



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Fernanda Carvalho Santos

**Caracterização molecular e estrutural de tecido ósseo humano
exposto à água de rio**

Rio de Janeiro

2018

Fernanda Carvalho dos Santos

Caracterização molecular e estrutural de tecido ósseo exposto à água de rio

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof. Dra. Dayse Aparecida da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S232 Santos, Fernanda Carvalho.
Caracterização molecular e estrutural de tecido ósseo humano exposto à
água de rio / Fernanda Carvalho Santos. – 2018.
84 f.

Orientadora: Dayse Aparecida da Silva
Coorientador: Elizeu Fagundes de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Genética de população humana – Teses. 2. Genética forense - Teses. 3.
Genoma humano - Teses. 4. Osso e Ossos. I. Silva, Dayse Aparecida da. II.
Carvalho, Elizeu Fagundes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 575.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Fernanda Carvalho Santos

Caracterização molecular e estrutural de tecido ósseo humano exposto à água de rio

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 2 de agosto de 2018.

Orientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dra. Beatriz Grosso Fleury

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

À CAPES, Ministério da Defesa e CEDAE-RJ, sem eles não conseguiríamos implementar este projeto.

À minha orientadora Dayse Aparecida da Silva por ter me dado a oportunidade deste projeto, me dando todo apoio necessário para realização do mesmo. Todos do Laboratório de Diagnóstico por DNA, em especial à Holyene, Pablo e Yasmin, que me forneceram toda a ajuda necessária para que esse trabalho fosse realizado.

Aos doutores Luiz Fernando, Rodrigo Stephanni e Lenize Maia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, e aos seus alunos, em especial ao Igor, por todo auxílio que me foi prestado durante as fases do projeto realizadas em parceria. Sem a colaboração de todos, não obteríamos resultados tão preciosos.

Aos meus pais, Vania e João Simões, e meu irmão João Gabriel, por estarem presentes em todos os momentos e sempre me auxiliar neste longo trajeto.

Ao meu namorado Oberdan que passou tantas noites em claros me auxiliando na criação deste projeto.

RESUMO

SANTOS, Fernanda Carvalho. **Caracterização molecular e estrutural de tecido ósseo humano exposto à água de rio**. 2018. 84f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A identificação de restos mortais a partir de tecido ósseo pode ser realizada com o uso de ferramentas de diferentes campos da Ciência Forense, sendo a Genética a mais avançada. O uso do DNA em casos forense possui uma grande importância em processos criminais e estudos voltados para o aprimoramento das técnicas existentes ainda são necessários no caso de ossos. Restos esqueletizados são frequentemente encontrados nos cenários de crimes, das guerras e das grandes catástrofes, envolvendo civis e militares, inclusive em ambientes aquáticos ou similares, sendo alvo de emprego de metodologias moleculares. Entretanto, estudos demonstram dificuldades em gerar perfis genéticos dessas amostras, visando sua identificação. O objetivo foi identificar alterações em amostras de tecido ósseo, sob em água do rio, em nível estrutural e genético, que possam corroborar para o melhor conhecimento da análise forense a partir dessas amostras. Para isto, foi utilizado amostras de fragmentos ósseos do acervo do Laboratório de Diagnóstico por DNA (UERJ). As amostras foram expostas à água de rio durante 30, 60 e 90 dias. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDS) e espectroscopia de Raman foram realizadas para avaliar a condição estrutural da amostra. Análise quantitativa da molécula de Ácido Deoxinucleico (DNA) preparadas das amostras foram realizadas por amplificação quantitativa por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Foi identificado alterações morfológicas presentes, principalmente, nos ossos corticais e trabeculares. Modificações iônicas foram observadas, primordialmente na superfície externa e na porção trabecular dos ossos, com presença da diminuição da porcentagem dos componentes principais e aumento de elementos, como Manganês, Ferro, Alumínio e Silício. Os resultados da quantificação por qPCR demonstraram não haver diferença significativa entre as quantidades de DNA em função da exposição ambiental nem do tempo estudado. De modo semelhante, a análise dos géis de agarose permitiu inferir que não houve redução significativa da qualidade do DNA mitocondrial (DNAMt) em função da exposição ambiental e do tempo estudado. Apenas íons positivos foram encontrados. Esses íons podem alterar a conformação do DNA e interferir no processo de anelamento de primers na PCR, o que pode diminuir a eficiência do processo de amplificação e interferir na qualidade do perfil genético gerado. Entretanto, são necessários estudos voltados diretamente para a estrutura do DNA para confirmação da nossa hipótese.

Palavras-chave: DNA. Forense. Ossos. Rio.

ABSTRACT

SANTOS, Fernanda Carvalho. **Molecular and structure characterization of bone tissue exposed to river water** 2018. 84f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Different subjects of Forensic Science are usually used in human remains identification and Forensic Genetic is the most advanced. This use is related for the force of DNA in the courts, been necessary more studies focus in skeletal cases. Skeletal Remains are common found in forensic scenarios, wars and wide catastrophes, involving military and civil persons, in aquatic environments or near to. In all cases DNA it's the most important tool for identify them. However, published articles shows difficulty in generate genetic profile from this individual and, then, identify yours bodies. Here the objective is identified changes in bones samples immersed, in structure and genetics levels, for increasing the knowledge in similar cases. Was used bones fragments from Diagnostics Laboratory by DNA (UERJ) exposed to river water for 30. 60 and 90 days. For structure analysis was used SEM-EDS and Raman Spectroscopy Quantitative PCR and Agarose Gel was performed for genetic knowledge. Was observed morphologic modifications in both cortical and trabecular bones. Change in ionic composition was observed more strongly in external surface and trabecular bone, with, less percentage in fundamentals components and in increasing in elements like Manganese, Iron, Aluminum and Silicon. DNA quantity have no changes in the experiment time. Only positive ions were founded in our analyses. Quantification results shows no significant differences in DNA quantity between control and exposed samples. Agarose Gel deduce no changes in quality of mitochondrial DNA in our experiment time. This contributes for hypotheses that ions and DNA interaction occur and, because of that, changes in chemical structural are triggered. This interaction can interfere in the annealing process in PCR, when less primers annealing to the DNA tape and make the amplification series. For future, new analysis focus in DNA structure will be necessary for confirmed the hypothesis.

Keywords: DNA. Forensic. Bones. River.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação da organização celular do tecido ósseo.....	14
Figura 2 –	Esquema estrutural do ósseo	16
Figura 3 –	Estrutura da molécula de DNA.....	19
Figura 4 –	Mapa da localização da Elevatória Lameirão a montante da ETA Guandu.....	28
Figura 5 –	Bacia hidrográfica do rio Guandu com indicação da localização da coleta (Elevatória Lameirão - ETA Guandu.....	29
Figura 6 –	Imagem de satélite da Elevatória Lameirão a montante da ETA Guandu - Seropédica.....	29
Figura 7 –	Fotografia do experimento teste para fixação de argolas de plástico, simulando fragmentos ósseos.....	31
Figura 8 –	Fotografia de corte transversal de fêmur (região diafisária) de osso humano de duas das amostras.....	32
Figura 9 –	Fotografias dos fragmentos ósseos na estrutura de fixação antes da ancoragem no rio (esquerda) e após 30 dias de ancoragem (direita).....	33
Figura 10 –	Fotografias de fragmento ósseo separado para as análises físico-químicas (esquerda) e esquema das áreas estudadas (direita).....	34
Figura 11 –	Esquema MEV /EDS.....	35
Figura 12 -	Fotografia do sistema de pulverização Freezer/Mill 6750.....	38
Figura 13 –	Esquema do pulverizador Freezer / Mill 6770 (similar ao 6750).....	38
Figura 14 –	Fotografia ilustrativa do KIT MAXWELL® 16 CELL DNA PURIFICATION.....	40
Figura 15 –	Esquema ilustrativo da qPCR.....	42
Figura 16 –	Fotografias por MEV da amostra 340.....	45
Figura 17 –	Fotografia por MEV da amostra 359.....	46
Figura 18 –	Fotografia por MEV da amostra 430.....	47
Figura 19 –	Fotografia por MEV da amostra 448.....	48
Figura 20 –	Fotografia por MEV da amostra 565.....	49
Figura 21 –	Fotografias por MEV da amostra 658.....	50
Figura 22 –	Fotografia por MEV da amostra 663. Aumento 100x.....	51

Figura 23 – Fotografia por MEV da amostra 679. Aumento 100x.....	52
Figura 24 – Espectros da amostra 340.....	54
Figura 25 – Espectros da amostra 359.....	55
Figura 26 – Espectros da amostra 430.....	56
Figura 27 – Espectros da amostra 448.....	57
Figura 28 – Espectros da amostra 565.....	58
Figura 29 – Espectros da amostra 658.....	59
Figura 30 – Espectros da amostra 663.....	60
Figura 31 – Espectros da amostra 679.....	61
Figura 32 – Gráficos de variações dos componentes iônicos nas amostras.....	64
Figura 33 – Gráfico das variações iônica no ambiente.....	67
Figura 34 – Gráfico de variação da quantidade de DNA nas amostras.....	68
Figura 35 - Eletroforese em gel de agarose.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Protocolo da programação de pulverização no equipamento Freezer/Mill 6750.....	13
Quadro 2 –	Protocolo de Extração com Plataforma Maxwell®.....	39
Quadro 3 –	Programação da ciclagem na PCR.....	39
Quadro 4 –	Resultado da análise por EDS.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEDAE	Companhia Estadual de Águas e Esgoto do Rio de Janeiro
CEP/HUPE	Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDS	<i>Energy- Dyspersive- X- rays Spectrometer</i>
ETA	Estação de Tratamento de Água
Ext	Externo
FBI	<i>Federal Bureau of Investigation</i>
HA	Hidroxiapatita
LDD	Laboratório de Diagnóstico por DNA
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Nº	Número
OCP	Octocalcio Fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PK	Proteinase K
POP	Protocolo Operacional Padrão
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RJ	Rio de Janeiro
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
TJRJ	Tribunal de Justiça do Rio de Janeiro
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°C	grau Celsius
v	estado vibracional
Al	Alumínio
Ca	Cálcio
cm	centímetros
Fe	Ferro
g	Gramas
km	quilômetro
l	Litro
m^3/s	metros cúbicos por segundo
Mg	Magnésio
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
Mn	Manganês
Na	Sódio
nm	nanômetro
O	Oxigênio
(OH)	grupo hidroxila
P	Fósforo
(PO_4)	grupo fosfato
Si	Silício
x g	tempo gravitacional
μg	micrograma
μl	microlitro
μM	micromolar

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	12
1	OBJETIVOS	25
1.1	Objetivos Específicos.....	25
2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	Seleção do macroambiente aquático a ser estudado.....	26
2.2	Local do experimento.....	26
2.3	Separação das amostras.....	30
2.4	Fase experimental	31
2.5	Preparação das amostras ósseas para o experimento de ancoragem no rio ..	31
2.6	Ancoragem das amostras no rio.....	32
2.7	Limpeza das amostras pós-ancoragem.....	33
2.8	Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raio X por Dispersão em Energia (MEV/EDS.....	34
2.9	Espectroscopia de Raman.....	36
2.10	Pulverização dos fragmentos ósseos com Freezer/ Mill.....	37
2.11	Extração de DNA com Maxwell®.....	39
2.12	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	41
2.13	PCR em tempo real.....	42
3	RESULTADOS	43
3.1	Análise das amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	43
3.2	Análise das amostras por Espectroscopia de Raman.....	53
3.3	Avaliação das amostras por Espectroscopia de Raio X por Dispersão em Energia (EDS).....	62
3.4	Avaliação da quantidade de DNA em amostras de osso por qPCR.....	68
3.5	Amplificação por Reação em cadeia da polimerase (PCR) de DNA Mitochondrial.....	68
4	DISCUSSÃO	70
	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	ANEXO A – Artigo publicado.....	82
	ANEXO B -. Aprovação do Comitê de Ética.....	84

INTRODUÇÃO

As catástrofes da humanidade, incluindo grandes conflitos, a exemplo da Guerra na Síria iniciada em 2011, desastres em massa provocado pela queda de aviões como o MH17 da Malaisian Airline em 2014, dentre outros podem resultar no desaparecimento de muitos indivíduos, sendo a morte dos mesmos um elemento provável.

O encontro dos restos mortais e seu reconhecimento representam tarefas de extrema importância das ações governamentais no sentido que atende um preceito legal, com a confirmação fidedigna do óbito de um indivíduo (Diário Oficial, 2016) e atendendo também, um preceito humanitário, de ordem ética e social, à medida que responde às necessidades de parcela da sociedade, caracterizada pelos familiares enlutados (CICV,2009).

A identificação é um processo que pode envolver um ou mais meios, desde os mais elementares como o reconhecimento visual, associado ou não à identificação de pertences pessoais até a utilização de meios científicos (Delabarde e Ludes, 2010). Em relação aos métodos científicos, a de se destacar os procedimentos clássicos empregados na medicina legal como a comparação das radiografias dentárias e das impressões digitais antes e post mortem, além da comparação de exames físicos e médicos, incluindo radiografias ósseas, implantes cirúrgicos e próteses (Bamber *et al*, 2014).

A esqueletização é a fase final da decomposição de restos mortais (Heaton *et al.*, 2010). Portanto, em situações em que os corpos sofrem uma rápida decomposição ou estão desaparecidos por longo tempo, o osso é a única evidência encontrada, o que torna esse tecido foco de estudos e emprego de técnicas forenses. Duas características primordiais deste sistema estão interligadas e justificam essa ênfase. A primeira é que os ossos longos são alvos de cálculos biométricos que permitem a identificação de sexo, altura e idade do indivíduo. Nesses casos, pode-se buscar o auxílio dos conhecimentos oriundos da Antropologia Forense como forma de se buscar informações que auxiliem no processo de identificação. A segunda, os ossos perdem apenas para o sistema tegumentar em relação a extensão no corpo humano e suas células, principalmente os osteócitos, são ricos em mitocôndrias. Esta característica é alvo de estudos genéticos voltados ao DNA mitocondrial, que permite relacionar um corpo encontrado a uma linhagem familiar, direcionando com isso a investigação de desaparecidos e, em alguns casos, até mesmo a identificação.

Caracterização do tecido ósseo

São encontrados quatro tipos celulares no tecido ósseo: osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e células de linhagem. Apesar de aparência inerte, este tecido está em constante reabsorção pelos osteoclastos e neoformação pelos osteoblastos (Florencio-Silva *et al.*, 2015). O balanço da ação de ambas as células é o que define a organização estrutural do tecido.

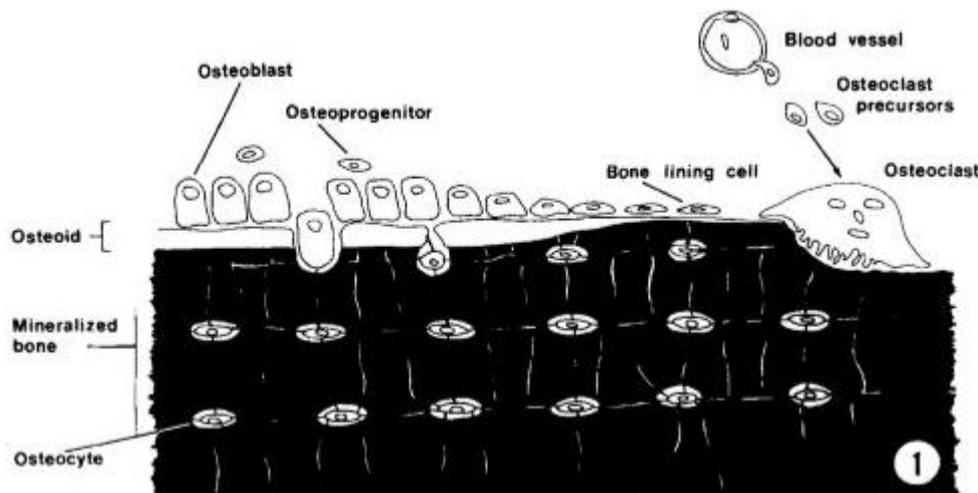
Os osteoclastos se diferem dos outros tipos celulares por possuírem sua origem celular das células progenitoras hematopoiéticas e não das células progenitoras mesenquimais, como o restante. São células grandes e multinucleadas, ricas em lisossomos e mitocôndrias (Downie e Siegel, 2006), que atuam como função semelhante à de macrófagos no sistema imune, fagocitando assim parte da matriz e atuando na reabsorção da mesma.

Os osteoblastos, por sua vez, são células mononucleadas robustas e cuboides organizadas em camadas, que agem de forma coordenada para a formação da matriz (Rodan, 1992), além de atuar no controle da mineralização da matriz (Marks e Popoff, 1988). Estas células, após o processo de maturação, podem continuar como osteoblastos, se tornar um osteócito ou se tornar uma célula de linhagem.

Os osteócitos representam cerca de 90% das células ósseas presentes em um adulto e são ricos em Complexos de Golgi e Retículo Endoplasmático Rugoso, devido a sua função secretora, e em mitocôndrias, por ser a célula óssea com maior taxa metabólica. Os osteoblastos dão início a sua conversão em osteócitos quando ficam presos na matriz extracelular que secretam. A medida em que vão se tornando maduros, perdem parte do citoplasma e o núcleo enriquecido de mitocôndrias passam a predominar no espaço intracelular (Downey e Siegel, 2006), importante para a manutenção de sua taxa metabólica que permite a manutenção das suas projeções citoplasmáticas comunicantes entre células vizinhas superficiais e internas. Essas projeções ainda atuam na transdução de sinais derivados de ações mecânicas, que geram a perda ou o ganho ósseo (Robling *et al.*, 2006).

As células de linhagem são derivadas de osteoblastos que possuem seu metabolismo praticamente inativo. São responsáveis pela regulação da formação óssea, através do controle da geração e atividade dos osteoclastos (Robling *et al.*, 2006). Após os osteoblastos sintetizarem a matriz, é dado início à um período de reabsorção da matriz extracelular pelos osteoclastos. Este processo leva ao desaparecimento dos osteoclastos e sua substituição por células mononucleadas. Os precursores de osteoblastos então são recrutados para uma cavidade de reabsorção, gerando osteoblastos que irão sintetizar a nova matriz óssea nesta cavidade. Ao final, toda a área é novamente repovoada por células de linhagem (Macdonald e Gowen, 1993), que irão reorganizar um novo ciclo de remodelação óssea. A organização dessas células no tecido está representada na figura 1.

Figura 1 - Representação da organização celular do tecido ósseo



Fonte: Marks e Popoff, 1988.

Todas estas etapas são fundamentais para a manutenção e mobilização do cálcio presente neste tecido (Rodan, 1992). Aproximadamente 99% do cálcio presente no corpo humano está localizado no tecido ósseo (Downey e Siegel, 2006), predominantemente na forma de hidroxapatita. A hidroxapatita possui como sua fórmula química $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e é o principal constituinte da matriz inorgânica (Clarke, 2008).

O tecido ósseo é composto por, aproximadamente, 50-70% de minerais, 20-40% de matriz orgânica, 5-10% de água e menos de 3% de lipídeos. Os minerais fazem parte da matriz inorgânica onde, como no parágrafo anterior, a hidroxapatita é seu principal constituinte. Em menores proporções temos a presença de íons de carbonato, magnésio,

fosfato ácido (Clarke, 2008) e sódio. As principais funções dessa matriz são a transdução nervosa (Downey e Siegel, 2006), sustentação e a rigidez do tecido (Clarke, 2008).

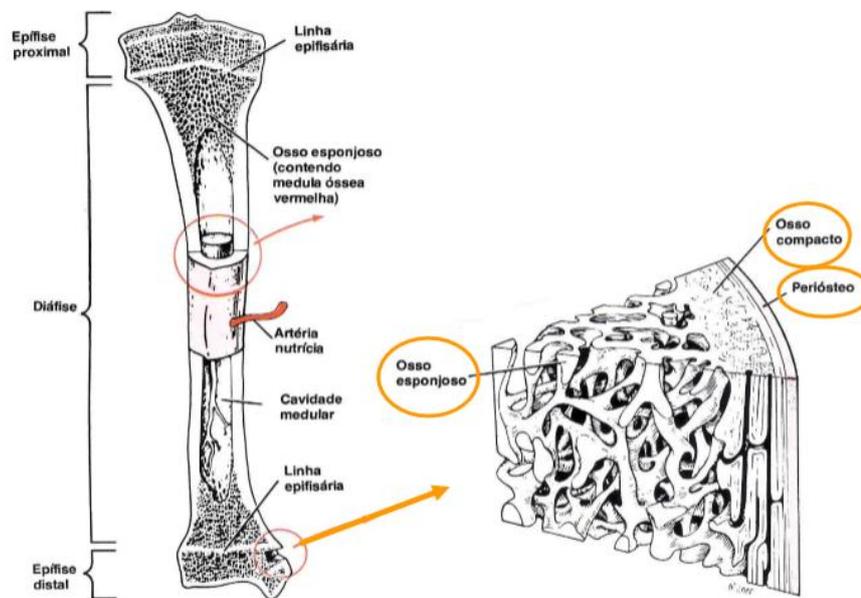
Já a matriz orgânica possui cerca de 85-90% de sua composição de colágeno, prioritariamente do tipo I. Sua função é conferir elasticidade e flexibilidade (Clarke, 2008) ao tecido para que juntamente com a matriz inorgânica, dê as características necessárias para a sua participação fundamental no sistema locomotor.

O sistema locomotor é formado pelos ossos e os músculos adjacentes. No corpo humano possuímos um total de 213 ossos, dentre eles 126 estão presentes no sistema apendicular – membros superiores e inferiores-, 74 no axial – cabeça, pescoço, vértebras e tronco- e 6 ossículos auditivos. Estes ossos podem ainda ser classificados em ossos longos, curtos, irregulares ou planos (Clarke, 2008).

Os principais representantes dos ossos longos são a ulna, o úmero e o rádio no membro superior, e o fêmur, a tíbia e a fíbula no inferior. Esses ossos são compartimentalizados em diáfise, epífise e metáfise, que são formadas pelos ossos trabeculares e corticais.

Os ossos trabeculares e corticais possuem a mesma composição em suas matrizes e células, porém, quando analisados em um mesmo volume, os corticais possuem maior relação de massa por volume que os trabeculares (Downey e Siegel, 2006). Esta relação justifica o porquê de encontrarmos 90% da região trabecular com estrutura porosa, enquanto na cortical encontramos apenas 10% (Buchwalter *et al.*, 1996).

Figura 2 - Esquema estrutural do ósseo



A porosidade possui uma relação íntima com a função da região do osso. A região trabecular, por exemplo, por ser rica em porosidades acaba também tendo uma maior área superficial, proporcionando um maior influxo de componentes e uma rápida reciclagem dos mesmos, permitindo a manutenção do seu alto metabolismo. Já a região cortical, conhecida também como osso denso, possui uma baixa porosidade por possuir como função o suporte do esqueleto (Rodan, 1992). A diáfise é rica em osso cortical, enquanto a epífise e a metáfise são ricas em osso trabecular, com apenas uma camada fina de cortical (Clarke, 2008). Na figura 2, temos uma representação esquemática da estrutura de um osso.

A Ciência Forense e análise de ossos

A Antropologia Forense está pautada no estudo dos ossos e nas informações que podem fornecer. Esta disciplina é uma ferramenta fundamental em casos de desastres em massa, sendo bastante útil na realização de triagem dos materiais ósseos encontrados, podendo levantar estimativas de origem, sexo, altura (Mundoff, 2012) e raça (Iscan e Steyn, 1999) dos elementos encontrados.

As estimativas quanto à origem estão relacionadas com as diferenças da morfologia óssea de acordo com a espécie pertencente. O sexo é estimado por diferentes metodologias, dentre as quais a de Phenice (1969) na qual é baseada em observações no osso pélvico nos processos do arco ventral, ramo isquiopúbico e a angulação da concavidade púbica. Como a mulher possui o canal de parto, sua angulação é maior do que a de um homem para permitir a passagem do recém-nascido. Além disso, homens possuem ossos mais robustos assim como seus processos do arco ventral e do ramo isquiopúbico, se diferenciando dos ossos pélvicos femininos.

Em relação à estimativa de altura pode ser realizada de duas formas. Quando é encontrado o esqueleto completo, é possível colocá-lo em posição anatômica e medi-lo desde a proeminência mais superior do crânio até a base dos pés. Quando apenas um osso é encontrado, sendo ele um osso longo, ou parte do esqueleto podem ser feitos cálculos de regressão linear com base na equação $(y) = a + bx$, onde a e b são, respectivamente, os coeficientes de regressão referentes ao esqueleto e ao osso ou parte óssea usada como base. Y , por tanto, será a altura do indivíduo e x será o tamanho do osso ou partes ósseas encontrados (Iscan e Steyn, 1999).

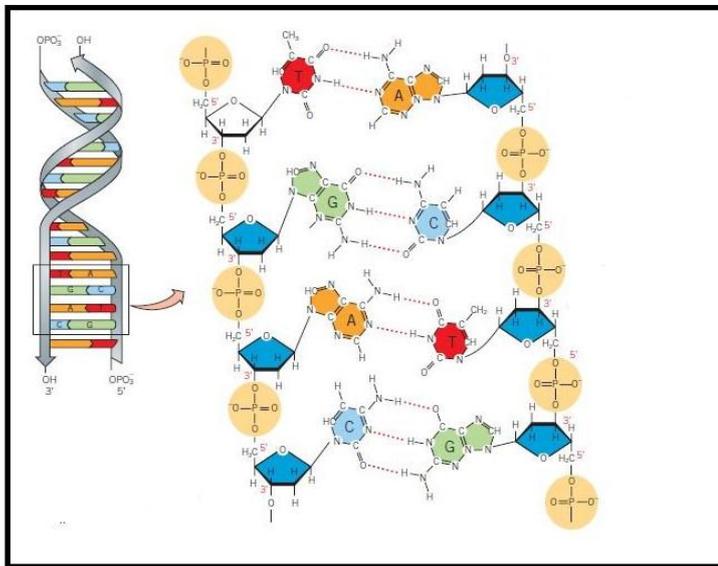
Todos estes dados gerados são apenas estimativas e, em sua maior parte, auxiliam apenas na triagem dos materiais e não em sua completa identificação. Ademais, são dependentes de ossos específicos que não são encontrados em todos os casos e, em muitos casos não são encontrados de forma íntegra que permita o emprego destas metodologias.

Nos últimos anos, a Antropologia Forense vem sendo aplicada juntamente com a metodologia inovadora baseada na análise por DNA (Delabarde e Ludes, 2010). Esta metodologia tem sido fundamental na identificação de indivíduos (de Boer *et al.*, 2018), principalmente quando ocorre uma perda fisionômica significativa do indivíduo, impossibilitando que métodos anatômicos convencionais do campo da Ciência Forense sejam utilizados (Clobino *et al.*, 2015). Nestas situações, o DNA é analisado e comparado com o intuito de incluir ou excluir vínculo genético com parentes de pessoas desaparecidas, permitindo a identificação da identidade dos restos mortais quando resulta em inclusão (Speller CF *et al.*, 2012).

As células ósseas por serem depósitos importantes do corpo humano de material genético, primordialmente do DNA mitocondrial (Parson, 2001), ganha destaque no estudo das técnicas moleculares na análise de ossos e gera, assim, um grande valor à ampliação de conhecimento nesta área.

O DNA foi descrito pela primeira vez por Watson e Crick (1953) como uma estrutura composta de duas cadeias helicoidais enroladas ao redor de um mesmo eixo, onde cada cadeia seria formada por um grupamento fosfodiéster ligado a resíduos de β -D-Deoxiribofuranose com ligações 3'5' (figura 3). As bases nitrogenadas se encontrariam então voltadas para o interior e o grupamento fosfato voltado para o exterior, o que facilitaria a interação com cátions (Watson e Crick, 1953). O DNA é encontrado em dois compartimentos celulares principais que dão o nome das suas classificações, nuclear e mitocondrial.

Figura 3 - Estrutura da molécula de DNA



Fonte: Google, 2018.

O DNA nuclear, como o próprio nome diz, é encontrado no núcleo celular e cada célula possui cerca de 2 cópias deste DNA por célula (Parsons, 2001), uma de origem materna e outra de origem paterna herdadas no momento da fusão dos gametas. Este, então, é capaz de identificar um indivíduo através da comparação de suas regiões polimórficas com as de seus parentes próximos (Goodwin *et al*, 2003).

A descoberta das regiões altamente polimórficas no DNA humano por Wyman e White (1980) foi de fundamental importância para estudos de análise do DNA na Identificação Humana (Botstein *et al.*, 1980) e, em 1985, com o desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), alavancou a Genética Forense.

Numa PCR é possível gerar um grande número de cópias de uma região de interesse do DNA, mesmo que esta esteja disponível em baixa concentração, por conseguir aumentar exponencialmente a quantidade de fitas de DNA no meio a cada ciclo (Thompson *et al.*, 2011). A principal aplicação desta tecnologia foi relatada por Jeffreys e colaboradores em 1985, no seu trabalho intitulado “Regiões Hipervariáveis Minisatélites no DNA humano” (Jeffreys *et al.*, 1985).

Em relação aos polimorfismos quatro são os mais empregados nos casos forenses ao longo da história. O VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*, descoberto por Jeffreys (1985), possui comprimento de 9-100 pares de bases e a análise de apenas 5 regiões é capaz de relacionar o parentesco entre indivíduos. Por ser longo, a dificuldade encontrada por muitos geneticistas foi de encontrar materiais íntegros suficientes para amplificar todos estes fragmentos (Góes, 2010) em casos forenses, o que impulsionou a descoberta dos STRs (*Short Tandem Repeats*). Semelhantes ao VNTRs, os STRs ou microssatélites são sequencias repetidas em regiões específicas do DNA, porém, com sequencias repetidas com 2 a 7 pares de bases necessitando uma menor quantidade de material genético (Thompson *et al.*, 2011).

Atualmente, são analisados polimorfismos do tipo microssatélites nas regiões de cromossomas autossômicos e nos cromossomos X e Y. Os polimorfismos de nucleotídeo único, SNPs, “*Single nucleotide polymorphisms*”, (Juras *et al.*, 2016) e os polimorfismos de inserção e deleção, *Indels*”, (Matte, 2011) do genoma nuclear também começaram a ser estudados para fins de Identificação Humana (Sobrinho *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2002) por necessitarem de quantidades ínfimas do material genético (Mehta *et al.*, 2016).

A análise de um conjunto representativo dessas regiões polimórficas é capaz de gerar um perfil genético individual. Estudos como os de Iscan *et al.* (2005) e Fredericks *et al.* (2013), demonstram o uso destas regiões para identificação e forenses com eficácia.

Apesar do grande potencial da identificação humana por DNA, a análise de restos humanos, principalmente os esqueletizados ainda é um problema, à medida que o tempo, as condições de exposição desse tecido a diferentes ambientes podem ser potencialmente danosos para a conservação de sua estrutura, células e, conseqüentemente, dos ácidos nucléicos. Depois que uma pessoa morre, seu DNA começa a degradar, e caso sua degradação seja extrema, a análise pode se tornar impossibilitada. A degradação depende muito do que acontece com o corpo ou o esqueleto após a morte, já que alguns ambientes, tais como os úmidos, são particularmente destrutivos para o DNA.

Crainic *et al.* (2002) aborda uma questão muito encontrada por geneticistas forenses. Situações onde os restos humanos foram encontrados em água do mar. Neste estudo, por possuir um baixo número de cópias por células o DNA nuclear não foi capaz de gerar um perfil genético completo e se fez necessário abrir mão desta vertente e substituir pelo uso do DNA mitocondrial. A explicação do porquê o uso desta molécula é mais eficaz em situações de escassez de material é simples. Em contrapartida ao DNA nuclear, o mitocondrial possui cerca de 500-2000 cópias por células (Parsons, 2001), obtendo-se maior quantidade de material genético nestes casos do que seria obtido caso o DNA nuclear fosse utilizado.

Em contrapartida, o DNA mitocondrial é herdado apenas da linhagem materna (Case e Wallace, 1981), não possuindo uma recombinação entre duas moléculas distintas, permanecendo com isto inalterado ao longo das gerações. A não alteração impossibilita uma identificação, já que indivíduos descendentes de um mesmo ancestral comum feminino irão possuir cópias semelhantes do DNA mitocondrial, porém ainda permite uma inclusão ou exclusão de restos mortais em um caso (Darok *et al.*, 2005). Por exemplo, no caso de militares que atuam na fronteira, apenas um membro da família está atuando naquele local. Quando há uma ocorrência que gere questões sobre a identificação de determinados restos mortais que não possam ser identificados por outros meios senão o DNA e há uma baixa quantidade de DNA nuclear, se a sequência do DNA mitocondrial encontrado for semelhante à de um dos membros da família então, neste caso, podemos identificá-lo. Por isso, amostras antigas e degradadas, como fios de cabelo e ossadas humanas, têm sido frequentemente analisadas em testes de identificação humana via herança materna (Góes *et al.*, 2002). A análise do DNA mitocondrial também tem sido importante em estudos de evolução humana e genética de populações (Álvarez *et al.*, 2001).

Considerando ainda a situação encontrada por Crainic *et al.* (2002), uma segunda variável tem importância para a condução das técnicas moleculares pelo geneticista na análise de ossos encontrados em ambiente úmido. A possibilidade de ocorrer algum tipo de interferência no processo de amplificação do material genético por PCR.

Embora não se saiba como ocorre a interferência na PCR, estudos como os de Crainic *et al.* (2002), Mameli *et al.* (2014) e Vacchiano e Vyshka (2014) retratam claramente a dificuldade de se obter um perfil genético completo de material ósseo encontrado em ambiente aquático.

No universo de outras evidências forense é sugerido que a interferência pode ocorrer devido a vários fatores, principalmente pelos denominados inibidores de PCR. Muitos

inibidores são constituintes da própria amostra, como hemoglobina, gordura e uréia (Abu e Radstrom, 1998), heparina (Menking *et al*, 1999) e polissacarídeos (Raina e Chandlee, 1996). Outros são co-extraídos juntamente com o DNA, por serem constituintes de substratos aos quais a amostra está fixada, como corantes de tecidos, extratos vegetais, ácido húmico e resíduos de metais encontrados no solo. A presença desses contaminantes pode afetar tanto a etapa de extração do DNA, quanto na PCR, inibindo a ação da enzima DNA polimerase (Eckhart *et al*, 2000).

Nenhum trabalho demonstrou como ocorre a interferência do ambiente aquático na técnica de PCR ou explicou fielmente a dificuldade encontrada por autores que trabalharam nesse macroambiente. As modificações estruturais apresentadas pelo tecido ósseo em meio ao ambiente aquático pode ser um fator relevante para essas dificuldades. Vacchiano e Vyshka (2014) demonstraram por microscopia óptica aumento de canálculos na superfície externa de ossos encontrados decorrentes da queda de um avião no Mar Mediterrâneo. Além disso, Langlais *et al*. (1900) demonstrou por Espectroscopia de Raman que, em ossos de bezerros, íons divalentes são capazes de se ligar ao grupamento fosfato do DNA alterando sua força de repulsão entre as fitas e, conseqüentemente, sua estrutura conformacional.

Neste trabalho temos o foco de identificar e compreender possíveis alterações na estrutura do tecido ósseo que possam desencadear processos de degradação e/ou alteração da estrutura do DNA e justificar estes resultados da literatura.

JUSTIFICATIVA

Atualmente contamos com um número superior ao de dois mil militares presentes em missões no exterior, além do montante relacionado às missões diplomáticas internacionais (Fonte: Ministério da Defesa, 2018). Nos locais de missões, os militares estão sujeitos aos eventos climáticos típicos das regiões, encontrando diversas adversidades durante este período.

Em 2010, em meio à missão das Forças Armadas presente no Haiti por mais de 13 anos, ocorreu um dos piores terremotos da história mundial, deixando mais de 200 mil mortos. Após este evento, o processo de identificação dos indivíduos mortos na operação foi realizado em conjunto com o de identificação populacional local, necessitando o emprego forense por parte não apenas dos haitianos, como também de brasileiro.

Em 2014, o segundo terremoto gerou inundações em todo país. Nesta segunda parte, a perícia necessitava não apenas de uma expertise na identificação de corpos presentes em meio a terra, mas também para aqueles encontrados em mares e rios, predominantes na topografia local. Casos como estes são rotineiros, tendo nossas Forças Armadas que estar preparadas para trabalhar em meio a situações de desastres em massa como estas (Cartozzo *et al.*, 2018).

Diante dessas situações, os corpos expostos ao ambiente aquático em sua maioria sofrem desmembramento e ação de organismos presentes no meio, fazendo com que a identificação destes indivíduos seja obtida principalmente por amostras de DNA obtidas dos esqueletos encontrados.

De acordo com estudos semelhantes ao de Papadodima *et al.* (2009), conseguimos conhecer os processos de transformações ocorridos com os tecidos moles do corpo humano com a exposição à água, especificamente água marinha. Entretanto, a influência que esta exposição gera no tecido ósseo e no material genético ainda precisa ser mais explorado.

Com o enfoque de buscar um melhor entendimento da problemática apresentada na análise de amostras biológicas como o tecido ósseo para identificação humana por técnicas moleculares, de modo a configurar um processo de identificação mais eficiente, o estudo aqui exposto em parceria com o Ministério da Defesa (ProDefesa), visa contribuir com o conhecimento forense ao compreender se a exposição à água de rio num período de três meses afeta qualitativamente e quantitativamente o material genético obtido de amostra óssea imerso nessa condição. Também, tivemos como objetivo avaliar por espectroscopia de Raman e por microscopia se, nas mesmas condições, ocorriam modificações estruturais e iônicas em nível tecidual, que pudessem corroborar com qualquer alteração do padrão da molécula.

1 OBJETIVO

Esse projeto tem como objetivo principal avaliar o efeito do macroambiente aquático (água de rio) sob a estrutura mineral e de ácidos nucleicos do tecido ósseo.

1.1 Objetivos específicos

- a) Analisar por espectrometria de Raman alterações morfológicas na estrutura óssea por influência da exposição à água;
- b) Analisar as alterações iônicas nas amostras e no macroambiente durante o período experimental por microscopia eletrônica de varredura;
- c) Avaliar o material genético das amostras expostas ao ambiente aquático por PCR quantitativa e por amplificação de fragmentos hipervariáveis da região controle do DNA mitocondrial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi dividido nas seguintes etapas: (1.) Seleção do microambiente a ser estudado, (2.) Seleção das amostras, (3.) Seleção do local do experimento, (4.) Experimento teste, (5.) Preparo das amostras ósseas, (6.) Experimento de campo, (7.) Análise do DNA das amostras, (8.) Análise mineral da matriz óssea e (9.) Análise dos dados.

2.1 Seleção do macroambiente aquático a ser estudado

Essa seleção baseou-se nos estudos publicados nas plataformas PubMed, Elsevier e Wiley. Como critério de seleção foi considerado o volume de dados publicados sobre cada macroambiente, modelos experimentais utilizados, dificuldades ainda existentes relacionadas à identificação de indivíduos e volume de dados existentes no Brasil.

Utilizando os critérios citados, verificamos um menor quantitativo de informação científica com foco na área forense em relação ao macroambiente aquático de rios. Portanto, conduzir esse tipo de estudo em rio seria uma contribuição importante no que diz respeito à identificação civil ou militar, a partir de restos mortais de indivíduos encontrados nesse macroambiente.

2.2 Local do experimento

Os critérios para a escolha do local do experimento foram baseados na possibilidade de se ter as condições reais do macroambiente aquático rio, sob condições climáticas e pluviométricas monitoradas com imersão mínima de 1 metro de profundidade, segurança na manutenção e monitoramento do experimento, fluxo de corrente de água controlado e que permitissem a ancoragem do material a um ponto fixo próximo a uma das margens dos rios.

Com o perfil do local definido, foram contatados gestores da Companhia Estadual de Águas e Esgotos (CEDAE) para avaliar se existia na área de atuação da empresa, um local com o perfil especificado. Realizadas reuniões com o pessoal gestor e do corpo técnico para

análise do projeto, foi identificado um local a montante da estação de tratamento do rio Guandu - unidade Lameirão, Seropédica (RJ), (22°48'54.4"S 43°37'25.5"W), mas ainda sob a responsabilidade da CEDAE, com as condições definidas para o estudo.

O rio Guandu está compreendido na bacia do rio Guandu, que começa na confluência do ribeirão das Lajes com o rio Santana. A partir deste ponto, na altitude de 30 m, o trecho é chamado de rio Guandu. O seu curso final é retificado até a foz na baía de Sepetiba e leva o nome de canal de São Francisco. Considerando-se o ribeirão das Lajes como principal formador do sistema, o comprimento total do rio Guandu é de 108,5 km. Apesar de receber volumes de águas de seus afluentes, como o rio Santana, o rio São Pedro e o rio dos Poços, a vazão do rio Guandu é majoritariamente constituída pela descarga do ribeirão das Lajes.

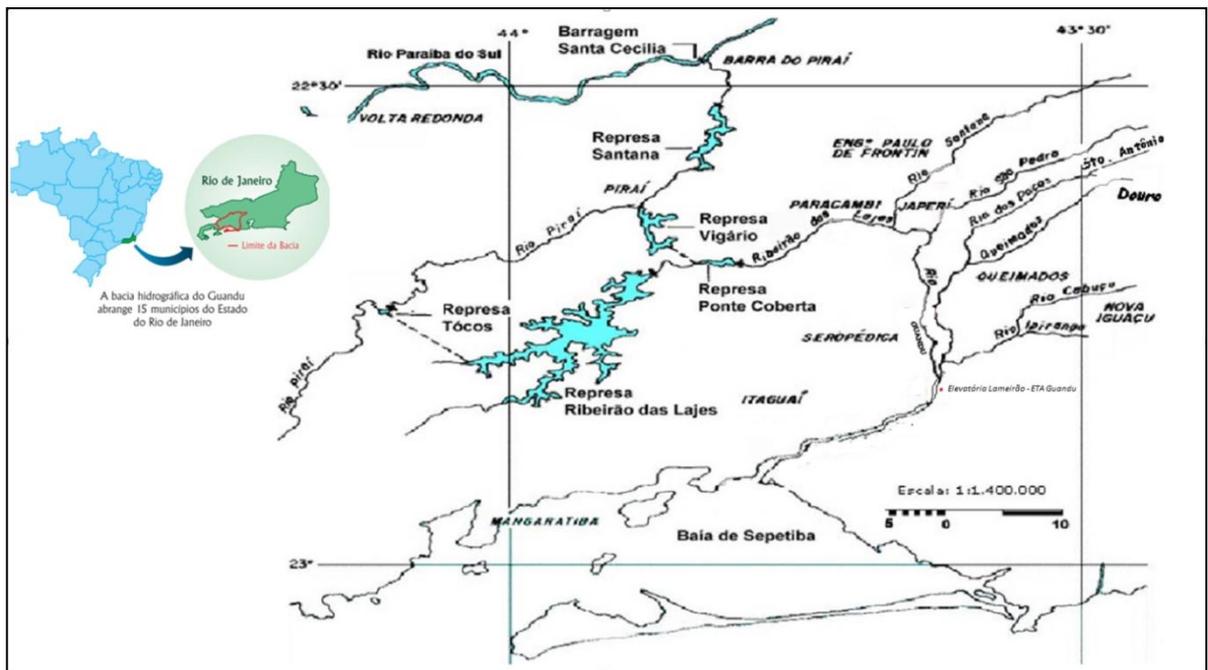
Rio Guandu em condições naturais teria uma vazão de cerca de 25 m³/s (CEDAE, 2013). Hoje, recebe uma contribuição média de 146 m³/s do Desvio Paraíba-Piraí, e de 10 m³/s do Desvio Tocos-Lajes. Essa contribuição adicional permitiu a construção da Estação de Tratamento de Água (ETA-CEDAE) no Rio Guandu, para abastecimento público e que entrou em operação em 1955, e hoje processa 47 m³/s de água para atender à cerca de oitenta por cento da população da região metropolitana do Rio de Janeiro (CEDAE, 2018). Além disso, toda a bacia do rio Guandu é intensamente utilizada por vários Municípios da Baixada Fluminense, o que denota a importância.

O rio Guandu como visto é bastante abrangente, passando por áreas do interior até zonas metropolitanas de gradiente populacional significativo. Muitos moradores na época do verão procuram suas águas para se banharem, sem conhecer os locais propícios para banho. Além disso, existe uma elevada estatística de crimes de morte em vários municípios próximos. Por essa característica, o leito desse rio é frequentemente visto como um local de encontro (David Maciel de Mello Neto, 2016) e ou ocultação de cadáveres no estado (André Rodrigues, 2017). Esse fato foi também o motivo para a escolha do desenvolvimento do projeto no macroambiente rio.

A região em que as amostras foram ancoradas não possui influência de substâncias químicas utilizadas durante o processo de tratamento da água, uma vez que é anterior a estação de tratamento propriamente dita. Como contrapartida para o estudo, além de sugerir o local para o experimento e autorizar a realização do estudo, a CEDAE-RJ forneceu todas as análises físico-químicas da água do rio, do local do experimento, durante o período de 90 dias. Esses dados foram utilizados como controle das variações iônicas observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

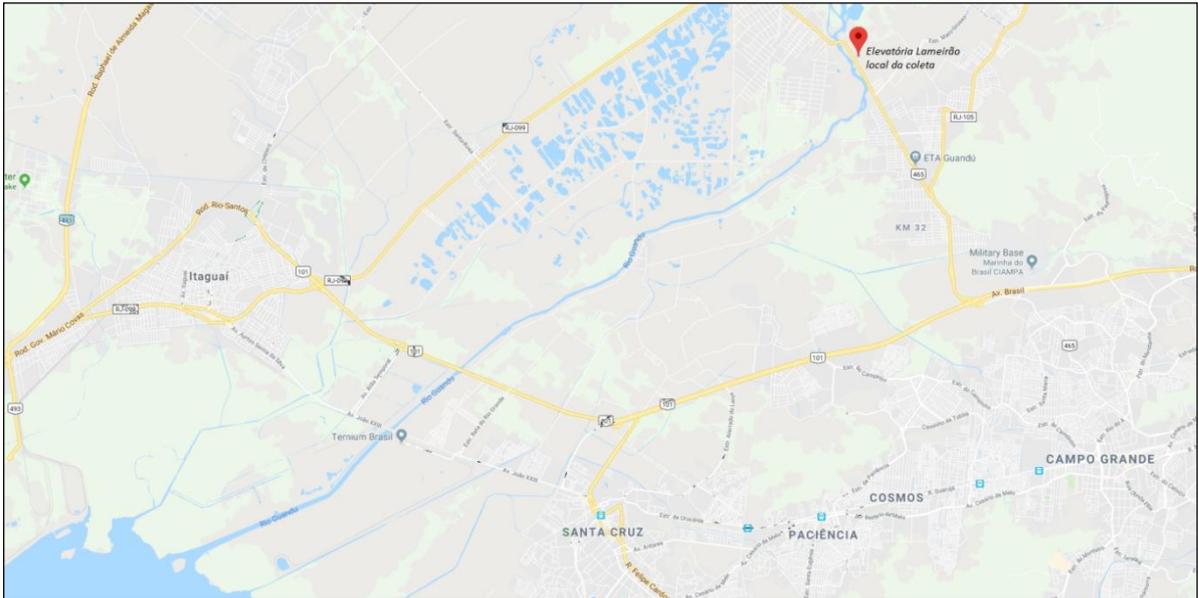
As figuras 4 mostra o local do experimento, no contexto da bacia do Guandu, a figura 5 o mapa da região de Seropédica, destacando o local do experimento a montante da ETA Guandu, a figura 6 mostra imagem de satélite da Elevatória e o local de ancoragem do experimento dentro da elevatória Lameirão.

Figura 4 - Bacia hidrográfica do rio Guandu com indicação da localização da coleta (Elevatória Lameirão - ETA Guandu)



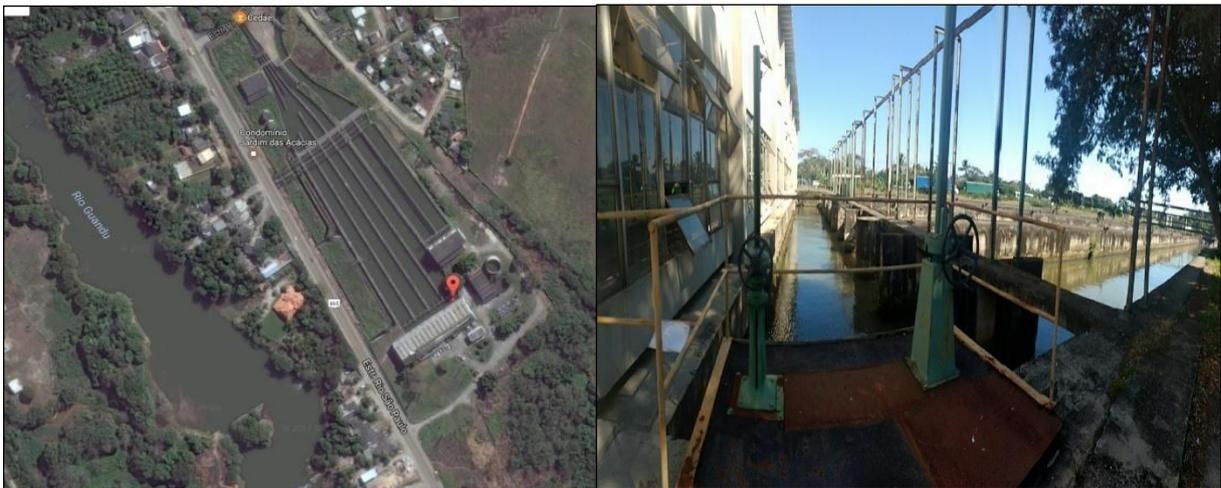
Fonte: adaptado de Comitê da Bacia Hidrográfica Guandu (RJ) (2012).

Figura 5- Mapa da localização da Elevatória Lameirão a montante da ETA Guandu



Fonte: Google Maps.

Figura 6 - Na esquerda: imagem de satélite da Elevatória Lameirão a montante da ETA Guandu - Seropédica, Rio de Janeiro. Na direita: local de ancoragem do experimento na Elevatória Lameirão - ETA Guandu.



Fonte: A autora, 2018.

2.3 Separação das amostras

As amostras utilizadas nesse estudo foram selecionadas a partir de um levantamento nos registros do banco de amostras de tecido que deram entrada no Laboratório de Diagnósticos por DNA da UERJ no período de 2014 a 2016. Todas as amostras estudadas deram entrada no laboratório com finalidade de identificação e investigações de paternidade, por meio de convênio UERJ/ Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro (TJRJ). A Utilização destas, de forma não identificada, é autorizada para fins de pesquisas, conforme aprovado em comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, pelo projeto (2485-CEP/HUPE – CAAE: 0067.0.228.000-09) “Regiões polimórficas do DNA como ferramentas para estudo de ancestralidade, movimentos migratórios, estudos sobre estruturação gênica da população brasileira e investigações criminais de vínculos genéticos” (em anexo à esta dissertação).

No levantamento foram anotados os dados dos seguintes padrões: tipo de fragmento arquivado, sexo, intervalo após a morte e chegada deste material ao laboratório, técnica utilizada para a identificação anterior e resultado da identificação. Com base no levantamento foram selecionadas 8 amostras com o seguinte padrão:

- a) Fragmento de diáfise de osso fêmur - tecido em maior quantidade no acervo do laboratório. Além disso, por ser o maior osso existente no corpo humano possibilitaria a criação de um bom número de cópias de uma mesma amostra com vistas à reprodutibilidade do experimento.
- b) Indivíduos do sexo masculino - Amostras do sexo masculino são as mais frequentes no banco do laboratório.
- c) Tempo máximo de exposição ao solo (12 meses). O intervalo utilizado como base foi essencial para que diminuíssemos o tempo de exposição do osso ao solo e, consequentemente, da formação de fatores interferentes dos processos de extração e amplificação devido a esta exposição
- d) Todas as amostras apresentaram resultado analítico conclusivo na ocasião da rotina de identificação do respectivo material, realizada com a mesma rotina de extração de DNA (Maxwell 16 – Promega Corporation) e genotipagem com o kit de PCR AmpFLSTR™ Identifiler™ (Thermofisher).

Desta forma todas as amostras escolhidas formaram um padrão amostral e nos permitiu eliminar interferências vindas das divergências intra amostral.

2.4 Fase experimental

O experimento teste foi realizado com o objetivo de avaliarmos a viabilidade do desenho experimental montado para a colocação das amostras no rio. Para isso, foi montada uma estrutura para fixação de argolas plásticas transparentes para simulação dos ossos. A estrutura de fixação foi construída com duas telas plásticas de 40x30cm com malha de 2cm, presas por abraçadeiras e contendo duas pedras de mármore para peso. A uma das suas extremidades foi amarrada uma corda de nylon de 12mm para a sua ancoragem a 0,5 metros de profundidade da margem do rio, a partir de uma barra de aço pré-existente no local.

O experimento foi mantido por uma semana no local. Após esse período de tempo, verificamos que a integridade do experimento foi preservada. A figura 7 mostra a estrutura que foi montada para o experimento teste e sua integridade após uma semana no rio.

Figura 7- Fotografia do experimento teste para fixação de argolas de plástico, simulando fragmentos ósseos



Fonte: o autor

2.5 Preparação das amostras ósseas para o experimento de ancoragem no rio

As amostras foram preparadas de acordo com protocolo interno do laboratório. Para isso, todas as amostras foram limpas superficialmente por escovação, imersas em hipoclorito de sódio a 1%, por 30 minutos e deixadas secar em temperatura ambiente por 3-4 horas. Após a secagem, os ossos foram submetidos a cortes transversais com a micro retífica Dremel®, lâmina n°420. De cada amostra foram gerados sete discos ósseos de aproximadamente 1 cm de espessura e 3 cm de largura, sendo um separado como controle e os demais, aos pares, retirado para imersão em ambiente de rio por 30, 60 e 90 dias.

A figura 8 mostra fotografias de cortes transversais gerados por serragem de duas amostras do estudo. Os procedimentos foram realizados em condições estéreis com assepsia do local e o material foi mantido a -4°C durante todo o tempo de armazenamento.

Figura 8 - Fotografia de corte transversal de fêmur (região diafisária) de osso humano de duas das amostras



Fonte: A autora, 2018.

2.6 Ancoragem das amostras no rio

Para a ancoragem das amostras no local da experimentação, três estruturas de fixação semelhantes a descrita no experimento teste foram construídas, sendo que as argolas foram

substituídas por 28 fragmentos ósseos – dois de cada indivíduo (N=14) e mantidas no rio nas mesmas condições do experimento teste. Após a colocação no rio do experimento com amostra óssea, a cada 30, 60 e 90 dias, uma das estruturas, foi retirada do rio para a realização das análises propostas. A figura 9 são fotografias da estrutura que foi montada para o experimento com as amostras ósseas ancoradas no rio.

Figura 9 - Fotografias dos fragmentos ósseos na estrutura de fixação antes da ancoragem no rio (esquerda) e após 30 dias de ancoragem (direita)



Fonte: A autora, 2018.

2.7 Limpeza das amostras pós ancoragem

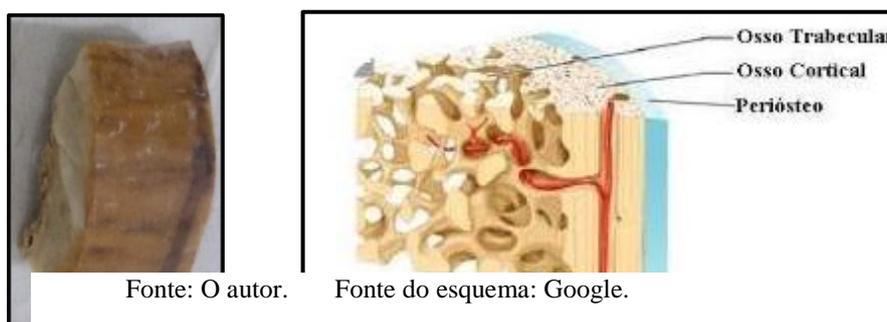
Após o tempo de imersão no rio, os discos ósseos não mais foram lavados com hipoclorito, porém com apenas escova de limpeza e água corrente para a retirada do excesso de detritos provenientes da exposição ao ambiente. O processo de secagem foi realizado a temperatura ambiente e foi estendido para uma duração de 8 horas, permanecendo ao longo de uma noite.

Após a secagem, os discos ósseos foram fragmentados em quatro partes com a micro retífica Dremel®, lâmina n°420, sendo três quartos de todas as amostras submetidos ao processo de pulverização, afim de serem preparados para as análises moleculares. Um quarto restante

foi mantido íntegro para as análises físico-químicas (MEV/ EDS e RAMAN). Todos os fragmentos e/ou pó foram mantidos a 4°C no decorrer das etapas experimentais seguintes.

A figura 10 mostra uma fotografia de um fragmento separados para as análises físico-químicas e um esquema com a indicação das estruturas ósseas cortical, trabecular e superfície externa – indicado como perióstee-, alvos destas análises.

Figura 10 - Fotografias de fragmento ósseo separado para as análises físico-químicas (esquerda) e esquema das áreas estudadas (direita)



Fonte: A autora, 2018.

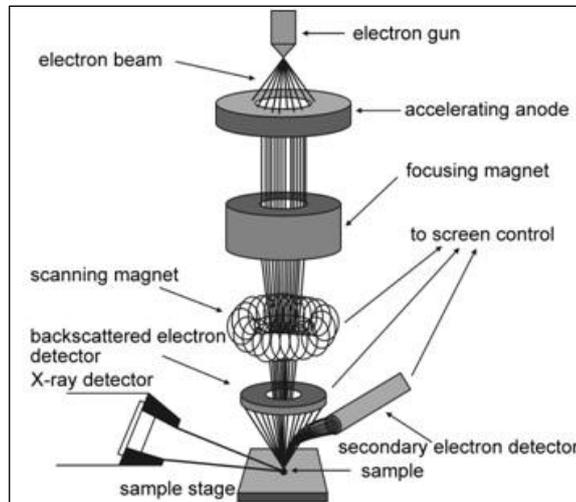
2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Raio X por Dispersão em Energia (MEV/EDS)

Utilizamos o MEV com EDS para a obtenção de imagens em alta resolução e identificação simultânea de alterações de compostos iônicos encontrados de maneira minoritária na matriz inorgânica óssea das amostras, ademais suas concentrações. As regiões corticais e medulares ósseas foram analisadas separadamente, respeitando as características dos tecidos.

A MEV é compartimentalizada conforme na figura 11. Um feixe de elétrons, aqui indicado como “*eléctron beam*”, é emitido por uma fonte emissora formada por um filamento de tungstênio, um eletrodo controle, um catodo e um ânodo. O aquecimento do filamento promove a emissão de elétrons em direção ao catodo e ânodo. Esta emissão gera uma segunda por conta de um resistor sobre o filamento, tornando o eletrodo controle negativo comparado ao filamento. Essa negatividade irá gerar uma repulsão dos elétrons, também carga negativa, da região do filamento, promovendo um fluxo para o catodo e ânodo. Ao chegar no ânodo há uma aceleração dos elétrons, conseguindo energia suficiente para a

chegada a amostra e, posteriormente, aos detectores compostos por tubos catódicos que irão atrair estes elétrons.

Figura 11- Esquema MEV /EDS



Fonte: <http://www.technoorg.hu/news-and-events/articles/high-resolution-scanning-electron-microscopy-1/>

A interação feixe-amostra irá resultar na formação de dois tipos principais de feixes, os retroespalhados e os secundários. Quando o feixe incide em camadas mais superficiais da amostra, em sua maioria, ocorre uma colisão elástica em que a energia é preservada e formando os elétrons **retroespalhados**. Em contrapartidas, feixes que incidem mais profundamente perdem energia para a amostra, ocorrendo uma colisão inelástica e a formação de elétrons **secundários**. Ambos são essenciais na formação da imagem, auxiliando tanto no contraste de relevo como na resolução da imagem. Por estes motivos, ao longo dos anos detectores específicos foram construídos como observamos na figura 11 indicados por “*backscattered electron detector*” e “*secundar electron detector*”.

O foco eletromagnético é capaz de desmagnificar a imagem de acordo a distância focal, modificando a nitidez da imagem visualizada. O ajuste do conjunto destes fatores é responsável pela qualidade da imagem obtida (Goldstein *et al*, 2003).

O EDS, por sua vez, é baseado no **Efeito Auger**. Esta técnica permite a análise quantitativa rápida dos principais constituintes da amostra (Diamantino e Nicolau, 2010). Quando o feixe incidente interage fortemente com os elétrons dos átomos encontrados na amostra há a ejeção de um elétron da camada mais interna (K). Esta ejeção provoca uma instabilidade na eletrosfera, promovendo a transferência de um elétron do cristal, presente no detector do equipamento, para o espaço vazio na eletrosfera. A transferência do elétron do

cristal para amostra irá liberar uma energia que será dispersa em forma de elétron **Auger** ou **raio X**. Este elétron irá interagir inelasticamente com a amostra e irá promover uma nova abertura na camada de valência, enquanto o raio x irá energizar o cristal novamente e reiniciar o ciclo, até que toda a energia seja captada pelo detector em forma de fótons. Estes dados são então transformados em valores por programações pré-existentes no equipamento e será fornecido ao usuário como pico em quiloeltronvolts (keV). Por se tratar de uma medida de conversão, o MEV nos fornece dados qualitativos da amostra (Goldstein *et al*, 2003).

Esta etapa foi realizada em parceria com o Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) utilizando o MEV de bancada Hitachi TM3000 para análise microscópica. O EDS acoplado pertence a marca Bruker Nano, modelo X Flash 430 e software Quantax utilizado para os dados de composição iônica. Análises estatísticas básica foram realizadas, apesar do método ser qualitativo, com o software ActionStat.

As amostras foram analisadas sem prévia preparação e a integridade amostral é preservada. Todas foram analisadas em suas regiões cortical, trabecular e superfície externa, conforme já ilustrado na introdução. A distância focal foi mantida na faixa de 9-11 mm, dada como ótima na literatura, com ajuste automático do foco. As imagens foram obtidas em uma magnificação de 100x. O campo escolhido para obtenção de imagem foi o que possuía menor nível de irregularidade, por esta característica interferir na análise de EDS. O tempo de processamento do EDS foi de 100s em todas as amostras, com detecção automática dos elementos encontrados na espectroscopia de raio X por energia dispersiva.

2.9 Espectroscopia de Raman

A Espectroscopia de Raman foi escolhida para analisarmos a composição molecular da estrutura das amostras, principalmente os grupamentos fosfato e carbonato contidos de forma abundante na matriz. O **Efeito Raman** é a base da técnica e nele defende-se que a incidência de uma luz monocromática em uma amostra qualquer leva à formação de raios de luz dispersivos elásticos e inelásticos, onde estes possuiriam comprimento de ondas diferentes do raio incidente e característicos de elementos químicos constituintes da amostra.

Os raios dispersivos inelásticos podem ainda ser de dois tipos, Stokes e anti-Stokes, sendo traduzido como os casos em que os raios dispersivos possuem frequências menores ou

maiores que o raio incidente, respectivamente. No espectro visualizamos ambos de modo que os Stokes, geralmente, possuem picos maiores e número de ondas positivos e os anti-Stokes, picos menores e mais negativos.

Por ser um efeito secundário a colisão elástica, a modificação na frequência subsiste como característico de uma molécula, permitindo sua identificação. Isto porque o fóton incidente provoca uma excitação da molécula que, rapidamente, irá tentar retornar ao estado fundamental, emitindo a mesma energia recebida. Entretanto, por ser inelástica, na colisão a mesma molécula recebeu ou passou mais energia do que tinha anteriormente ao evento, não retornando de fato ao estado fundamental. A energia que terá em excesso ou em falta fará com que a molécula entre em um estado rotacional ou vibracional da inicial e fará com que a energia liberada em forma de fóton tenha uma frequência distinta. O fóton liberado terá energia proporcional a massa e a força de ligação dos elementos emissores (Cano e Marquez,2014).

Utilizamos o espectrômetro Raman OceanOptics de baixa resolução (13cm^{-1}) equipado com cabos de fibra óptica, linhas de excitação em 532nm e 789nm, personalizado para 512 leituras. Os espectros foram gerados no software Origin versão 8. Este tipo de equipamento não prevê necessidade de preparação prévia do material, não existindo assim um processamento da amostra. Além disso, não há alteração significativa no material, permitindo repetições das análises.

2.10 Pulverização dos fragmentos ósseos com *Freezer/Mill*

A pulverização de cada fragmento ósseo foi realizada no sistema *6750Freezer/Mill® Cryogenic Grinder* (figura12), da marca *Spex Sample Prep*. Esse sistema nos permite pulverizar o material em baixa temperatura e, conseqüentemente, com maior preservação do material genético.

O sistema inclui um equipamento onde ocorre o processo, tubos de policarboneto oclusos por ponteiros de metal condutor, uma haste magnética e parafuso condutor. No interior dos tubos, juntamente com a haste magnética, colocamos as amostras de modo que este tubo estará pronto para o processo (figura 12).

Figura 12 - Fotografia do sistema de pulverização *Freezer/Mill 6750*

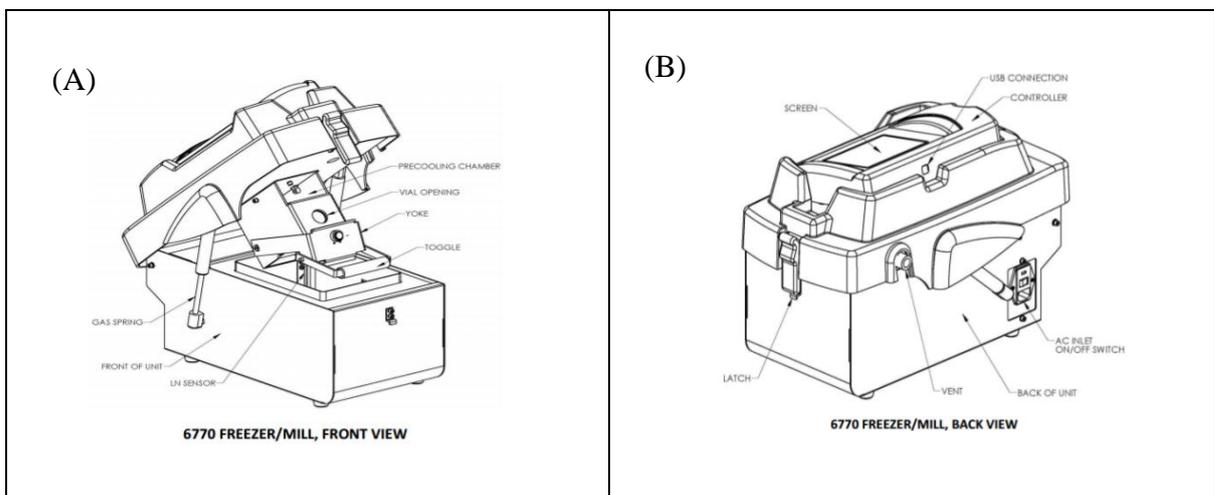


Fonte: A autora, 2018.

Na figura 13 a indicação de “*vial opening*” demonstra o local de armazenamento do tubo preparado para a trituração.

O parafuso fica localizado no “*Yoke*” (figura 14) e é a partir deste que a energia magnética é propagada do equipamento para o tubo. A formação de um campo magnético entre as extremidades do tubo por ação da energia magnética permite que a haste magnética localizada no interior do tubo se movimente. Conforme há a movimentação da haste, os fragmentos da amostra presentes no tubo são triturados e, por estar imerso em nitrogênio líquido, o processo se dá em baixa temperatura, aumentando a preservação do material genético (Operation Manual Sample Prep, 6770, Freezer/Mill, 2010).

Figura 13 - Esquema do pulverizador Freezer/Mill 6770 (similar ao 6750)



Legenda: (A) - Interno e (B) Externo. Fonte: Operation Manual Sample Prep, 6770, /Mill, 2010.

A programação do equipamento é dada em forma de ciclos constituídos por três etapas, “*precool*”, “*run time*” e “*cool*”. Primeiramente há um resfriamento do compartimento interno pelo nitrogênio líquido, seguido da emissão de ondas eletromagnéticas por meio do parafuso e um novo resfriamento para a manutenção da temperatura. A repetição do ciclo se dá de acordo com a dureza do material, em que materiais mais rígidos necessitam de um maior número de ciclos para a pulverização total. Sendo este nosso caso, utilizamos uma programação com três ciclos com as características presentes no quadro 1.

Quadro 1 - Protocolo da programação de pulverização no equipamento *Freezer/Mill 6750*

Etapa do ciclo	Tempo programado
<i>Precool</i>	3 min
<i>Run time</i>	2 min
<i>Cool</i>	1 min

Ao final, o pó obtido foi rotulado, pesado e armazenado em tubos, tipo *Falcons*, de 50mL para prosseguimento na análise genética. Após esta etapa, todos os tubos permaneceram armazenados em temperatura de 4°C como anteriormente.

2.11 Extração de DNA com Maxwell®

O DNA foi extraído da amostra através da plataforma automatizada *Maxwell® 16 Forensic Instrument*, Promega. O protocolo empregado faz parte dos protocolos operacionais padrão (POP) do Laboratório de Diagnóstico por DNA e é detalhado no quadro a seguir (quadro 2).

Quadro 2 - Protocolo de Extração com Plataforma Maxwell®

REAGENTE	QUANTIDADE
Pó ósseo	400mg
EDTA 1.5M, PH 8,0	160µL
RNASE	1µL
Proteinase K (PK) -18µG/µL	50µL
DTT	5µL
Kit Maxwell® 16 cell LEV DNA purification	1 kit
Tampão de lise	500µL
Tampão de eluição	50µL

O pó ósseo e o EDTA são adicionados a um tubo tipo *Falcon* de 15mL, criando uma mistura homogênea após agitação. Essa mistura é incubada durante toda a noite em banho seco a 37°C, para que ocorra a descalcificação. Esta etapa de purificação é essencial para a diminuição da concentração de cristais de cálcio da hidroxiapatita, conhecido como um forte inibidor da PCR (Courts e Madea, 2011).

No segundo dia é dado o início a fase de digestão, com adição enzimas RNase e proteinase k e incubação em banho maria (3 horas a 56°C). A elevação da temperatura promove a ativação da proteinase K, enzima responsável pela degradação de proteínas existentes no conteúdo amostral, auxiliando na liberação do material genético no meio e a degradação de possíveis contaminantes (Hilz *et al.*, 1975). Após o intervalo, as amostras são centrifugadas a 5.000 x g por 5 minutos. Do conteúdo resultante, 500µL do sobrenadante é coletado e transferido para um microtubo de 2mL. A este é adicionado tampão de lise, fornecido pelo fabricante, e o DTT. A agitação é necessária para criação de uma nova mistura homogênea.

Ao final, 650µL da mistura anterior é transferido para o primeiro poço do kit de extração (figura 14). O final do processo é dado de forma automatizada no interior do equipamento, resultando na eluição do material no tampão de eluição acrescentado ao último poço do Kit (figura 14).

Figura 14 - Fotografia ilustrativa do KIT MAXWELL® 16 CELL LEV DNA PURIFICATION



2.12 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Com a colaboração do projeto de doutorado intitulado “Desenvolvimento de ensaio multiplex para a tipagem da região controle do DNA mitocondrial de amostra óssea submersa” de autoria de Pablo Cavalcanti, sob a orientação da doutora Dayse Aparecida da Silva, as amostras desse trabalho foram amplificadas com mini-primers combinados para gerar amplicons em reações PCR multiplexes, cobrindo a região controle do DNAm.

As reações foram preparadas para volume final de 20 μL , contendo 10 μL de Tampão Qiagen *Multi* (2X), 2 μL de uma mistura dos iniciadores do DNA mitocondrial L15900, H16322, L16555, H00285, L00314 e H00639 na concentração final 0,2 μM , 4 μL do DNA (50pg/ μL) e água para o volume final. As reações de amplificação de DNA pela PCR foram realizadas em termocicladores modelo Veriti 96 well – Thermal Cycler (Applied Biosystems), na programação termocíclica apresentadas no quadro 3. A subsequente eletroforese para observação dos amplicons gerados foi realizada em gel de agarose 3% com TAE 1x, pH.

Quadro 3 - Programação da ciclagem na PCR.

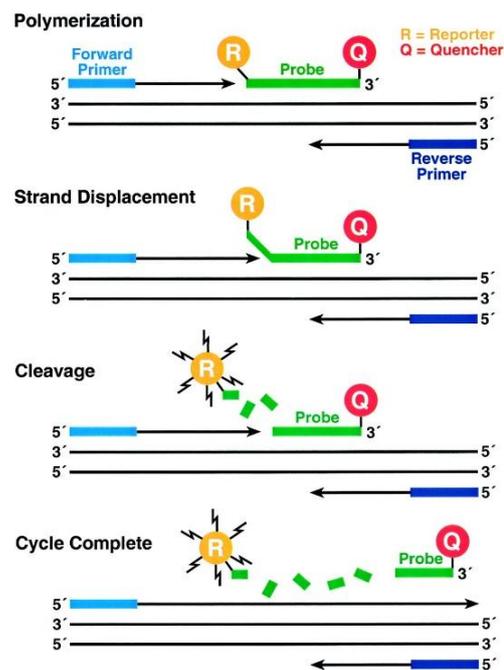
ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO
Pré-aquecimento	95°C	15 min
Desnaturação	94°C	15s
Anelamento	57°C	10s
Extensão	72°C	20s

2.13 PCR em tempo real

Realizamos a quantificação do material com o kit *Quantifiler® Duo DNA Quantification* na plataforma *7500 Real-time PCR System*, que permite quantificar DNA autossômico e sexual masculino. Os processos ocorrem de modo simultâneo em ambos os materiais devido a presença de iniciadores específicos e sondas TaqMan MGB marcadas com fluorocromos VIC e FAM que, respectivamente, são capazes de se ligar e amplificar nestes DNAs-alvo. Além destas duas sondas, há a existência de uma terceira sonda com o fluorocromo NED, amplificando assim quando as ciclagens acontecem eficientemente.

Em relação à PCR convencional, a reação em tempo real gera medições da concentração do DNA através da emissão de fluorescência pelo Repórter, indicado na figura 15 como “R”. Cada sonda adicionada a reação possui um Repórter ligado à sua extremidade 5’ e um Inibidor (indicado por “Q” na figura 15) em sua 3’, sendo “Q” um inibidor de “R” que, enquanto ligados, não permite que “R” emita sua fluorescência.

Figura 15 - Esquema ilustrativo da qPCR



Fonte: Google.

Durante a etapa de extensão, conforme a DNA polimerase avança e encontra a sonda ligada a fita-molde, esta enzima quebra a ligação de “R” com a sonda e, por consequência, com “Q”, permitindo a emissão da fluorescência. Quão maior é o número de moléculas de DNA no meio de reação, maior será a emissão de fluorescência. Esta emissão então é detectada por um detector que, por meio da prévia assimilação entre o tipo de fluorocromo e uma cor estabelecida pelo operador, consegue detectar a intensidade e o comprimento de onda da luz emitida, identificando assim o tipo de material genético e sua quantidade.

A análise estatística do resultado da quantificação de DNA foi realizada no software R com teste estatístico de variância.

3 RESULTADOS

3.1 Análise das amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise qualitativa das fotografias em Microscopia Eletrônica de Varredura sugere alterações morfológicas em todas as amostras. Apesar de visível nas três porções aqui estudadas, as alterações ocorreram de forma mais intensa nas regiões trabecular e, prioritariamente, na cortical como exposto na figura.

A amostra 340 (figura 16) sofreu alterações em sua porosidade, estando evidente nas regiões cortical e trabecular em 90 dias. Note a presença de um infiltrado nos locais próximos as porosidades formadas.

Na amostra 359 (figura 17) foi possível observar presença de infiltrado desde 30 dias após o início da exposição do material à água do rio. Embora não possua porosidades de tamanho semelhantes ao encontrado na amostra 340 (figura 16), esses infiltrados parecem se concentrar em uma localidade específica da amostra como mostra a figura.

Com relação a amostra 430 (figura 18) ocorre um aumento no número de rachaduras em sua estrutura.

Semelhante à 430 (figura 18), a amostra 448 (figura 19) apresentou aumento em sua quantidade de rachaduras e de porosidade principalmente na região cortical, além do aumento da porosidade e presença de infiltrado.

A amostra 565 (figura 20) possuiu a maior concentração de infiltrado entre nossas amostras, com predominância na região trabecular no tempo de 90 dias.

A exceção dentre as estudadas foi a amostra 658 (figura 21) possuindo a presença de infiltrado em abundância na região superficial externa.

Na amostra 663 (figura 22) observamos um aumento da porosidade na região trabecular, porém, maior presença de infiltrado na cortical.

Já na amostra 679 (figura 23) verificamos uma maior concentração de infiltrado nos tempos de 30 e 60 dias pós exposição ao rio.

Nas imagens verifica-se a presença de um infiltrado nas regiões cortical e trabecular, majoritariamente, a partir dos 30 dias de exposição e com maior intensidade no tempo de 90 dias. Baseado nessas modificações morfológicas, nos perguntamos se estas poderiam estar

associadas a alguma modificação na composição estrutural do tecido. Para responder a esta pergunta utilizamos a metodologia de Espectroscopia de Raman.

Figura 16 - Fotografias por MEV da amostra 340. Aumento de 100x.

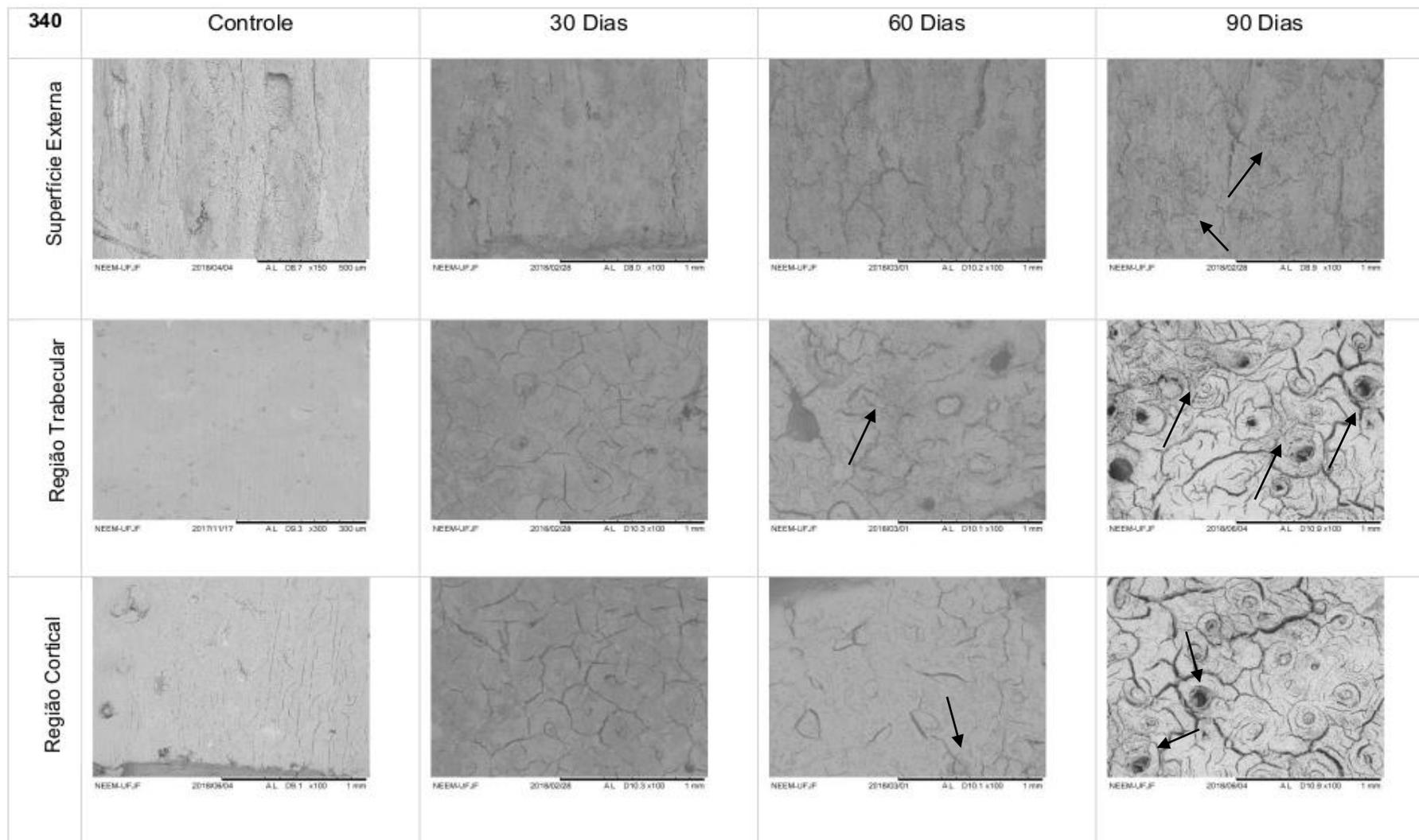


Figura 17 - Fotografia por MEV da amostra 359. Aumento 100x.

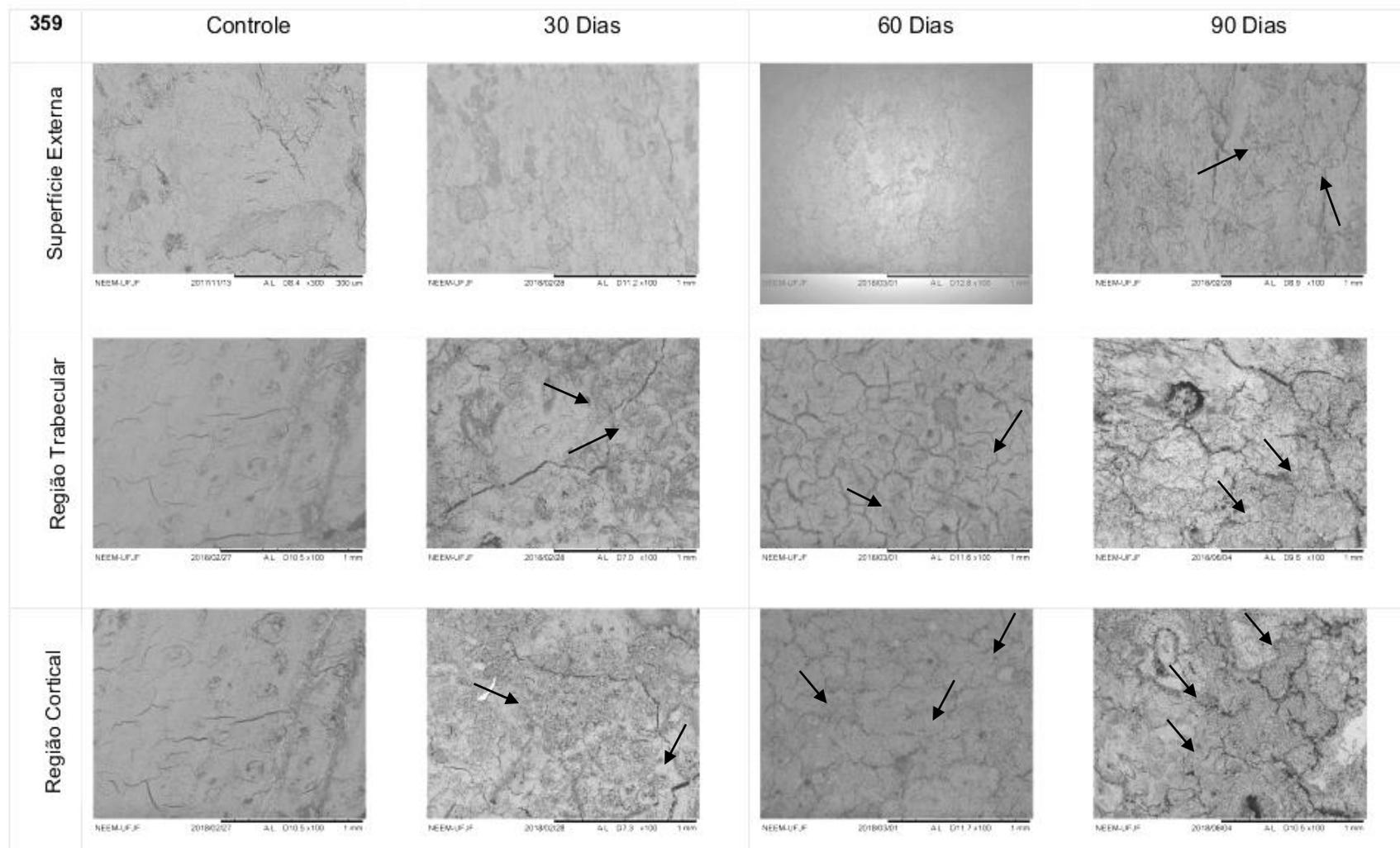


Figura 18 - Fotografia por MEV da amostra 430. Aumento 100x.

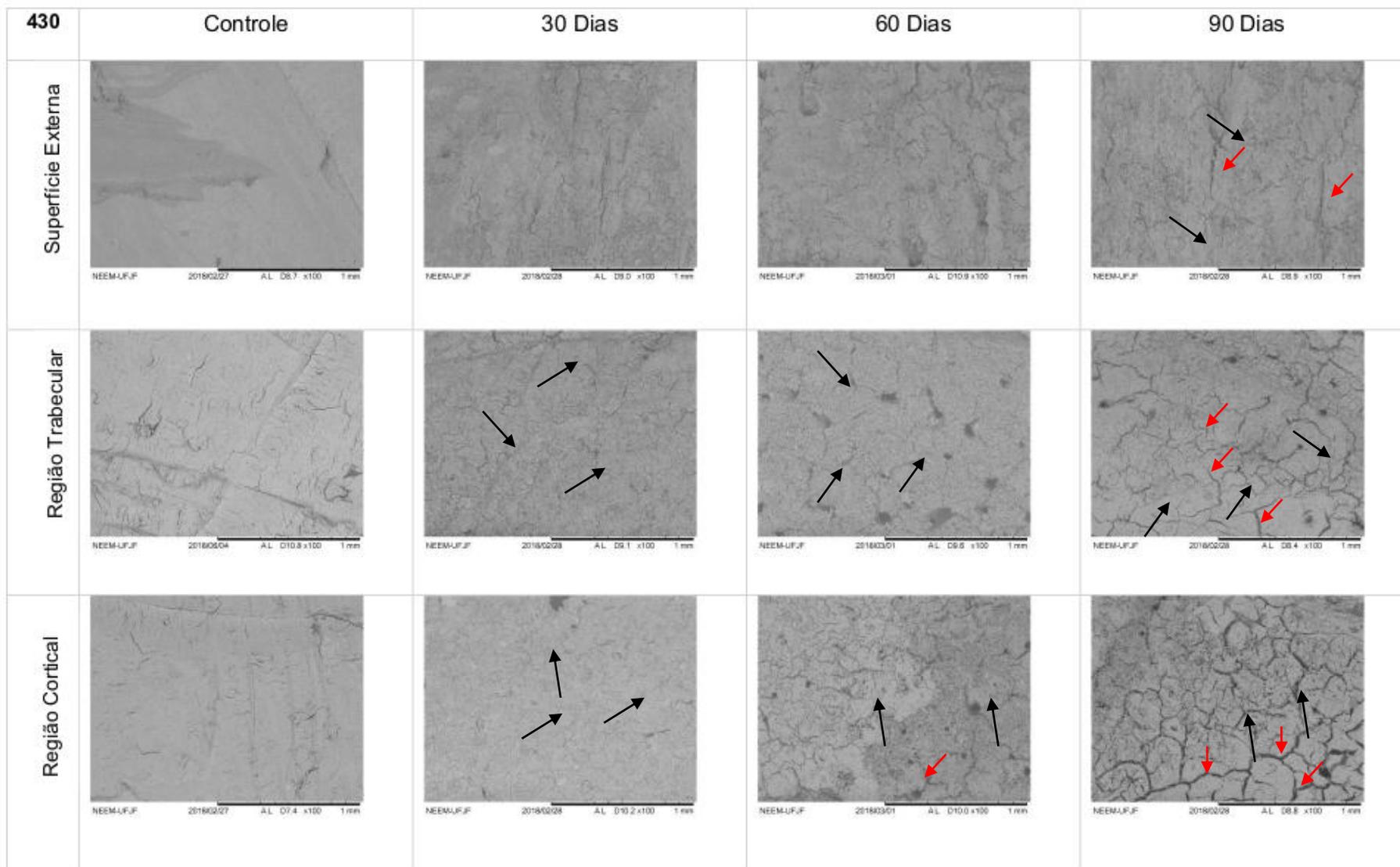


Figura 19 - Fotografia por MEV da amostra 448. Aumento 100x.

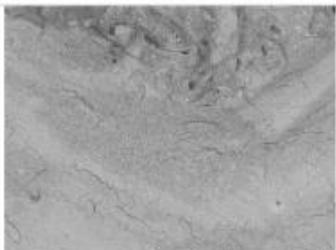
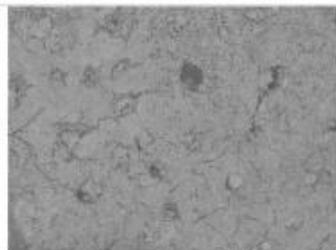
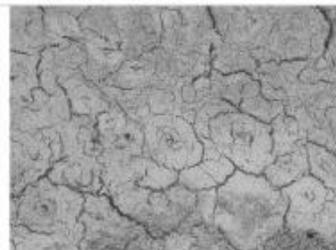
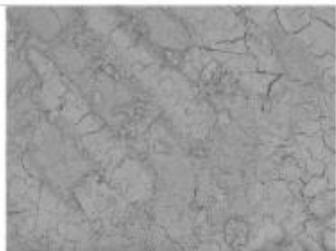
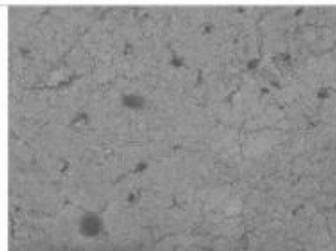
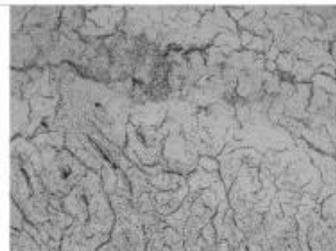
448	Controle	30 Dias	60 Dias	90 Dias
Superfície Externa	 <p data-bbox="259 611 595 630">NEEM-LF,JF 20180403 AL D8.3 x150 500 um</p>	 <p data-bbox="663 611 999 630">NEEM-LF,JF 20180201 AL D10.9 x100 1 mm</p>	 <p data-bbox="1066 611 1402 630">NEEM-LF,JF 20180301 AL D10.3 x100 1 mm</p>	 <p data-bbox="1469 611 1805 630">NEEM-LF,JF 20180228 AL D7.6 x100 1 mm</p>
Região Trabecular	 <p data-bbox="259 933 595 952">NEEM-LF,JF 20180606 AL D12.3 x100 1 mm</p>	 <p data-bbox="663 933 999 952">NEEM-LF,JF 20180228 AL D10.5 x100 1 mm</p>	 <p data-bbox="1066 933 1402 952">NEEM-LF,JF 20180301 AL D10.5 x100 1 mm</p>	 <p data-bbox="1469 933 1805 952">NEEM-LF,JF 20180603 AL D11.8 x100 1 mm</p>
Região Cortical	 <p data-bbox="259 1256 595 1275">NEEM-LF,JF 20180804 AL D10.8 x100 1 mm</p>	 <p data-bbox="663 1256 999 1275">NEEM-LF,JF 20180228 AL D11.0 x100 1 mm</p>	 <p data-bbox="1066 1256 1402 1275">NEEM-LF,JF 20180301 AL D10.7 x100 1 mm</p>	 <p data-bbox="1469 1256 1805 1275">NEEM-LF,JF 20180603 AL D11.8 x100 1 mm</p>

Figura 20 - Fotografia por MEV da amostra 565. Aumento 100x.

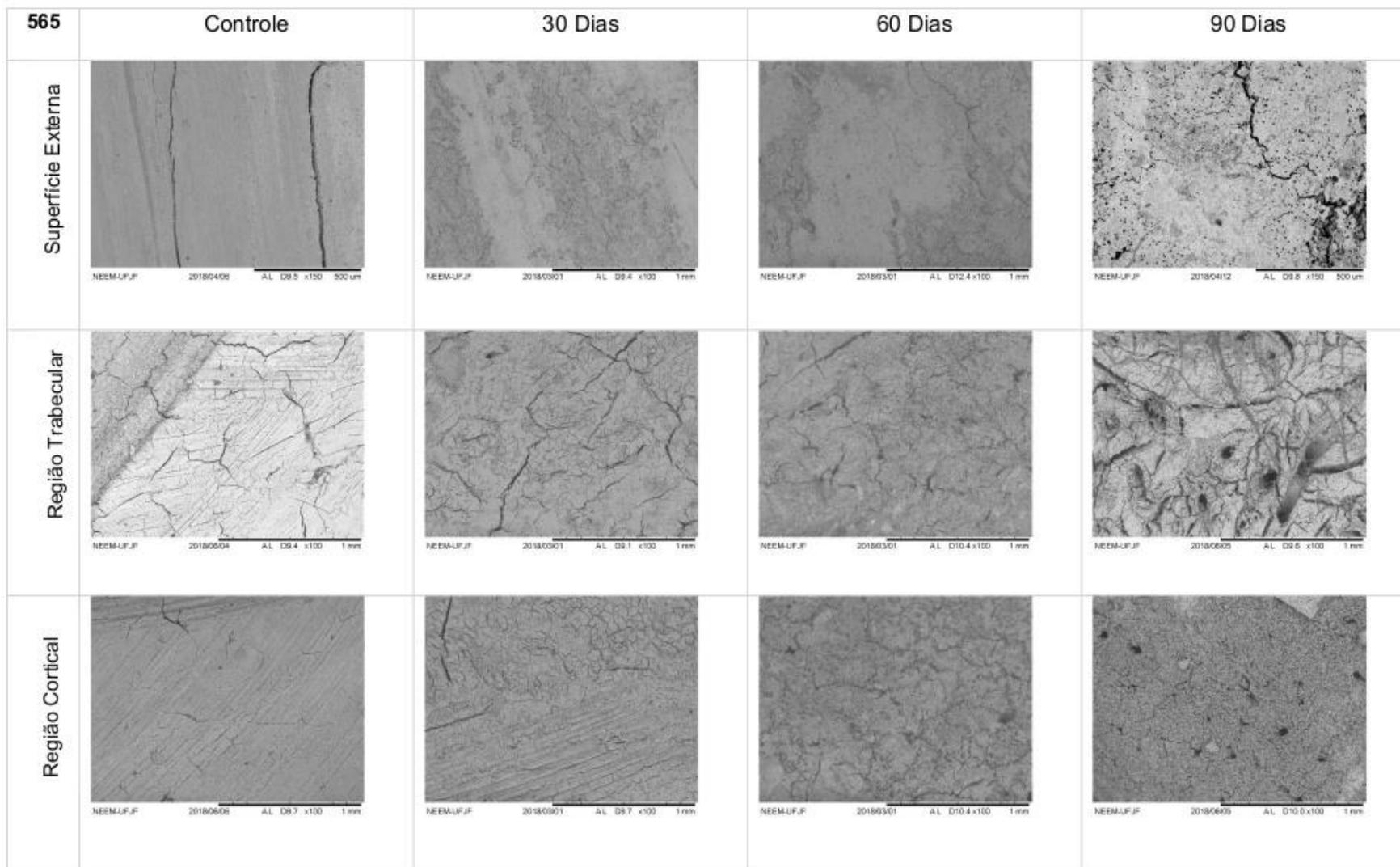


Figura 21- Fotografias por MEV da amostra 658. Aumento de 100x.

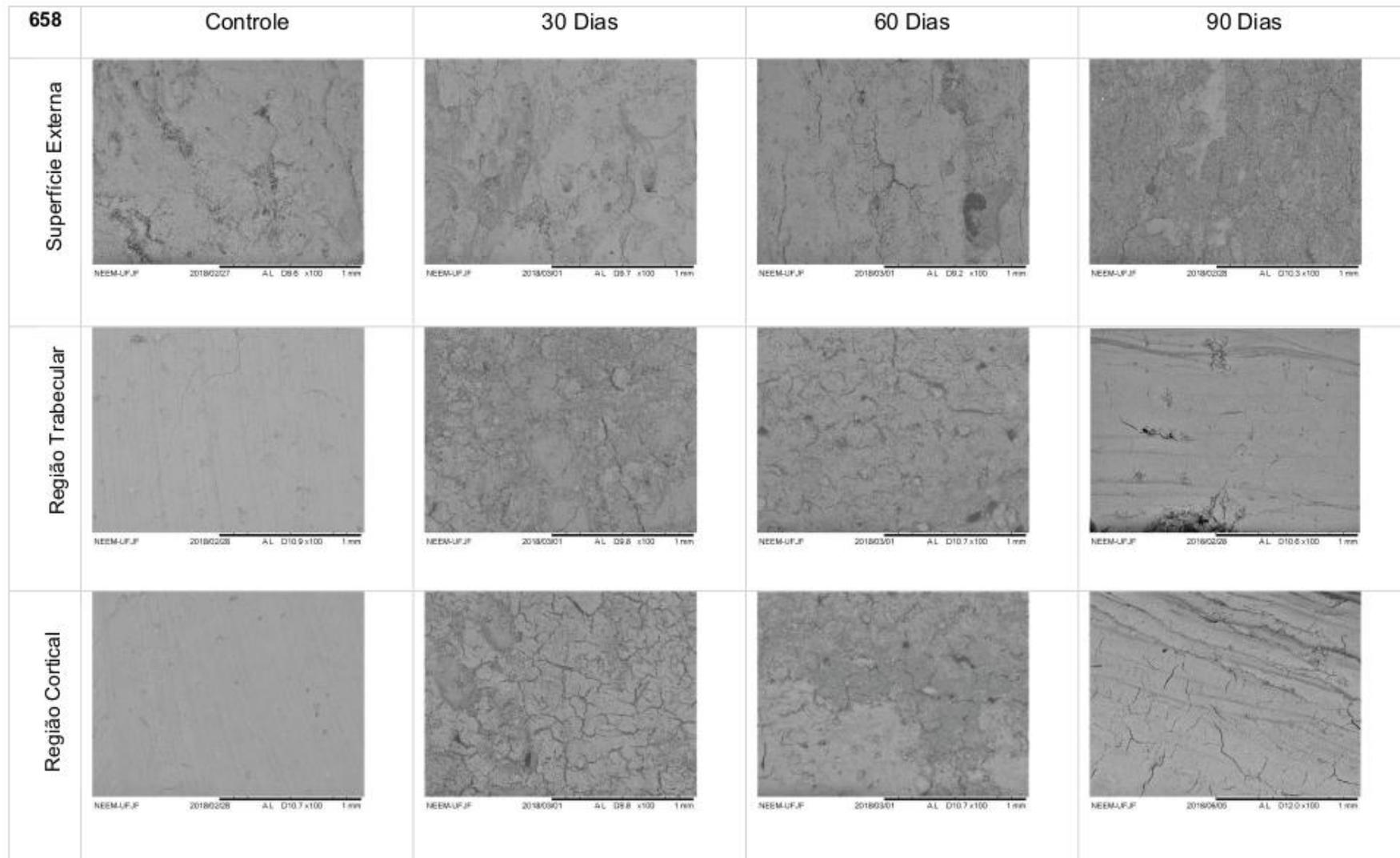


Figura 22- Fotografia por MEV da amostra 663. Aumento 100x.

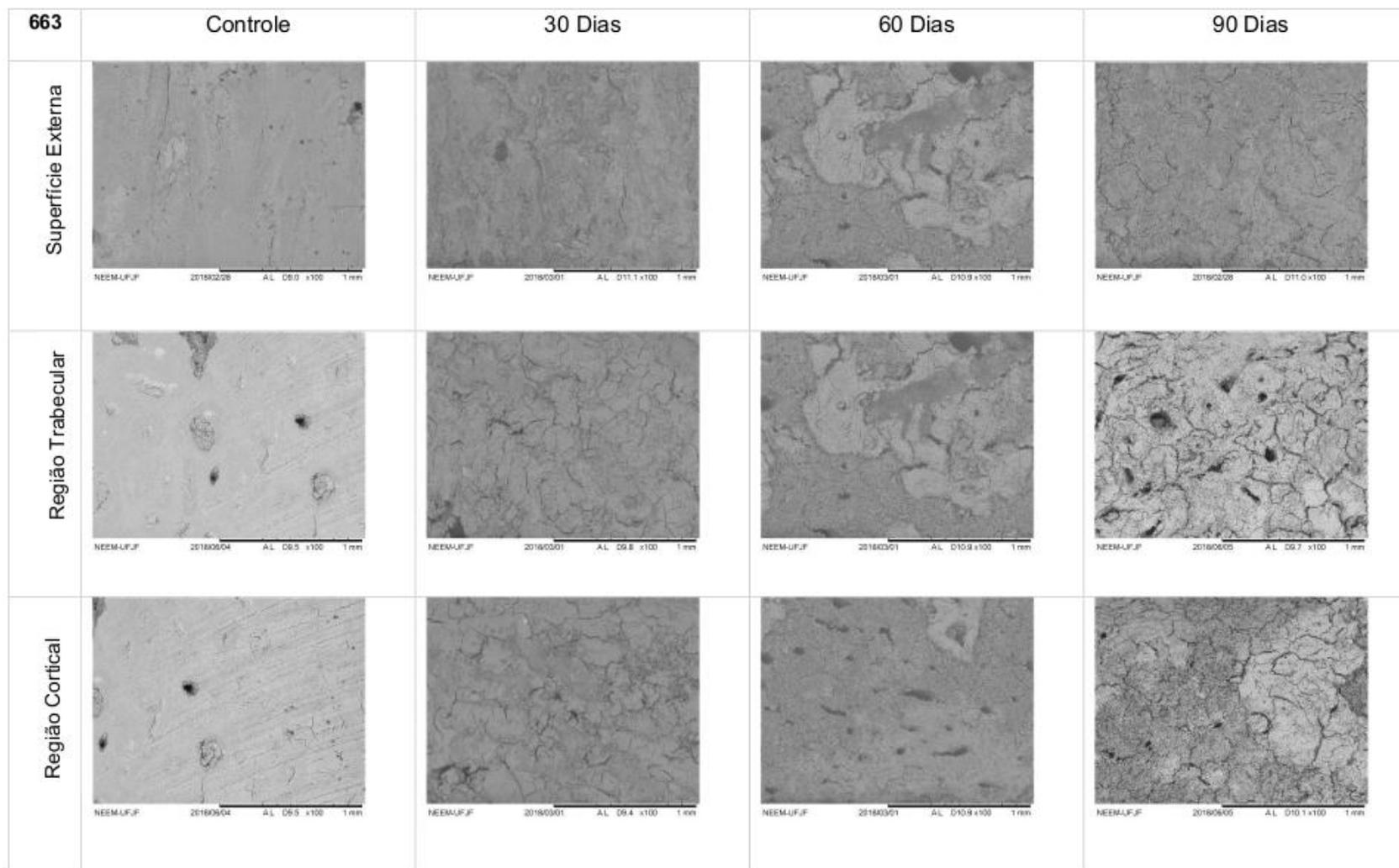
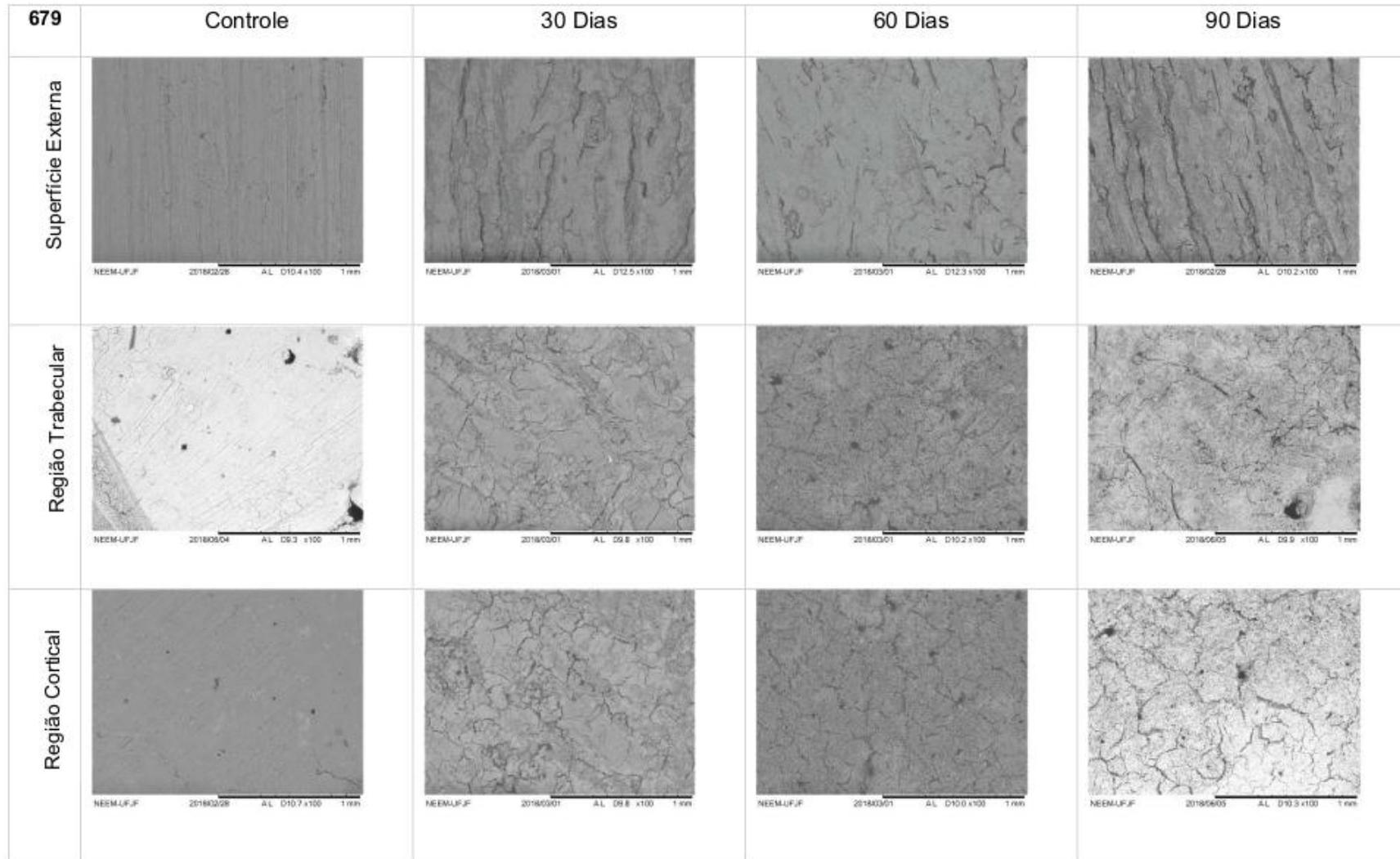


Figura 23- Fotografia por MEV da amostra 679. Aumento 100x.



3.2 Análise das amostras por Espectroscopia Raman

Neste estudo focalizamos as análises para o intervalo de número de ondas entre 200 e 1800 cm^{-1} , onde conseguimos identificar as bandas de três estados vibracionais do grupamento fosfato- ν_2 (431 cm^{-1}), ν_4 (592 cm^{-1}) e ν_1 (962 cm^{-1}), de um estado vibracional do grupamento carbonato- ν_1 - (1072 cm^{-1}), da amida I (1295 cm^{-1}), CH_2 (1450 cm^{-1}) e amida III (1660 cm^{-1}), como mostram as figuras.

Na figura 24, verificamos a presença de fluorescência nos espectros de ambos os tempos. Segundo Carden e Morris (2000), é comum o aparecimento de fluorescência em espectros gerados por Raman em tecidos mineralizados, devido à concentração de proteínas intra e extra matricial. Como consequência dessa interferência, picos de baixa intensidade do fosfato que são encontrados na faixa do 431 cm^{-1} e 592 cm^{-1} não foram detectados.

A importância dos grupamentos identificados está relacionada diretamente com as suas participações na composição do tecido ósseo. Os estados vibracionais ν_2 e ν_4 do fosfato representam a molécula de Octocalcio Fosfato (OCP) e o estado ν_1 , a hidroxiapatita (HA). Concomitantemente estas moléculas formam os cristais minerais presentes no tecido ósseo (Chickerur *et al.*, 1980), porém os cristais constituídos de OCP possuem uma menor razão de Cálcio/Fósforo quando comparados aos de HA, possuindo, por tanto, menor rigidez.

O estado ν_1 do carbonato reflete a proporção de carbonato que foram incorporados no lugar do fosfato dentro da apatita (Aparecido, 2009), enquanto que os grupamentos amida I e III e CH_2 estão intrinsecamente correlacionados com a matriz orgânica do tecido. A amida I é utilizada como principal marcador de colágeno do tipo I.

Figura 24- Espectros da amostra 340

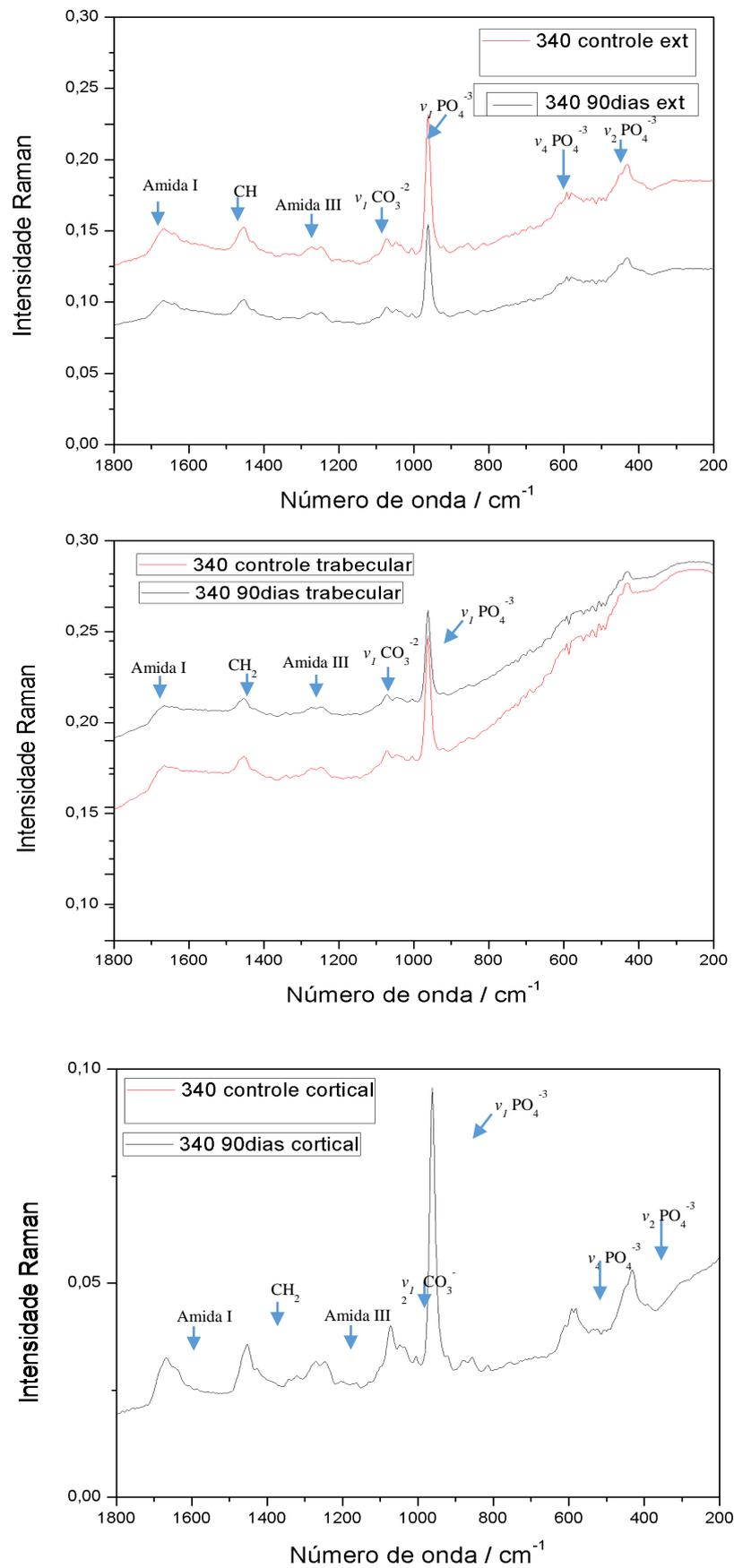


Figura 25- Espectros da amostra 359

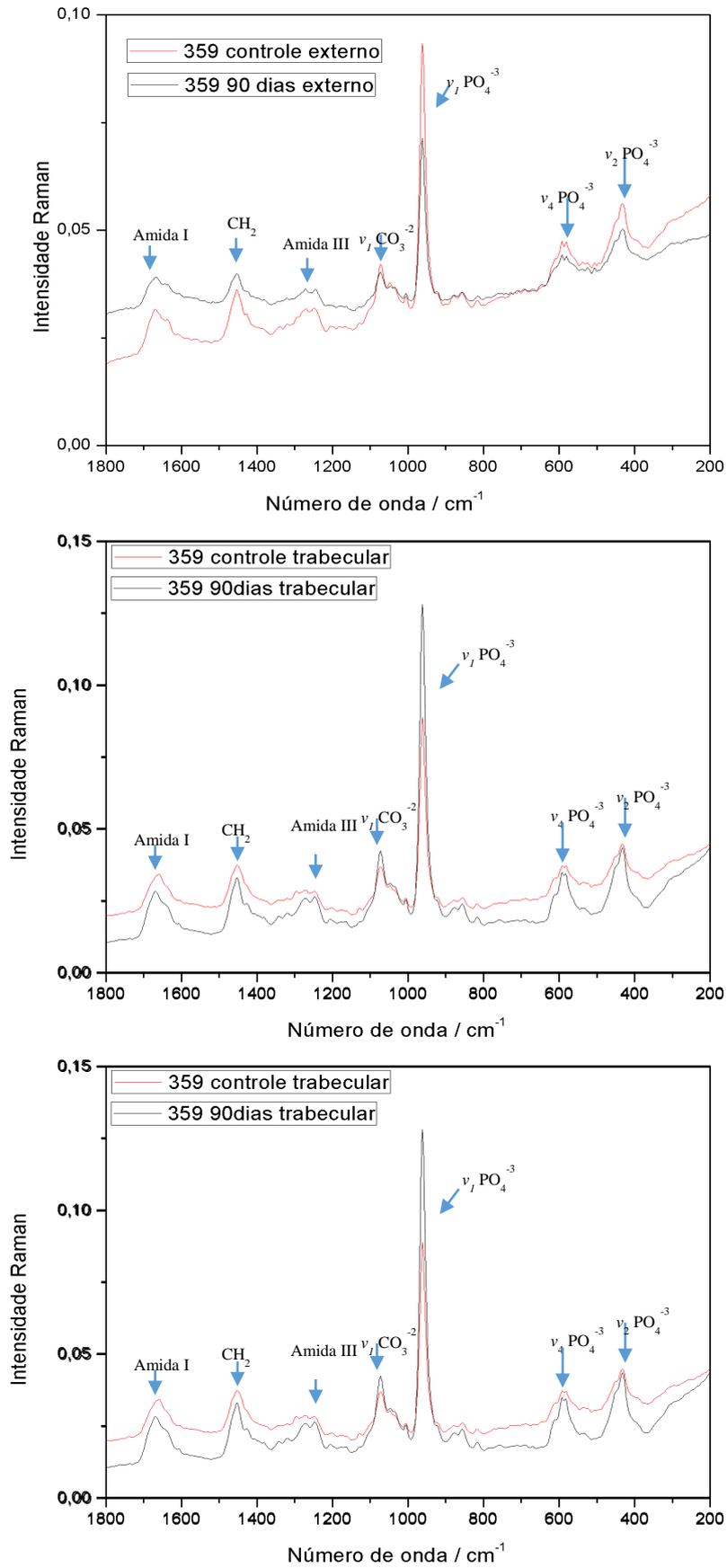


Figura 26- Espectros da amostra 430

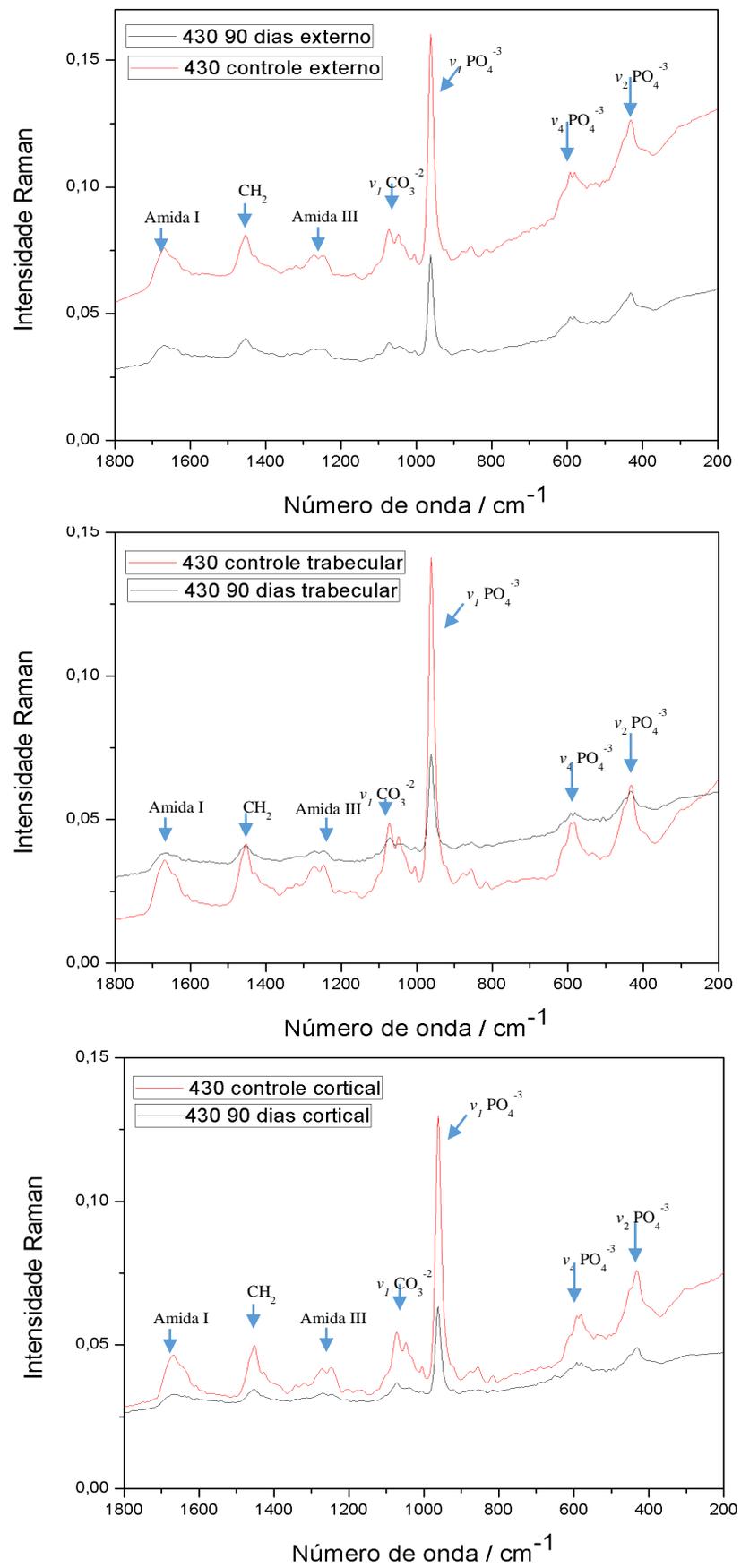


Figura 27- Espectros da amostra 448

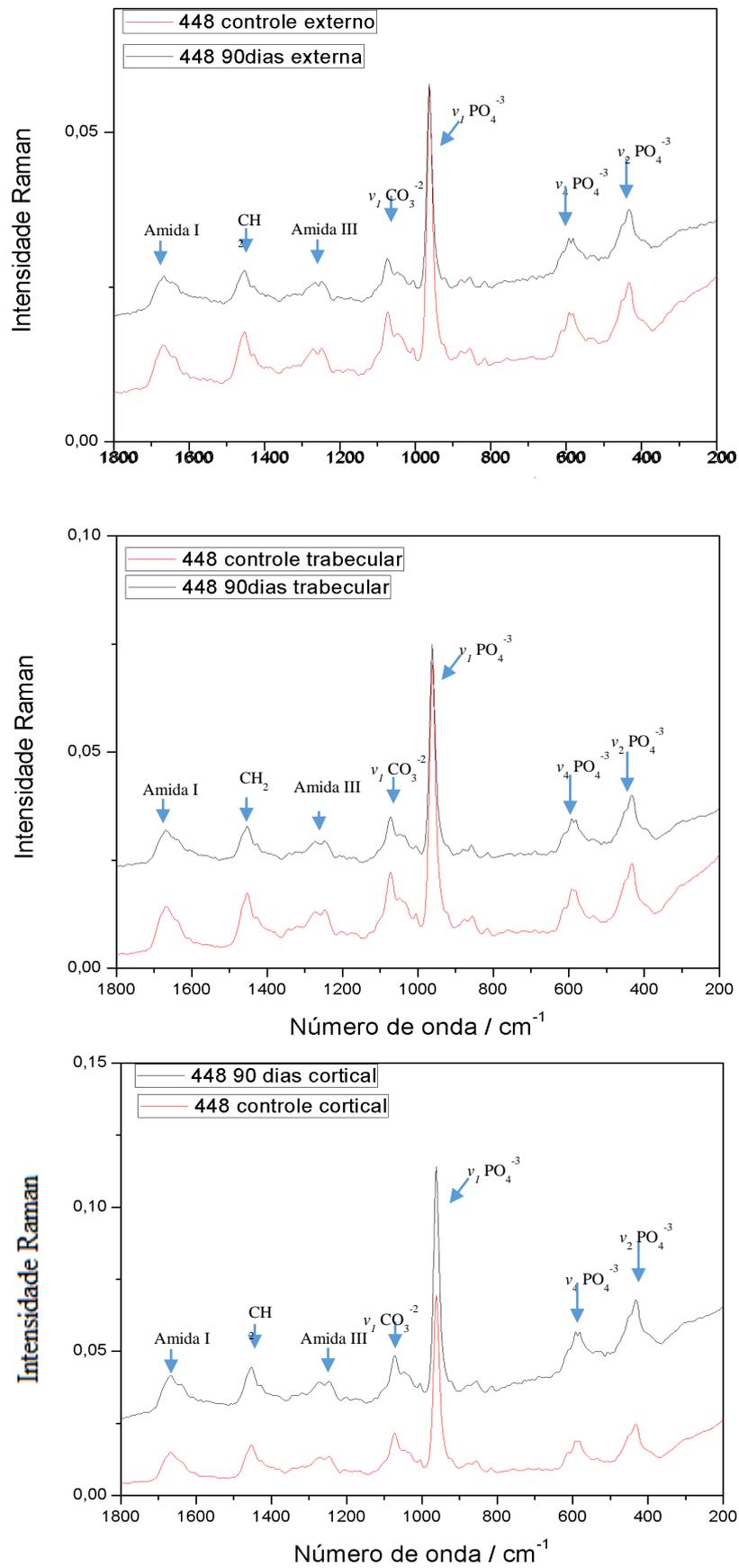


Figura 28- Espectros da amostra 565

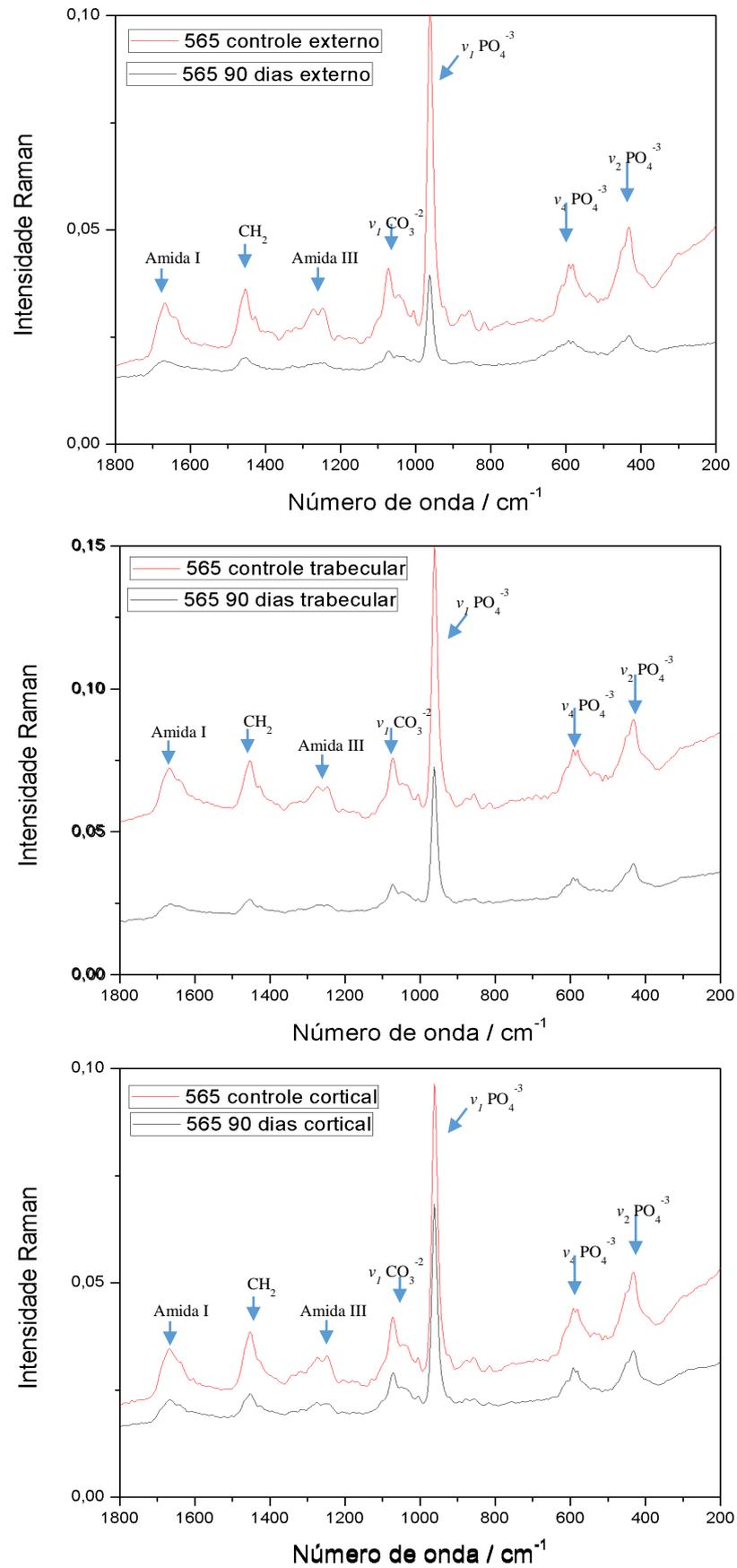


Figura 29 - Espectros da amostra 658

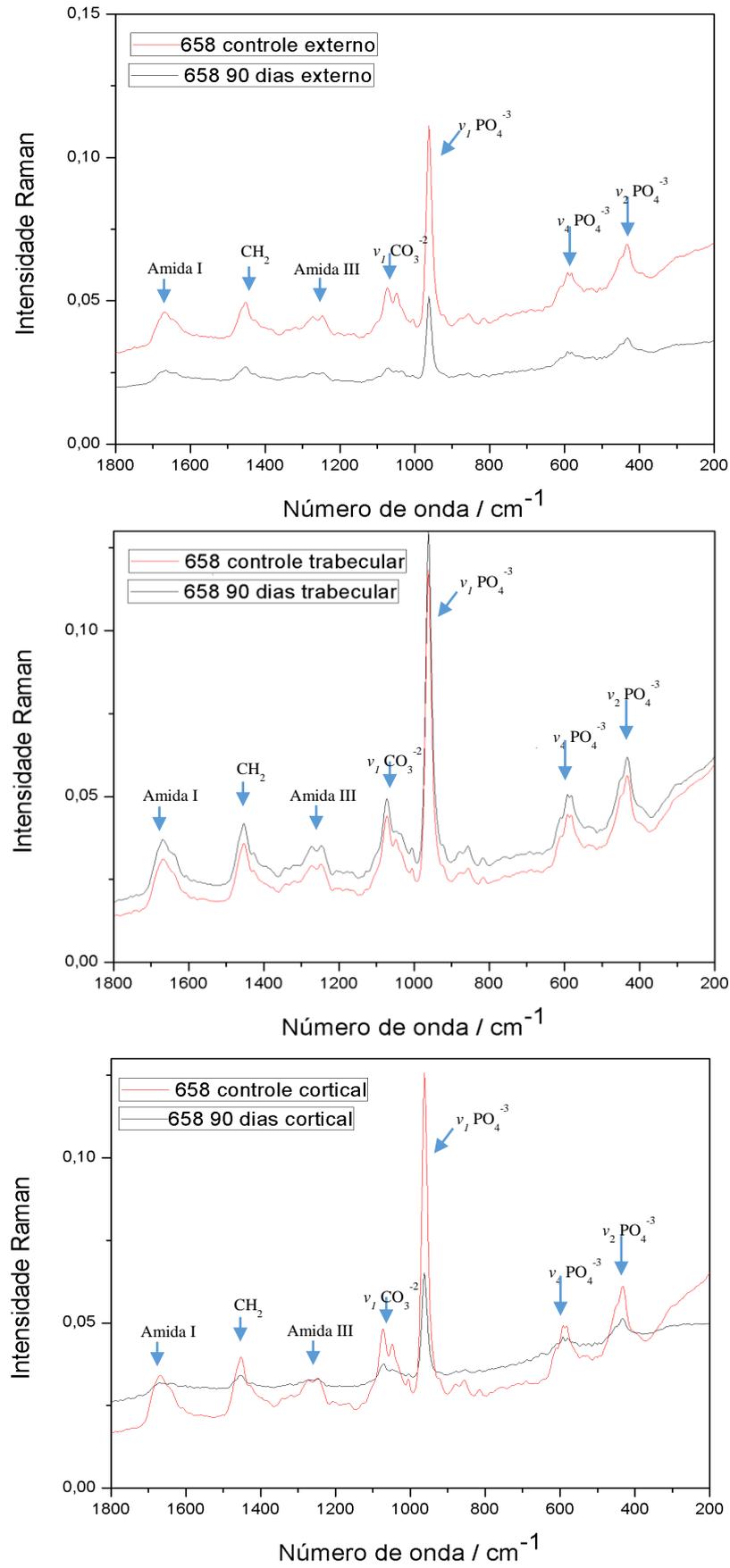


Figura 30- Espectros da amostra 663

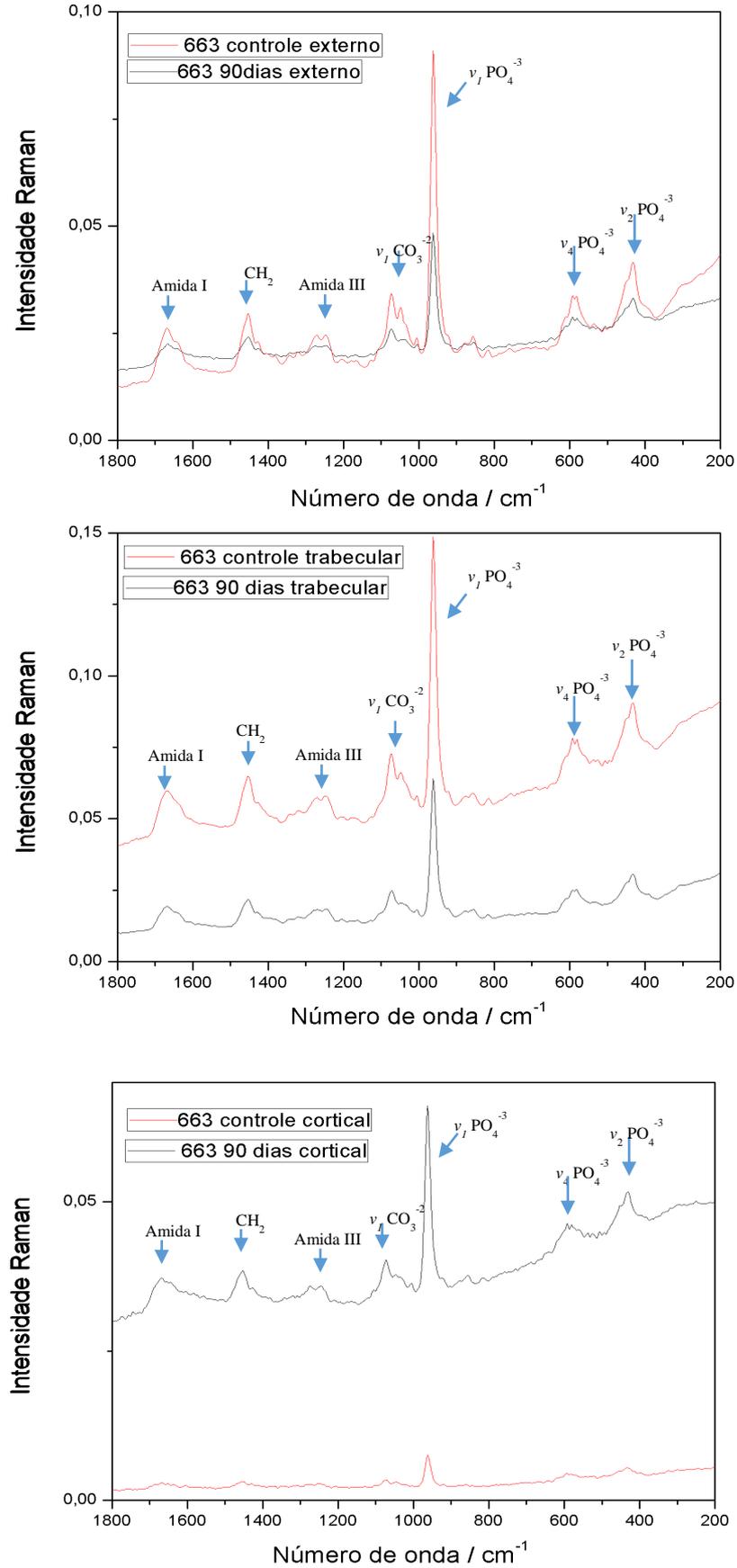
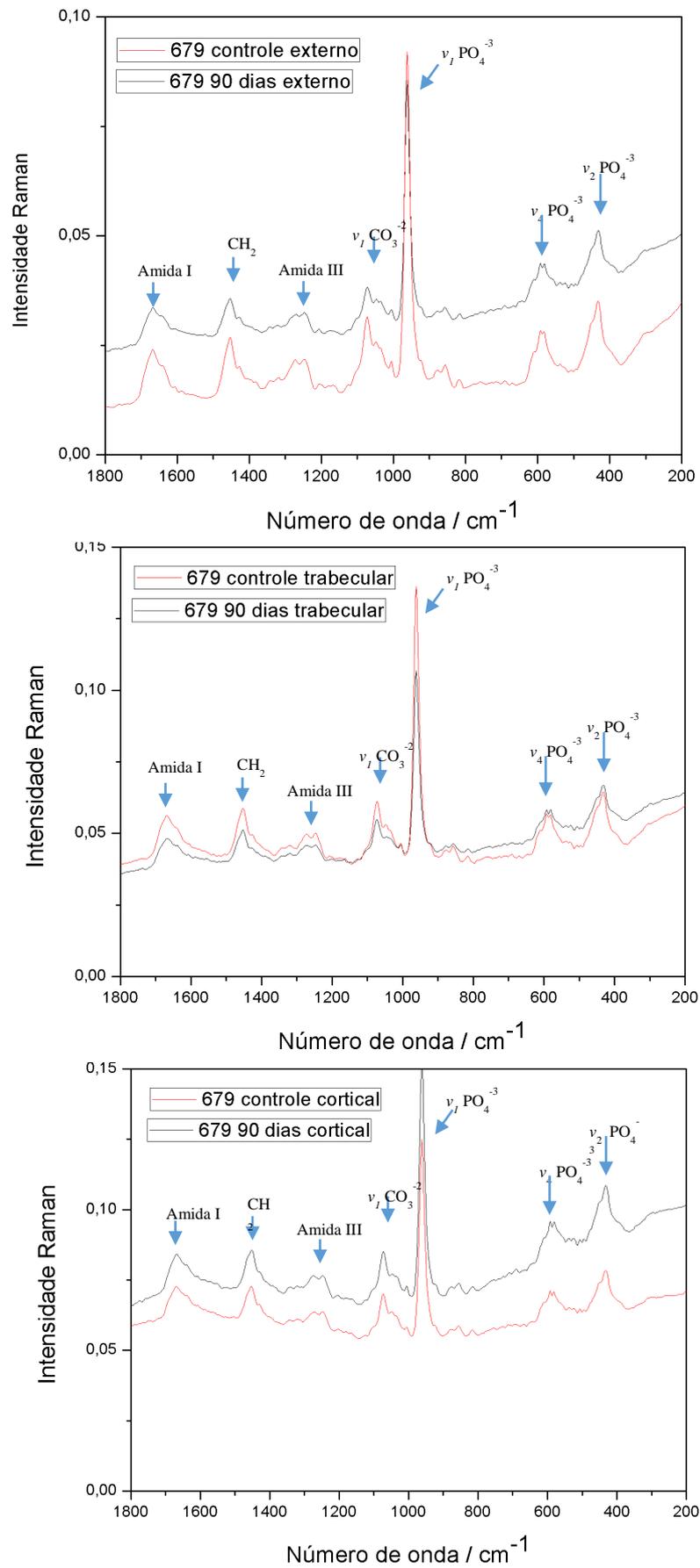


Figura 31 - Espectros da amostra 679



A partir destas informações, inferimos que a composição estrutural básica permaneceu inalterada apesar da exposição à água, uma vez que os espectros das amostras controle e 90 dias de todos os grupos são iguais. Um segundo aspecto a ser abordado é a distinção entre as linhas bases dos espectros destas amostras. A intensidade do Raman pode ser alterada por diferenças no ângulo de incidência da luz, presença de componentes que diminuam a penetração da luz na amostra ou por diminuição do conteúdo que as bandas representam. Aqui não realizamos correções da linha base, não permitindo, por isto, que qualquer estudo de razão de proporção seja realizado e comentemos sobre o aumento ou diminuição da concentração dessas moléculas. O fato é que, como visto na microscopia de varredura, há uma alteração morfológica nas amostras exposta à água e esta é uma possível explicação para a ocorrência deste fenômeno na intensidade.

A Espectroscopia de Raman nos possibilitou verificar que a base estrutural permaneceu inalterada, mas não nos possibilitou inferir sobre concentração dos componentes. Unindo os resultados da MEV e do Raman, uma terceira pergunta surgiu sobre estas concentrações. Levando em consideração que pequenas alterações iônicas não são facilmente visualizadas por Raman, optamos por realizar uma Espectroscopia de Raio X por Dispersão em Energia (EDS) a fim de visualizarmos se as diferenças vistas por microscopia estariam relacionadas com a composição iônica e não a molecular.

3.3 Avaliação das amostras de osso por Espectroscopia de Raio X por Dispersão em Energia (EDS)

Por meio desta técnica, identificamos a alteração da composição iônica devido a exposição à água (quadro 4). No tempo controle apenas os elementos já ditos como constituintes da matriz inorgânica foram encontrados, ao passo que com 30 dias já verificamos a presença de íons, como Si^+ , Al^{+3} , e a não a detecção do íon Mg^{+2} .

O quadro 4 está separado de acordo com o tempo experimental e a região analisada. Os elementos estão configurados para uma cor única representativa e em ordem decrescente de concentração, onde os elementos mais abundantes aparecem como primeiro elemento da tabela e assim sucessivamente até o de menor concentração. Elementos que possuíram sua

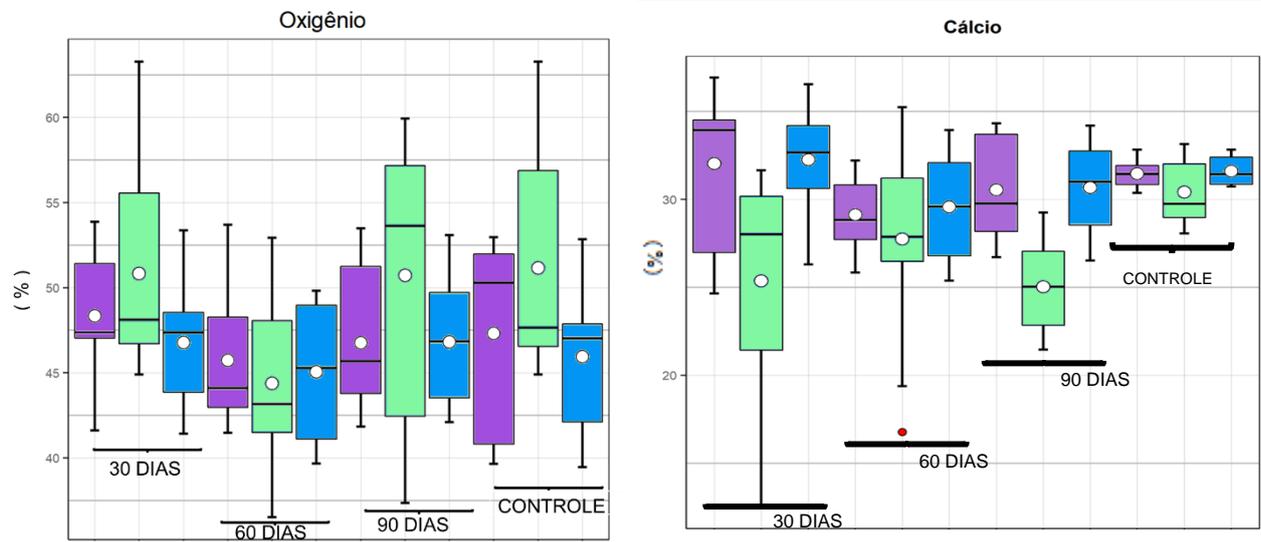
concentração alterada ao longo do experimento são demonstrados em posição diferente da anterior na tabela.

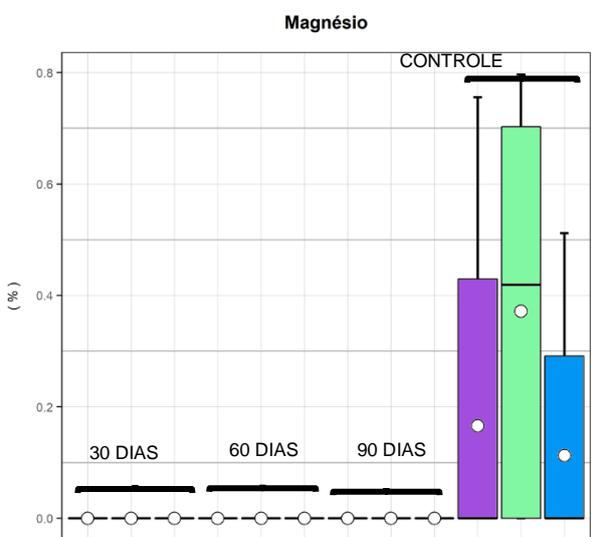
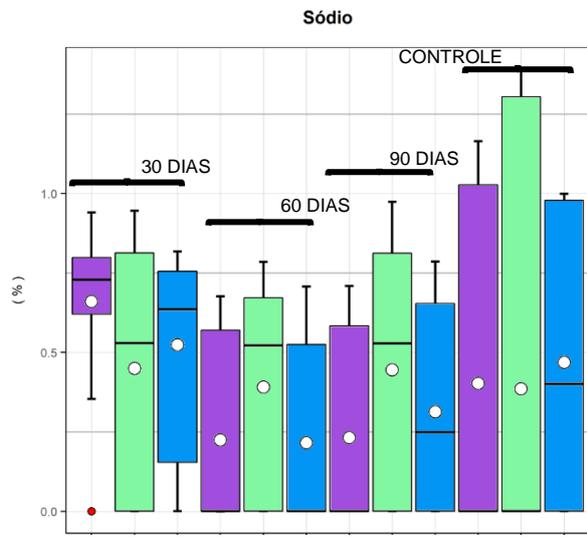
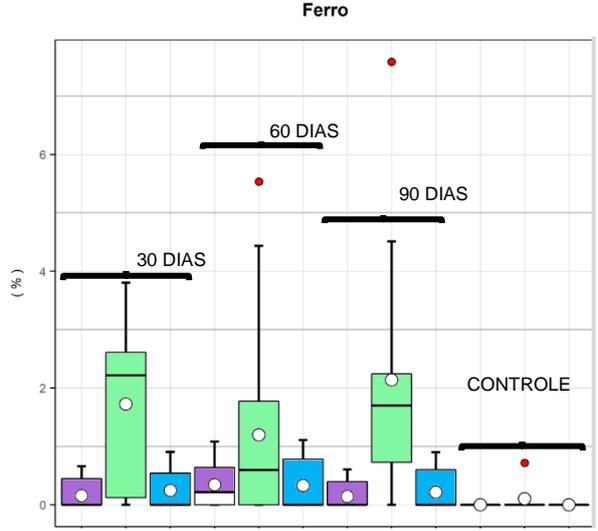
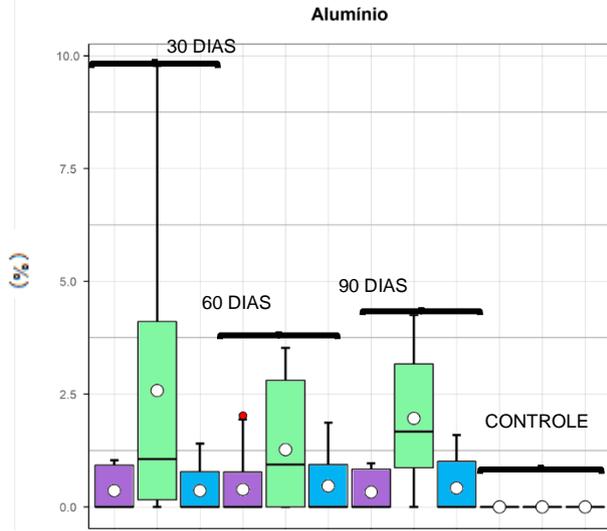
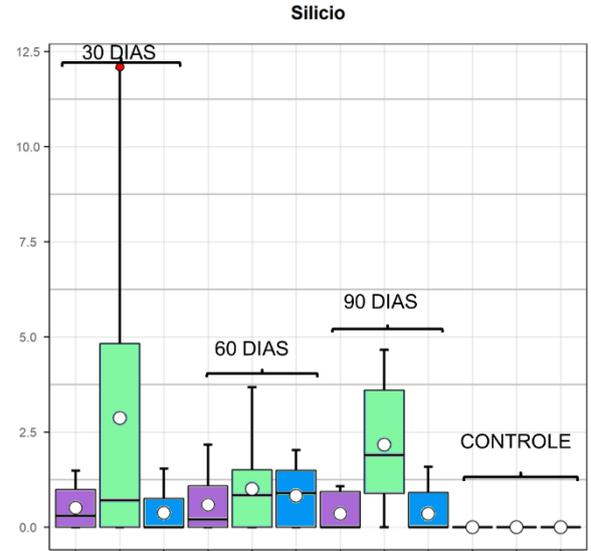
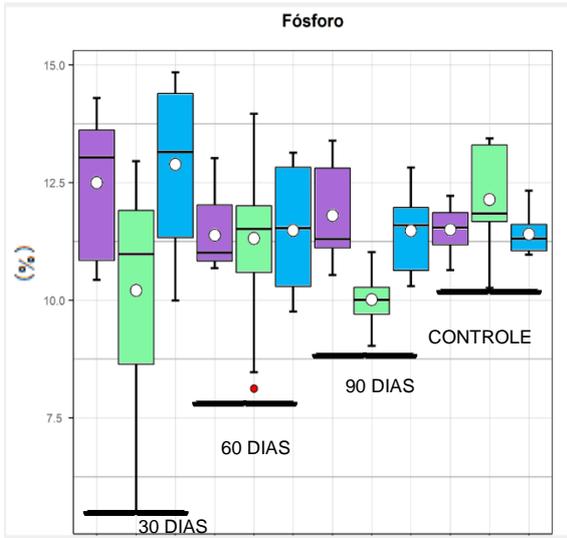
Quadro 4 - Resultado da análise por EDS

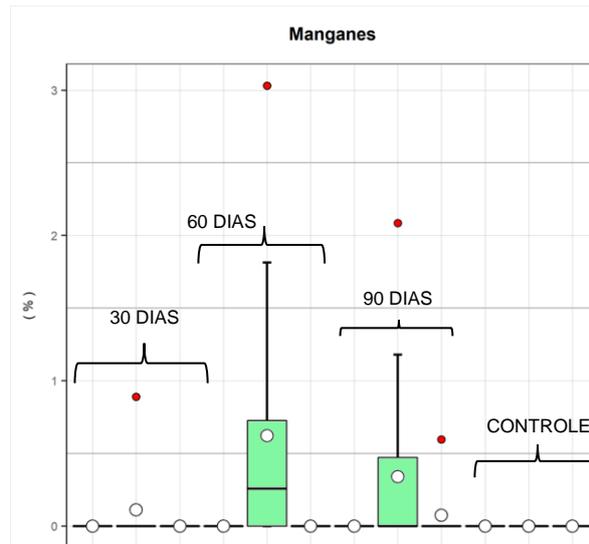
tempo	controle			30 dias		
interface	trabecular	cortical	externa	trabecular	cortical	externa
340	O,Ca,P	O,Ca,P	O,Ca,P	O,Ca,P,Si,Al,Na	O,Ca,P,Si,Al,Fe,Na	O,Ca,P,Si,Al,Fe
359	O,Ca,P	O,Ca,P	O,Ca,P,Mg	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Na
430	O,Ca,P,Na,Mg	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Na,Mg	O,Ca,P,Si,Al,Fe	O,Ca,P,Si,Al,Na,Fe	O,Ca,P,Si,Al,Na,Fe
448	O,Ca,P	O,Ca,P	O,Ca,P	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Al,Na
565	O,Ca,P	O,Ca,P	O,Ca,P,Na,Fe,Mg	O,Ca,P	O,Ca,P,Si,Al,Na,Fe	O,Ca,P,Fe,Al,Si
658	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Na,Mg	O,Ca,P,Mg	O,Ca,P,Si,Al	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Fe,Si,Al,Mn,Na
663	O,Ca,P,Na	O,Ca,P	O,Ca,P,Mg	O,Ca,P,Si,Na,Al,Fe	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Si,Al,Fe,Na
679	O,Ca,P,Na,Mg	O,Ca,P,Na,Mg	O,Ca,P	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Si	O,Ca,Si,Al,P,Fe
tempo	60dias			90dias		
interface	trabecular	cortical	externa	trabecular	cortical	externa
340	O,Ca,P	O,Ca,P	O,Ca,P,Si,Al,Na,Fe,Mg	O,Ca,P	O,Ca,P,Al,Na,Si	O,Ca,P
359	O,Ca,P,Si,Al,Fe	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Si	O,Ca,P	O,Ca,P	O,Ca,P,Si,Al,Fe,Na
430	O,Ca,P,Si,Al,Fe	O,Ca,P,Si,Al,Na,Fe	O,Ca,P,Fe,Mn	O,Ca,P,Si,Al,Fe	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Fe,Al,Si,Mn,Na
448	O,Ca,P,Si	O,Ca,P	O,Ca,P	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Si,Al,Fe
565	O,Ca,P,Na	O,Ca,P	O,Ca,P,Fe,Si,Al,Mn,Na	O,Ca,P,Al,Si,Fe,Na	O,Ca,P	O,Ca,P,Fe,Mn,Si,Al
658	O,Ca,P,Si,Al,Fe	O,Ca,P,Si,Al,Fe	O,Ca,P,Fe,Si,Al,Mn,Na	O,Ca,P	O,Ca,P	O,Ca,P,Si,Al,Fe
663	O,Ca,P,Si,Al,Na	O,Ca,P,Na,Si	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Al,Mn,Na	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Si,Al,Fe,Na
679	O,Ca,P,Si,Al	O,Ca,P,Na	O,Ca,P,Si,Al,Mn,Fe,Na	O,Ca,P,Si,Al,Fe,Na	O,Ca,P,Si,Al,Fe,Na	O,Ca,P,Si,Al,Fe,Na

De maneira mais ilustrativa, os gráficos encontrados na figura 32 representam os dados contidos na tabela. Divididos pelos tempos analisados, as barras em lilás demonstram os resultados obtidos nas análises da região da superfície externa, em verde da trabecular e em azul da cortical. A disposição dos gráficos no texto foi realizada conforme a concentração do elemento nas amostras. Assim, os elementos que possuíram uma detecção de maior concentração são demonstrados primeiro. Desta forma, conseguimos visualizar de forma clara que a concentração dos elementos oxigênio, cálcio e fósforo diminuem ao longo da exposição à água em todas as faces analisadas e, em contrapartida, elementos como o ferro, alumínio e silício tem sua concentração aumentada.

Figura 32- Gráficos de variações dos componentes iônicos nas amostras







O comprimento da barra representa o intervalo do percentual de concentração encontrado do elemento. Os extremos das caixas demonstram o terceiro quartil na porção superior e o primeiro quartil na inferior, enquanto que a horizontal é a mediana encontrada. Os círculos vermelham representam pontos que estão distantes do padrão amostral encontrado e os brancos, as médias.

Pelo gráfico de percentual de oxigênio notamos uma alteração nas médias dos percentuais da superfície externa, com um aumento da média em 90 dias na região trabecular e uma manutenção de percentual na cortical.

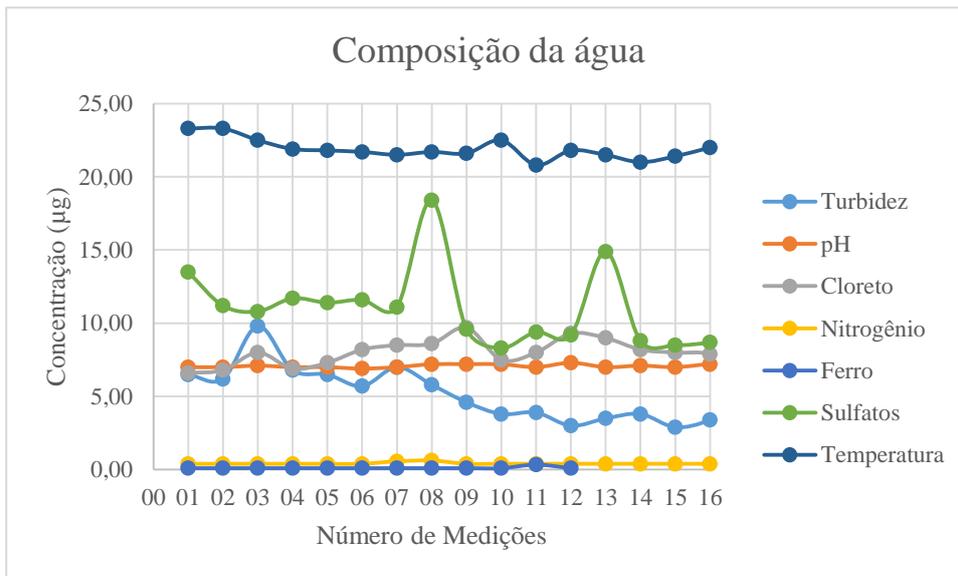
Com relação ao cálcio, temos um perfil de distribuição homogênea dentre as faces analisadas dos elementos existente no controle e mantida no tempo de 60 dias. Nos tempos de 30 e 90 dias, porém, há uma diminuição das médias na região trabecular. Este perfil é semelhante ao encontrado para o elemento fósforo.

O silício, um dos elementos detectados a partir de 30 dias, tem sua expressão percentual mais elevada na região trabecular e nos tempos de 30 e 90 dias. O alumínio e o ferro seguem a mesma linha que o silício. Por outro lado, o sódio que é detectado também no controle, se mantém em todas as faces analisadas e em todos os tempos, com uma diminuição da média percentual após a exposição e com manutenção de sua maior média na região trabecular.

Os elementos magnésio e manganês apresentaram perfis mais diferentes, sendo detectados, respectivamente, apenas no tempo controle e na região trabecular nos tempos de 30 e 60 dias. Unificando esses dados, percebemos que é na região trabecular onde ocorre maior troca iônica, por mais que seja na superfície externa o local de maior diversidade.

Um ponto relevante é a presença apenas de íons catiônicos. Para entendermos se essa exclusividade seria devido às características do ambiente experimental, analisamos os dados das medições ocorridas e cedidas pela CEDAE no local de ancoragem durante todo o período experimental (figura 33).

Figura 33 - Gráfico das variações iônica no ambiente



De acordo com a CEDAE, no mês de maio foram realizadas duas medições, em junho três, em julho cinco, em agosto quatro e em setembro uma medição durante o nosso período experimental, representados nos gráficos pelo número de medições.

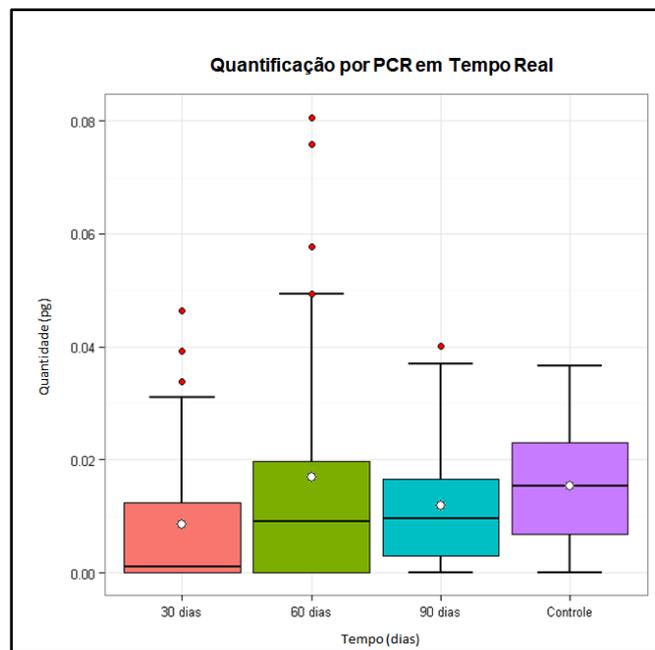
Embora as análises cedidas não possuam todos os íons encontrados por nós no EDS, é notório a presença de íons aniônicos em concentrações relativamente altas que não foram encontrados por nós. Colocando em evidencia os desgastes morfológicos encontrado por nós nas análises microscópicas e tendo em mente a maior quantidade de células presente na região trabecular, uma última pergunta foi idealizada.

Sabemos que o DNA está presente no interior das células do tecido ósseo e que, com a alteração morfológica do tecido, este material pode se tornar mais vulnerável. Além disso, é uma estrutura com polaridade negativa, atraindo então íons de carga positivas. Com isto nos questionamos se as alterações encontradas através do EDS e da microscopia eletrônica poderiam estar relacionadas com alterações na molécula de DNA, quantitativa e qualitativamente. Aqui nos detemos apenas para as análises quantitativa por questões de tempo e, para isto, realizamos a quantificação por PCR em tempo real (qPCR).

3.4 Avaliação da quantidade de DNA em amostras de osso por qPCR

Os resultados da quantificação de DNA por PCR em tempo real das amostras de tecido ósseo controle e imersas em rio por três meses podem ser observados no gráfico abaixo (figura 34). Apesar das variações entre as médias dos grupos, os testes de Fisher e Kruskal-Wallis revelaram não serem significantes quando analisados separadamente ($p < 0.05$).

Figura 34- Gráfico de variação da quantidade de DNA nas amostras

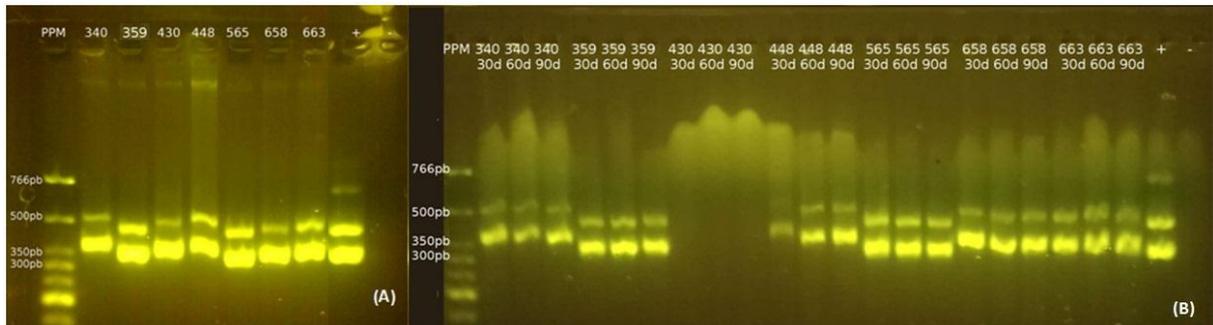


3.5 Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de DNA mitocondrial

A amplificação por PCR sequencias da região controle do DNA mitocondrial foi realizada com o DNA extraído oito das amostras biológicas estudadas, tanto para os controles quanto das amostras imersas por 30, 60 e 90 dias. O objetivo foi verificar se havia a presença de produtos de amplificação do DNA mitocondrial com o mesmo perfil e intensidade de bandas.

A figura 36 A e B são imagens dos géis de agarose a 3% empregados na realização da eletroforese para a verificação dos amplicons da região controle (A) e do DNA mitocondrial de amostras imersas por 30, 60 e 90 dias (B).

Figura 35 - Eletroforese em gel de agarose (3%) do mtDNA das amostras de tecido ósseo



Legenda: (A) controles amplificados com o conjunto multiplex 1; (B) amostras submersas por 30, 60 e 90 dias amplificadas com o conjunto multiplex 1; PPM: (A), (B) – Low Molecular Weight.

Verifica-se que todas as amostras, com exceção da amostra 430 imersa por 30, 60 e 90 dias apresentaram amplificação. Embora sete das oito amostras tenham amplificado em todas as condições, as amostras controle apresentaram padrão de intensidade de banda mais evidente que as amostras imersas em água.

4 DISCUSSÃO

Os conhecimentos da Antropologia Forense foram, por décadas, utilizados como a principal fonte norteadora para o processo de identificação de ossadas (Galik *et al.*, 2015). Entretanto, com o avanço científico e tecnológico, a genética em conjunto com a Antropologia passou a contribuir de forma significativa para o aprimoramento desse processo, de forma mais eficiente e com maior aceitação em tribunais.

Por estar presente em todas as células, é possível obter material genético de diferentes partes de um indivíduo, mesmo em pequenos fragmentos. Além disso, necessita pequenas quantidades para análise e pode ser confrontado com os resultados obtidos das análises de parentes vivos e não necessariamente do próprio indivíduo (de Boer *et al.*, 2018).

Casos de desastres em massa, ocorridos inclusive em ambiente aquático vem ganhando espaço em problemas sociais recentes (Cartozzo *et al.*, 2018) no âmbito civil e militar. Poucos são os artigos que demonstram sucesso na amplificação total de material obtido de ossadas encontradas no mar após acidentes aéreos (Cranic *et al.*, 2002; Court e Madea., 2011). Em sua maioria, a amplificação acontece de maneira comprometida, com apenas partes do perfil genético ou quantidades insuficientes para que este processo ocorra (Fredericks *et al.*, 2013; Goodwin *et al.*, 2003).

O tecido ósseo é frequentemente utilizado no contexto forense devido ao maior grau de preservação desse tecido ao longo do tempo, inclusive sob condições adversas. Na genética forense, perfis de haplótipos do DNA mitocondrial que retratam linhagens familiares podem ser mais facilmente obtidos a partir desse tipo de amostra (Parsons, 2001). Por outro lado, perfis de marcadores para identificação como os microssatélites, entre outros, precisaram ter origem em amostras com melhor grau de conservação, mesmo oriundas de tecido ósseo. Dito isto, é de suma importância conhecimento sobre a relação entre possíveis alterações ocorridas no tecido ósseo sob condições adversas e os ácidos nucleicos de uso em identificação humana.

A análise por microscopia é considerada padrão ouro para estudos do tecido ósseos. Em trabalho realizado por Zebaze e colaboradores (2013) foram demonstradas alterações estruturais ocorridas pela exposição deste tecido ao ambiente de água doce. Vacchiano e Vyshka (2014) observaram formações de canaliculos na superfície externa de ossos encontrados no mar Mediterrâneo e preservação na camada interna. No presente trabalho, observamos por Microscopia Eletrônica de Varredura a presença de infiltrado em todas as regiões analisadas, além de uma degradação da região cortical, oposto aos dados anteriores. Entretanto, os dados obtidos nesse estudo são referentes a ambientes de água doce, o que explicaria a diferença nos resultados.

A porosidade observada nos dados da microscopia possuía um grau mais acentuado nas regiões cortical e trabecular, tendo na cortical poros mais evidentes. Gao e seus colaboradores (2004) demonstraram a presença de porosidades semelhantes a encontrada por nós em ossos de coelho que sofreram a desmineralização de sua matriz óssea. Ademais, poros com formatos distintos foram encontradas nas regiões cortical e trabecular, o que explica as diferenças de porosidade encontradas em nosso estudo.

Os espectros do Raman, por sua vez, apresentaram uma similaridade entre as bandas presentes nos tempos controle e pós 90 dias de exposição, alterando apenas suas respectivas intensidades. Todavia, as análises por EDS apresentaram diminuição da concentração de fósforo, cálcio e oxigênio ao longo de toda a exposição, demonstrando que a diminuição da intensidade de Raman encontrada nos espectros pode estar relacionada com a perda destes componentes com a exposição à água do rio. As imagens por MEV também sugerem uma alteração da estrutura óssea, corroborando a hipótese de ter ocorrido desmineralização como vista por Gao e seus colaboradores.

Além das alterações encontradas nos elementos majoritários da porção inorgânica, encontramos a perda por completo do elemento magnésio e a presença de ferro, silício, manganês e alumínio. Langlais e seus colaboradores (1990) utilizaram a espectroscopia Raman para analisar as interações entre íons e DNA. Em seu estudo, o DNA de bezerro foi usado como amostra-alvo e os íons foram adicionados de modo experimental. Eles observaram que íons divalentes, como o cálcio e o magnésio, são capazes de se ligar predominantemente ao grupamento fosfato presente na estrutura molecular do DNA e, com isto, diminuir a força de repulsão entre as fitas da dupla-hélice, tornando o DNA mais compacto.

Em 1993 Dugluid e colaboradores demonstraram que o manganês é capaz de se ligar preferencialmente às bases nitrogenadas, mais especificamente à adenina e à guanina e de forma mais intensa que o magnésio. Apesar da maior atração do magnésio pelo grupamento fosfato, no tecido ósseo sua concentração é ínfima quando comparada à do cálcio que interage de maneira semelhante com o DNA. Esta diferença de concentração pode fazer com que o magnésio acabe por interagir mais com as bases do que normalmente. Contudo, a exposição à água promove o aumento da concentração de manganês no tecido e tenha uma competição entre eles. Isto explicaria o porquê de nossas análises não encontrarem ambos simultaneamente.

Outros dois íons foram encontrados em nossas análises por EDS, alumínio e ferro. Embora os espectros por Raman reflitam um aumento da intensidade da banda de ν_1 do fosfato, que possui correlação com a concentração de hidroxiapatita, Chappard e colaboradores (2015) viram que a presença dos íons de alumínio e ferro em casos de osteocondroma – um tumor benigno do tecido ósseo- leva a substituição do íon cálcio presente neste composto por um deste íons. Ainda não foram realizados estudos em tecido saudável, porém, estes resultados corroboram com a diminuição da concentração do cálcio e o aumento das concentrações de alumínio e ferro, apesar de uma estabilização da concentração de fósforo, encontrados por nós.

Em relação ao silício, já é sabido que o mesmo interage com o DNA devido à atração de cargas opostas, mas nada foi encontrado na literatura sobre os locais de interação entre esses compostos. Este íon foi encontrado nas três regiões estudadas, cortical, trabecular e superfície externa, com dispersão concentrada na superfície externa e desde 30 dias após exposição. Quanto ao sódio, o mesmo foi detectado nas análises de todos os tempos experimentais e sua maior diminuição foi vista na região cortical e, maior manutenção, na superfície externa. Nenhum dado da literatura foi encontrado de modo a explicar essa observação.

De maneira geral, todos os íons resultantes das nossas análises possuem carga positiva. A análise da água do local dos experimentos resultou na descoberta de íons negativos, como sulfatos e nitratos, presentes neste meio. Contudo, nenhum ânion estava presente em nossos resultados, nos levando a acreditar que a alteração estrutural visualizada por microscopia eletrônica de varredura tenha permitido uma maior exposição dos osteócitos, antes presentes imersos na matriz extracelular, e, conseqüentemente do conteúdo genético em larga escala no núcleo das células. Esta exposição, então, poderia gerar uma carga superficial nestas células e atrair apenas cátions, igualmente ao perfil visto por nós.

As explicações para a não modificação significativa da quantidade de DNA obtida como resultado da qPCR estaria que não há de fato uma diminuição significativa da quantidade deste material, porém sim de sua estrutura. Yurgaitis e Lazurkin (1981) perceberam que a presença de íons manganês faz com que haja uma ligação entre ele e os resíduos de guanina contidos na fita simples e impeça a ligação dos fragmentos de DNA resultantes da amplificação do DNA. O material genético obtido de células ósseas pode sofrer modificações estruturais provocadas por processo de hidrólise (Latham e Madonna, 2013) o que é corroborado pela alta concentração de íons na amostra que podem ativar cofatores enzimáticos (Reza Alaeddini *et al.*, 2010). Como consequência, não ocorre a formação de uma cadeia única e alterações nos resultados pós PCR.

Mundorff e Donoren (2014) realizaram testes genéticos similares aos nossos e seus resultados não apresentaram amplificação de grande parte das amostras, necessitando fazer uma segunda PCR. Apesar disso, a quantificação também não apresentou alterações no IPC demonstrando a ausência de inibidores como em nossos resultados. Todos os seus resultados positivos foram de material genético extraído de ossos corticais, região com menor alteração da composição iônica encontrada por nós ao longo deste estudo.

Wheeler e colaboradores (2017) analisaram diferentes ossadas embalsamadas e descobriram que a quantidade de DNA não é diretamente ligada à quantidade de locis amplificados no perfil genético, o que indica que a presença de inibidores ou interferentes influencia mais fortemente a geração do perfil do que a quantidade de fato. Por tanto, para sabermos o grau de prejuízo do material tendo em vista o perfil genético, faremos em um futuro próximo à amplificação e geraremos estes perfis para compararmos com controle. Eagle e colaboradores (2014) e Frank e colaboradores (2015) demonstraram uma diminuição da amplificação no perfil genético quando o osso é exposto à água quente por um curto período, o que vai de encontro aos nossos resultados.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a exposição de amostras ósseas à água de rio, num dado intervalo de tempo, afeta qualitativamente e quantitativamente o material genético extraído a partir desse tecido, o que pode representar um problema a genética forense, mais especificamente a identificação de um indivíduo por DNA. Também, tivemos como meta, avaliar se no período de três meses sob imersão em água de rio, ocorriam modificações estruturais em nível tecidual, analisadas por espectroscopia de Raman e microscopia eletrônica de varredura, que pudessem corroborar com qualquer alteração do padrão da molécula. Modificações estruturais foram observadas ao longo do tempo com base nas análises físico-químicas. No entanto, variações significativas não foram observadas quanto à quantidade de ácidos nucleicos e nem mesmo qualquer efeito negativo na amplificação de DNA mitocondrial.

Como perspectivas, propomos ampliar as análises de espectroscopia de Raman e MEV-EDS para o DNA extraído dessas amostras com o intuito de identificar os locais de ligação e a forma como ocorre. Somado, a isso a realização de testes de variações da temperatura de *melting* utilizada na PCR como base para o anelamento dos primers e extensão pela DNA polimerase, a fim de entendermos como esta temperatura pode ser afetada pela presença destes compostos iônicos. Por fim, estender as análises moleculares para outros marcadores genéticos como microssatélites e de inserção e deleção para avaliar se esses marcadores podem ser amplificados com o DNA obtido a partir das amostras ósseas analisadas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que, quando exposto à água de rio por um período de três meses, o osso sofre processo de desmineralização, alterando seus principais componentes iônicos e a porção inorgânica da matriz óssea. Essas modificações levam à formação de fissuras em nível estrutural, principalmente nas porções cortical e trabecular dos ossos, com maior preservação da região superficial externa.

As modificações observadas em nível estrutural não puderam ser associadas com alterações da quantidade, ou mesmo com a qualidade, do material genético obtido de tecido ósseo nas condições estudadas, visto que o material genético de todas as amostras analisadas possibilitou a amplificação de fragmento da região hipervariável HVI do DNA mitocondrial.

Para uma maior compreensão entre a interação de íons com a molécula de DNA se faz necessário avançar nesse estudo, com uma vertente maior para a estrutura dessa molécula e não apenas sua apresentação geral.

REFERÊNCIAS

- Abu W & Radstrom P. **Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-Inhibiting samples.** Applied and environmental Microbiology. 1998. 64.
- Alexandre Diamantino, Renata A. Nicolau . **RAIO-X, EDX E MEV COMO MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO PROCESSO DEREPARAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO: REVISÃO DE LITERATURA.** XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. Álvarez JC, Entrala C, Lorente JA et al. **Análisis de ADN mitochondrial. Forénsica.** 2001. 1: 40-59.
- André Rodrigues. **Homicídios na Baixada Fluminense: Estado, Mercado, Criminalidade e Poder.** Geo UERJ, 2017. doi: 10.12957/geouerj.2017.32058.
 Andréa C. S. Góes, **Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais.** Revista CRBM nº65, 2010.
- Angela Carden, Michael D. Morris, "**Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review),**" Journal of Biomedical Optics 5(3), (1 July 2000). <https://doi.org/10.1117/1.429994> .
- Anna Juras, Maciej Chyleński, Marta Krenz Niedbała, Helena Malmstrom, Edvard Ehler, Łukasz Pospieszny, Sylwia Łukasik, Józef Bednarczyk, Janusz Piontek, Mattias Jakobsson, Mirosława Dabert, **Investigating kinship of Neolithic post-LBK human remains from Krusza Zamkowa, Poland using ancient DNA,** Forensic Science International: Genetics <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.10.008>
- Bamber, A.R., Pryce, J.W., Ashworth, M.T. et al. **Immersion-related deaths in infants and children: autopsy experience from a specialist center.** Forensic Science and Medicine Pathology, 2014. 10. <https://doi.org/10.1007/s12024-014-9569-0>.
- Brian R. Macdonald, Maxine Gowen, **The cell biology of bone,** Baillière's Clinical Rheumatology, 1993, Issue 3. [https://doi.org/10.1016/S0950-3579\(05\)80071-8](https://doi.org/10.1016/S0950-3579(05)80071-8)
- Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., & Recker, R. **Bone biology. Part I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization.** Journal of Bone and Joint Surgery - Series A, 1995, 77.
- Botstein D, et al. **Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.** American Journal of Human Genetics. 1980, 32.
- Cartozzo, C., Singh, B., Boone, E. and Simmons, T. **Evaluation of DNA Extraction Methods from Waterlogged Bones: A Pilot Study.** Journal of Forensic Science. 2018. doi:[10.1111/1556-4029.13792](https://doi.org/10.1111/1556-4029.13792)
- Case, J.T. & Wallace, D.C. **Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts.** Somatology Cell Mol Genetics (1981) 7: 103. <https://doi.org/10.1007/BF01544751>

Cecília H. F. Matte, **Indels autossômicos e do cromossomo X na população do Rio Grande do Sul para possíveis aplicações forenses**. Disponível em: <http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/5427/1/437673.pdf>

Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology CJASN*, 3 (Supplementary 3), 2008. <http://doi.org/10.2215/CJN.04151206>.

CICV- Comitê Internacional da Cruz Vermelha. **Pessoas Desaparecidas, Análise de DNA e Identificação de Restos Mortais**. (Disponível em www.icrc.org : [acesso em 28 de junho de 2018]).

Crainic, K., Paraire, F., Leterreux, M., Durigon, M., and de Mazancourt, P., "Skeletal Remains Presumed Submerged in Water for Three Years Identified Using PCR-STR Analysis," *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 47. <https://doi.org/10.1520/JFS15490J>. ISSN 0022-1198

CEDAE livro Guandu. Disponível em: comiteguandu.org.br/

CEDAE, **Relatório Mensal Abril 2018**. Disponível em: cedae.com.br

Chickerur, N.S., Tung, M.S. & Brown, W.E. **A mechanism for incorporation of carbonate into apatite**. *Calcified Tissue International*, 1980. 32. <https://doi.org/10.1007/BF02408521>.

C.Robino et al. **Evaluation of DNA typing as a positive identification method for soft and hard tissues immersed in strong acids**. *Legal Medicine* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2015.07.004>

Daniel Chappard, Guillaume Mabilieu, Didier Moukoko, Nicolas Henric, Vincent Steiger, Patrick Le Nay, Jean-Marie Frin, Charlotte De Bodman. **Aluminum and iron can be deposited in the calcified matrix of bone exostoses**. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2015. Volume 152. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.09.008>.

David Maciel de Mello Neto. **‘Esquadrão da morte’: Uma outra categoria da acumulação social da violência no Rio de Janeiro**. *DILEMAS – Vol.10 – no 1 – JAN-ABR 2017*.

Delabarde, T. and Ludes, B. **Missing in Amazonian Jungle: A Case Report of Skeletal Evidence for Dismemberment**. *Journal of Forensic Sciences*. 2010. 55. doi:10.1111/j.1556-4029.2010.01367.x.

Diário Oficial. **Capítulo I: Contextos Históricos dos Autos de Resistências**. 23 de novembro de 2016. Ano XLI, nº 213, Parte II.

Duguid J, Bloomfield VA, Benevides J, Thomas GJ. **Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd**. *Biophysical Journal*. 1993. 65. doi:10.1016/S0006-3495(93)81263-3.

Eagle, M.J., Man, J., Rooney, P. et al. **Assessment of an improved bone washing protocol for deceased donor human bone.** Cell Tissue Bank. 2015. 16.
<https://doi.org/10.1007/s10561-014-9443-z>

Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E. **Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000. 271.

E.M. Frank, A.Z. Mundorff, J.M. Davoren. **The effect of common imaging and hot water maceration on DNA recovery from skeletal remains.** Forensic Science International 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.08.019>

Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. **Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells.** BioMed Research International. 2015. doi:10.1155/2015/421746.

Fredericks J., Brown K., Williams A., Bennett P. **DNA analysis of skeletal tissue recovered from the English Channel.** Journal of Forensic and Legal Medicine. 2013. 20.

Galik A, Mohandesan E, Forstenpointner G, Scholz UM, Ruiz E, et al. **A Sunken Ship of the Desert at the River Danube in Tulln, Austria.** PLOS ONE. 2015. 10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121235>

Gao, Jizong, Knaack, David; Goldberg, Victor, M; Caplan, Arnold, I. **Osteochondral Defect Repair by Demineralized Cortical Bone Matrix Clinical Orthopaedics and Related Research®: October 2004.** doi: 10.1097/01.blo.0000143819.82510.0d

Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Lyman, C.E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L., Michael, J.R. **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis.** 10.1007/978-1-4615-0215-9

Hans H.de Boer, George J.R.Maat, D.Aji Kadarmo, Putut T.Widodo, Ate D.Kloosterman, Arnoud J.Kal, **DNA identification of human remains in Disaster Victim Identification (DVI): an efficient sampling method for muscle, bone, bone marrow and teeth.** Forensic Science International. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.044>

Heaton, V., Lagden, A., Moffatt, C. and Simmons, T., **Predicting the Postmortem Submersion Interval for Human Remains Recovered from U.K. Waterways.** Journal of Forensic Sciences. 2010. 55. doi:[10.1111/j.1556-4029.2009.01291.x](https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01291.x)

Hilz H, Wieggers U, Adamietz P. **"Stimulation of Proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins"**. European Journal of Biochemistry. 1975. 56.

Jeffreys AJ, Wilson V & Thein SL. **Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA.** Nature. 1985. 314.

Langlais, M., Tajmir- Riahi, H. A. and Savoie, R. **Raman spectroscopic study of the effects of Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ ions on calf thymus DNA: Binding sites and conformational changes.** Biopolymers. 1990. 30. doi:[10.1002/bip.360300709](https://doi.org/10.1002/bip.360300709)

Krista E. Latham and Megan E. Madonna. **DNA survivability in skeletal remains.** Manual of forensic taphonomy.

M. Darok, B. Reichenpfader, P. Roll, **Finding of a skeleton in the Altaussee Lake—a forensic odyssey.** Forensic Science International, 2005 Volume 147. Supplement. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.088>.

Mameli, A., Piras, G. and Delogu, G. **The Successful Recovery of Low Copy Number and Degraded DNA from Bones Exposed to Seawater Suitable for Generating a DNA STR Profile.** Journal of Forensic Science, 2014. 59. doi:[10.1111/1556-4029.12323](https://doi.org/10.1111/1556-4029.12323)

Marks, S. C. and Popoff, S. N. **Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton.** American Journal of Anatomy, 1988. 183. doi:[10.1002/aja.1001830102](https://doi.org/10.1002/aja.1001830102).

Mehmet Yaşar İşcan,, Steyn M. **Craniometric determination of population affinity in South Africans.** International Journal of Legal Medicine, 1999. 112.

Mehmet Yaşar İşcan, Horacio E. Solla, Barbara Q. McCabe, **Victim of a dictatorial regime: Identification of Mr. Roberto Gomensoro Josman,** Forensic Science International, Volume 151. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.12.035>.

Menking DE, Emanuel PA, Valdes JJ. **Rapid cleanup of bacterial DNA from Field samples.** Resources, Conservation and recycling. 1999. 27.

Mehta, B., Daniel, R., Phillips, C. et al. **Forensically relevant SNaPshot® assays for human DNA SNP analysis: a review.** International Journal of Legal Medicine, 2017. 131. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1490-5>.

Mundorff, A.Z. **Integrating forensic anthropology into disaster victim identification.** Forensic Science of Medicine Pathology, 2012. 8. <https://doi.org/10.1007/s12024-011-9275-0>

Mundorff A., Davoren J.M. **Examination of DNA yield rates for different skeletal elements at increasing post mortem intervals.** Forensic Science International: Genetics, 2014. 8.

Mukaida M., Hiroko Kimura, Yuzo Takada, Tomoo Masuda, Yasuko Nakata, **The personal identification of many samples recovered from under the sea,** Forensic Science International, Volume 113. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00219-X).

Papadodima, S. A., Athanaselis, S. A., Skliros, E. and Spiliopoulou, C. A. **Forensic investigation of submersion deaths.** International Journal of Clinical Practice, 2010. 6. doi:[10.1111/j.1742-1241.2008.01890.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2008.01890.x)

Parr, R. L., Carlyle, S. W. and O'Rourke, D. H. **Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands.** American Journal of Physycal

Anthropology, 1996. 99. doi:10.1002/(SICI)1096-8644(199604)99:4<507::AID-AJPA1>3.0.CO;2-R

Parsons, Coble. **Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome.** Croatian Medical Journal. 2001. 42.

Patricia A Downey, Michael I Siegel. **Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis.** Physical Therapy. 2006. Volume 86.

Phenice, T. W. **A newly developed visual method of sexing the os pubis.** American Journal of Physical Anthropology, (1969). 30. doi:[10.1002/ajpa.1330300214](https://doi.org/10.1002/ajpa.1330300214)

Rodan, Gideon A. **Introduction to bone biology.** Bone, 1992. Volume 13, Supplement 1. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(09\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(09)80003-3).

Raina K & Chandlee J. **Recovery of genomic DNA from a fungus (Sclerotinia homoeocarpa) with high polysaccharide content.** Biotechniques. 1996. 21.

Reza Alaeddini, Simon J. Walsh, Ali Abbas. **Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—A review.** Forensic Science International: Genetics, Volume 4. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.09.007>.

Robling, Alexander G.; Alesha B. Castillo, Charles H. Turner. **Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling.** Annual Review of Biomedical Engineering. 2006; 8. doi: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721

Roger W. Byard; Katrin Both; Ellie Simpson. **The Identification of Submerged Skeletonized Remains.** The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 2008. 29. DOI: 10.1097/PAF.0b013e31816520aa.

Speller, C. F., Spalding, K. L., Buchholz, B. A., Hildebrand, D., Moore, J., Mathewes, R., Skinner, M. F. and Yang, D. Y.. **Personal Identification of Cold Case Remains Through Combined Contribution from Anthropological, mtDNA, and Bomb- Pulse Dating Analyses.** Journal of Forensic Science, 2012. 57. doi:10.1111/j.1556-4029.2012.02223.x .

Sobrinho B, Brio M., Carracedo A. **SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies.** Forensic Science International, 2005. 154.

Thompson R., Zoppis S., McCord B. (2012) **An Overview of DNA Typing Methods for Human Identification: Past, Present, and Future.** In: Alonso A. (eds) DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). 830.

Vacchiano G, Vyshka G. **Skeletal Remains Submerged in Mediterranean Sea for Eight Years: Histological Observations.** Anthropology, 2015. 2. Doi: 10.4172/2332-0915.1000137

Vanessa Gutierrez Cano and Javier Otero Márquez. **Espectroscopía Raman: Fundamento y Aplicaciones.** 2014. Disponível em :

<https://www.researchgate.net/publication/280720782> Espectroscopia Raman Fundamento y aplicaciones.

W. Goodwin, J. McFarlane, J. Roberts, **The identification of a US Serviceman recovered from the Holy Loch, Scotland**, Science & Justice, 2003. Volume 43.

[https://doi.org/10.1016/S1355-0306\(03\)71740-7](https://doi.org/10.1016/S1355-0306(03)71740-7).

WATSON, F. H. CRICK. **The structure of DNA**. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1953. 18.

Weber J L *et al.* **Human Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms**. American Journal of Human Genetics. 2002.71.

Wheeler, A., Czado, N., Gangitano, D. et al. **Comparison of DNA yield and STR success rates from different tissues in embalmed bodies**. International Journal of Legal Medicine, 2017. 131 <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1405-5>

Wyman AR, White R. **A highly polymorphic locus in human DNA**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1980. 77.

Yurgaitis, A. P. and Lazurkin, Y. S. **Mechanism of DNA denaturation in the presence of manganese ions**. Biopolymers, 1981. 20. doi:[10.1002/bip.1981.360200509](https://doi.org/10.1002/bip.1981.360200509).

Zebaze, A. Ghasem-Zadeh, A. Mbala, E. Seeman. **A new method of segmentation of compact-appearing, transitional and trabecular compartments and quantification of cortical porosity from high resolution peripheral quantitative computed tomographic images**. Bone, Volume 54.

ANEXO A - Artigo publicado

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 6 (2017) e469–e470



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsigss

A mini-primer set in a multiplex PCR fashion covering the MTDNA control region from submerged skeletal remains

P. Cavalcanti, F. Carvalho, E.F. Carvalho, D.A. Silva*

Laboratório de Diagnósticos por DNA, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
mtDNA
Mini-primer
Submerged
Skeletal

ABSTRACT

When DNA is recovered in a small quantity and low quality, typing methods based on mtDNA should be considered. Mini-primer sets multiplex with reduced amplicons has been successful in amplifying the entire CR. This study developed a mini-primer set PCR multiplex assay to amplify the entire CR of mtDNA from fragments of human skeletal remains submerged in water up to 30, 60 and 90 days. So far, the new mini-primer set for PCR multiplex assay was tested on four samples, three of them submerged in river water for a period of 30 months. This approach gave successful PCR amplifications for the three samples submerged and the control. The following sequencing analysis brought partial mtDNA control region profiles to the samples and a complete to the control.

1. Introduction

In forensics, often, skeletal remains submerged in water yield DNA in a small quantity and low quality [1]. In such cases, although STRs are the gold standard for human DNA typing, alternative typing methods should be considered [2]. Mitochondrial DNA (mtDNA) has proven to be an eligible source to the development of typing methods for human identification [3]. The recommended approach to mtDNA analysis dwells in the PCR amplification of the entire control region (CR), a segment of mtDNA with 1122 base pairs (bp) [4]. However, when DNA is severely degraded, portions with such length may not be amplified [5]. To solve this, mini-primer sets multiplex reducing the amplicon sizes have been described successful in amplifying the entire CR. In this approach, at least 5 overlapping amplicons are generated to cover the entire control region, overcoming the issues generated by the DNA degradation – as the fragmentation of the CR [6].

So, this study aimed to develop a mini-primer set PCR multiplex assay, using 10 primers previously described in the literature, in order to amplify the entire CR of mtDNA from fragments of human skeletal remains submerged in water up to 30, 60 and 90 days.

2. Materials and methods

Human femurs from the DNA Diagnostic Laboratory (LDD), totaling four samples, were selected according to the following criteria: (1) material obtained by exhumation and (2) with inconclusive results typed with standard methods. So, the bones were prepared, cleaned and

then small sections were cut using a hand drill. The resulting fragments were submerged in a river water for 30, 60 and 90 days. After that period, samples were pulverized and DNA was extracted from the bone powder according to the protocol previously described [2]. A quantification step was performed by spectrophotometry on Nanodrop® 2000, in compliance with manufacturer instructions [7].

Ten mini-primers were selected from previously published papers [8–12] and combined to generate five overlapping mid-amplicons, divided into two multiplexes, covering the entire control region. Primers range, sequences, concentrations and amplicons sizes are showed in Table 1. Both multiplexes were amplified in a final volume of 20 µl using 12x Multiplex PCR Master Mix (Qiagen). PCR multiplexes were performed under the following thermal cycling conditions: 95 °C pre-incubation step for 15 min, then 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 90 s and extension at 72 °C for 60 s, with a 10 min final extension at 72 °C. Amplicon were purified by EXOSAP-IT (AB) and sequenced with BigDye (AB) under those thermal cycling conditions: 96 °C pre-incubation step for 2 min, then 35 cycles of denaturation at 96 °C for 15 s, annealing at 50 °C for 9 s and extension at 60 °C for 120 s, with a 10 min final extension at 60 °C. A final purification step was performed with SEPHADEX resin prior to run the sequences on ABI3500 Genetic Analyser (AB). The data were analyzed using Sequencing Analysis Version 3.7 software (AB).

3. Results and discussion

So far, the new mini-primer set for PCR multiplex assay was tested

* Corresponding author at: Rua São Francisco Xavier, 524, Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha, 20550-013 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail address: dayse.a.silva@gmail.com (D.A. Silva).

Table 1
Primer ranges, sequences and concentrations for PCR multiplexes 1 and 2; FC: final concentration.

Primer	Primer range	Primer sequence 5'–3'	FC	Amplicon size
Multiplex 1				
L15900	15900–15927	TAAACTAATACACCAGTCTTGTAAACC	0.1nM	422pb
H16322	16322–16342	TGGCTTTATGTAATACTGTAC	0.1nM	
L16555	16555–16575	CCACACAGTTCCCTTAAAT	0.1nM	299pb
H00285	00285–00307	GGGGTTGGTGGAAATTTTTTG	0.1nM	
L00314	00314–00294	CCGCTTCTGGCCACAGCACT	0.1nM	325pb
H00639	00639–00619	GGGTGATGTGAGCCCGTCTA	0.1nM	
Multiplex 2				
L16268	16268–16288	CACTAGGATACCAACAAACC	0.1nM	317
H00016	00016–16564	CCCGTGAGTGGTAAATAGGGT	0.1nM	
L00172	00172–00192	ATTATTTATCGCACACTACGT	0.1nM	236
H00408	00408–00430	CTGTAAAAGTGCATACCGCCA	0.1nM	

on the DNA recovered from four fragments of a human femur, three of them submerged in river water for a period of 30 days. This approach gave successful PCR amplifications for the three samples submerged and the control. The following sequencing analysis brought partial mtDNA control region profiles to the samples and a complete to the control. Further analysis of the samples submerged in river water for periods of 60 and 90 days are still necessary. However, the findings obtained so far suggests a similar scenario. The results revealed that the level of DNA degradation on bones samples submerged in river water for one month demand the development of a different approach. An eligible one is a combination of mtDNA mini-primers in order to generate smaller amplicons fragments in a mini-amplicon fashion [6]. So, the next step of this work consists in the development of mini-primer set for PCR multiplex assay in a mini-amplicon fashion.

4. Conclusions

We conclude that the new mini-primer set for PCR multiplex assay developed showed promising results when tested on the DNA recovered from challenging human skeletal remains, inconclusive when typed by standards methods. However, for those samples submerged by, at least, one month, a mini-amplicon approach is necessary. So, a further development of this study relies on the development of a mini-amplicon approach.

Role of funding

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and the Defense Ministry of Brazil (Pro-defesa No. 031/2013).

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

The authors would like to thank the personnel of the LDD and The State Water and Sewage Company of Rio de Janeiro (CEDAE), involved in the development of that work.

References

- [1] K. Crainic, F. Paraire, M. Leterreux, et al., Skeletal remains presumed submerged in water for three years identified using PCR-STR analysis, *J. Forensic Sci.* 47 (5) (2002) 1–3.
- [2] P. Cavalcanti, H. Freitas, E.F. Carvalho, et al., Optimized DNA extraction method from skeletal remains using different typing methodologies in forensics, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (2015) e223–e224.
- [3] M.M. Holland, Molecular analysis of the human mitochondrial DNA control region for forensic identity testing, *Curr. Protoc. Hum. Genet.* (2012) 74 14.7, 14.7. 1–14.7.23).
- [4] W. Parson, et al., DNA commission of the international society for forensic genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing, *Forensic Sci. Int. Genet.* 13 (2014) 134–142.
- [5] C. Eichmann, W. Parson, Mitominis: multiplex PCR analysis of reduced size amplicons for compound sequence analysis of the entire mtDNA control region in highly degraded samples, *Int. J. Leg. Med.* 122 (2008) 385–388.
- [6] C. Berger, W. Parson, Mini-midi-mito: adapting the amplification and sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1 (2009) 149–153.
- [7] Thermo Scientific, NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual, (2009) [online] Available at: http://www.mlx-garching.de/files/nanodrop_2000_user_manual.pdf [Accessed 23 March 2017].
- [8] L. Vigilant, R. Pennington, H. Harpending, et al., Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a Southern African population, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 9350–9354.
- [9] M.N. Gabriel, et al., Improved mtDNA sequence analysis of forensic remains using a "mini-primer set" amplification strategy, *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 247–253.
- [10] C.D. Calloway, R.L. Reynolds, G.L. Herrin, et al., The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age, *Am. J. Hum. Genet.* 66 (2000) 1384–1397.
- [11] M.R. Wilson, et al., Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis, *Int. J. Leg. Med.* 108 (1995) 68–74.
- [12] H. Parson, H.J. Bandelt, Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 1 (1) (2007) 13–19.

ANEXO B- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Rio de Janeiro, 14 de outubro de 2009

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Profª. Patrícia Maria C. O. Duque
Para: Coord. Prof. Elizeu Fagundes de Carvalho

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2485-CEP/HUPE – CAAE: 0067.0.228.000-09) "REGIÕES POLIMÓRFICAS DO DNA COMO FERRAMENTAS PARA ESTUDOS DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES E FORENSE: UTILIZAÇÃO COMO MARCADORES DE ANCESTRALIDADE, MOVIMENTOS MIGRATÓRIOS, ESTUDOS SOBRE ESTRUTURAÇÃO GÊNICA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA E INVESTIGAÇÕES CRIMINAIS E DE VÍNCULOS GENÉTICOS" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


Profª Patrícia Maria C. O. Duque
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UERJ