



23º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

**Análise Comparativa de Métodos de Extração de ADN Antigo
em amostras ósseas e dentárias com integração de tecnologias forenses:
Revisão da Literatura**

M. Henriques^{1, 2}, H. Afonso Costa^{1, 5}, A. Amorim^{1, 3, 4, 6}, L. Cainé^{1, 2, 6}

¹ Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Portugal

² Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Portugal

³ Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal

⁴ Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Portugal

⁵ Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, Portugal

⁶ REQUIMTE, Laboratório Associado FCT, Portugal

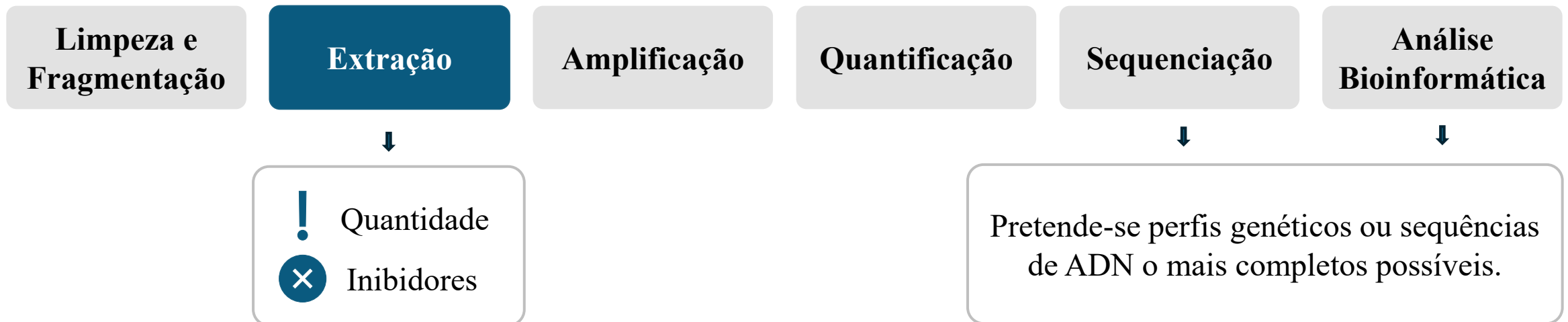
Contexto Introductório

ADN antigo → Fragmentos curtos ($\sim < 50\text{pb}$) + Desaminação da citosina nas extremidades das cadeias

Desafios: baixa quantidade e evitar contaminação

Para além do primeiro manuseamento da amostra, o processo de extração de ADN revela-se condicionante para o estudo

→ Influencia todos os resultados obtidos nos procedimentos subsequentes



Extração de ADN antigo: importância

Obter uma **quantidade suficiente** de material genético, mas que contenha o **mínimo de inibidores** possível

Maximizar a recuperação de **fragmentos ultracurtos** (~ 25 - 35 pb)



Adequar o método ao tipo de amostra

Para o mesmo método, é importante (saber) **adaptar** o protocolo



ADN antigo VS Amostras Forenses

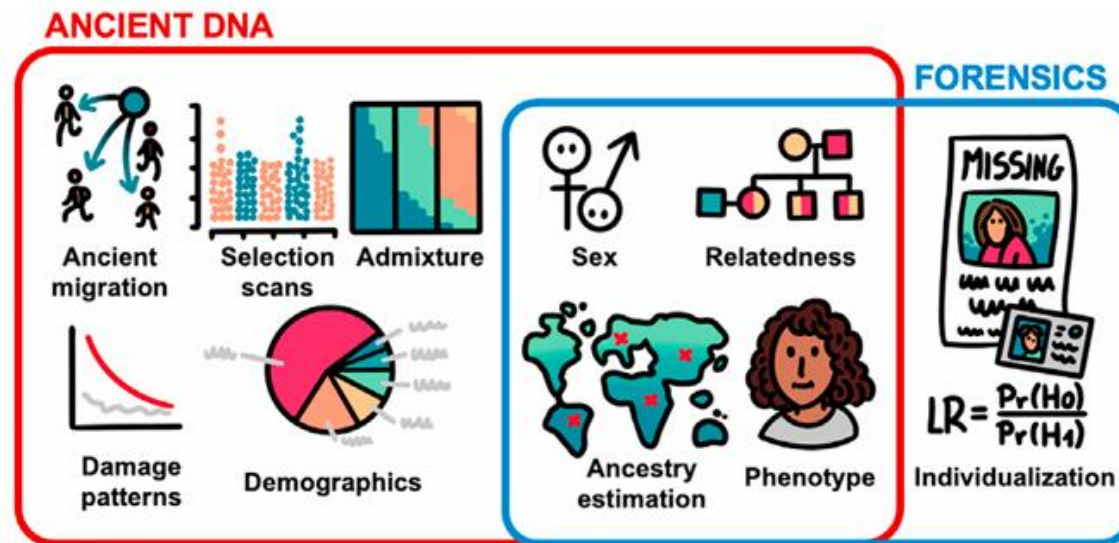


Fig. 1.: Imagem adaptada de Childebayeva, A., & Zavala, E. I. (2023). Review: Computational analysis of human skeletal remains in ancient DNA and forensic genetics. *iScience*, 26(11).
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108066>

Perícias Forenses ➡ Focam-se mais na análise de **STRs** (*Short tandem repeats*) ➡ ↑ Polimorfismo ➡ Identificação



ADN antigo VS Amostras Forenses

Porém...

Exigência e controle das atividades periciais

(acreditação dos laboratórios e validação de quaisquer
procedimentos efetuados)

+

Custos e tempo associados à inclusão de novas metodologias

(novos equipamentos, reagentes, formação, adequação do
espaço, ensaios, atualizações de softwares, etc.)



Tornam morosas a adesão e possivelmente inclusão
de novas técnicas, ainda que (possivelmente sejam)
mais vantajosas às previamente implementadas

“While aDNA studies typically center around human evolution and past history, and forensic genetics is often more concerned with identifying a specific individual, scientists in both fields face similar challenges”

“Since the advent of NGS, a natural widening has occurred between the forensic and aDNA fields”

Citações de:

Childebayeva, A., & Zavala, E. I. (2023). Review: Computational analysis of human skeletal remains in ancient DNA and forensic genetics. *iScience*, 26(11), pp. 1, 2.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108066>

Fatores **prévios** à extração que influenciam os resultados obtidos

Intrínsecos

- Tipo de amostra (que maximize a quantidade de ADN endógeno possível de ser extraído):
 - **Ossos**: composição a nível (in)orgânico (trabecular/cortical)
 - Os melhores são: **região pétrea** do osso temporal e **fémur**
 - **Dentes**: zona alvo pretendida → 1º Cimento radicular, 2º Polpa
 - Os melhores são: 1º **molares**, 2º pré molares e caninos e 3º incisivos

Extrínsecos

- Intervalo *post mortem*;
- Condições ambientais (pH, temperatura, etc), local de inumação, estado de preservação/degradação, presença de contaminantes;
- Manuseamento da amostra e contaminações externas: na exumação, limpeza e fragmentação do osso; equipamento pessoal utilizado (ou não).

“The time between death and DNA isolation is not as crucial as environmental storage conditions, but it may provide preliminary information about the likelihood of success.”

Citação de:

Dobosz, A., Jonkisz, A., Lebioda, A., Kawecki, J., & Dobosz, T. (2025). Destructive and Non-Destructive Methods for aDNA Isolation from Teeth and Their Analysis: A Comparison. *Genes*, 16(9), 1059, p. 14.

<https://doi.org/10.3390/genes16091059>

Metodologia/Objetivos

- Pesquisa Bibliográfica:
 - Bases Bibliográficas adequadas
 - **Multidisciplinares** (Web of Science, Scopus, Google Scholar)
 - **Específicas** (PubMed e SciELO)
 - Palavras-chave: “ancient”, “human”, “DNA”, “extraction” e “protocol”
- Quais os primeiros estudos desenvolvidos e com que técnicas?
- Quais os protocolos mais utilizados?
- Que adaptações têm vindo a ser efetuadas?
- Quais os melhores protocolos a utilizar hoje em dia para este tipo de amostras?

Métodos Orgânicos

Separação dos ácidos nucleicos dos restantes componentes celulares com base na solubilidade

Vantagens:

- > Pureza
- < custo

Desvantagens:

- < eficácia com fragmentos curtos (perdas na recuperação de ADN)
- > risco de contaminação

Fenol-Clorofórmio
(*Phenol-chloroform-isoamyl alcohol*)



Higuchi et al. (1984)

Höss & Pääbo (1993)

Pääbo et al. (1988)

Cattaneo (1995)

Pääbo (1985, 1989)

Loreille et al. (2007)

Hagelberg & Clegg (1991)

Métodos Comerciais

Essencialmente à base de **Sílica**, com processos **automatizados** e **kits completos** comercializados por diversas casas comerciais

Vantagens:

- + rápidos
- < manipulação
- < Risco de contaminação

Desvantagens:

Não removem todos os inibidores

Sílica em Coluna

Nucleo Spin DNA Trace
(Macherey-Nagel)

QIAamp DNA Investigator Kit (50)
(Qiagen)

Sílica em Suspensão

PrepFiler Express BTA
(Thermo Fisher Scientific)

DNA IQ System
(Promega)

Fenol Clorofórmio VS Sílica

Fenol-Clorofórmio (*Phenol-chloroform-isoamyl alcohol*)

- **Digestão inicial para quebrar minerais, proteínas e lípidos** na mistura, através da mistura com EDTA, SDS, Proteinase K, DTT e Tween 20
- Usa solventes orgânicos (fenol e clorofórmio) que são produtos tóxicos que **ajudam a separar o ADN dos restantes componentes celulares:**
 - *Phenol* ajuda a desnaturar e extrair proteínas
 - *Chloroform* ajuda a extrair lípidos
- A **Precipitação etanólica recupera o ADN da fase aquosa** da mistura

Vantagens:

- Aplicável a vários tipos de amostra
- Compatível com extrações de pequena e larga escala
- Fácil aplicação e obtenção de fragmentos completos
- Alta pureza

Desvantagens:

- Requer vários procedimentos
- Menos eficiente em fragmentos curtos
- Utilização de produtos tóxicos

↓ ↓
Uso decrescente em ADN antigo

Sílica

- A extração com base em sílica consiste na **absorção do ADN à sílica na presença de sais caotrópicos** (destabilizam macromoléculas em soluções aquosas minimizando efeito hidrofóbico);
- **Lavagem** com tampões contendo etanol ou isopropanol **remove contaminantes, sais e proteínas;**
- Eluição em **tampão de baixa força iónica** (ex: TE, Tris-HCl, água) e **pH neutro** ou ligeiramente alcalino → ADN recuperado.



Coluna

Sílica em Coluna Vs Suspensão

Suspensão

ADN liga-se à membrana de sílica por centrifugação

Vantagens:

- ✓ Boa recuperação de fragmentos curtos (>35pb)
- ✓ Eficiente na remoção de inibidores, mas depende da coluna e tampão de lavagem
- ✓ Compatível com protocolos Clássicos
- + prático (Material pré montado)
- + rápido, se aplicada a poucas amostras

Desvantagens:

- > Custo (kits comerciais)
- Volumes fixos dos reagentes

+ comum em genética forense (ADN está menos fragmentado)

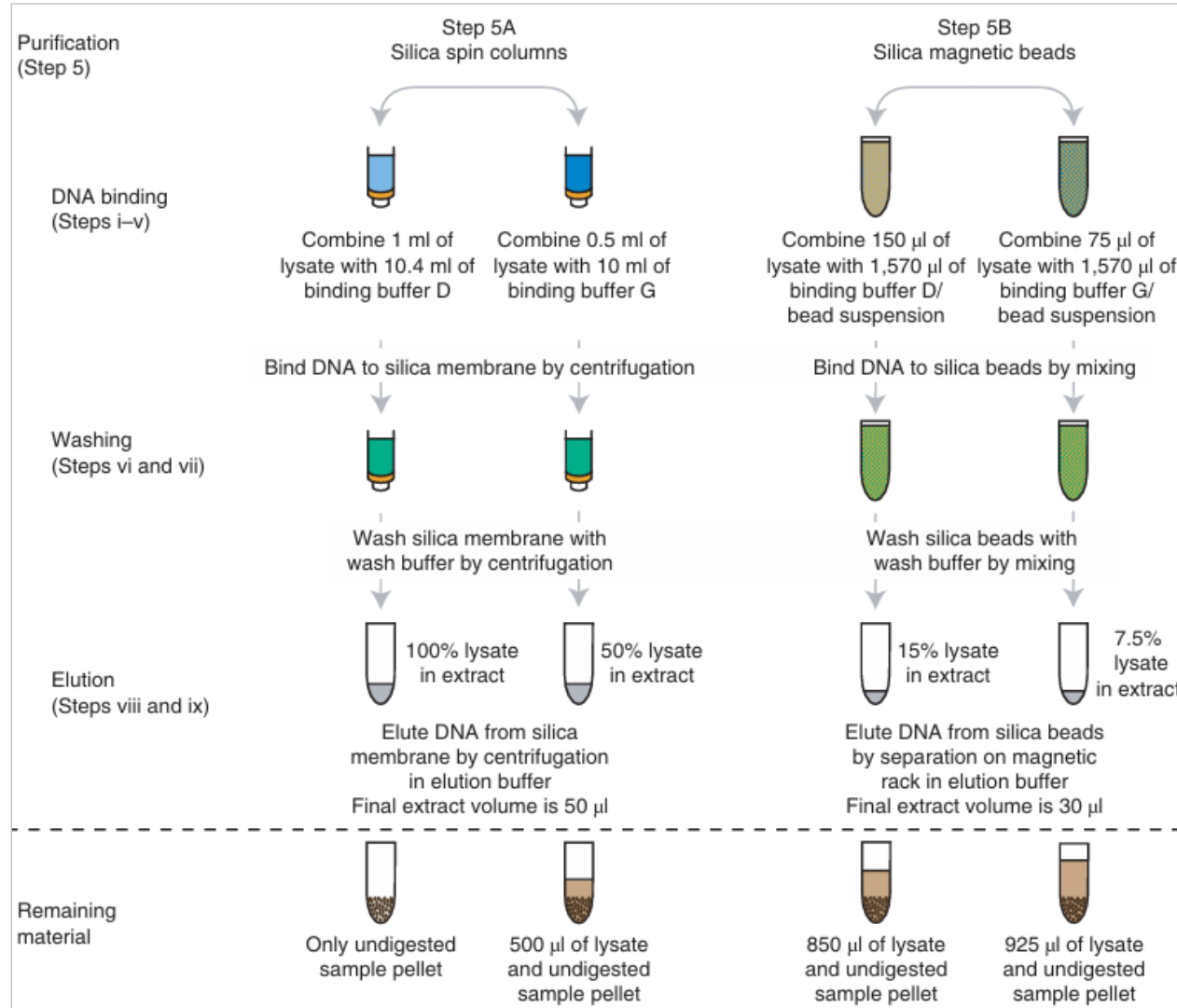


Fig. 2.: Imagem adaptada de Rohland et al. (2018). Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing. *Nature protocols*, 13(11), 2447–2461.

<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0050-5>

ADN liga-se às partículas (*beads*) de sílica por mistura

Vantagens:

- ✓ Excelente recuperação de fragmentos curtos (>25pb)
- + eficiente na remoção de inibidores
- ✓ Compatível com automação
- ✓ Quantidades ajustáveis dos reagentes
- + barato

Desvantagens:

- + procedimentos (incluindo preparação dos reagentes)
- + demorado

Método de eleição em laboratórios de ADN antigo

Extração de ADN a partir de Múmias Egípcias +
Precipitação Etanólica
Pääbo
1985

Pääbo
Influência da fragmentação e contaminação nos resultados obtidos
Importância da PCR e do acondicionamento dos ossos

Hagelberg, Sykes & Hedges
Extração com ossos humanos com milhares de anos; demonstração da aplicação da PCR a ADN em quantidades mínimas e fragmentado

Realça a **descalcificação, digestão enzimática e extração orgânica** como essenciais para extração bem sucedida de ADN antigo

Hagelberg & Clegg

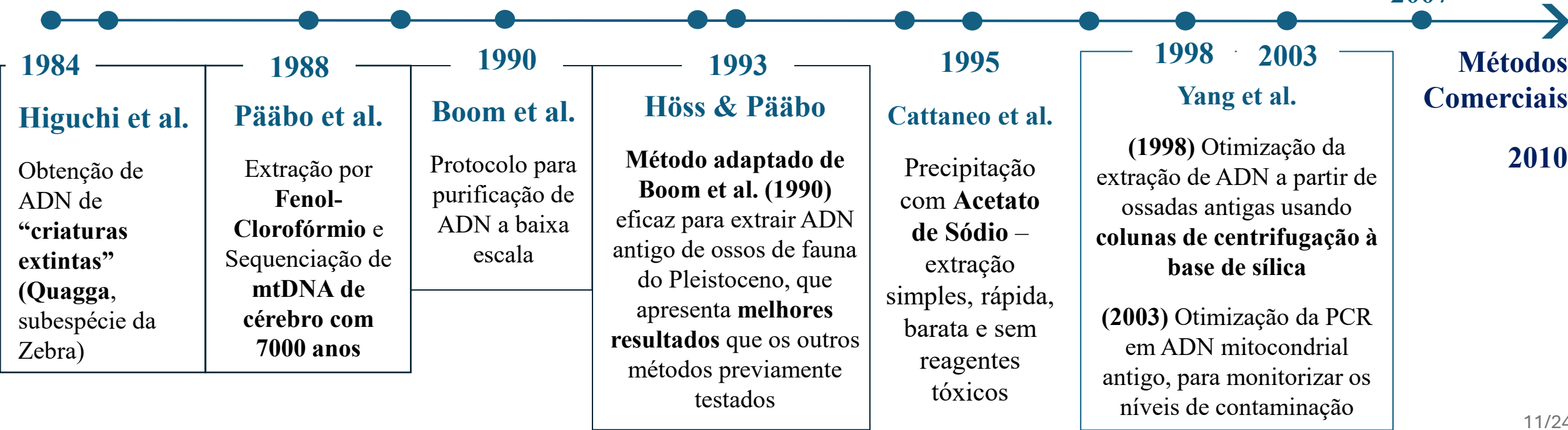
Método de Höss e Pääbo (1993) é melhor comparado com **Fenol-clorofórmio, Chelex 100 e tampão fosfato.**

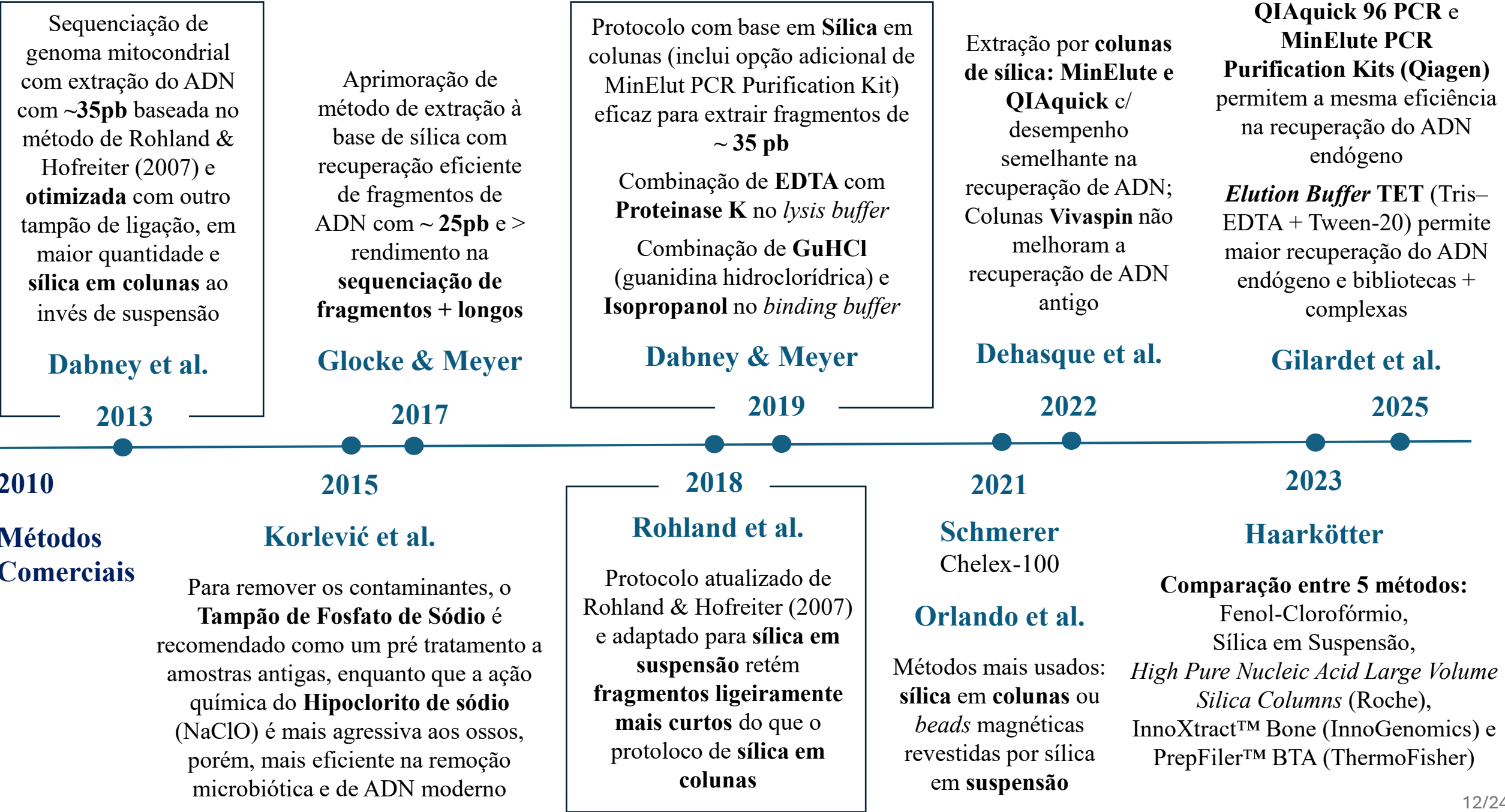
Handt et al.

Remoção de inibidores de PCR através de **colunas de centrifugação à base de sílica**

Yang et al.

Rohland & Hofreiter
Método simples e rápido com **EDTA e Proteinase K** para lise celular e purificação com **Sílica em suspensão.**
Loreille et al.
Desmineralização total do pó de osso/dente potencia a quantidade de ADN extraído, bem como o tamanho dos fragmentos





Quais os melhores/mais usados métodos/protocolos?

- Como facilitar a **libertação dos ácidos nucleicos**, sem fragmentar ainda mais as cadeias?
- Como remover o máximo de **inibidores** possíveis?
- Que **reagentes e tampões (*buffers*)** podem ser mais adequados?
- Potenciar a recuperação de **fragmentos ultra curtos!**



Degradação do ADN



Fragmentos longos recuperáveis tendem a ser bastante raros



Quanto mais fragmentos curtos se consiga incluir na extração, maior a quantidade de ADN endógeno utilizável para análise

Maior fiabilidade relativa à **autenticidade genética** da amostra e respetivo indivíduo



Potencia a **recuperação de alterações genéticas** e evita **reconstruções incompletas ou até enviesadas**

Os métodos à base de **sílica** tendem a ser os mais usados em **amostras antigas/degradadas**

Tampão (*buffer*)



Solução (mistura) de reagentes que resiste a variações de pH



Mantém a estabilidade e integridade do ADN e garante as condições ideais para enzimas, evitando degradações químicas



Podem condicionar os resultados obtidos:

- **Lise celular (*lysis*)** →
- **Ligação do ADN à sílica (*binding*)** →
- **Lavagem/remoção de contaminantes (*wash*)**
- **Separação do ADN purificado da sílica (*elution*)** →

pH = 5.2 (ambiente **ácido** favorece a ligação do ADN à sílica) → ADN extraído + puro com - inibidores da PCR e sequenciação

pH = 8.0 (básico) para estabilizar o ADN e ser compatível com enzimas como a Proteinase K e a Taq Polimerase (amplificação: se o material extraído estiver muito degradado ou desnaturado, a Taq Polimerase não consegue permitir a amplificação das cadeias).

Reagente	Tipo	Função	pH
EDTA (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)	Ácido	Descalcificação + Inibição da atividade de nucleases	~ 8.0 (ideal)
Proteinase K	Enzima	Digestão de proteínas	~ 8.0 (ideal)
SDS (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)	Detergente	Lise celular + Desnaturação proteica	~ 6.0 - 9.0
Triton X-100	Detergente	Lise celular	~ 5.0–10.0
Tris-HCl (<i>tris(hydroxymethyl)aminomet hane hydrochloride</i>)	Surfactante (reduz tensão superficial entre 2 líquidos ou entre líquido e superfície sólida)	Impede que fragmentos curtos adiram a superfícies plásticas maximizando o rendimento da extração	~ 7.0 – 9.0
Tween-20	Surfactante	Lise celular + Evita adesão do DNA a superfícies plásticas	~ 5.0 - 7.0
Guanidina hidrocloreídrica	Agente caotrópico (destabiliza macromoléculas em soluções aquosas minimizando efeito hidrofóbico)	Desnaturação proteica + Ligação do ADN à matriz de sílica	~ 4.5 - 6.5
Isopropanol	Álcool	Precipitação + Ligação do ADN à sílica	~ 6.0 - 8.0
Acetato de sódio	Sal	Precipitação + Ligação do ADN à sílica	~ 4.5 - 9.0 (bastante variável)
Cloreto de Sódio			~ 7.0
Etanol	Álcool	Lavagem/separação do ADN ligado à sílica	~7.0 (puro)

Tampões (*buffers*) testados:

Lise celular (*lysis*)

- **EDTA + Proteinase K** → Protocolos de Dabney et al. (2013) e Gilardet et al. (2025);
- **EDTA + SDS + Proteinase K** → Higuchi et al. 1984, Pääbo (1989), Höss et al. (1993), Yang et al. (1998), Rohland & Hofreiter (2007), Dabney et al. (2013) e Rohland et al. (2018);
- **ATL** (*Animal Tissue Lysis buffer*):
 - Detergente não iônico (ex: SDS e Triton X-100) + Tris-HCl + sal (ex: NaCl) (**Qiagen**);
 - Compatível com Protocolos Forenses;
- **G2** (Guanidina hidrocloreídrica + Tris-HCl + EDTA + Tween-20 + Triton X-100) (**Qiagen**) → Para extração automatizada com **Sílica em Suspensão**.

Ligação do ADN à sílica (*binding*)

- **PB** (Guanidina hidrocloreídrica + isopropanol) (**Qiagen**) → Comum em Protocolos com **Sílica em Colunas**;
- **Guanidina hidrocloreídrica + isopropanol + acetato de sódio**:
 - Adaptado por Dabney & Meyer (2019);
 - Otimizado para fragmentos ultra curtos (~ 35 pb).

Tampões (*buffers*) testados:

Lavagem/remoção de contaminantes (*wash*)

- **PE** (Etanol + Tris) → Comum em kits da **Qiagen**;
- **Etanol** → Protocolos de **Dabney & Meyer (2019)** e **Rohland et al. (2018)**.

Separação do ADN purificado da sílica (*elution*)

- **EB** (Tris-Cl 10 mM, pH 8.5) → inicialmente usado com **Fenol Clorofórmio**;
- **TE** (Tris-HCl + EDTA) → **Höss & Pääbo (1993)**, **Yang et al. (1998)**, **Rohland & Hofreiter (2007)** e **Dabney et al. (2013)**;
- **TET** (Tris-HCl + EDTA + Tween-20) → para preservar ADN → **Boom et al. (1990)**, **Rohland & Hofreiter (2007)**, **Dabney et al. (2013)** e **Rohland et al. (2018)**;
- **Água** (*water [nuclease-free]*) → utilização isolada de água (s/ nenhum outro reagente) pode reduzir estabilidade do ADN ao longo do tempo → **Höss & Pääbo (1993)**, **Yang et al. (1998)**, **Rohland & Hofreiter (2007)** e **Dabney et al. (2013)**.

Remoção de inibidores



Tampões (*buffers*) que contêm apenas **EDTA** e **Proteinase K** têm demonstrado permitir obter mais quantidades de ADN e reduzir os inibidores do que protocolos mais elaborados

- Remoção da superfície externa com ferramentas (semi) abrasivas (ex: discos de corte, lixas) para eliminar contaminantes ambientais e ADN moderno;
- Lise celular com **EDTA** + **Proteinase K** + **detergentes suaves** (ex: Tween 20);
- Lavagem com **Etanol** + **Tris** + **NaCl** + **EDTA** para remover sais e proteínas;
- **BSA** (*bovine serum albumin*) ajuda a minimizar o efeito dos inibidores na PCR, ao ser adicionada à mistura para amplificação.

Lise celular

PTB (*N*-Phenacylthiazolium Bromide)
e
DTT (*Dithiothreitol*)

Facilitam a separação e
recuperação do ADN,
mas acabam por prejudicar

PTB: Fragmenta ainda mais as cadeias

DTT: Interfere com a ligação à sílica

EDTA
e
Proteinase K

Eficazes na obtenção de ADN endógeno,
sem comprometer a sua estabilidade:

- minimiza a degradação adicional do ADN já fragmentado;
- são compatíveis com a maioria dos protocolos de purificação por sílica;
- não interferem com a ligação do ADN à matriz.

EDTA: composto orgânico que remove iões de metais pesados (cálcio, magnésio, ferro, etc), impedindo a atividade de enzimas nucleases que dependem desses iões para degradar o ADN

Proteinase K (enzima): atua em pH neutro (ideal para amostras antigas/degradadas)

Outras considerações

Recupera-se ainda menos ADN intacto
Verificam-se mais erros na sequenciação



Quebra ligações

Bases azotadas sofrem oxidação

Algumas enzimas essenciais são inativadas



Temperatura

↑ temperaturas inibem o desenvolvimento de bactérias ✓

Degradação estrutural do ADN ✗

Descalcificação

↑ pureza do ADN extraído ✓

↑ custo e tempo investido ✗

Esterilização por UV

Quebra as cadeias de ADN nas ligações entre pares de bases ✗

Afeta a PCR ✗

Captura baseada em hibridização (*Hybridization-based capture*) de regiões genómicas específicas

Potencial na recuperação de fragmentos ultra curtos (~35 pb) ✓

Conclusões e Perspetivas futuras

A **degradação** é o principal obstáculo

Importância de se aplicar o método mais **adequado à amostra em causa** e às aplicações previstas após a genotipagem

Continuam a ser necessários métodos **menos destrutivos, mais rápidos/automatizados e eficazes** à obtenção de boas quantidades de ADN endógeno

Necessidade de **mais** estudos com amostras **diferentes**

Comparações diretas/sistemáticas entre protocolos

Transparência e Reprodutibilidade dos resultados

Colaboração interdisciplinar:

- Selecionar as amostras mais bem preservadas e menos contaminadas
- Documentar contexto arqueológico e cronológico (antropologia/arqueologia)
- Articulação com museus e curadores
- Química / Bioquímica: Otimização de processos como extração e purificação
- Bioinformática / Estatística: Processamento e validação dos dados genéticos

Referências

- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*, 28(3), 495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
- Cattaneo, C., Smillie, D. M., Gelsthorpe, K., Piccinini, A., Gelsthorpe, A. R., & Sokol, R. J. (1995). A simple method for extracting DNA from old skeletal material. *Forensic science international*, 74(3), 167–174. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(95\)01758-b](https://doi.org/10.1016/0379-0738(95)01758-b)
- Childebayeva, A., & Zavala, E. I. (2023). Review: Computational analysis of human skeletal remains in ancient DNA and forensic genetics. *iScience*, 26(11). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108066>
- Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M. T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., García, N., Pääbo, S., Arsuaga, J. L., & Meyer, M. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(39), 15758–15763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314445110>
- Dabney, J., Meyer, M. (2019). Extraction of Highly Degraded DNA from Ancient Bones and Teeth. In: Shapiro, B., Barlow, A., Heintzman, P., Hofreiter, M., Paijmans, J., Soares, A. (eds) Ancient DNA. Methods in Molecular Biology, vol 1963. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9176-1_4
- Dehasque, M., Pečnerová, P., Kempe Lagerholm, V., Ersmark, E., Danilov, G. K., Mortensen, P., Vartanyan, S., & Dalén, L. (2022). Development and Optimization of a Silica Column-Based Extraction Protocol for Ancient DNA. *Genes*, 13(4), 687. <https://doi.org/10.3390/genes13040687>
- Finaughty, C., Heathfield, L. J., Kemp, V., & Márquez-Grant, N. (2023). Forensic DNA extraction methods for human hard tissue: A systematic literature review and meta-analysis of technologies and sample type. *Forensic science international. Genetics*, 63, 102818. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102818>
- Gilardet, A., Lord, E., García, G. O., Xenikoudakis, G., Douka, K., Wooller, M. J., Rowe, T., Martin, M. D., Le Moullec, M., Anisimov, M., Heintzman, P. D., & Dalén, L. (2025). A High-Throughput Ancient DNA Extraction Method for Large-Scale Sample Screening. *Molecular ecology resources*, 25(4), e14077. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.14077>
- Glocke, I., & Meyer, M. (2017). Extending the spectrum of DNA sequences retrieved from ancient bones and teeth. *Genome research*, 27(7), 1230–1237. <https://doi.org/10.1101/gr.219675.116>
- Gomes, C., Palomo-Díez, S., Roig, J., López-Parra, A.M., Baeza-Richer, C., Esparza-Arroyo, A., Gibaja, J. & Arroyo-Pardo, A.. Nondestructive extraction DNA method from bones or teeth, true or false? *Forensic Science International Genetics Supplement Series* 5. e279–e282. <https://doi.org/10.1016/j.sigss.2015.09.111> (Originally presented at the 26th Congress of the International Society for Forensic Genetics, from August 31st to September 5th)
- Haarkötter, C., Gálvez, X., Vinueza-Espinosa, D. C., Medina-Lozano, M. I., Saiz, M., Lorente, J. A., & Álvarez, J. C. (2023). A comparison of five DNA extraction methods from degraded human skeletal remains. *Forensic science international*, 348, 111730. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111730>
- Hagelberg, E., Sykes, B., & Hedges, R. (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature*, 342(6249), 485. <https://doi.org/10.1038/342485a0>
- Hagelberg, E., & Clegg, J. B. (1991). Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceedings. Biological sciences*, 244(1309), 45–50. <https://doi.org/10.1098/rspb.1991.0049>
- Handt, O., Höss, M., Krings, M., & Pääbo, S. (1994). Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia*, 50(6), 524–529. <https://doi.org/10.1007/BF01921720>

Referências

- Hofreiter, M., Snieberger, J., Pospisek, M., & Vanek, D. (2021). Progress in forensic bone DNA analysis: Lessons learned from ancient DNA. *Forensic Science International. Genetics*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102538>
- Höss, M., & Pääbo, S. (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic acids research*, 21(16), 3913–3914. <https://doi.org/10.1093/nar/21.16.3913>
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A., & Wilson, A. C. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312(5991), 282–284. <https://doi.org/10.1038/312282a0>
- Korlević, P., Gerber, T., Gansauge, M. T., Hajdinjak, M., Nagel, S., Aximu-Petri, A., & Meyer, M. (2015). Reducing microbial and human contamination in DNA extractions from ancient bones and teeth. *BioTechniques*, 59(2), 87–93. <https://doi.org/10.2144/000114320>
- Loreille, O. M., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D., & Parsons, T. J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic science international. Genetics*, 1(2), 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.006>
- Orlando, L., Allaby, R., Skoglund, P., Der Sarkissian, C., Stockhammer, P. W., Ávila-Arcos, M. C., Fu, Q., Krause, J., Willerslev, E., Stone, A. C., & Warinner, C. (2021). Ancient DNA analysis. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/s43586-020-00011-0>
- Pääbo S. (1985). Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314(6012), 644–645. <https://doi.org/10.1038/314644a0>
- Pääbo, S., Gifford, J. A., & Wilson, A. C. (1988). Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic acids research*, 16(20), 9775–9787. <https://doi.org/10.1093/nar/16.20.9775>
- Pääbo S. (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(6), 1939–1943. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.6.1939>
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007a). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature protocols*, 2(7), 1756–1762. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>
- Rohland, N., Glocke, I., Aximu-Petri, A., & Meyer, M. (2018). Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing. *Nature protocols*, 13(11), 2447–2461. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0050-5>
- Schmerer, Wera M. (2021). Optimized protocol for DNA extraction from ancient skeletal remains using Chelex-100. *International Journal of Forensic Medicine*. 18-22. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2109.02172>
- Yang, H., Golenberg, E. M., & Shoshani, J. (1997). Proboscidean DNA from museum and fossil specimens: an assessment of ancient DNA extraction and amplification techniques. *Biochemical genetics*, 35(5-6), 165–179. <https://doi.org/10.1023/a:1021902125382>
- Yang, D. Y., Eng, B., Wayne, J. S., Dudar, J. C., & Saunders, S. R. (1998). Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American journal of physical anthropology*, 105(4), 539–543. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199804\)105:4<539::AID-AJPA10>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199804)105:4<539::AID-AJPA10>3.0.CO;2-1)
- Yang, D. Y., Eng, B., & Saunders, S. R. (2003). Hypersensitive PCR, ancient human mtDNA, and contamination. *Human biology*, 75(3), 355–364. <https://doi.org/10.1353/hub.2003.0050>



23º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

**Análise Comparativa de Métodos de Extração de ADN Antigo
em amostras ósseas e dentárias com integração de tecnologias forenses:
Revisão da Literatura**

Madalena Henriques; Heloísa Afonso Costa; António Amorim; Laura Cainé