

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Título da Dissertação de Mestrado:

**UM MÉTODO RÁPIDO E ECONÔMICO PARA A OBTENÇÃO DE DNA DE DENTES
PARA ESTUDOS FORENSES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular pelo PPGBCM-PUCRS

Pós-Graduando: Paulo Eduardo Raimann
Orientadora: Clarice Sampaio Alho

Porto Alegre
Rio Grande do Sul – Brasil
Setembro/2006

*Yo no sé dónde nací,
ni sé tampoco quién soy
No sé de dónde he venido
ni sé para dónde voy.*

*Soy gajo de árbol caído
Que no sé dónde cayó.
¿Dónde estarán mis raíces?
¿De qué árbol soy rama yo?*

Coplas populares de Boyacá, Colombia.
citado em Memoria del Fuego II.
Las caras y las máscaras.
Eduardo Galeano, 1995.

Identificações

*não escrevi pra encher páginas
gastar tempo
completar livro
ganhar algo com isso*

*escrevi gostando curtindo
vendo muita desorganização
objetos da casa
minha alma espantosamente em paz
afinava com
os defensores de pilhas de jornais
amantes incondicionais de livros
coleccionadores de vinis*

Crocâncias inéditas
Frank Jorge, 2001

AGRADECIMENTOS

A Doutora Clarice Sampaio Alho pela qualificada e presente orientação desta dissertação, e pela coragem de me acompanhar nesta nova empreitada que é a Genética Forense.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Biociências da PUCRS.

A todos os colegas do Laboratório de Perícias, Setor de Genética Forense e ao Diretor do Instituto-Geral de Perícias, pela oportunidade oferecida para desenvolver este projeto. Agradecimento especial à Perita Bianca de Almeida Carvalho pela ajuda essencial no seqüenciamento do DNA.

Às estagiárias Juliana Wollmann Gonçalves e Joana Ziggotti Bolsi, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Siomara Dias da Costa Lemos, Paula Heinen, Márcia Kober, Juliana Fredo, Matias Frizzo e Fábio Maito.

Ao meu pai, Ivo Antônio Raimann, que me mostrou o que é Perícia Forense, e minha mãe, Maria Loracy Schmidt Raimann, por ter suportado todos nós!!!

A minha esposa, Adriana Alves Touguinha Raimann, e a minha filha, Eduarda Touguinha Raimann, vocês são a minha vida!!!

APRESENTAÇÃO

A presente Dissertação de Mestrado é composta por quatro partes, a saber:

1. **Resumo:** o qual apresenta de forma objetiva o trabalho realizado no âmbito do Mestrado.
2. **Apresentação do Tema, Justificativa e Objetivo:** a qual apresenta um referencial teórico acerca do conhecimento que embasou a realização do trabalho experimental abordando os temas que foram estudados, a justificativa da execução desta proposta e seus objetivos geral e específicos.
3. **Um manuscrito com os resultados do trabalho experimental:** que trata de um manuscrito de artigo científico, contendo as investigações científicas realizadas pelo pós-graduando, durante o período do Mestrado, e que será submetido à revista Forensic Science International.
4. **Conclusões e Considerações finais:** a quais apresentam conclusões e observações acerca do estudo realizado durante o Mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	2
APRESENTAÇÃO DO TEMA	4
JUSTIFICATIVA	5
OBJETIVO	6
BIBLIOGRAFIAS	7
MANUSCRITO COM OS RESULTADOS DO TRABALHO EXPERIMENTAL	8
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
ANEXO	23

RESUMO

Introdução

Devido a sua estrutura mineralizada e inerte, ao seu tamanho e a sua localização, dentes molares e pré-molares são considerados boas fontes para obtenção do DNA necessário para a identificação molecular de pessoas. Várias metodologias têm sido empregadas para obtenção de DNA a partir dos dentes, sendo que o uso do equipamento de pulverização criogênica *Freezer mill*[®] para a pulverização e da coluna concentradora Microcon[™]-100 são procedimentos padrão mais utilizados e difundidos. O uso conjunto dessas duas metodologias é, porém, demorado e de custo elevado.

Nós desenvolvemos este trabalho com o objetivo de testar e padronizar um novo método econômico e rápido para a obtenção de DNA de dentes para estudos forenses. O resultado deste trabalho vem a atender aos interesses do Convênio de Cooperação entre o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS (PPGBCM-PUCRS) e o Instituto-Geral de Perícias (IGP-RS) da Secretaria da Justiça e da Segurança Pública do Rio Grande do Sul (SJS-RS), o qual visa desenvolver pesquisas que atendam às necessidades de avanço na linha de investigação da Biologia Forense.

Material

Foram utilizados dentes molares ou pré-molares provenientes de 26 cadáveres não identificados previamente, depositados no DML-RS. Para cada cadáver avaliado foi registrado seu estado geral de apresentação, o tempo estimado de morte, a idade e o local onde o cadáver foi encontrado. Os dentes foram retirados dos cadáveres, armazenados por no mínimo 24 horas a – 80°C e, posteriormente, utilizados nos testes. A escolha dos corpos foi aleatória, abrangendo vários estágios de decomposição, tempo de morte e locais onde foram encontrados.

Metodologia

Para a economia: (I) foi usado o moinho mineralógico IKA (Ika do Brasil – RJ- Brasil), de baixo custo em comparação ao uso do *Freezer mill*[®]; (II) foi usado precipitação do DNA com o uso de isopropanol, de baixo custo em comparação ao uso do Microcon[™]-100.

Para a rapidez: foi testado o tempo de duas horas para a incubação do tecido no tampão de lise celular em comparação ao tempo padronizado de 12 horas.

Procedimentos: Nós usamos o moinho mineralógico IKA para obtenção de tecido pulverizado dos dentes a fim de extrair DNA na quantidade e qualidade necessárias para a obtenção de perfil genético. Cada amostra foi moída e separada em quatro subamostras, nas quais foi avaliado o tempo de incubação (2 ou 12 horas de incubação) e o método de precipitação final do DNA (Microcon[™]-100 ou isopropanol). A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram testadas. A viabilidade de uso do DNA nuclear e do DNA mitocondrial obtido foi verificada pela capacidade de amplificação por técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) das amostras através do uso dos kits apropriados.

Resultados e Discussão:

A utilização do moinho mineralógico IKA para pulverização de tecido foi eficaz em todas as amostras testadas. As amostras processadas com Microcon[™]-100 não apresentaram diferenças significativas na quantidade de DNA obtido quando incubadas por 2 ou 12 horas, o que permite aceitar que uma incubação de duas horas é suficiente para o procedimento padrão. O mesmo foi verificado nos subgrupos, nos quais, a precipitação foi realizada com isopropanol. Com o uso do Microcon[™]-100 obteve-se uma concentração superior de DNA quando comparado ao uso do isopropanol ($p < 0,001$). No entanto, a precipitação por isopropanol obteve um DNA de pureza superior ao do DNA processado com Microcon[™]-100 ($p < 0,001$). Dos 26 casos avaliados, dentes de 20 corpos tiveram seu DNA nuclear autossômico identificado com sucesso e, em dois dos 20 casos, foi também utilizada com sucesso a análise do cromossomo Y, não excluindo vínculo patrilíneo. Os seis demais casos apenas foram identificados pela análise do DNA mitocondrial, não excluindo o vínculo matrilineo. A menor concentração de DNA derivada da precipitação realizada com isopropanol parece ter sido compensada pela maior pureza do material uma vez que houve

similaridade do números de *loci* analisados com sucesso quando se comparam MicroconTM-100 e isopropanol. O estado geral do cadáver, o tempo estimado de morte, a idade e o local onde o cadáver foi encontrado não foram significativamente associados com a quantidade ou a qualidade do DNA obtido, bem como com o número de *loci* analisados com sucesso.

Conclusão:

A utilização do moinho mineralógico IKA para pulverização de tecido foi eficaz e pode substituir o uso do *Freezer mill*[®] reduzindo o custo dos procedimentos. A precipitação com isopropanol foi eficaz e pode substituir o uso do MicroconTM-100 reduzindo ainda mais o custo dos procedimentos. Um tempo de duas horas para a incubação do tecido no tampão de lise celular foi eficaz para reduzir o tempo dos procedimentos.

Os experimentos desenvolvidos neste trabalho testaram e padronizaram um novo método rápido e econômico para a obtenção de DNA de dentes para estudos forenses, que pode ser empregado em outros caso de identificação de cadáveres humanos. O resultado deste trabalho poderá atender aos interesses do Convênio de Cooperação entre o PPGBCM-PUCRS e o IGP-RS no desenvolvimento e no avanço na linha de investigação da Biologia Forense.

APRESENTAÇÃO DO TEMA

Desastres em massa como os ocorridos nas Torres Gêmeas, nos Estados Unidos, a Tsunami, ou ainda como o incêndio ocorrido em 1º de agosto de 2004 no supermercado Ycuá Bolaños em Assunção-Paraguai, são um desafio para os médicos e odontólogos, e para os setores de biologia molecular encarregados da identificação das vítimas e dos restos mortais. A identificação de cadáveres humanos em avançado estado de decomposição, como por exemplo, exumado, afogado, esquartejado, ocultado sob condições diversas, expostos ao tempo e a ação de animais, ou carbonizados fica extremamente prejudicada uma vez que os elementos utilizados pelos médicos-odontólogos, odontólogos e/ou papiloscopistas para tal identificação, como impressões digitais, sexo, compleição física, grupo étnico, estatura e arcada dentária podem estar alterados a ponto de impossibilitar qualquer conclusão (Grévin et al., 1998, Bilge et al., 2003). Desta forma a única possibilidade de identificação é através do uso das técnicas de DNA (Clayton et al., 1995, Graw et al., 2000, Mass Fatality Incidents, June 2005).

O Estado do Rio Grande do Sul tem em seu Laboratório de Perícias o Setor de Genética Forense responsável pela realização destas análises. Quando surgiu em 1997, todas as ossadas ou amostras provenientes de corpos em estado de saponificação, isto é, ossos e dentes, não eram identificadas devido a problemas de metodologia, pois a qualidade e a quantidade do DNA humano extraído dependem muito do local onde o corpo foi depositado (Clayton et al., 1995, Graw et al., 2000, Iwamura et al., 2005, Onori et al., 2006). A escolha dos dentes molares e pré-molares para obtenção de DNA se baseia na sua estrutura mineralizada inerte, tamanho e localização dos mesmos (Sivagami et al., 2000, Avon, 2004), pois sua estrutura pode preservar mais tempo o DNA, seu tamanho pode conter mais material genético e sua localização é privilegiada, pois em caso de morte traumática é mais provável a sua permanência na cavidade oral (Drancourt et al., 1998, Gilbert et al., 2003).

Várias metodologias são empregadas para obtenção de DNA a partir de dentes, algumas utilizam o *Freezer mill*TM (SPEX Certiprep, Metuchen, New Jersey, USA) para pulverização criogênica e o CentriconTM-100 para filtração e concentração (Alonso et al., 2001, Meyer et al., 2000, Alonso et al., 2004), outras utilizam trituração com moinho mineralógico e extração com sílica (Höss et al., 1993, Vernesi et al., 2001), ou pulverização com nitrogênio líquido em cadinho e pistilo autoclavados (Sivagami et al., 2000, Murakami et al., 2000), ou incisão e secção do dente (Raoult et al., 2000), ou ainda recobrimento do dente com silicone e a remoção da dentina com broca dentária (Gilbert et al., 2004). Estas metodologias são muito caras ou pouco práticas. Considerando que: a) o *Freezer mill*TM custa aproximadamente R\$ 80.000,00, um valor alto para os laboratórios de perícias públicos; b) o *Freezer mill*TM consome alto volume de nitrogênio líquido,

um componente também de elevado custo; c) o uso alternativo de equipamentos dentários de pulverização por alta-rotação tem também alto custo; d) o uso alternativo de equipamentos dentários de pulverização por alta-rotação necessita de água ultra pura ou Milli-Q, um componente também de elevado custo; e) o uso alternativo do pistilo e do cadinho, que teria baixo custo, ainda que possa ser autoclavado, é passível de contaminação por ser muito poroso e espalha pó no ambiente de extração, o que para um laboratório forense, não é recomendável; nós desenvolvemos este trabalho com o objetivo de testar e padronizar um novo método que utiliza o moinho mineralógico IKA (Ika do Brasil – RJ- Brasil), o qual tem um custo aproximado de R\$ 3.000,00, para obtenção de DNA na quantidade e qualidade necessária para a obtenção de perfil genético.

Em relação aos custos, nós nos preparamos a comparar o uso substitutivo da membrana concentradora (MicroconTM-100) com o uso do isopropanol como precipitante do DNA. Em relação ao tempo, nós nos preparamos a comparar os períodos de incubação, com o tampão de lise celular, durante duas ou 12 horas.

Os indicadores de sucesso das metodologias a serem testadas foram a verificação da quantidade e da qualidade do DNA obtido por meio de ampliações de regiões de DNA nuclear e mitocondrial próprias para análise forense.

Os resultados oriundos deste trabalho visam atender aos interesses do Convênio de Cooperação entre o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS (PPGBCM-PUCRS) e o Instituto-Geral de Perícias da Secretaria de Segurança do Rio Grande do Sul (IGP-RS), o qual tem como objetivo desenvolver conhecimento que atenda às necessidades de avanço na linha de investigação da Biologia Forense.

JUSTIFICATIVA

Aproximadamente 40 ossadas de cadáveres são encaminhadas ao Departamento Médico Legal do Instituto-Geral de Perícias do Estado Rio Grande do Sul, Brasil (DML/IGP-RS), por ano, para identificação. Em média 26% destas são destinadas ao Setor de Genética Forense do Laboratório de Perícias para identificação por DNA. Esta porcentagem de cadáveres necessita de análises moleculares eficazes para sua identificação tanto no âmbito legal, pois na ausência de uma identificação positiva não existe a imputação do crime quando o caso for de homicídio, como no âmbito familiar, dado que familiares das vítimas aguardam uma resolução dos casos em que seus aparentados estiveram envolvidos. Além disto, o Setor de Genética Forense do Laboratório de Perícias do IGP-RS, atualmente, tem a necessidade de identificar as demais ossadas anteriormente armazenadas que, devido a diversos problemas, ainda não foram identificadas e os corpos sem identidade, que são enterrados, e ficam no aguardo de que apareça algum familiar que possa

reconhecer fotos, vestes, tatuagens, ou algum outro objeto que justifique a sua exumação para posterior análise de DNA.

Observa-se, portanto, a necessidade de acesso a uma tecnologia de obtenção de DNA para estudos forenses que seja, além de eficaz, econômica e rápida no intuito de resolver as pendências do Estado do Rio Grande do Sul, bem como atender a crescente demanda do Setor.

Desta forma, a padronização de uma técnica para a extração de DNA a partir da polpa de dentes molares e pré-molares poderá ser uma ferramenta importante para criar uma metodologia acessível que atenda às necessidades do Setor de Genética Forense do Laboratório de Perícias do IGP-RS, e que possa ser utilizada em Laboratórios Forenses da rede nacional criada pela Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenhar e padronizar uma metodologia econômica e rápida para a obtenção de DNA de boa qualidade e quantidade para estudos forenses a partir de dentes molares e pré-molares humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a quantidade de DNA obtido com a nova técnica;
2. Avaliar a qualidade do DNA obtido com a nova técnica;
3. Avaliar a viabilidade de uso do DNA obtido com a nova técnica;
4. Registrar dados das amostras de DNA obtidas com a nova técnica segundo as variáveis: (I) peso do material inicial; (II) procedimentos da nova técnica; (III) quantidade do DNA; (IV) qualidade do DNA; (V) viabilidade de uso do DNA; (VI) tempo de morte do cadáver; (VII) condição do corpo do cadáver.
5. Verificar se há associação entre as variáveis acima indicadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Alonso, S. Andelinovic, P. Martin, D. Sutlovic, I. Erceg, E. Huffine, L. F. Simón, C. Albarrán, M. D. Gojanovic, A. F. Rodriguez, P. García, I. Drmic, B. Rezig, S. Kuret, M. Sancho, D. Primorac, DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples, *Croat. Med. J.* 42 (2001) 260-266.
- A. Alonso, P. Martín, C. Albarrán, P. García, O. García, L. F. Simón, J.G.-Hirschfeld, M. Sancho, C.Rúa, J. F.-Piqueras, Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies, *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 141-149.
- A.V. Sivagami, A.R Rao, U. Varshney, A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian population, *Forensic Sci. Int.* 110 (2000) 107-115.
- C. Vernesi, G. Benedetto, D. Caramelli, E. Secchieri, L. Simoni, E. Katti, P. Malaspina, A. Novelleto, V.T.W. Marin, G. Barbujani, Genetic characterization of the body attributed to the evangelist Luke, *Proc. Natl. Acas. Sci.* 23 (2001) 13460-13463.
- D. Raoult, G. Aboudharam, E. Crubézy, G. Larrouy, B. Ludes, M. Drancourt, Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of medieval black death, *Proc. Natl. Acas. Sci.* 23 (2000) 12800-12803.
- E. Meyer, M. Wiese, H. Bruchhaus, M. Claussen, A. Klein, Extration and amplification of authentic DNA from ancient human remains, *Forensic Sci. Int.* 113 (2000) 87-90.
- E.S. M. Iwamura, C.R.G.C.M. Oliveira, J.A.S.-Vieira, S.A.B. Nascimento, D.R. Muñoz, A qualitative study of compact bone microstruture and nuclear short tandem repeat obtained from femur of human remains found on the graound and exhumed 3 yers after death, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 26 (2005) 33-44
- F.-X. Ricaut, C.K.Tracqui, E. Crubézy, B. Ludes, STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples, *Forensic Sci. Int.* 151 (2005) 31–35.
- G. Grévin, P. Bailet, G. Quatrehomme, A. Ollier, Anatomical reconstruction of fragments of burned human bones: a necessary means for forensic identification, *Forensic Sci. Int.* 96 (1998) 129-134.
- H. Murakami, Y. Yamamoto, K. Yoshitome, T. Ono, O. Okamoto, Y. Shigeta, Y. Doi, S. Miyashi, H. Ishizu, Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples, *Acta Med Okayama* 54 (2000) 21-32.
- K. Bender, P.M. Schneider, C. Rittner, Application os mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *For. Sci. Int.* 113 (2000) 103-107.
- K.M. Sullivan, R. Hopgood, P. Gill, Identification of human remains by amplification and automated sequencing of human mitochondrial DNA. *Int. J. Leg. Med.* 105 (1992) 83-86.
- L. Quintana-Murci, C. Krausz, K. Mcelreavey, The Human Y Cromossome: Function, Evolution and Disease. *Forensic Sci. Int.* 118 (2001) 169-181.

- Mass Fatality Incidents: A Guide for Human Forensic Identification. NCJ 199758, June 2005, Special Report, by National Institute of Justice. Available from: <http://www.ncjrs.org/pdffiles1/nij/199758.pdf>. Accessed: April 6, 2006.
- M. Drancourt, G. Aboudharam, M. Signoli, O. Dutour, D. Raoult, Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 12637-12640.
- M. Graw, H.J. Weisser, S. Lutz, DNA typing of human remains found in damp environments, *Forensic Sci. Int.* 113 (2000) 91-95.
- M. Höss, S. Pääbo, DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3913-3914.
- M.T.P. Gilbert, E. Willerslev, A. J. Hansen, I. Barnes, L. Rudbeck, N. Lynnerup, A. Cooper, Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA, *Am. J. Hum. Genet.* 72 (2003) 32-47.
- M.T.P. Gilbert, J. Cuccui, W. White, N. Lynnerup, R.W. Titball, A. Cooper, M.B. Prentice, Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five european excavations of putative plague victims, *Microbiology* 150 (2004) 341-354.
- N. Onori, V. Onofri, F. Alessandrini, L. Buscemi, M. Pesaresi, C. Turchi, A. Tagliabracci, Post-mortem DNA damage: A comparative study of STRs and SNPs typing efficiency in simulated forensic samples, *International Congress Series* 1288 (2006) 510-512.
- S. L. Avon, Forensic Odontology: The Roles and Responsibilities of the Dentist, *J Can Dent Assoc.* 70 (2004) 453-458.
- T.M. Clayton, J.P. Whitaker, C.N. Maguire, Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci, *Forensic Sci. Int.* 76 (1995) 7-15.
- Y. Bilge, P.S. Kedici, Y. D. Alakoç, K. Ü. Ülküer, Y.Y. Ilkyaz, The identification of a dismembered human body: a multidisciplinary approach, *Forensic Sci. Int.* 137 (2003) 141-146.

Title of the paper:

**A FAST AND COST-EFFECTIVE METHOD TO OBTAIN DNA FROM TEETH
FOR FORENSIC STUDIES**

The name of authors:

Paulo E. Raimann^{a,b},

Joana Z. Bolsi^{a,b}

Clarice S. Alho^a

Name of the institution(s) where the work was performed:

^a Setor de Genética Forense, Instituto-Geral de Perícias do Estado Rio Grande do Sul, Brasil

^b Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Address and name of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent:

Setor de Genética Forense, Instituto-Geral de Perícias do Estado Rio Grande do Sul, Brasil

Av. Azenha, 255. Bairro Azenha. Porto Alegre, RS, Brazil, 90160-000

00 55 513288-2667, pauloraimann@gmail.com

Key Words:

Forensic science; tooth; DNA extraction

A FAST AND COST-EFFECTIVE METHOD TO OBTAIN DNA FROM TEETH FOR FORENSIC STUDIES

Paulo E. Raimann^{a,b,*}; Joana Z. Bolsi^{a,b}; Clarice S. Alho^b

^a*Instituto-Geral de Perícias, Setor de Genética Forense, SJS-RS; Av. Azenha, 255, Bairro Azenha, Porto Alegre, RS, Brazil, 90160-000; phone: 00 55 513288-2667, pauloraimann@gmail.com*

^b*Faculdade de Biociências, PUCRS.*

Abstract

In this study we describe a method for DNA extraction from molar and premolar teeth using the IKA Works A11 Basic Mill (IKA do Brasil – RJ, Brazil). We tested 2h and 12h of lysis buffer incubation, DNA concentration using MicroconTM-100 (Millipore, Beverly, MA, USA) or isopropanol, and DNA amplification using kits for nuclear autosomic DNA (nDNA), Y-chromosome (Y-STR) or mitochondrial DNA (mtDNA). Molar or premolar teeth from 26 previously unidentified bodies, deposited in the Legal Medical Department (DML-RS), were removed and stored. All specimens were casework samples submitted to the Forensic Lab. of Rio Grande do Sul, Brazil for DNA typing. DNA typing was successfully detected in all samples. In conclusion, with this 'fast and cost-effective method' it was possible to obtain sufficient DNA from molar and premolar teeth. This procedure eliminates the use of expensive tools and is less time consuming as it reduces the long lysis buffer incubation step, thus reducing the cost and time of the procedure. This 'fast and cost-effective method' greatly facilitates corpse identification using DNA analysis.

1. Introduction

Forensic identification of victims is essential for humanitarian reasons, but also for civil or criminal investigative needs. It is essentially based on forensic anthropology, fingerprints, forensic odontology, radiology, and DNA typing [1]. Such identification is usually difficult [1,2,3,4], because the elements used by pathologists, forensic anthropologists and/or odontologists, such as fingerprints, sex, physical constitution, ethnic group, stature, and dental arch can be easily modified, hampering a conclusion. Consequently, the standard forensic identification methods are not sufficient in 30-35% of all victims [4] and, for this reason, the use of DNA techniques represents a good possibility of identification [5,6,7]. Given that the quality and amount of human DNA extracted depends heavily on the place where the body was deposited [5,6,8,9], the choice of molar and premolar teeth to obtain DNA is based on their mineralized inert structure, size, and location [8,10,11]. This structure can preserve DNA for longer periods, the large size implies the presence of a significant amount of genetic material and, because of their privileged location, these teeth, in case of traumatic death are more likely to remain in the oral cavity [12,13]. The teeth are the hardest

materials in the human body because of the dental enamel, which makes them resistant to adverse conditions that degrade the DNA, such as humidity, high temperature, and the action of fungi and bacteria [14]. The most important variables upon which identification by DNA apparently depends are the length of time after death, the type of soil in which the body was buried, and the method of DNA extraction [15]. At least six methods have been used to obtain DNA from teeth: (I) using a 6750 Freezer mill™ (SPEX Certiprep, Metuchen, New Jersey, USA) [5] for spraying and the Centricon-100 (Millipore, Beverly, MA, USA) for filtration and concentration [5,16,17]; (II) using the mill for grinding together with silica-based extraction [18,19]; (III) pulverizing, by means of liquid nitrogen and an autoclaved mortar and pestle [9,20]; (IV) sectioning the tooth and extracting the pulp [21,22]; (V) covering the tooth with silicon and removing the dentine with a dental drill [23]; and (VI) using a QiaAmp® DNA MiniKit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) [24]. All These methods are expensive and time consuming.

In this study, we describe a method of DNA extraction from molar and premolar teeth using the IKA Works A11 Basic Mill (IKA do Brasil – RJ, Brazil) (Figure 1). This impact-grinding mill can be used for hard, brittle, non-elastic materials, and has a high-grade stainless steel beater. This beater can be used for materials with Mohs hardness of up to six. The grinding chamber is made of Tefcel (PTFE, glass fiber-reinforced) with a stainless steel inlet (1.4571), an effective volume of 80 ml, for embrittlement of the material to be ground with liquid nitrogen in the grinding chamber. We tested DNA precipitation using Microcon™-100 (Millipore, Beverly, MA, USA) or isopropanol, and the DNA amplification using kits designed for nDNA, Y-STR or mtDNA.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and DNA extraction

All specimens were casework samples submitted to the Forensic Laboratory of Rio Grande do Sul, Brazil for DNA typing. Molar or premolar teeth from 26 previously unidentified bodies, deposited in the DML-RS, were removed and stored, for at least 24 hours, at -80°C in an UltraFreezer (SANYO, Tokyo, Japan). For each evaluated corpse, the general state of presentation, the approximate time of death, the age, and the place where the corpse was found were recorded. Teeth were ground using an IKA A11 Basic Mill. Each tooth was exhaustively ground and separated into four 2-ml tubes. Between 0.4 and 0.8 g of teeth powder was used for each DNA extraction. DNA was extracted from the tooth samples using 600 µl of lysis buffer [100 mM NaCl, 10 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 2% SDS (sodium dodecyl sulphate), 10 mM Tris-HCl (pH 8), 24 µl of 20 mg/ml proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, USA) and 48 µl of 1 M DTT (dithiotreitol – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)]. The samples were incubated at 56°C for 2 or 12 hours. For extraction, 700 µl of UltraPure™ [phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25:24:1, v/v), Invitrogen, Carlsbad, CA, USA] was added, vortexed, and centrifuged for 7 min at 15,000 X g in a

microcentrifuge. The upper aqueous layer was placed inside a MicroconTM-100 concentrator (Millipore, Beverly, MA, USA) and centrifuged at 500 X g until only a few microliters remained. MicroconTM-100 filtering was repeated twice by adding 400 µl of DNA-free H₂O. Fifty microliters of DNA-free H₂O was added, the columns inverted and the retentate collected by centrifugation at 1000 X g for 3 min. The retentate was transferred into a new microcentrifuge tube and stored at -20°C. Alternatively, the upper aqueous layer was precipitated by adding an equal volume of isopropanol, centrifuged at 7000 X g for 7 min and washed twice with 70% ethanol, centrifuged, and dried in a dry bath at 95°C for 5 min. Extracted DNA was re-suspended in a volume of 50 µl of DNA-free H₂O followed by proteinase K inactivation at 95°C for 5 min, and stored at -20°C (Figure 2).

2.2. DNA quantification

Total DNA concentration was measured with a GeneQuant *pro* spectrophotometer (Amersham Biosciences, Cambridge, England) at $\lambda=260$ nm. Purity of DNA was assessed using the ratio of OD₂₆₀/280 with a ratio of 1.7-2.0 representing good purity [25].

2.3 PCR amplification conditions

Samples were amplified by PCR using either a PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA, USA) or an ABI 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). STR genotyping was performed using the PowerPlex16TM System PCR Amplification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) (nDNA). Y-STR genotyping was conducted using the AmpF1STR[®] YfilerTM Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR was carried out according to the manufacturer's instructions. Fluorescence detection of genotypes was performed with an ABI Prism[®] 3100-Avant Genetic Analyzer and by using the Data Collection v.2.0, and Gene Mapper ID v.3.2 analysis software (Applied Biosystems, Foster City, USA). For mtDNA analysis, PCR amplification using the primer pairs L15996/H16401 yielded a fragment of 406 bp, as described by Wilson *et al.*, 1995 [26]. The PCR products were separated from residual primers and sequenced directly by cycle sequencing. The ABI PRISMTM 3100-Avant Genetic Analyser was used for separation and detection of the fluorescence-labeled chain termination products. Hypervariable segments were sequenced with the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit from Applied Biosystems on an ABI PRISMTM 3100-Avant DNA sequencer. The sequences were manually checked in CHROMAS [27] and aligned with CLUSTAL-X [28].

2.4 Statistics

The relationships between the samples were examined using ANOVA, or ANOVA followed by Student Newman's Keul Post Hoc, and Pearson's correlation (SPSS software package for Windows version 13.0; SPSS, Inc.). A *P* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

In this study, post-mortem time, sex, tooth mass, and environmental conditions of the cases presented varied widely, as shown in Table 1. The total mean \pm SD weight of the teeth was 2.649 \pm 1.22 g. The use of the IKA A11 Basic Mill presented satisfactory results, with the possibility of positive identification of all the investigated bodies (Table 1).

Nuclear DNA typing was successful in 20 cases out of 26 samples (77%). In two (8%) of these 20 cases Y-STR was used to confirm the male lineage. Although in the six remaining samples (23%) there was a good amount of DNA, the amplification of nDNA (PowerPlex16TM) produced an insufficient number of *loci* to allow for the positive identification of the samples. The amount of DNA in the samples could be due to microorganism contamination [29,30]. To verify this, specific human DNA quantification by Real Time PCR analysis would be necessary [31]. With regard to the remaining six cases, mtDNA amplification was performed and the nucleotide sequences of the HV1 region were successfully analysed. The nucleotide sequences of the HV1 were consistent with those in reference samples obtained from presumed maternal relatives (data not shown). In all tested cases, the electropherograms obtained from the case samples showed no ambiguous peak, which could be a result of contamination.

Table 2 shows that: (I) no significant differences were observed in the amount of DNA obtained with distinct incubation times; however, MicroconTM-100 extraction resulted in an increased amount of DNA when compared to isopropanol ($p < 0.001$); (II) isopropanol precipitation resulted in higher DNA pureness in comparison to MicroconTM-100 ($p < 0.001$); (III) the lower concentration of DNA obtained with the precipitation of isopropanol seems to be compensated by the higher purity, since no differences in the number of amplified *loci* were found ($p < 0.001$).

Body state, age, and place where the corpse was found had no effect on concentration, quality and/or numbers of *loci* (data not shown). No correlation between time of death and DNA concentration was found.

4. Discussion and Conclusion

Dental pulp is generally considered sheltered from the Taq DNA polymerase inhibitors contained in soil (humic acids, tannins) [24]. However, the DNA samples obtained from corpses found in rivers or on their banks presented higher amplification inhibition. This inhibition must be related to the great amount of bacteria found in the water and, therefore, may be greatly increased when the bodies are floating facedown [29,32].

The DNA samples obtained from bodies that were recovered from rivers or river banks, presented higher inhibition. However, while the length of time the body remains in the water may be an important factor, some bodies have been identified with nDNA [32].

Concerning the PCR results, no inverse correlation could be observed with respect to the success of typing and the postmortem times of the corpses. The employment of DNA typing shown in this report therefore suggests the high potential of tooth specimens as a source of DNA typing.

Malaver and Yunis (2003) [14] suggested that the amount of DNA in teeth was below the limits of detection with a Quantiblot kit, indicating the need to develop methods that could accurately determine the amount of DNA in teeth used in forensic casework [14]. Pfeiffer *et al.*, 1999, suggested that fragment lengths of more than 500 bp cannot be successfully amplified in old skeletal material or decomposed bodies [7]. In the methods analyzed in this study, we found no significant difference between the numbers of *loci* genotyped, because the kits used for nDNA do not present fragment lengths longer than 400pb (Table 2).

The DNA concentration in the extracts did not depend on the weight or the type of tooth from which the DNA was extracted, as also reported by Iwamura *et al.*, 2005 [8]. The amount of DNA, confirmed by spectrophotometry, was higher in the protocols where MicroconTM-100 was employed than in those where precipitation with isopropanol was used (Table 2). This could be due to contamination by microorganisms, since tooth samples did not undergo any cleaning process. However, the quality of the electropherograms and the evidence of the genetic relationship with the putative relatives, seem to indicate that this procedure produces DNA in sufficient quantity and quality to permit DNA examination. The precipitation with isopropanol produces a DNA with higher degree of purity, as indicated by the OD260/280 relation. This is because isopropanol is more selective in the precipitation of DNA [25].

In conclusion, the use of this 'fast and cost-effective method' made it possible to collect sufficient DNA from molar and premolar teeth. This procedure completely eliminates the need to use any expensive tool, and is more time effective, since it eliminates of the step of long lysis buffer incubation, thus reducing the cost and time of operation.

Acknowledgments

We are grateful to the colleagues of the Sector of Forensic Genetics of the Laboratório de Perícias of the Rio Grande do Sul. This project was supported by SENASP, IGP/RS, and PUCRS.

References

[1] Mass Fatality Incidents: A Guide for Human Forensic Identification. NCJ 199758, June 2005, Special Report, by National Institute of Justice. Available from: <http://www.ncjrs.org/pdffiles1/nij/199758.pdf>. Accessed: April 6, 2006.

[2] G. Grévin, P. Bailet, G. Quatrehomme, A. Ollier, Anatomical reconstruction of fragments of burned human bones: a necessary means for forensic identification, *Forensic Sci. Int.* 96 (1998) 129-134.

- [3] Y. Bilge, P.S. Kedici, Y. D. Alakoç, K. Ü. Ülkür, Y.Y. Ilkyaz, The identification of a dismembered human body: a multidisciplinary approach, *Forensic Sci. Int.* 137 (2003) 141-146.
- [4] A. Alonso, S. Anpelinovic, P. Martín, D. Sutlovic, I. Erceg, E. Huffine, L. Fernández de Simón, C. Albarrán, M. Definis-Gojanovic, A. Fernández-Rodriguez, P. García, I. Drmic, B. Rezic, S. Kuret, M. Sancho, D. Primorac, DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples, *Croat. Med. J.* 42 (2001) 260–266.
- [5] T.M. Clayton, J.P. Whitaker, C.N. Maguire, Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci, *Forensic Sci. Int.* 76 (1995) 7-15.
- [6] M. Graw, H.J. Weisser, S. Lutz, DNA typing of human remains found in damp environments, *Forensic Sci. Int.* 113 (2000) 91-95.
- [7] H. Pfeiffer, J. Hühne, B. Seitz, B. Brinkmann, Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth, *Int J Legal Med* 112 (1999) 142–144.
- [8] E.S. M. Iwamura, C.R.G.C.M. Oliveira, J.A.S.-Vieira, S.A.B. Nascimento, D.R. Muñoz, A qualitative study of compact bone microstructure and nuclear short tandem repeat obtained from femur of human remains found on the ground and exhumed 3 years after death, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 26 (2005) 33-44.
- [9] N. Onori, V. Onofri, F. Alessandrini, L. Buscemi, M. Pesaresi, C. Turchi, A. Tagliabracci, Post-mortem DNA damage: A comparative study of STRs and SNPs typing efficiency in simulated forensic samples, *International Congress Series* 1288 (2006) 510-512.
- [10] S. L. Avon, *Forensic Odontology: The Roles and Responsibilities of the Dentist*, *J Can Dent Assoc*; 70 (2004) 453–458.
- [11] A.V. Sivagami, A.R Rao, U. Varshney, A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian population, *Forensic Sci. Int.* 110 (2000) 107-115.
- [12] M. Drancourt, G. Aboudharam, M. Signoli, O. Dutour, D. Raoult, Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 12637-12640.
- [13] M. T. P. Gilbert, E. Willerslev, A. J. Hansen, I. Barnes, L. Rudbeck, N. Lynnerup, A. Cooper, Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA, *Am. J. Hum. Genet.* 72 (2003) 32-47.
- [14] P. C. Malaver, J. J. Yunis, Different Dental Tissues as Source of DNA for Human Identification in Forensic Cases, *Croat. Med. J.* 44 (2003) 306–309.
- [15] D. Primorac, Identification of Human Remains from Mass Graves found in Croatia and Bosnia and Herzegovina, *J. Forensic Sci.* 41 (1996), 891-894.
- [16] E. Meyer, M. Wiese, H. Bruchhaus, M. Claussen, A. Klein, Extration and amplification of authentic DNA from ancient human remains, *Forensic Sci. Int.* 113 (2000) 87-90.

- [17] A. Alonso, P. Martín, C. Albarrán, P. García, O. García, L. F. Simón, J.G.-Hirschfeld, M. Sancho, C.Rúa, J. F.-Piqueras, Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies, *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 141-149.
- [18] M. Höss, S. Pääbo, DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3913-3914.
- [19] C. Vernesi, G. Benedetto, D. Caramelli, E. Secchieri, L. Simoni, E. Katti, P. Malaspina, A. Novelleto, V.T.W. Marin, G. Barbujani, Genetic characterization of the body attributed to the evangelist Luke, *Proc. Natl. Acas. Sci.* 23 (2001) 13460-13463.
- [20] H. Murakami, Y. Yamamoto, K. Yoshitome, T. Ono, O. Okamoto, Y. Shigeta, Y. Doi, S. Miyashi, H. Ishizu, Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples, *Acta Med Okayama* 54 (2000) 21-32.
- [21] D. Raoult, G. Aboudharam, E. Crubézy, G. Larrouy, B. Ludes, M. Drancourt, Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of medieval black death, *Proc. Natl. Acas. Sci.* 23 (2000) 12800-12803.
- [22] F.-X. Ricaut, C.K.Tracqui, E. Crubézy, B. Ludes, STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples, *Forensic Sci. Int.* 151 (2005) 31–35.
- [23] M.T.P. Gilbert, J.Cuccui, W. White, N. Lynnerup, R.W. Titball, A. Cooper, M.B. Prentice, Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five european excavations of putative plague victims, *Microbiology* 150 (2004) 341-354.
- [24] G.C. Calacal, F.C. Delfin, M.M.M. Tan, L.Roewer, D.L. Magtanong, M.C. Lara, R. Fortun, M.C.A. De Ungria, Identification of Exhumed Remains of Fire Tragedy, Victims Using Conventional Methods and Autosomal/Y-Chromosomal Short Tandem Repeat DNA Profiling, *Am J Forensic Med Pathol* 26 (2005) 285-291.
- [25] J. Sambrook, E.P. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: A Laboratory Manual* second edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- [26] M.R. Wilson, J.A. DiZinno, D. Polanskey, J. Replogle, .B Budowle, Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis, *Int J Legal Med* 108 (1995) 68–74.
- [27] C. McCarthy, *Chromas 1.45*, Griffith University, Gold Coast Campus, Southport, Queensland, Australia, Copyright 1996-1998.
- [28] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Research*, 24 (1997) 4876-4882.
- [29] Y.J. Deng, Y.Z. Li, X.G. Yu, L. Li, D.Y. Wu, J. Zhou, T.Y. Man, G. Yang, J.W. Yan, D.Q. Cai, J. Wang, H.M. Yang, S.B. Li, J. Yu, Preliminary DNA Identification for the Tsunami Victims in Thailand, *Geno. Prot. Bioinfo.* 3 (2005) 143-157.
- [30] A. Alonso, Š. Anđelinović, P. Martín, D. Sutlović, I. Erceg, E. Huffine, L.F. de Simón, C. Albarrán, M. Definis-Gojanović, A. Fernández-Rodríguez, P. García, I. Drmić, B. Režić, S. Kuret, M. Sancho, D. Primorac, DNA Typing from Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on DNA Isolated from Bone and Teeth Samples, *Croat Med J* 42 (2001) 260-266.

[31] A.Alonso, P. Martín, C. Albarrán, P. García, O.García, L.F. de Simón, J.García-Hirschfeld, M.Sancho, C.de la Rúa, J.Fernández-Piquerasd, Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies, *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 141–149

[32] A. Alonso, P. Martín, C. Albarrán, P. García, L.F. de Simón, M.J. Iturralde, A. Fernández-Rodríguez, I.Atienza, J.Capilla, J.García-Hirschfeld, P.Martínez, G.Vallejo, O.García, E.García, P.Real, D.Álvarez, A.León, M.Sancho, Challenges of DNA Profiling in Mass Disaster Investigations, *Croat Med J.* 46 (2005) 540-548.

Table 1: Data on investigated bodies.

Case	Teeth	Age (years)	Sex	Reference Information	Location were found	Estimate Post-mortem time ^a	Quantity of teeth powder (g)	Positive identification
01	PM	nr	M	Putrefactive	Under ground	4380	2.297	nDNA
02	ML	nr	M	Putrefactive	Under ground	2065	3.394	nDNA
03	PM	nr	M	Putrefactive	Under ground	1915	2.098	nDNA
04	PM	22	M	Completely skeletonized	Outside	1670	1.993	nDNA
05	PM	44	M	Drowned	River	1095	2.104	mtDNA
06	ML	43	M	Putrefactive	Woodland area	1335	2.638	nDNA/ Y-STR
07	ML	43	M	Putrefactive	Outside	1104	3.245	nDNA
08	ML	51	M	Putrefactive	Outside	760	2.107	nDNA
09	ML	16	M	Completely skeletonized	Woodland area	2555	2.590	mtDNA
10	ML	44	M	Burned	Outside	635	1.689	mtDNA
11	PM	51	M	Putrefactive	River	605	4.712	mtDNA
12	ML	33	M	Putrefactive	Woodland area	730	5.810	nDNA
13	PM	33	M	Putrefactive	Under ground	540	1.794	nDNA
14	PM	51	M	Completely skeletonized	Under ground	1215	2.137	nDNA
15	ML	48	M	Putrefactive	Under ground	69	2.159	nDNA
16	PM	46	M	Putrefactive	River	820	1.899	mtDNA
17	ML	32	M	Putrefactive	River	820	2.400	nDNA
18	PM	nr	M	Putrefactive	River	395	2.085	nDNA
19	ML	26	M	Putrefactive	River bank	150	1.890	nDNA
20	ML	50	M	Completely skeletonized	Woodland area	665	2.247	nDNA Y-STR
21	ML	56	M	Drowned	River bank	850	3.043	nDNA
22	PM	59	M	Putrefactive	Under ground	1185	1.983	nDNA
23	PM	23	M	Putrefactive	Outside	180	1.640	nDNA
24	ML	22	M	Putrefactive	River bank	120	2.099	mtDNA
25	ML	18	M	Completely skeletonized	Under ground	120	2.318	nDNA
26	ML	23	F	Putrefactive	River bank	90	6.499	nDNA

PM: premolar tooth; ML: molar tooth; nr: not report; nDNA: nuclear DNA fragments analyzed by PowerPlex16TM System; Y-STR: Y-Chromosome STR analyzed by AmpF1STR[®]YfilerTM; mtDNA: mitochondrial (HVI) DNA analyzed by Big Dye Terminator; ^a estimated days between person's disappearance and the analysis for DNA.

Table 2: Comparison of four methods of DNA extraction:

	12h/Micro	12h/iso	2h/Micro	2h/iso
$\mu\text{gDNA}/\mu\text{l/g Teeth}$ mean \pm SD	184.32 \pm 75.78*	52.08 \pm 54.04	207.88 \pm 89.93*	53.43 \pm 45.44
OD 260/280 mean \pm SD	1.46 \pm 0.22*	1.76 \pm 0.31	1.42 \pm 0.27*	1.71 \pm 0.21
number of studied <i>loci</i> mean \pm SD	11.5 \pm 5.70	9.15 \pm 6.14	10.77 \pm 6.87	9.77 \pm 5.52

12h/Micro: 12h lysis buffer incubation and MicroconTM-100 concentration; 12h/iso: 12h lysis buffer incubation and isopropanol concentration; 2h/Micro: 2h lysis buffer incubation and MicroconTM-100 concentration; 2h/iso: 2h lysis buffer incubation and isopropanol concentration; * $p < 0.001$ relative to the comparison between 12h/Micro *versus* 12h/iso, and between 2h/Micro *versus* 2h/iso (ANOVA followed by Student Newman's Keul Post Hoc).



Figure 1. IKA Works A11 Basic Mill (IKA do Brasil, RJ, Brazil)

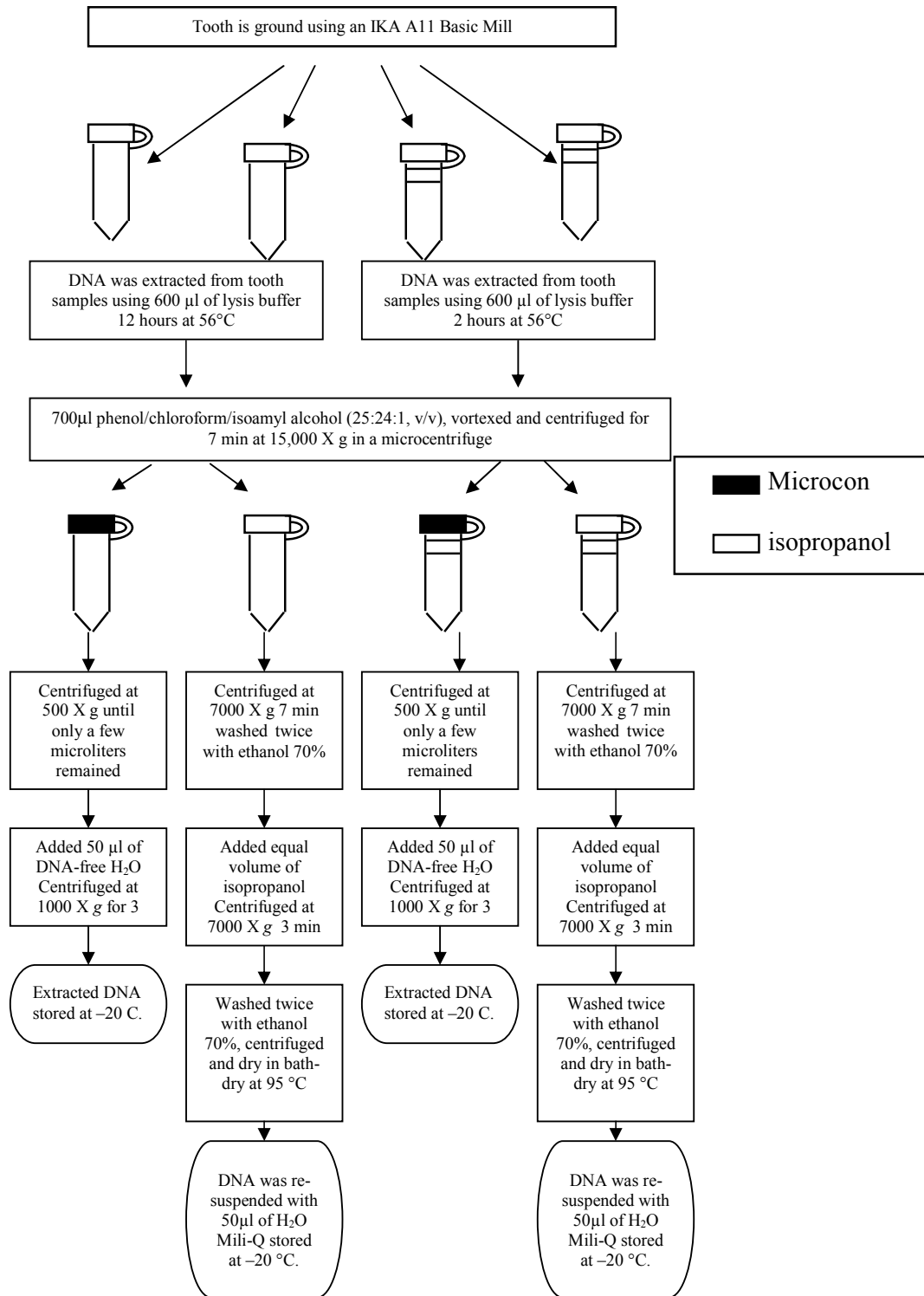


Figure 2. Comparison of methods for DNA extraction.

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclusões:

- A utilização do moinho mineralógico IKA para pulverização de tecido dentário foi eficaz e pode substituir o uso do *Freezer mill*[®], reduzindo o custo dos procedimentos.
- A precipitação com isopropanol foi eficaz e pode substituir o uso do Microcon[™]-100, reduzindo ainda mais o custo dos procedimentos.
- Um tempo de duas horas para a incubação do tecido no tampão de lise celular foi eficaz na redução do tempo dos procedimentos.
- Os experimentos desenvolvidos neste trabalho testaram e padronizaram um novo método econômico e rápido para a obtenção de DNA de dentes para estudos forenses.
- O resultado deste trabalho irá atender aos interesses do Convênio de Cooperação entre o PPGBCM-PUCRS e IGP-RS no desenvolvimento e no avanço na linha de investigação da Biologia Forense.

Considerações Finais:

Com este trabalho foi possível a identificação de cadáveres criando a possibilidade de que outros Laboratórios de Perícias, ligados à rede de Laboratórios de DNA mantida pela SENASP (Secretaria Nacional de Segurança Pública) utilizem uma metodologia mais barata, rápida e tão eficiente quanto os procedimentos padrão já estipulados na literatura forense.

ANEXO

Normas para publicação

1. Manuscripts should be written in English. *Language Editing*: [Elsevier's Author Gateway](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com. Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions http://authors.elsevier.com/terms_and_conditions.html?dc=TANDC.
2. The text should be typed in double-spacing on consecutively numbered pages. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.
3. Manuscripts in general should be organized in the following order:
 - Title (should be clear, descriptive and not too long)
 - Name(s) of author(s)
 - Complete postal address(es) of affiliation(s)
 - Telephone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author
 - Abstract, which should be clear, descriptive and not longer than 400 words
 - Keywords, normally 3-6 items
 - Introduction
 - Material studied, methods, techniques
 - Results
 - Discussion
 - Conclusion
 - Acknowledgments
 - References
4. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

References

References should be numbered in the order in which they are cited (using square brackets in the text) and listed in numerical order on a separate sheet. This journal should be cited as *Forensic Sci. Int.* References to journals, books and multi-author volumes should accord with the following examples:

- [1.] N. von Wurmb-Schwark, R. Higuchi, A. P. Fenech, C. Elfstroem, C. Meissner, M. Oehmichen and G. A. Cortopassi, Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR. *Forensic Sci. Int.* 126 (2002) 34-39.
- [2.] J. Siegel, G. Knupfer and P. Saukko, *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Academic Press, London, San Diego, 2000.
- [3.] R.E. Bisbing, *Finding Trace Evidence*, in: M.M. Houck (Ed.) *Mute Witnesses - Trace Evidence Analysis*, Academic Press, London, San Diego, 2001, pp. 87-115.

Tables

Authors should take notice of the limitations set by the size and layout of the journal. Tables should be typed in double spacing on separate sheets, and numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

Illustrations

- Illustrations should be designed with the format of the journal in mind.
- Illustrations and lettering should be of such a size as to allow a photographic reduction of 50% without becoming illegible
- If scales are required, use scale bars on the illustration itself instead of numerical magnification factors
- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol
- Number the illustrations according to their sequence in the text
- Use a logical naming convention for your artwork files
- Provide all illustrations as separate files
- Provide captions to illustrations separately
- Produce images near to the desired size of the printed version

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://authors.elsevier.com/artwork>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is". Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low
- Supply files that are too low in resolution
- Submit graphics that are disproportionately large for the content

Elsevier will ensure that colour figures will appear free-of-charge in colour in the electronic version of accepted papers, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is paid for by the author or a sponsor: you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Preparation of supplementary data

Supplementary files supplied will be published online, at no charge, alongside the electronic article. Supplementary files include, but are not limited to, supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, and sound clips. Please ensure that data is provided in one of our recommended file formats to ensure that any submitted material is directly usable. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- Make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- Make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- Post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- Post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- Present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- For your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- Retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- Include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- Use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- Prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

UM MÉTODO RÁPIDO E ECONÔMICO PARA A OBTENÇÃO DE DNA DE DENTES
PARA ESTUDOS FORENSES

Paulo Eduardo Raimann

Porto Alegre

Setembro/2006