

Análise comparativa de diferentes protocolos de extração de DNA a partir de amostras ósseas: revisão de literatura

Georgia Freitas¹, Alinne Castro².

¹Acadêmica do curso de graduação em Biomedicina, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS, Brasil.

²Doutora em Biologia Molecular pela Universidade de Brasília - UnB. Professora/Pesquisadora da Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande – MS, Brasil.

RESUMO

A descoberta de marcadores moleculares únicos em cada indivíduo tornou as técnicas de biologia molecular essenciais para a elucidação de casos criminais e identificação humana. Comumente o DNA presente no local do crime pode encontrar-se degradado ou em baixa concentração. Quando o estágio de decomposição do cadáver é avançado, a amostra de material genético coletada são os ossos. Ressalta-se que, a extração de DNA a partir de amostras ósseas representa um desafio ainda não resolvido na ciência forense. Os principais empecilhos são a quantidade e qualidade do DNA, pois em geral os ossos são encontrados em condições adversas após um longo período de tempo, além de possuírem minerais em sua estrutura. Muitos estudos elaboraram estratégias e métodos de extração de DNA para contornar esses interferentes e obter uma concentração suficiente de DNA. Diante do exposto, o presente estudo avaliou diferentes protocolos de extração de DNA a partir de amostras ósseas publicados entre 2000 e 2020 por meio de análises comparativas com abordagem qualitativa tendo como foco de natureza exploratória e descritiva. Ao total foram avaliados 9 protocolos e conclui-se que entre as muitas variáveis que influenciam os resultados da extração do DNA, 2 protocolos se destacaram demonstrando os melhores resultados. O tempo de bancada não foi utilizado como critério final, visto que os 9 protocolos de extração de DNA descritos levam entre 1 e 2 dias para sua realização, portanto não apresentam diferenças discrepantes que tornariam um ou outro vantajoso para a extração.

Palavras-chave: protocolo, extração de DNA, ossos.

ABSTRACT

The discovery of unique molecular markers in each individual developed as techniques of molecular biology became essential for the elucidation of criminal cases and human identification. Commonly, the DNA present in a crime scene can be degraded or in low concentration. The sample of genetic material collected when the stage of decomposition of the corpse is advanced are bones. It should be noted that the extraction of DNA from bone represents a challenge that has not yet been solved in forensic science. The main obstacles are the quantity and quality of DNA, because in general the bones are found in adverse conditions after a long period of time, in addition to having minerals in their structure. Many studies had developed DNA extraction strategies and methods to circumvent these interferers and obtain a sufficient concentration of DNA. In view of the above, the present study evaluated different protocols for DNA extraction from bone betwin 2000 and 2020 through comparative analyzes with a qualitative approach focusing on an exploratory and descriptive nature. In total, nine protocols were adopted and it is concluded that among the many variables that influence the results of DNA extraction, 2 protocols stood out demonstrating the best results. The bench time was not used as a final criterion, since the nine previous DNA extraction protocols take between 1 and 2 days to be carried out, so there are no differences that would make one or the other advantageous.

Keywords: protocol, DNA extraction, bones.

INTRODUÇÃO

Em meados do século XIX, os tecidos vivos eram identificados e classificados apenas por suas características morfológicas em nível macroscópico e microscópico. O desenvolvimento da tecnologia possibilitou descobertas fundamentais na ciência como o conteúdo submicroscópico das células, descobrindo as moléculas que as compõem. Desta forma, a biologia molecular ganhou espaço devido a sua grande relevância clínica e epidemiológica, com uma vasta aplicação em diversas áreas (PINHO, 2006).

A biologia molecular busca compreender com base na genética, biologia celular e bioquímica a estrutura do material genético composto pelo ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA) e os produtos de sua expressão: proteínas. A evidenciação de

que existem marcadores moleculares únicos em cada indivíduo possibilitando a identificação humana através de qualquer célula, tornou as técnicas de biologia molecular essenciais para a elucidação de casos criminais (KOCH & ANDRADE, 2008).

O genoma humano possui diversas sequências de DNA repetitivas (DNA satélite) que se dividem em classes, como: os minissatélites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) e os microsatélites ou STR (*Short Tandem Repeats*). Os marcadores STRs estão presentes em todo o genoma e possuem tamanho reduzido (100-400pb) o que torna sua utilização mais interessante em análises de amostras forenses em comparação com os minissatélites, pois em geral o DNA encontrado no local do crime está danificado e em baixa concentração (FILHO et al., 2020).

Nos testes de identificação humana os marcadores genéticos não estão localizados nos genes, mas em regiões não codificantes nos cromossomos autossômicos e sexuais. Dessa maneira, os resultados desses testes não descobrem informações relacionadas às características físicas do indivíduo, porém o loci STR possui a capacidade de discriminar geneticamente um sujeito em um fundo gênico de um trilhão de pessoas (GE et al., 2012).

Torna-se então vantajoso um banco de dados de perfis genéticos para a comparação entre os resultados obtidos. Os conjuntos de STR devem apresentar um padrão para que possam ser reproduzidos e comparados, e estão presentes nos kits comerciais aprovados por um rígido controle de qualidade. Esses kits são utilizados pelos geneticistas forenses em laboratórios ao redor do mundo (BUTLER et al., 2005).

Na perícia criminal o material genético pode ser obtido a partir de fios de cabelo, manchas de sangue e fluidos corporais encontrados diretamente no local do crime ou em objetos presentes no mesmo. Essas amostras de DNA são denominadas vestígios biológicos, que devem ser manuseados minuciosamente presando pela cadeia de custódia, pois são passíveis de questionamento durante o processo penal. A cadeia de custódia é imprescindível para que o vestígio se torne uma evidência para ser utilizada como prova diante da justiça, utilizando três elementos fundamentais: o registro documental, a rastreabilidade e a integralidade da prova (SILVA, 2006).

Após os vestígios biológicos serem coletados e catalogados, são enviados para o laboratório para a realização da extração do DNA. Essa etapa de extração tem como objetivo a liberação do material genético do interior do núcleo celular, assim como seu isolamento.

Todas as coletas das amostras devem ser feitas em quantidade suficiente para realizar a extração do DNA e para o armazenamento da contraprova, que pode ser solicitada durante o julgamento do caso para confirmar a veracidade dos resultados (DIAS FILHO, 2009).

Em casos criminais ou cíveis de identificação de cadáveres, a amostra de material genético a ser coletada dependerá do estágio de decomposição em que se encontra o corpo do indivíduo. Essa degradação é influenciada pelo intervalo *post mortem* (intervalo de tempo entre a morte do indivíduo até ser encontrado) e por diversos outros fatores como a causa da morte, condições atmosféricas e fauna em que o cadáver ficou exposto. Quando o estágio de decomposição é avançado ou em cadáveres que passaram por processos conservativos, deve-se priorizar a coleta de ossos ou dentes. Caso seja possível escolher, pelo menos 5cm² de osso longo limpo ou dois elementos dentários molares ou pré-molares são partes preferencialmente adequadas para a obtenção eficaz de DNA (FILHO et al., 2020).

Os ossos são formados por tecido conjuntivo compostos de fibras proteicas e cristais minerais. A fração proteica forma a matriz, na qual os cristais minerais se desenvolvem. A matriz óssea é constituída por uma parte orgânica de fibras colágenas e uma parte inorgânica que originam cristais de hidroxiapatita a partir de fosfato de cálcio. O cálcio e o colágeno são os mais relevantes inibidores de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) nos ossos (TRUEMAN; MARTILL, 2002). Apesar disso, os cristais de hidroxiapatita preservam o DNA nos osteócitos. Quando a matriz de colágeno se degrada, os grãos de cristais agregados não se desagregam, contribuindo para a permanência intacta do DNA (SALAMON et al., 2005).

De forma geral, ossos longos sempre possibilitam resultados mais eficazes na obtenção de DNA em comparação com ossos chatos e porosos. Em casos de ossadas carbonizadas e amostras com materiais moles degradados incrustados, é necessária uma quantidade significativamente maior de amostra dos ossos para a limpeza até o alcance da matriz óssea (MEDEIROS et al., 2019). Estudos recentes mostraram que a densidade óssea, que é específica e diferente para cada parte do corpo, é um dos fatores importantes relacionados com a quantidade e qualidade do DNA disponível no material ósseo (HASAP et al., 2019).

Diante do exposto, diversos estudos trazem contribuições relevantes para minimizar os desafios inerentes ao processamento de amostras ósseas, considerando que cada amostra possui variados interferentes de acordo com as condições em que foram encontradas. Entretanto, por via de regra, os principais empecilhos são: a quantidade e qualidade do DNA,

determinantes para a obtenção de um perfil gênico; DNA exógeno, proveniente do local onde a amostra foi encontrada; e inibidores da PCR. Muitos desses estudos elaboraram estratégias e métodos para contornar esses interferentes e possibilitar a amplificação de uma quantidade suficiente de pares de bases para descobrir o perfil genético (SIRIBOONPIPUTTANA et al., 2018).

Dada à importância da identificação humana *post mortem*, a extração do DNA a partir de amostras ósseas, é crucial nesse processo. Sendo assim, justifica-se a realização do presente estudo devido à complexidade de se obter um perfil genético com este tipo de matriz biológica. Dessa maneira, o objetivo foi avaliar diferentes protocolos de extração de DNA a partir de ossos por meio da revisão de estudos publicados entre 2000 à 2020.

METODOLOGIA

Neste estudo realizou-se uma análise comparativa dos diferentes métodos de extração de DNA em ossos a partir de uma revisão de literatura. Foram incluídos estudos realizados no período de 2000 a 2020, os quais empregaram diferentes amostras de ossos em diversos estágios de decomposição. Os trabalhos foram encontrados nas bases de dados *Scielo* e *PubMed* utilizando os descritores: *protocol*, *DNA extraction* e *bones*.

Os protocolos analisados foram comparados quanto à quantidade, qualidade e pureza de DNA extraído para possibilitar a obtenção do perfil genético dos indivíduos e o tempo necessário para realizar todo o procedimento. Os artigos que não possuíam dados detalhados sobre os resultados obtidos foram descartados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão supracitados na metodologia, encontrou-se um total de 79 artigos a partir das bases de dados utilizadas na pesquisa com as requisições previamente estabelecidas. Após a leitura, um total de 4 artigos foram selecionados para a comparação dos diferentes protocolos de extração de DNA a partir de

amostras providas de tecido ósseo. Estes artigos foram escolhidos pois apresentavam a quantidade de DNA extraído em seus resultados.

A maior parte dos protocolos que são utilizados hoje nos laboratórios para a extração de DNA em ossos foram elaborados a partir de estudos com amostras humanas antigas (*ancient DNA*), pois são estas amostras que representam o maior desafio devido a baixa quantidade e qualidade do material genético disponível (FILHO et al., 2020). Esses protocolos seguem a premissa de que os métodos de extração de DNA devem evitar tratamentos agressivos, já que o DNA se encontra muito danificado para suportar altas temperaturas ou o uso de detergentes fortes (DAVALIEVA, 2010).

A metodologia clássica que utiliza fenol clorofórmio (PCE) é a mais comum entre os protocolos de extração de DNA em ossos. O princípio do método é a diferença de solubilidade entre ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, no qual o fenol desnatura as proteínas e as tornam insolúveis na fase aquosa, enquanto o clorofórmio remove os contaminantes desta fase, restando apenas os ácidos nucleicos nesta. O álcool isoamílico geralmente é adicionado com a função de diminuir a formação de espuma devido à agitação no vórtex e também retém proteínas desnaturadas (SCORSATO TELLES, 2011).

Nesta metodologia vários protocolos estão descritos na literatura científica com pequenas variações de acordo com os autores. No estudo realizado por Ferreira (2013) dois protocolos utilizando o método orgânico de fenol-clorofórmio foram comparados (Tabela 1). O primeiro foi de elaboração própria, no qual se modificou a PCE clássica e o segundo de acordo com o que foi descrito em Edson (2004). Brevemente, foram selecionadas 20 amostras ósseas em diferentes graus de decomposição, as quais foram limpas e pulverizadas no Moinho Criogênico (*CertiPrep 6750 Freezer Mill Spex*). No protocolo 1, 2g do osso pulverizado foi incubado em 10 mL do tampão de extração (10mM Tris, pH 8.0; 100mM NaCl; 10 mM EDTA, 39mM DTT-2% SDS, pH8.0) e 340 µl de Proteinase K (20mg/mL) e 360 µl de DTT (*Dithiothreitol*) e incubado com leve agitação *overnight* a 56°C.

No protocolo 2, aproximadamente 2g do osso pulverizado foi incubado em 4 mL do tampão de extração (10mM Tris, pH 8.0; 100mM NaCl; 50 mM EDTA, pH 8.0; 0.5 SDS), adicionado 4 µl de Proteinase K (20mg/mL) e incubado em leve agitação *overnight* a 56°C. Todas as amostras foram concentradas com *Centricon 100 Centrifugal Filter Units* (Millipore).

Os resultados obtidos pelo protocolo 1, de Ferreira (2013), confirmaram que o método desenvolvido a partir de uma modificação do protocolo proposto por Edson (2004), foi mais eficiente de acordo com a quantidade de DNA obtido e a qualidade dos perfis de STR. Vale a pena ressaltar que, a escolha do protocolo pode ser decisiva para o sucesso na quantidade viável de DNA obtido. Variáveis incluindo a idade dos ossos, possíveis inibidores de PCR e volume dos reagentes são fatores importantes a serem considerados na hora da escolha do protocolo (FERREIRA et al., 2013). O protocolo considerado ideal seria aquele que pode ser empregado para a maioria das amostras, é de simples execução e possui baixo custo para o laboratório (BUDOWLE, 2001).

O critério de escolha das amostras para Vanek et al. (2017) foi a utilização de ossos com mais de 150 anos doados para estudo científico e sem nenhuma conexão familiar. O estudo contou com a participação de 19 laboratórios que receberam duas amostras diferentes das partes médias dos ossos longos, 5 deles não retornaram com resultados. As amostras foram preparadas utilizando moinho de nitrogênio líquido, entretanto os laboratórios se dividiram entre os métodos de extração (Tabela 1), sendo um deles o protocolo *silica-based* descrito por Vanek et al (2009) e o outro utilizou o clássico método orgânico de fenol clorofórmio. O sucesso do experimento foi baseado na quantidade de locis que foram amplificados. A maioria dos laboratórios utilizaram *silica-based extraction method*, por ser o método mais utilizado rotineiramente em cada respectivo laboratório para a extração de DNA a partir de amostras ósseas.

Conclui-se que os laboratórios que utilizaram *silica-based extraction method* obtiveram resultados melhores se comparados aos que utilizaram fenol clorofórmio para a extração de DNA, sendo o *silica-based extraction method* o mais eficaz. Uma sugestão do estudo para os laboratórios foi incluir dois controles positivos para avaliar a presença de inibidores de PCR e degradação do DNA. E por fim, utilizar *amplicons* mais curtos para amostras mais complicadas (VANEK et al., 2009).

Outro estudo mais recente utilizou sílica como um dos métodos de extração de DNA, de acordo com a publicação de Marshall et al (2014) que utiliza uma coluna de purificação (Hi-Flow®). Além deste protocolo outros dois foram comparados com o método desenvolvido pelo artigo (Tabela 1), sendo o de Desmineralização Total (TD), no qual as amostras foram ressuspensas em um tampão de extração contendo EDTA (ácido

etilenodiamino tetra-acético), Sarcosinato de N-lauroil e Proteinase k, posteriormente foram incubadas com agitação *overnight* a 56°C e por fim concentradas com Amicon.

O kit comercial PrepFiler® BTA, o qual utiliza partículas magnéticas, foi utilizado como outra alternativa de protocolo de extração de DNA. O método desenvolvido foi uma variação do TD com adição de DTT e tendo a purificação como última etapa na extração, sendo estes dois protocolos os que demonstraram resultados mais promissores no estudo (HASAP et al., 2019).

Em alguns casos, versões modificadas de protocolos já existentes, que acrescentam algum passo e/ou reagente ou até mesmo modificam a quantidade de determinado reagente, como a Proteinase k, podem ser mais eficazes comparadas ao protocolo original (SILVA et al., 2018). Outros artigos trazem estratégias eficazes para a extração do DNA, as quais podem facilitar a obtenção do material genético a partir dessas amostras, como Korlevic (2012) ressalta que cada estratégia possui um antecedente: se a amostra possui inibidores, deve-se utilizar BCA (Ácido Bicinconínico) e repetir a PCR por três ciclos. Quando houver contaminantes aderidos ao osso, deve-se realizar a limpeza utilizando água bidestilada, detergente, etanol e luz UV. A secagem do osso ou dente a 50°C também deve contribuir para a extração.

O protocolo de extração (Tabela 4) empregado em Siriboonpiputtana et al., (2018) foi o do kit comercial DNA IQ™ System (Promega, USA), sendo que foram utilizadas 80 amostras de diferentes partes ósseas que possuíam baixo, médio e alto grau de decomposição. Na preparação foram submetidas à pulverização com FreezerMill®, e após a extração foram concentradas com Microcon® (Millipore, USA). A quantidade ideal de gramas do osso pulverizado foi de 0,75g para extrair uma quantidade de DNA (0,9ng/μl) para gerar um perfil completo após a amplificação.

A efetividade do protocolo depende do grau de decomposição do osso em questão, desta forma recomendou-se aos laboratórios que categorizem os graus de decomposição dos ossos para reduzir custos, tempo e os processos. O artigo conclui que a escolha da amostra óssea disponível para a realização do exame também deve interferir nos resultados. Siriboonpiputtana et al., 2018 em concordância com diversos artigos, observou-se que a amostra óssea mais indicada na qual o DNA permanece melhor preservado, provém de ossos longos, principalmente o fêmur (ANDELINOVIĆ et al., 2005).

Para avaliar qual protocolo seria o mais recomendado para cada grau de decomposição óssea, Jakubowska (2012) realizou análises a partir de 3 protocolos diferentes. Logo, utilizou o método orgânico clássico com fenol-clorofórmio (PCE), o método de Desmineralização Total (TD), e por fim o método de extração de cristais ósseos (EA) descrito por Salamon (2005). Os resultados dos experimentos demonstraram que no geral o protocolo TD possibilitou uma maior obtenção de DNA, porém o protocolo EA obteve resultados melhores com amostras antigas e em um alto grau de decomposição contrastando com amostras frescas, nas quais não obteve sucesso.

Tabela 1. Resultados obtidos na extração de DNA provindos dos nove protocolos descritos nos 4 artigos selecionados

Referência	Protocolo	Rendimento	Tempo de bancada
Ferreita et al., 2013	Edson et al., 2004	(3 amostras) 0,2-1.0ng/μl	2 dias
		(17 amostras) <0,2ng/μl	
	Ferreira et al., 2013	(8 amostras) 0,2-1.0ng/μl	2 dias
		(12 amostras) <0,2ng/μl	
Vanek et al., 2017	Vanek et al., 2009	0,4ng/μl	1 dia
	PCE clássico	0,01ng/μl	2 dias
Hasap et al., 2019	Marshall et al., 2014	0,054ng/μl	1 dia
	TD	0,208ng/μl	2 dias
	PrepFiler®	0,207ng/μl	1 dia
	Hasap et al., 2019	0,224ng/μl	2 dias
Siriboonpiputtana et al., 2018	Siriboonpiputtana et al., 2018	(baixo grau de decomposição) 1,45ng/μl	2 dias
		(médio grau de decomposição) 0,07ng/μl	
		(alto grau de decomposição) 0,00ng/μl	

CONCLUSÃO

De forma geral, há muitas variáveis que influenciam diretamente nos resultados da extração do DNA, como o estágio de decomposição em que se encontra a amostra óssea, qual é o osso disponível para a extração, assim como o tempo e recursos de que se pode dispor. Todas essas variáveis devem ser levadas em consideração para a escolha do protocolo ideal. Dentre os 9 protocolos de extração de DNA descritos nos 4 artigos selecionados neste estudo, os 2 protocolos de extração de DNA que obtiveram melhores resultados de acordo com a quantidade de DNA extraídas de todas as amostras em diferentes graus de decomposição foram elaborados a partir da modificação de protocolos já existentes, sendo estes: Vanek et al (2009); e Hasap et al (2019). Todos os 9 protocolos de extração de DNA possuem entre 1 e 2 dias de tempo de bancada necessário desde a preparação da amostra biológica até a amplificação do DNA, não apresentando assim diferenças discrepantes que poderiam tornar um ou outro vantajoso. Portanto, nesse caso o tempo de bancada não foi utilizado como critério para a preferenciar 1 dos 9 protocolos de extração de DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDELINOVIĆ S.; SUTLOVIĆ D.; ERCEG IVKOSIĆ I.; IVKOSIĆ A.; PAIĆ F.; REZIĆ B.; DEFINIS-GOJANOVIĆ M.; PRIMORAC D. Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J*, v. 46, n. 4, p. 530-539, 2005.
- BUDOWLE, B.; BROWN B. L. The use of DNA typing for forensic identification. *Forénsica*, v. 1, n. 1, p. 23-37, 2001.
- BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**. 2 ed. Editora Elsevier, 2005.
- DAVALIEVA, K.; EFREMOV, G. D. Influence of salts and PCR inhibitors on the amplification capacity of three thermostable DNA Polymerases. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, v. 29, n. 1, p. 57-62, 2010.
- DIAS FILHO, C. Cadeia de Custódia: do local de crime ao trânsito em julgado; do vestígio à evidência. *Revista dos Tribunais*, v. 883, p. 433-443, 2008.
- EDSON S.M., et al. Naming the dead-confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Science*, v. 16, p. 63-90, 2004.
- FERREIRA T. G.; ALMEIDA. P. A.; MAIA A. F.; MORAES A. V. A comparative study between two protocols for DNA extraction from bones, **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 4, n. 1, p. 374-375, 2013.

FILHO, C. *et al.* **Introdução à Genética Forense**. 1 ed. Campinas: Millenium, 2020.

GE J.; EISENBERG A.; BUDOWLE B. Developing criteria and data to determine best options for expanding the core CODIS loci. *Investig Genet.*, v. 6, n. 3, p.1, 2012.

HASAP L, CHOTIGEAT W, PRADUTKANCHANA J, VONGVATCHARANON U, KITPIPIT T, THANAKIATKRAI P. A novel, 4-h DNA extraction method for STR typing of casework bone samples. *Int J Legal Med.*, v. 134, n. 2, p. 461-471, 2019.

KORLEVIĆ, P.; TALAMO S.; MEYER M. A combined method for DNA analysis and radiocarbon dating from a single sample. *Scientific reports*, v. 8, p. 1-10, 2018.

Marshall PL, Stoljarova M, Schmedes SE, King JL, Budowle B. A high volume extraction and purification method for recovering DNA from human bone. *Forensic Sci Int Genet.*, v. 12, p. 155-160, 2014

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**: 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JAKUBOWSKA J.; MACIEJEWSKA A.; PAWLOWSKI R. Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *Int J Legal Med.*, v. 123, p. 173-178, 2012.

KOCH, A.; ANDRADE, Fabiana Michelsen de. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. **Rev. Bras. de Análises Clínicas**. v. 40, n. 1, p. 17-23, 2008.

PINHO, M. S. Pesquisa em Biologia Molecular: como fazer? **Rev bras Coloproct**, v. 26, n. 3, p. 331-336, 2006.

SALAMON, M. *et al.* Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 39, p. 13783-13788, 2005.

SILVA, R.; SANTOS A. R; MONTE S.; CASTRO S.; SOUZA A.; EKERT M.; SANTOS A. L.; Ramalho C. Alternative Methodology for Extraction of High Quality DNA from Ancient Bones by Desmineralization without Pulverization. *Forensic Science*. v. 62, p. 109-115, 2018.

SIRIBOONPIPUTTANA T, RINTHACHAI T, SHOTIVARANON J, PEONIM V, RERKAMNUAYCHOKE B. Forensic genetic analysis of bone remain samples. *Forensic Sci Int*. v. 284, p. 167-175, 2018

VANEK D.; SASKOVA L.; KOCH H. Kinship and Y-chromosome analysis of 7th century human remains: novel DNA extraction and typing procedure for ancient material. *Croat Med J*. v. 50, p. 286-295, 2009.

VANEK D., *et al.* Results of a collaborative study on DNA identification of aged bone samples. *Forensic Science*. v. 58, p. 203-213, 2017.