

Metodologias para preparação e extração de ADN de fragmentos humanos antigos: uma revisão preliminar

Magda Franco¹ ; Helena Correia Dias^{1,2,3}; Filipa Balsa¹; Armando Coimbra Serra¹; Heloísa Afonso Costa^{1,4}; Rui Nascimento^{1,5}; Francisco Corte Real^{1,6}; Laura Cainé^{1,7,8}; António Amorim^{1,8,9}

¹Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Portugal; ²Laboratório de Antropologia Forense (LAF), Centro de Ecologia Funcional (CEF), Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Portugal; ³Centro de Investigação em Antropologia e Saúde (CIAS), Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Portugal; ⁴Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal; ⁵Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal; ⁶Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal; ⁷Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Portugal; ⁸REQUIMTE | Laboratório Associado, Analytical Development Group, Portugal; ⁹Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal.

O **Laboratório de ADN Antigo** do INMLCF tem como objetivo analisar fragmentos humanos antigos, nomeadamente, **ossos e dentes** (Figura 1). Através de análises genéticas, pretende-se contribuir para estudos de evolução de populações antigas, assim como a sua relação com a população atual.

O nosso grupo fez uma revisão bibliográfica sobre as **técnicas de pré-tratamento e extração de ADN antigo**, com o objetivo de implementar as metodologias mais adequadas e eficientes, tentando, sempre que possível, **preservar a integridade da amostra**.

Pré-tratamento das amostras

Descontaminação

Métodos químicos (Lixívia, etanol e luz UV)

Métodos físicos (Limpeza da camada externa com broca ou outros instrumentos)

Obtenção de pó/fragmentos

- **Perfuração** ^[2]
- **Redução a pó** ^[3]
- **Raspagem** (“Scrapping”) ^[6]

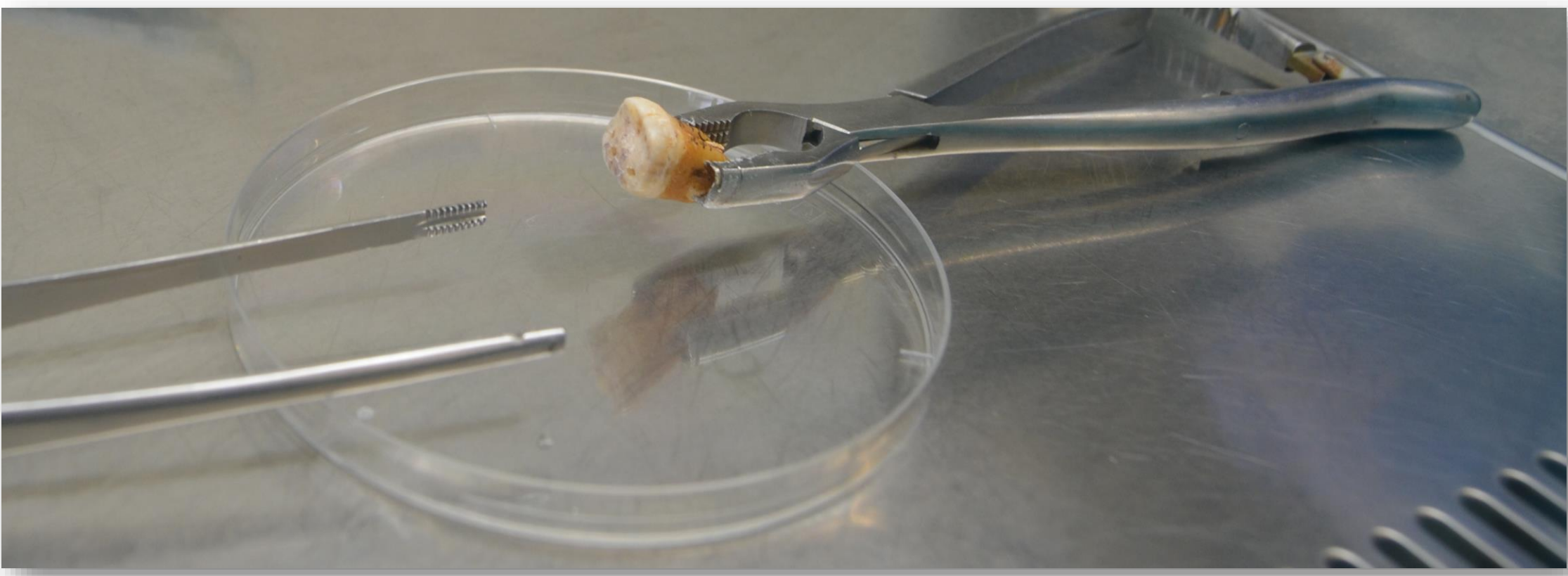


Figura 1. Pré-tratamento de uma amostra de dente no Laboratório de ADN Antigo do SGBF-C do INMLCF.

Extração de ADN antigo

Metodologia	Vantagens	Desvantagens
Extração baseada em sílica (protocolo melhorado) ^[3]	➤ Obtenção de fragmentos pequenos (>25bp, >35bp) ➤ Rápido (1-2 dias) ➤ Remove inibidores de PCR ➤ Alto rendimento	➤ Destruição da amostra
“Minimally destructive protocol” ^[1]	➤ Preservação integridade da amostra ➤ Rápido (1-2 dias) ➤ Rendimento similar aos métodos tradicionais	➤ Pode não funcionar bem para amostras muito degradadas
Extração baseada em coluna (protocolo melhorado) ^[4]	➤ Rápido ➤ Rendimento similar aos métodos de sílica	➤ Destruição da amostra
Fenol-clorofórmio ^[5]	➤ ADN obtido com boa integridade e pureza ➤ Boa eficiência	➤ Destruição da amostra ➤ Riscos para o operador ➤ Bastante moroso ➤ Possibilidade de baixo rendimento

Referências bibliográficas

[1] Harney, et al. A minimally destructive protocol for DNA extraction from ancient teeth. *Genome Res.* 2021;31(3):472-483.

[2] Hervella M, Iñiguez MG, Izagirre N, Anta A, de-la-Rúa C. Nondestructive methods for recovery of biological material from human teeth for DNA extraction. *J Forensic Sci.* 2015;60(1):136-41.

[3] Rohland N, Glocke I, Aximu-Petri A, Meyer M. Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing. *Nat Protoc.* 2018;13(11):2447-2461.

[4] Rohland N, Siedel H, Hofreiter M. A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput. *Mol Ecol Resour.* 2010;10(4):677-83.

[5] Barnett R, Larson G. A phenol-chloroform protocol for extracting DNA from ancient samples. *Methods Mol Biol.* 2012;840:13-9.

[6] Sahoo S, Samal R, Biswas S. Efficacy of a novel bone preprocessing method for better DNA yield. *Forensic Sci Int.* 2021;325:110887.

Dependendo do **tipo de amostra, idade e estado de degradação**, deve-se ponderar todas as vantagens e desvantagens dos diferentes métodos a utilizar, para a obtenção de resultados fidedignos.