados nas amostras degradadas, tal como Lee *et al* (2010)

observaram. Além disso, os *loci* com maior peso molecular no kit NGM™ (e que por isso não lhes é atribuído nenhuma designação devido à possível degradação do ADN) podem aparecer genotipados no PowerPlex® ESI 17 como marcadores de baixo peso molecular.

A combinação destes dois kits de amplificação permite uma comparação e confirmação dos resultados obtidos de cada amostra, pois todos os 16 marcadores presentes no kit NGM™ existem igualmente no kit PowerPlex® ESI 17.

1.5 Amostras degradadas – inibidores e consequências na análise genética

A análise do ADN antigo pode encontrar limitações metodológicas, pois após o processo de morte oxidativa, as nucleases celulares e outras enzimas hidrolíticas causam a degradação cromossomal do ADN em fragmentos cada vez menores ao longo do tempo. Têm-se estudado outros factores que possam servir de barreira à optimização do rendimento da extracção do ADN e da PCR, sendo que os inibidores existentes que possam afectar uma genotipagem correcta são a própria hematina do sangue, heparina, ureia, compostos fenólicos, EDTA, a presença de bactérias e o ácido húmico e metais pesados presentes no solo (Tebbe e Vahjen, 1993; Wilson, 1997; Sutlović *et al*, 2005; Hartman *et al*, 2005). Uns compostos considerados responsáveis inibidores durante a extracção do ADN e da PCR são iões metálicos. De um ponto de vista arqueológico, uma fonte comum destes iões é a proximidade do esqueleto a um artefacto de metal. A presença de concentrações baixas destes compostos no solo ambiente é também uma causa comum de inibição de ADN, onde enzimas como as ADN polimerases são inibidas prejudicando as técnicas subsequentes da análise (Wilson, 1997; Matheson *et al*, 2009).

Nas ciências forenses, a prática corrente para ultrapassar a presença de inibidores nas amostras, é a diluição do produto extraído, levando também à diluição do agente inibidor, podendo resultar na obtenção de um perfil genético. Porém, esta abordagem igualmente reduz a quantidade de ADN presente, o que pode ser um problema com amostras de ADN vestigiais e antigas degradadas, podendo levar à perda do pouco material genético que há.

Apesar de existirem variadas técnicas para a optimização da extracção de ADN, o estudo de amostras vestigiais (*Low Copy Number DNA* - LCN DNA) torna-se um desafio na interpretação dos resultados. Gill *et al* (2000) definiram-nas como amostras que contêm uma quantidade de ADN genómico inferior a 100pg (picogramas). Budowle *et al* (2009) referem-se à análise de qualquer amostra que contenha menos de 200 pg de ADN. De modo a aumentar a sensibilidade dos métodos para ser possível uma análise genética destes vestígios, o método mais comum é o aumento do número de ciclos de PCR. Existem outros métodos de modo a genotipar ADN de amostras degradadas, nomeadamente, realização de *nested*-PCR, a amplificação do genoma total antes da PCR, redução do volume da PCR, usar formamida de baixa condutividade, adicionar mais produto amplificado para análise no sequenciador, aumento de tempo de injecção na electroforese capilar, entre outros. Contudo, ao tentar-se aumentar a possibilidade de obter um perfil genético com quantidades abaixo da concentração óptima de ADN leva ao aparecimento de numerosos problemas (artefactos) que podem dificultar, ou até mesmo impossibilitar, a análise de um perfil. Estes artefactos correspondem a efeitos estocásticos, os quais são: (1) alelo/*locus drop-out* quando num *locus* heterozigoto, um dos alelos é amplificado preferencialmente, levando ao desaparecimento do outro, ou até mesmo o desaparecimento do *locus* por inteiro; (2) aumento do tamanho das bandas *stutter* que podem levar a uma falsa análise de um heterozigoto, geralmente conhecidos por falsos alelos; (3) a formação de picos não balanceados pode também levar à caracterização de um falso homozigoto.

Outro problema que se prende com a análise de amostras degradadas é a presença de contaminações, podendo levar à observação de diferentes perfis após a replicação das amplificações por PCR, através de alelos *drop-in* que, na realidade, é apenas o aparecimento de alelos extra que não pertencem à amostra. As potenciais fontes de uma contaminação podem resultar: dos investigadores na cena do crime, do pessoal do laboratório, da contaminação cruzada entre amostras processadas no laboratório, ou da contaminação do material de plástico usado na técnica (Gill P, 2001; Alonso *et al*, 2003; Gill P, 2008; Mc Cartney C, 2008; Budowle *et al*, 2009).

Para minimizar sérias possibilidades de contaminação das amostras dentro do próprio laboratório, existem certas directrizes que são seguidas: (1) a extracção do ADN e a realização das reacções de PCR são realizadas numa sala de laboratório próprio; (2) o pessoal deve vestir batas de laboratório, luvas e máscaras descartáveis; (3) as bancadas de trabalho e o equipamento são lavadas frequentemente com lixívia e irradiados com luz UV; (4) a amplificação por PCR é levada a cabo numa área diferente do laboratório; e (5) são utilizados controlos negativos para controlar a presença de contaminações (Gill P, 2001; Alonso *et al*, 2003; Budowle *et al*, 2009).

1.6 Justificação do tema

Desde há muitos anos que se tem tentado escolher a melhor técnica de identificação a partir de dentes, pois em casos de extrema degradação dos tecidos biológicos, onde as amostras habitualmente utilizadas (manchas de sangue, saliva ou outros) não permitem uma correcta identificação, esta estrutura mineralizada apresenta-se como o único meio presente. Num estudo realizado previamente por Malaver e Yunis (2003), apenas obtiveram resultados da amplificação da região HVII do ADN mitocondrial na polpa, dentina e cemento. Corte-Real *et al*, 2006, apenas usou a dentina para a extracção, sendo

uma fonte valiosa de ADN para a identificação em casos forenses. Este procedimento permitiu-lhe a obtenção de perfis completos de ADN mitocondrial em todas as amostras, assim como a definição de perfis de STRs em algumas delas.

Outros estudos têm sido realizados de modo a comparar a eficiência de vários métodos de extracção de ADN, como por exemplo, Davoren *et al* em 2007 compararam dois tipos de extracção em ossos, um método baseado em sílica (fase sólida) e o outro baseado em extracção orgânica (fenol-clorofórmio). Mostraram que a técnica de fase sólida apresentou melhores resultados na tipagem de STR nucleares (1.94 ng de ADN por grama de osso) que o método de fenol-clorofórmio (0.68 ng/g). Brevnov e seus colaboradores (2009) compararam a técnica de extracção PrepFiler™ Forensic DNA com o tradicional método de extracção por fenol-clorofórmio em variadas amostras biológicas. Observaram um maior rendimento de ADN através do primeiro método.

Ludwikowska-Pawłowska *et al* em 2009, extraíram ADN de restos ósseos altamente degradados com a aplicação do QIAamp DNA Investigator kit da Qiagen, e do PrepFiler Forensic DNA extraction kit. Os autores demonstraram que o QIAamp DNA Investigator kit foi mais eficaz, conveniente e um método estatisticamente melhor.

Não se registou nenhum estudo científico que relacionasse diferentes técnicas de extracção em dentina. Sendo assim, este estudo revela ser de extrema importância pois a extracção de ADN nuclear da dentina ainda não foi profundamente abordada pelos cientistas. O estudo de kits de extracção relativamente recentes na Genética Forense (AmpFℓSTR® NGM™ e PowerPlex® ESI 17 System) também não tem sido abordado, o que nos vai poder também permitir comprovar a eficiência destes em casos de amostras em condições de extrema degradação.

A divisão da dentina de cada dente na sua parte apical e outra parte restante, vai também permitir um incremento no número de amostragem de cada dente. Este tipo de procedimento é útil, principalmente quando não existem outras amostras biológicas que sirvam de perfil de comparação, pois a multiplicidade de extracções e amplificações de uma mesma amostra poderá permitir a comparação, e posterior confirmação dos resultados.

2. Artigo Científico

Extraction of degraded DNA in dental specimens: Application to Forensic Genetics

Caroline Veloso[a], Joaquin Gamero[b,d], Ana-Teresa Corte-Real[c,d], Maria João Porto[a,d], Francisco Corte-Real[a,c,d]

[a] National Institute of Legal Medicine, Centre Branch, Forensic Genetics Service, Portugal
[b] Faculty of Medicine, University of Cadiz, Spain
[c] Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal
[d] CENCIFOR – Forensic Sciences Centre, Portugal

Abstract

Tracing the genetic profile of teeth subjected to environmental degradation often becomes a challenge. Degraded DNA is particularly difficult to extract and amplify, given its susceptibility to contamination, and its low yield of DNA. To trace the more correct genetic profile we compared two different DNA extraction and amplification methods. It was used two solid-phase extraction methods, one silica-based DNA manual extraction (QiAamp DNA Investigator Kit from Qiagen) and one automated magnetic particle-based DNA extraction technology named PrepFiler Express BTA™ (Applied Biosystems). To increase the chances of obtaining a complete profile of the samples under study, both DNA extractions methods where amplified with the next generation AmpFℓSTR® NGM™ PCR amplification kit (Applied Biosystems) (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, D2S441 and the gender determination locus Amelogenin) and the PowerPlex® ESI 17 System (Promega) (D22S1045, D2S1338, D19S433, D3S1358, Amelogenin, D2S441, D10S1248, D1S1656, D18S51, D16S539, D12S391, D21S11, vWA, TH01, SE33, FGA and D8S1179).

In some samples, complete identification was achieved, and in the remains more than 70% of the 17 markers were identified.

Introduction

The Importance of human identification

In several situations, like mass disasters and/or crime scenes, the human identification is essential to deliver the bodies to families. There are several traditional methods of forensic identification that can help to identify the victims such as fingerprints and odontological examination, but these methods require pre-existing records for comparison purposes that not always exist. Other methods that can be used in disaster victim identification (DVI) are (1) visual identification by relative or close acquaintance, (2) identification by clothing and other artefacts worn by the deceased, (3) body features such as gender, height, weight, hair color, eye color, body scars, deformities, and tattoos, (4) autopsy findings as well as previous surgical procedures or implants such as cardiac pacemakers, and finally (5) the forensic anthropology can allow an estimation of gender, ancestry, stature, build, and age. All these methods of identification provide useful knowledge to decrease the number of potential victims to connect to an individual body. However, these cannot be considered primary identification criteria.

Genetic forensics and teeth in human identification

Catastrophic situations can lead to unrecognizable bodies, even body parts can be separated from one another and the remains mixed, becoming impossible the identification of the body. In these cases, the use of traditional methods of forensic identification is difficult or impossible. Therefore, forensic scientists use DNA analysis to aid in the identification, being often the only way to identify cadavers in an advanced state of putrefaction or even skeletonized.

In cases where the body is buried the degradation of soft tissues (blood samples, muscle tissue) occurs in a short period of time. In these cases, bones and teeth are suitable samples to obtain DNA (Ohira *et al*, 2009; Kitayama *et al*, 2010) and can often survive to extreme environmental conditions. Teeth are a resistant structure and a valuable source of DNA in adverse forensic conditions because the tongue, jaws and dental enamel often protect them from external adverse factors. Its morphology and

histology contributes for the preservation of the cellular components (Gaytmenn *et al*, 2003; Corte-Real *et al*, 2008). The crown of the tooth (dentin) is covered by enamel, whereas the radicular dentin is covered by cement. Both tissues protect the inside of the tooth from external factors (Malaver and Yunis, 2003).

DNA Markers used in forensic genetics

DNA typing is a robust, consistent and reliable technique ideally apt for identifying victims of mass disasters. During the post-mortem period, DNA has a limited durability depending on several conditions. Its own protection against diverse destructive factors as well as environmental factors can contribute to a better or worst presence of intact DNA. The integrity state of DNA determines which polymorphisms can be analyzed. Short Tandem Repeats (STR) systems are the most powerful and widely used genetic marker systems in forensic genetics, being a valuable way to human identification, due to its great discriminative power and to the minimum amount of biological sample needed to its analysis. Several multiplex STR typing kits have been developed for the simultaneous amplification of up to 16 STR loci. However, STR typing is limited by the degree of DNA degradation, and the length of the PCR amplicon. DNA degradation may cause artefacts such as preferential amplification, allele and/or locus drop-out (Schneider *et al*, 2004; Bender *et al*, 2004; Dixon *et al*, 2006). In more problematic samples such as old stains or decomposed tissue, the DNA fragment is reduced to sizes smaller than 300bp. Thus the loss of genetic information may occur and the STR typing may fail due to the lack of suitable template DNA (Whitaker *et al*, 1995). These reduced-size STR amplicons can be better acquired by selecting primers which are located more closely to the repeat region thus reducing the amplicon sizes, called mini-STRs (Butler, 2009; Senge *et al*, 2011). However, these markers have the disadvantages that only a few loci can be simultaneously amplified in a multiplex reaction to avoid nonspecific primer annealing since the size aspect has been removed.

The effect of environmental factors on teeth DNA analysis

As previously mentioned, teeth can be the only way to obtain a match between a victim and a comparative sample. In several cases, the teeth can be found in extreme conditions (buried in sand or soil, burned, found in water) which leads to the degradation of sample DNA. The dental enamel makes teeth resistant to adverse environmental conditions, such as humidity, extreme temperature, and the action of fungus and bacteria. Nevertheless, the problems that forensic scientists face while working with DNA from teeth are: degradation, low quantity, contamination and presence of inhibitors (Yang *et al*, 1998; Alonso *et al*, 2001).

PCR inhibition is an especially significant problem when extracting DNA from old and ancient material. When teeth are buried in soil, humic acid can inhibit PCR, so the extraction process is essential, not only to ensure that DNA is efficiently extracted from each sample, but also to remove inhibitors which may interfere with subsequent processes (Sutlović *et al*, 2005; Phillips *et al*, 2011).

Materials and methods

Experimental conditions

Six teeth were collected by orthodontic and odontological conserving treatments from patients in a dental clinic in Cadiz. They were buried separately in sand of a beach on coastal province of Cadiz, in small plastic boxes with holes to allow contact of teeth with sand. The identity of each tooth was unknown and comparative samples were not available. These experimental conditions were extended up to 3 years and a half, allowing the dental pieces to suffer environmental degradation such as: humidity, temperature oscillations and inhibitors of soil composition.

Pre-treatment of samples

To avoid contamination, the following procedures were performed wearing protective gloves, face mask and using disposable filter tips. All surfaces and instruments were sterilized and decontaminated before use.

The main step to obtain a good profile without contamination is the proper cleaning of the outer surface of teeth. Each sample was washed in a diluted sodium hypochlorite solution (commercial bleach) for 1 minute, then was passed in distilled water and air-dried. The outer surface of teeth samples was sanded using a motor drill with a dental bur (Arkansas' bur). The entire enamel and the superficial layer of the root, the cement, were removed using a diamond cutting disc. With the same disc, teeth were fragmented transversely (Smith *et al*, 1993) exposing the pulp content, which was scraped with forceps. Each tooth was divided in two portions: the dentine of the root tip and the remaining dentine. This allowed to obtain a comparison sample of each own tooth and to increase the possibility to obtain a genetic profile. All the pieces were pulverized by cryogenic grinding using liquid nitrogen on a SPEX 6770 Freezer/Mill®. The bone powder was transferred to a 1.5mL tube and stored at -80°C until DNA extraction.

DNA Extraction from teeth powder

DNA extraction of the root and remaining dentine was performed using the manual commercial kit QIAamp® DNA Investigator (Qiagen) and the automated PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction (Applied Biosystems). To minimize the hazard of contamination, each extraction kit was used separately in different days and each part of dentine (root tip and remaining region) was extracted in different days. With these kits, DNA bonds to a substrate, such as silica, and is released after several washes which purify DNA (Butler, 2009). The procedures followed were recommended by the manufacturers for the respective extraction kits.

Negative controls were used to despite contamination.

DNA Quantification

Assessment of possible PCR inhibitors and human genomic DNA content was determined using the Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) according the manufacturer's procedures. All samples were performed in ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) and the ABI Prism 7000 SDS software v. 1.0.1.

Each real-time qPCR assay had a total volume of 12.5 µL (6.25 µL of Quantifiler PCR Reaction Mix, 5.25 µL of Quantifiler Human Primer Mix and 1 µL of extracted DNA sample). Real-time PCR amplification was carried out at 95°C – 10min, 1 cycle; 95°C – 15 s, 60°C – 1 min, 40 cycles.

Negative and positive controls (Promega 9947A DNA 10ng/µL and Applied Biosystems AmpFℓSTR® Control DNA 9947A 0.1ng/µL) were used to ensure the efficiency of real-time PCR reaction.

Beyond those that gave undetermined results, all samples that presented any quantification value were used in subsequent STR PCR.

Nuclear DNA Amplification

Amplification was performed using AmpFℓSTR® NGM™ PCR amplification kit (Applied Biosystems) and the PowerPlex® ESI 17 System (Promega). The NGM kit is a short tandem repeat (STR) multiplex assay that amplifies 14 tetranucleotide repeat loci and 1 trinucleotide repeat locus, D22S1045. The kit simultaneously co-amplifies the 10 loci contained in the AmpFℓSTR® SGM Plus® kit (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01 and FGA) together with 2 highly polymorphic STR loci (D1S1656 and D12S391), 3 mini-STR loci (D10S1248, D22S1045 and D2S441), and the gender determination locus Amelogenin. PowerPlex ESI 17 System allows co-amplification of 17 loci (16 STR loci and Amelogenin), including D22S1045, D2S1338, D19S433, D3S1358, Amelogenin, D2S441, D10S1248, D1S1656, D18S51, D16S539, D12S391, D21S11, vWA, TH01, SE33, FGA and D8S1179. This kit was developed to meet the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and

the European DNA Profiling (EDNAP) Group recommendations for increasing the number of STR loci included in the European Standard Set (ESS) (Hill *et al*, 2011).

The use of these two amplification kits allows the comparison of results between the same samples because all the 15 markers present in NGM kit are also in PowerPlex system.

The amplification with AmpFℓSTR® NGM™ PCR kit was performed with reaction mixtures consisting ideally of 1.0 ng/µL (using up to 10 µL of sample) of DNA, 10 µL of AmpFlSTR® NGM™ Master Mix, 5 µL of AmpFlSTR® NGM™ Primer Set, and sterile distilled water (if necessary) to complete a total volume reaction of 25 µL. With the PowerPlex® ESI 17 System the ideal amplification conditions were 0.1 ng/µL (up to 17.5 µL) of DNA, 5 µL of PowerPlex® ESI 5X Master Mix, 2.5 µL of PowerPlex® ESI 17 10X Primer Pair Mix, and sterile distilled water (if necessary) to complete a total volume reaction of 25 µL.

In several samples, the 1.0 ng/µL or 0.1 ng/µL of DNA (AmpFℓSTR® NGM™ PCR kit and PowerPlex® ESI 17 System respectively) was not introduced in reaction mixtures due to the low amount of DNA present in these cases.

Thermal cycling was conducted on a GeneAmp® PCR System 9700 with the following conditions to NGM kit: 95°C – 11min, 1 cycle; 94°C – 20 s, 59°C – 3 min, 29 cycles; 60°C – 10 min, 1 cycle; 4°C – soak. To the PowerPlex kit the conditions were: 96°C – 2 min, 1 cycle; 94°C – 30 s, 59°C – 2 min, 72°C – 90 s, 30 cycles; 60°C – 45 min, 1 cycle; 4°C – soak.

Negative controls were used to despite contamination.

Electrophoresis and Data Analysis

Following PCR amplification, capillary electrophoresis of NGM amplification samples was carried out on ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using Data Collection v.3.0 software, POP-6™ polymer, a 36 cm capillary array and an injection time of 20 sec. 3 µL of each sample was diluted in 12 µL of Hi-Di Formamide and 0.5 µL of GeneScan 500 LIZ Internal Size Standard. Data analysis was performed using the Gene Mapper® ID v.3.2, and the minimal peak height threshold for analysis was 50 rfu.

PowerPlex amplification samples (and some NGM samples) were run in ABI Prism® 3500 Analyzer using 3500 Data Collection Software, POP-4™ and time of injection was 10 sec. In this case, 3 µL of each sample was diluted in 10 µL of Hi-Di Formamide and 0.5 µL of CC5 ILS 500 Size Standard. GeneMapper® *ID*-X Software, Version 1.2, was used for data analysis, and the minimal peak height threshold for analysis was 150 rfu.

Allelic ladders used were provided by the manufacturers.

Results

DNA quantification of the six samples can be seen in table 1. The various values are observed for each extraction method and for each region of the tooth in which was divided.

Table 1. Quantifications from DNA extraction.

	Sample	Quantification (ng/µL)	Mean	Total Mean
Remaining Region with QIAamp	122	0.0053	0.00348	0.01746
	123	0.0017		
	124	0.0055		
	126	0.0008		
	127	0.0041		
	129	Undetermined		
Root Tip with QIAamp	122	0.1237	0.03144	
	123	0.0033		
	124	0.0118		
	126	0.0134		
	127	Lost in grinding		
	129	0.0050		
Remaining Region with PrepFiler	122	0.0234	0.0182	0.01588
	123	0.0037		
	124	0.0416		
	126	0.0006		
	127	0.0217		
	129	Undetermined		
Root Tip with PrepFiler	122	0.0416	0.01356	
	123	0.0012		
	124	0.0079		
	126	0.0120		
	127	Lost in grinding		
	129	0.0051		

In three of the six samples it was obtained full DNA profiles (table 2). In the others were obtained partial profiles with more than 12 markers.

Table 2. Profiles obtained from each DNA extraction and each PCR amplification from booth teeth region.

Sample	QIAamp Profile	loci obtained by QIAamp		PrepFiler Profile	loci obtained by PrepFiler		Total Profile
		AmpFℓSTR® NGM™	PowerPlex® ESI 17		AmpFℓSTR® NGM™	PowerPlex® ESI 17	
122	complete	16/16	16/17	complete	16/16	17/17	complete
123	partial	12/16	8/17	partial	10/16	13/17	partial: 14/17
124	complete	12/16	17/17	complete	16/16	16/17	complete
126	partial	13/16	14/17	complete	16/16	17/17	complete
127	partial	0/16	8/17	partial	11/16	8/17	partial: 12/17
129	complete	16/16	16/17	complete	15/16	17/17	complete

Discussion

Extraction methods for degraded DNA should maximize the yield of recovered DNA and minimize the presence of PCR inhibitors. The QIAamp DNA Investigator Kit uses well-established technology for purification of genomic DNA from small sample volumes or sizes. The procedure is designed to ensure that there is no sample-to-sample cross-contamination. Compared to ancient DNA extraction methods this silica method has several advantages, such as (1) quick and easy to perform, (2) simple to implement, and (3) efficient to remove PCR inhibitors (Rohland and Hofreiter, 2007). The PrepFiler™ Express BTA™ Kit contains reagents and plastics needed for (1) lysis of cells, (2) binding of the DNA to the magnetic particles, (3) removal of PCR inhibitors, (4) release of bound DNA (Brevnov *et al*, 2009) and (5) automated DNA extraction and purification with the AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems). This system allows automated, fast, and reliable DNA extraction since is a closed system, reducing the sample handling from forensic expert and minimizes the risk of contamination and transposition errors (Brevnov *et al*, 2009). These vantages led the National Institute of Legal Medicine (Centre Branch, Forensic Genetics Service, Portugal) to use these methods of DNA extraction.

As Corte-Real *et al*, 2006, we used only the dentine to extract DNA, being a valuable source of DNA for identification in forensic case works. In a previous study made by Malaver and Yunis (2003), they only obtained results of the amplification of the HVII region of the mitochondrial DNA in pulp, dentin and cement. Our results (showed in table 1) demonstrate that we obtained some reasonable values of quantification (since 0.0006 ng/µL to 0.1237 ng/µL).

Gaytmenn and his collaborators (2003), collected human teeth without inferring them any kind of extreme environmental conditions. They indicate a broad person-to-person variation in DNA yield from the different tooth regions, suggesting that the number of DNA containing cells in teeth, and the different regions, differs significantly between people. In our case, the quantification results were homogeneous even if more samples would need to be tested to ensure the veracity of results. The fact that we have inferred them environmental insults is an advantage since it can represent better the reality.

The NGM™ kit has a greater power of discrimination, enhanced sensitivity and improved robustness than earlier generation kits of Applied Biosystems as we can see in AmpFlSTR® NGM™ PCR Amplification Kit User's Guide. For samples that have a low amount of DNA or may possibly be contaminated with external DNA, this kit is able to generate more consistent and often elucidate more complex mixtures. The presence of a high concentration of loci in the low molecular weight region of the profile improves performance on severely degraded samples. In our results, we obtained a good partial profile in sample 123 (e.g.), which presented quantifications values (table 1) below the kit recommendations (< 1.0 ng of DNA). The PowerPlex® ESI 17 System amplifies the same loci as the NGM™ kit, but with the addition of a primer pair for the SE33 locus. The use of these two kits is due to have a method of comparison for each sample in order to confirm all results. The presence of mini-STRs in the two kits increase the mean number of genotyped loci in these degraded samples, as Lee *et al* (2010) have seen. On other hand, loci that have higher molecular weight in NGM™ kit (and therefore often are not size-called due to degradation) appears in PowerPlex® ESI 17 as markers of lower molecular weight. This allowed us to obtain a greater number of genotyped markers in each studied sample. We can visualize an example through

sample 127 in table 2. It was genotyped 12 loci with the cross-results of the common alleles obtained from the two PCRs per extraction.

In general, there were no significant differences between the numbers of identified polymorphisms obtained from the two extraction methods. As it could be saw in table 2 the number of loci obtained by QIAamp method were similar from those obtained by PrepFiler™ Express BTA™ in all samples. Compared to the manual QIAamp method (around 90 minutes to perform 6 samples), PrepFiler™ Express BTA™ was easier to use and performed faster the extraction (around 30 minutes up to 12 samples).

After the analysis and cross-results of all profiles obtained from each sample, the loci that presented none or more than two alleles were considered doubtful. Certain loci that had one not-well defined allele and it was not present in all results, were also considered doubtful. These results can be due to the presence of PCR inhibitors that were not eliminated in DNA purification. In DNA extracted directly from soil, the main inhibitor is humic acid which can be co-extracted with DNA (Tsai and Olson, 1991; Tebbe and Vahjen, 1993; Sutlović *et al*, 2005). Sand, where teeth were buried, has little humic acid. The hypothesis of the presence of inhibitors in samples is not valid, since the Internal Positive Control (IPC) in PCR quantification showed values that indicated their absence (IPC<30).

The presence of doubtful loci may also be due to stochastic effects. These effects are the consequence of the extremely low amounts of DNA (low-template-DNA) that the technique is claimed to amplify. Mc Cartney in 2008, wrote that the increase of PCR cycle number can provide a DNA profile from forensic samples. From the outset, difficulties with the low level DNA technique were reported, including concerns about the increased risks of contamination, about allelic drop-put and drop-in as well as artefacts. Such phenomena can lead to false positives: adventitious matches with innocent individuals. In our samples, even without increasing the number of PCR cycles, we obtained stochastic effects probably because the amounts of DNA used were below those recommended in the amplification kits. In several cases (table 1) the reached amount of DNA was very low (e.g. 0.0006 ng/µL, 0.0008 ng/µL, 0.0012 ng/µL), being impossible to achieve the recommended quantity in PCR amplification kits.

The contamination, referred to as allele drop-in, can be by external DNA or cross-contamination among samples. In this study, negative control from manual QIAamp extraction of the remaining region of teeth appears with contamination. In PCR amplification with PowerPlex® ESI 17, negative control showed a partial profile that did not match with any profile of experts working in the lab. These two contaminations were not significant when we traced the genetic profiles of the samples. The fact that they have been extracted and amplified with two different methods in each region of teeth, allowed the crossing and the confirmation of the data.

Alaeddini *et al*, 2010 said that allelic drop-out is a common event in heterozygote individuals, when one of the two alleles fails to amplify properly. This phenomenon may be reduced with the utilization of mini-STRs as we can see in profiles obtained by AmpFℓSTR® NGM™ and PowerPlex® ESI 17 System (table 2) where the loci achieved with one of the kits are not always in the same number with those achieved by the other kit (e.g. sample 123). This is due because one marker can be an STR in NGM™ kit and a mini-STR in PowerPlex® ESI 17 (e.g. D8S51 and D22S1045).

Other artefacts such as stutter products and heterozygote peak imbalance can occur in the analysis of low-template DNA (Butler, 2009).

Conclusions

Our study compared results between extraction methodology and commercial amplification kits which are relatively recent in forensic genetics.

Many times, the absence of reference samples may be a challenge. The fact of extract and amplify DNA from teeth with two different methods, can help to establish a positive identification by crossing data, contributing to high success rates in solving forensic cases.

Dividing teeth in several portions we can increase the probability of obtaining a complete profile of each sample.

The use of two commercial amplification kits with the same markers but located in different positions (dissimilar sizes of amplification) provides a confirmation and an increase in results.

Our results were satisfactory whereas complete identification was achieved in four of six samples. The other two were genotyped in at least twelve of the 17 markers studied.

To make a firm conclusion, more samples would need to be tested.

References

Alaeddini R, Walsh S, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA – A review. Forensic Sci. Int.: Genet. 4 (2010) 148-157.

Alonso A, Andelinović Š, Martin P, Sutlović D, Erceg I, Huffine E, *et al*. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. Croat Med J. (2001) 42:260-6.

Alshamali F, Bfandstätter A, Zimmermann B, Parson W. Mitochondrial DNA control region variation in Dubai, United Arab Emirates. Forensic Sci. Int.: Genet. 2 (2008) e9-e10.

Bath HK, Epelboym I. Quantitative analysis of total mitochondrial DNA: competitive polymerase chain reaction versus real-time polymerase chain reaction. J Biochem Mol Toxicol. Volume 18 (2004) No. 4.

Bender K, Farfan MJ, Schneider PM. Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. Forensic Sci Int (2004) 139:135-40.

Bradford L, Heal J, Anderson J, *et al*. Disaster victim investigation recommendations from two simulated mass disaster scenarios utilized for user acceptance testing CODIS 6.0. Forensic Sci Int: Genet.5 (2011) 291-296.

Brevnov, MG, Pawar, HS, Mundt, J, *et al*. Developmental validation of the PrepFiler™ forensic DNA extraction kit for extraction of genomic DNA from biological samples. J Forensic Sci, May 2009, Vol. 54, No.3.

Butler JM. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Elsevier Academy Press, 2009.

Cardoso S, Zarrabeitia MT, Valverde L, Odriozola A, Alfonso-Sanchéz MÁ, de Pancorbo MM. Variability of the entire mitochondrial DNA control region in a human isolate from the Pas Valley (northern Spain). J Forensic Sci. Sep 2010; 55(5):1196-201.

Corte-Real A, Andrade L, Anjos MJ, Carvalho M, Vide MC, Corte-Real F, Vieira DN. The DNA extraction from the pulp dentine complexo f both with and without carious. Int Congress Series 1288 (2006) 710-712.

Corte-Real AT, Anjos MJ, Andrade L, *et al*. Genetic identification in endodontic treated tooth root. Forensic Sci. Int.: Genet. Supplement Series 1 (2008) 457-458.

Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD, et al. Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs – results of a collaborative European (EDNAP) exercise. Forensic Sci. Int. (2006) 164:33-44.

Gaytmenn R. *et al.* Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. J Forensic Sci (2003) Vol.48, No. 3.

Hill CR, Duewer DL, Kline MC, *et al*. Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex® ESX 17 and ESI 17 systems. Forensic Sci. Int.: Genet.5 (2011) 269-275.

Kitayama T, Ogawa Y, Fujii K, *et al*. Evaluation of a new experimental kit for the extraction DNA from bones and teeth using a non-powder method, Leg Med 12 (2010) 84-89.

Malaver PC, Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. Croat Med J. (2003) 44(3):306-9.

McCartney, C. LCN DNA: proof beyond reasonable doubt. Nature Rev. Genet. 9 (2008) 325.

Ohira H, Yamamuro Y, Kitagawa Y, Nakagawa K, *et al*. Effective appropriate use of dental remains and forensic DNA testing for personal identity confirmation. Leg Med 11 (2009) S560-S562.

Phillips K, McCallum N, Welch L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA investigator kit (manual and automated). Forensic Sci Int: Genet. (2011), doi:10.1016/j.fsigen.2011.04.018.

Rohland N, Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. Biotechniques 42 (2007) 343-352.

Schneider PM, Bender K, Mayr WR, *et al*. STR analysis of artificially degraded DNA – results of a collaborative European exercise. Forensic Sci. Int. 139 (2004) 123-134.

Senge T, Madea B, Junge A, *et al*. STRs, mini STRs and SNPs – A comparative study for typing degraded DNA. Leg. Med. 13 (2011) 68-74.

Smith BC *et al*. A systematic approach to the sampling of dental DNA. J. Forensic Sci. 38 (5) (1993) 1194-1209.

Sutlović D, Gojanović MD, Andelinović S *et al*. Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. Croat Med J. (2005) 46(4):556-562.

Tebbe C, Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. Appl. Environ. Microbiol. Vol 59, No. 8 (1993) 2657-2665.

Tsai Y, Olson BH. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol. Vol 57, No. 4 (1991) 1070-1074.

Whitaker JP, Clayton TM, Urquhart AJ, Millican ES, Downes TJ, Kimpton CP, Gill P, Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples, Biotechniques 18 (1995) 670-677.

Wiesner R, Rüegg J, Morano I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. Biochem Biophys Res Commun (1992) 183:553-559.

Yang DY, Eng B, Waye JS, Dudar JC, Saundersi SR. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. Am. J. Phys. Anthropol (1998) 105:539-543.

Conclusões

O nosso estudo comparou resultados entre diferentes métodos de extracção de ADN e diferentes kits de amplificação.

O facto de se extrair e amplificar ADN de dentes através de dois métodos diferentes pode ajudar no estabelecimento de uma identificação genética positiva pelo cruzamento dos dados. Isto contribui para o aumento da taxa de sucesso na resolução de casos forenses.

O uso de dois kits comerciais de amplificação com os mesmos marcadores genéticos, mas localizados em posições diferentes (diferentes tamanhos de amplificação), proporciona uma confirmação dos resultados, na medida em que, certos marcadores de maior tamanho num dos kits (que não consigam ser amplificados por estarem degradados) possam apresentar um menor tamanho no outro, e aí conseguirem ser amplificados e genotipados.

Os nossos resultados foram satisfatórios visto que foram obtidas identificações completas em quatro das seis amostras estudadas. As outras duas foram genotipadas em pelo menos doze dos dezassete marcadores estudados.

Para podermos inferir conclusões mais firmes, o número da amostragem a ser estudada teria de ser maior.

Referências

Alaeddini R, Walsh S, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA – A review. Forensic Sci. Int.: Genet. 4 (2010) 148-157.

Alonso A, Martín P, Albarrán C, García P, *et al*. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. Croat Med J. (2003) 44(3):273-280.

Alonso A, Andelinović Š, Martin P, Sutlović D, Erceg I, Huffine E, *et al*. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. Croat Med J. 2001;42:260-6.

Alshamali F, Bfandstätter A, Zimmermann B, Parson W. Mitochondrial DNA control region variation in Dubai, United Arab Emirates. Forensic Sci. Int.: Genet. 2 (2008) e9-e10.

Bender K, Farfan MJ, Schneider PM. Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. Forensic Sci Int 2004; 139:135-40.

Brevnov MG, Pawar HS, Mundt J, *et al*. Developmental validation of the PrepFiler™ forensic DNA extraction kit for extraction of genomic DNA from biological samples. J Forensic Sci, May 2009, Vol. 54, No.3.

Budowle B, Elsenberg A J, Daal AV. Validity of low copy number typing and applications to forensic science. Croat Med J. (2009) 207-217. Doi: 10.3325%cmj.2009.50.207.

Butler JM, Fundamentals of Forensic DNA Typing. Elsevier Academy Press, 2009.

Cardoso S, Zarrabeitia MT, Valverde L, Odriozola A, Alfonso-Sanchéz MÁ, de Pancorbo MM. Variability of the entire mitochondrial DNA control region in a

human isolate from the Pas Valley (northern Spain). J Forensic Sci. 2010 Sep; 55(5):1196-201.

Corte-Real A, Andrade L, Anjos MJ, Carvalho M, Vide MC, Corte-Real F, Vieira DN. The DNA extraction from the pulp dentine complexo f both with and without carious. Int Congress Series 1288 (2006) 710-712.

Corte-Real AT, Anjos MJ, Andrade L, *et al*. Genetic identification in endodontic treated tooth root. Forensic Sci. Int.: Genet. Supplement Series 1 (2008) 457-458.

Courts C, Madea B. Full STR profile of a 67-year-old-bone found in a fresh water lake. J Forensic Sci (2011) Vol.56, No.S1.

Davoren J, Vanek D, Konjhodzic R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. Croat Med J. (2007) 48:478-85.

Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD, et al. Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs – results of a collaborative European (EDNAP) exercise. Forensic Sci. Int. 2006;164:33-44.

Garcia AA, Muñoz I, Pestoni C, Lareu MV, Rodríguez-Calvo MS, Carracedo A. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. Int J Legal Med (1996) 109: 125-129.

Gaytmenn R, *et al.* Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. J Forensic Sci (2003) Vol.48, No. 3.

Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. Forensic Sci Int. (2000) 112: 17-40.

Gill P. Application of low copy number DNA profiling. Croat Med J. (2001) 42(3):229-232.

Gill P. LCN DNA: a proof beyond reasonable doubt? – a response. Nature Rev. Genet. (2008).

Hartman LJ, Coyne SR, Norwood A. Development of a novel internal positive control for Taqman® based assays. Mol Cell Probes 19 (2005) 51-59.

Kaiser C, Bachmeier B, Conrad C *et al*. Molecular study of time dependent changes in DNA stability in soil buried skeletal residues. Forensic Sci Int 177 (2008) 32-36.

Kitayama T, Ogawa Y, Fujii K, *et al*. Evaluation of a new experimental kit for the extraction DNA from bones and teeth using a non-powder method, Leg Med 12 (2010) 84-89.

Ludwikowska-Pawłowska M, Jacewicz R, Jedrzejczyk M, Prośniak A, Berent J. Application of the QIAamp DNA Investigator Kit and Prepfiler Forensic DNA Extraction Kit in genomic DNA extraction from skeletal remains. Arch Med Sadowej Kryminol. (2009) 59(4):289-94.

Malaver PC, Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. Croat Med J. (2003) 44(3):306-9.

Manjunath BC, Chandrashekar BR, Mahesh M, Vatchala Rani RM. DNA profiling and forensic dentistry – A review of the recent concepts and trends. J Forensic Sci and Leg Med 18 (2011) 191-197.

Matheson CD, Marion TE, Hayter S, *et al*. Technical note : Removal of metal ion inhibition encountered during DNA extraction and amplification of copper-preserved archaeological bone using size exclusion chromatography. Am J Phys Anthropol. 140 (2009) 384-391.

McCartney C. LCN DNA: proof beyond reasonable doubt. Nature Rev. Genet. 9, 325, 2008.

Mörnstad H, Pfeiffer H, Yoon C, Teivens A. Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. Int J Legal Med. 1999;112(2):98-100.

Ohira H, Yamamuro Y, Kitagawa Y, Nakagawa K, *et al*. Effective appropriate use of dental remains and forensic DNA testing for personal identity confirmation. Leg Med 11 (2009) S560-S562.

Pötsch L, Meyer U, Rothschild S, *et al*. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. Int J Leg Med (1992) 105:139-143.

Schneider PM, Bender K, Mayr WR, *et al*. STR analysis of artificially degraded DNA – results of a collaborative European exercise. Forensic Sci. Int. 139 (2004) 123-134.

Senge T, Madea B, Junge A, *et al*. STRs, mini STRs and SNPs – A comparative study for typing degraded DNA. Leg Med. 13 (2011) 68-74.

Smith BC *et al*., A systematic approach to the sampling of dental DNA. J. Forensic Sci. 38 (5) (1993) 1194-1209.

Sutlović D, Gojanović MD, Andelinović S *et al*. Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. Croat Med J. (2005) 46(4):556-562.

Tebbe C, Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. Appl. Environ. Microbiol. Vol 59, No. 8 (1993) 2657-2665.

Ten Cate AR. Oral histology - development, structure and function. 3rd ed. Copyright © 1989 by the C.V. Mosby Company.

Whitaker JP, Clayton TM, Urquhart AJ, Millican ES, Downes TJ, Kimpton CP, Gill P, Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples, Biotechniques 18 (1995) 670-677.

Wiesner R, Rüegg J, Morano I. 1992. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. Biochem Biophys Res Commun 183:553-559.

Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 63 (1997) 3741-3751.

Woodward SR, King MJ, Chiu NM, *et al*. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. PCR Methods Appl (1994) 3:244-247.