



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CHRISTHIANE PINTO CUTRIM

**DNA NUCLEAR DE OSSOS HUMANOS (DENTES) DE INDIVÍDUOS NÃO
RECLAMADOS E NÃO IDENTIFICADOS DO SETOR DE ODONTOLOGIA LEGAL
DO INSTITUTO MÉDICO LEGAL DE SÃO LUÍS/MA (IML –SLZ/MA)**

Recife - PE

2019

CHRISTHIANE PINTO CUTRIM

**DNA NUCLEAR DE OSSOS HUMANOS (DENTES) DE INDIVÍDUOS NÃO
RECLAMADOS E NÃO IDENTIFICADOS DO SETOR DE ODONTOLOGIA LEGAL
DO INSTITUTO MÉDICO LEGAL DE SÃO LUÍS/MA (IML –SLZ/MA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Recife - PE

2019

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Cutrim, Christiane Pinto

Análise do DNA nuclear de ossos humanos (dentes) de indivíduos não reclamados e não identificados do setor de Odontologia Legal do Instituto Médico legal de São Luís/Maranhão (IML - SLZ/MA) / Christiane Pinto Cutrim. - 2019.

117 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Genética. 2. Genética forense. 3. Medicina legal. I. Balbino, Valdir de Queiroz (orientador). II. Título.

576

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-137

CHRISTHIANE PINTO CUTRIM

**DNA NUCLEAR DE OSSOS HUMANOS (DENTES) DE INDIVÍDUOS NÃO
RECLAMADOS E NÃO IDENTIFICADOS DO SETOR DE ODONTOLOGIA LEGAL
DO INSTITUTO MÉDICO LEGAL DE SÃO LUÍS/MA (IML –SLZ/MA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico esse trabalho aos meus pais, Linda e Augusto, e aos meus filhos, Sofia e Rafa, com amor.

AGRADECIMENTOS

Confesso que foi uma longa trajetória. Mas tudo se torna mais leve quando temos pessoas queridas que nos alegram com uma palavra de conforto e incentivo. Quando o valor real de viver passa a ser o inestimável dos pequenos gestos e palavras que fazem a grande diferença!

Em atenção especial à Polícia Civil do Maranhão, na pessoa da Dra. Adriana Amarante, meus agradecimentos pelo grande incentivo;

À Superintendência de Polícia Técnico-Científica e Perícia Oficial do Maranhão, na pessoa do Dr. Miguel Alves Neto, pelo apoio constante e irrestrito;

À equipe do Instituto de Genética Forense do Estado do Maranhão: Américo, Geyson, Walison, Lafayete, Marcelo, Leandro, Cindy, Pedro, Madá, Esmé, Max, Rosi, Arlene, Rafa, Vera, Luza, Diana, Sanya, Graci, Hassan, Valdo, Maria, Arthur, Lúcia, Kilda, Cleyton, Sodré, Flavio, Ícaro, Thiago. Sem dúvidas uma família, vocês foram incríveis!

À equipe do Instituto Médico Legal de São Luís, em especial ao Dr. Wanderley, Fred, Salen e Ju, pela parceria, amizade e incentivo.

À Perícia Oficial do Brasil, na pessoa da querida amiga e irmã Cila. Foram muitos momentos de superação, de alegrias e vitórias juntas! Sem você... nada seria possível... Dedico também à sua linda família: Léo, Laís e Gláucio!

À Genética Forense brasileira, na pessoa da amiga querida Rosi. As palavras tem poder! Muito obrigada pela amizade e incentivo, querida amiga!

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, aos professores e alunos dessa trajetória acadêmica. E que as Universidades Públicas possam se fortalecer cada vez mais!

Ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (*LABBE*), em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Valdir Balbino. Obrigada pela paciência, apoio e dedicação de sempre!

À minha família, meus pais, Linda e Augusto, pelo incentivo e amor; minha tia Joana (minha inspiração), minhas primas Jol e Naiana (de fato, irmãs), meu sobrinho Samuel; e aos meus filhotes queridos, Sofia e Rafa, os que mais sofreram com as ausências, mas que se fortaleceram conjuntamente nessa trajetória!

O Sentido de uma história depende do ponto a partir do qual começamos a contá-la.

Luiz Eduardo Soares (2011)

RESUMO

A identificação humana de indivíduos não reclamados e não identificados (NRNI) por meio de elementos dentários representam um grande desafio em virtude das condições ambientais e dos fatores individuais que influenciam na qualidade e quantidade do material recuperado. Os altos índices de violência no Brasil, demonstram que grande parte das vítimas NRNI são provenientes de crimes violentos. Marcadores STRs e YSTRs são utilizados para a identificação humana, sendo particularmente úteis para a individualização dos indivíduos. Em populações miscigenadas, como a brasileira, a caracterização de haplogrupos fornecem importantes informações acerca da origem populacional. Os objetivos do trabalho foram: avaliar e otimizar os métodos de extração orgânica, purificação automatizada e chelex de dentes submetidos aos pré-tratamentos de pulverização e descalcificação, obter o perfil genético dos elementos dentários por meio de marcadores autossômicos para correlacionar com os metadados do exame odontológico de cadáver e inferir sobre a provável origem ancestral dos indivíduos através dos marcadores Y-STRs. Foram utilizados os elementos dentários de 52 indivíduos NRNI provenientes do Instituto Médico Legal de São Luis/MA no período de janeiro de 2015 a julho de 2017. Os marcadores genéticos foram amplificados pelo sistema multiplex PowerPlex®Fusion 6 C e YFiler® PLUS PCR Amplification Kit. O método de purificação automatizada de amostras pulverizadas se destacou com relação aos demais. Houve o sucesso na obtenção do perfil genético completo de 73% das amostras para STRs e 71% para Y-STRs. O haplogrupo predominante observado foi R1b, característico da população europeia. Melhores resultados de recuperação de DNA de elementos dentários podem ser obtidos com a adição de mini-STRs para a amplificação de regiões mais curtas do DNA e a adição da análise do DNA mitocondrial para inferência ancestral materna.

Palavras-chave: Genética Forense. Identificação humana. Perfil genético. STRs. Y-STRs.

ABSTRACT

The human identification of not claimed and unidentified person based on teeth can be a major challenge in terms of ambiental conditions that influence the quality and quantity of recovered material. The higher level of violence in Brazil, demonstrates that some of the missing person are victims of violent crimes. STRs and YSTRs markers are used for human identification and are particularly useful for human individualization. In miscegenated populations, such as the Brazilian one, a characterization of haplogroups reach important information of the population origin. This study aimed to evaluate and optimize the organic extraction, automated purification and chelex methods, with samples previously decalcified or pulverized, to analyse the STRs and Y-STRs markers profiles in order to correlate with the metadata of the odontolegal cadaver examination and to infer the probable ancestral origin of the teeth donors using Y-STRs markers. The dental elements of 52 dead bodies of not claimed or unidentified persons from Legal Medical Institute – São Luís/MA from January 2015 to July 2017 were used. Genetic markers were amplified by the PowerPlex® Fusion 6 C multiplex system and Yfiler® PLUS PCR Amplification Kit. Several factors related to the DNA concentration and the alleles amplification were the teeth classification and the environment conditions. The method of automated extraction of pulverized samples stood out from the others. The method that had 73% of the STRs profiles and 71% of the Y-STRs profiles were completely obtained. The haplogroup predominance was R1b, from European population. For best results of DNA recovery of degraded samples, the use of mini-STRs are suggested, as well as mitochondrial DNA for maternal ancestral inference.

Key-words: Forensic Genetics. Human identification. Genetic profile. STRs. Y-STRs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Localização geográfica do estado do Maranhão.....	21
Figura 2 –	Frente de ocupação do território maranhense.....	22
Figura 3 –	Evolução da taxa de homicídios no Brasil e nas regiões geopolíticas brasileiras, entre os anos de 2006 e 2016.....	24
Figura 4 –	Representação esquemática da técnica de RFLP.....	32
Figura 5 –	Estrutura anatômica do elemento dentário.....	35
Figura 6 –	Classificação dos elementos dentários.....	36
Figura 7 –	Estrutura do cromossomo Y.....	44
Figura 8 –	Y-STRs de uso forense.....	45
Figura 9 –	Filogenia simplificada do Cromossomo Y demonstrando os principais haplogrupos.....	48
Figura 10 –	Esquematização da placa de quantificação das amostras forenses.....	62
Figura 11 –	Elementos dentários NRNI/NR.....	94
Figura 12 –	Seccionamento dos elementos dentários.....	100

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Relação entre o IPC (C_i) x concentração (ng/uL) de amostras descalcificadas e extraídas pelo método orgânico.....	66
Gráfico 2 –	Relação entre o IPC (C_i) x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e extraídas pelo método orgânico.....	67
Gráfico 3 –	Relação entre o IPC (C_i) x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e purificadas pelo método automatizado.....	67
Gráfico 4 –	Relação entre o IPC (C_i) x concentração (ng/uL) de amostras descalcificadas e purificadas pelo método automatizado.....	68
Gráfico 5 –	Relação entre o IPC (C_i) x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e extraídas pelo método de Chelex.....	68
Gráfico 6 –	Índice de degradação x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e extraídas pelo método de Chelex.....	69
Gráfico 7 –	Índice de degradação x concentração (ng/uL) de amostras descalcificadas e extraídas pelo método orgânico.....	69
Gráfico 8 –	Índice de degradação x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e purificadas de modo automatizado.....	70
Gráfico 9 –	Índice de degradação x concentração (ng/uL) de amostras descalcificadas e extraídas pelo método orgânico.....	70
Gráfico 10 –	Índice de degradação x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e extraídas pelo método orgânico.....	71
Gráfico 11 –	Percentual de perfil genético recuperado (STRs) das amostras NRNI/NR.....	74
Gráfico 12 –	Percentual de perfil genético recuperado (Y-STRs) das amostras NRNI/NR.....	75
Gráfico 13 –	Haplogrupos das amostras NRNI/NR obtidos por meio dos marcadores Y-STRs.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Índices de confronto dos indexadores CODIS.....	51
Tabela 2 –	Componentes do Sistema TaqMan do Quantifiler Trio DNA Kit.	59
Tabela 3 –	Especificação dos valores de slope para os alvos AS, LA e Y.....	60
Tabela 4 –	DNA de concentração conhecida utilizado para diluição da curva de calibração do kit de quantificação Quantifiler Trio DNA.	61
Tabela 5 –	Genotipagem dos marcadores STRs autossômicos para 52 indivíduos NRNI/NR.....	71
Tabela 6 –	DNA de concentração conhecida utilizado para diluição da curva de calibração do kit de quantificação Quantifiler Trio DNA.	75
Tabela 7 –	Metadados das amostras de indivíduos NRNI/NR obtidos do exame odontológico de cadáver do IML-SLZ/MA	95
Tabela 8 –	Classificação dos elementos dentários.....	98
Tabela 9 –	Números de ciclos (C_t) necessários para atingir o threshold na amplificação do IPC das amostras NRNI/NR.....	101
Tabela 10 –	Concentração em ng/uL de DNA extraído dos 52 indivíduos NRNI/NR conforme as duas etapas de pré-tratamento e três métodos de extração.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS

AMEL	Amelogenina
CODIS	<i>Combined DNA Index System</i> , ou Sistema Indexado Combinado de DNA
C _t	<i>Cycle Threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
ddNTP	Dideoxinucleotídeo trifosfato
EDNAP	<i>European DNA Profiling Group</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENSFI	<i>European Network of Forensic Science Institutes</i>
ESS	<i>European Standard Set</i>
FBI	<i>Federal Bureau of Investigation</i> , ou Serviço Federal de Investigação
IGF	Instituto de Genética Forense
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IML	Instituto Médico Legal
INTERPOL	<i>The International Criminal Police Organization</i> , ou Organização Internacional de Polícia Criminal
IPC	<i>Internal PCR Control</i>
IPM	Intervalo <i>post mortem</i>
ISFG	<i>International Society for Forensic Genetics</i> , ou Sociedade Internacional de Genética Forense
Kb	Quilobases
Mb	Megabases
MLP	<i>Multilocus probe</i>
ng/μL	Nanogramas por microlitro
NRNI	Não reclamado e não identificado
PAR	<i>Pseudo-Autosomic Region</i> , ou Região Pseudo-Autosômica
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , ou reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RIBPG	Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos

RM-STR	<i>Rapidly Mutating Short Tandem Repeats</i> , ou Repetições Curtas em Tandem de mutação rápida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Y-SNPs	Y-specific Single Nucleotide Polymorphisms
SRY	<i>Sex-Determining Region of the Y chromosome</i> , ou Região de determinação sexual do cromossomo Y
STR	<i>Short Tandem Repeats</i> ou Repetições Curtas em Tandem
SWGDM	<i>Society Working Group on DNA Analysis Methods</i> , ou Grupo de Trabalho Científico sobre Métodos de Análise de DNA
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VNTRs	<i>Variable number of tandem repeats</i> , ou Repetições Consecutivas de Número Variável
Y-STR	<i>Y Short Tandem Repeats</i> , ou Repetições Curtas em Tandem de Y
Yp	Braço curto do cromossomo Y
Yq	Braço longo do cromossomo Y
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO	17
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo Geral	18
1.2.2	Objetivos Específicos	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	CARACTERÍSTICAS DA COLONIZAÇÃO BRASILEIRA	19
2.2	PROCESSO DE OCUPAÇÃO TERRITORIAL DO MARANHÃO	20
2.3	VIOLÊNCIA, CRIMINALIDADE E A PERÍCIA CRIMINAL	23
2.4	ESTADOS DE DECOMPOSIÇÃO	25
2.5	IDENTIFICAÇÃO HUMANA ATRAVÉS DO EXAME DE DNA	28
2.6	DNA NO CONTEXTO FORENSE	30
2.7	ELEMENTOS DENTÁRIOS COMO FONTE DE MATERIAL GENÉTICO	33
2.8	MARCADORES MOLECULARES	37
2.9	POLIMORFISMOS DE SEQUÊNCIA	38
2.10	POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO	39
2.11	STRS AUTOSSÔMICOS DE USO FORENSE	41
2.12	CROMOSSOMO Y E MARCADORES Y-STRS	43
2.13	HAPLÓTIPOS E HAPLOGRUPOS	47
2.14	BANCOS DE PERFIS GENÉTICOS	49
3	MÉTODO	53
3.1	CASUÍSTICA	53
3.2	CARACTERIZAÇÃO	53
3.3	DESCONTAMINAÇÃO E SECCIONAMENTO	54
3.4	PRÉ-TRATAMENTO	54
3.4.1	Pulverização	54
3.4.2	Desmineralização	55
3.4.3	Extração	55
3.4.4	Extração Orgânica	56
3.4.5	Extração por Chelex	57
3.4.6	Extração por sistema automatizado de purificação de amostras forenses	57

3.4.7 Quantificação do DNA	58
3.4.8 Amplificação	62
3.4.8.1 <i>Powerplex ®Fusion 6 C System (Promega Corporation)</i>	62
3.4.8.2 <i>Ampflstr®Yfiler® Plus Pcr Amplification Kit (Applied Biosystems)</i>	63
3.4.9 Genotipagem	63
3.4.10 Análise dos resultados da genotipagem	64
4 RESULTADOS	65
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	85
APÊNDICE A	94
APÊNDICE B	95
APÊNDICE C	98
APÊNDICE D	100
APÊNDICE E	101
APÊNDICE F	108
ANEXO A	113

1 INTRODUÇÃO

A Genética Forense surgiu como uma proposta de materializar o crime por meio do “retrato genético” do indivíduo. O uso dessa ferramenta foi amplamente difundido nas séries televisivas que apresentavam a análise do DNA como uma tecnologia capaz de determinar, em tempo real, o resultado de um exame que poderia inocentar uma pessoa ou até mesmo apontar o criminoso. Entretanto, apesar dos avanços tecnológicos o exame de DNA requer, além da habilidade técnica, a *expertise* de se extrair o DNA de diversas fontes de vestígios criminais, os quais podem estar sujeitos a diversas condições ambientais que podem dificultar a análise.

Um dos objetivos da Genética Forense diz respeito à identificação de corpos, quer pela razão humanitária (direito ao luto), quer pela necessidade de se esclarecer um crime. De fato, os altos índices de violência do país demonstram que os processos de identificação de cadáveres estão relacionados a crimes de ação violenta. Porém, inúmeros casos de identificação estão relacionados a indivíduos não reclamados, quer pela ausência de um mecanismo eficiente de busca para os familiares, quer pela própria ausência de parentes vivos.

Os exames de DNA relacionados à identificação humana correspondem àqueles em que não houve a possibilidade de identificação por outros métodos da criminalística (e.g. datiloscopia e exame da arcada dentária). Em casos de indivíduos não reclamados e não identificados, o exame genético também se faz importante em virtude da possibilidade da inclusão do perfil genético em bancos de dados específicos para esta finalidade (e.g. CODIS, do inglês *Combined DNA Index System*, ou Sistema Indexado Combinado de DNA), com o intercambiamento, no Brasil, das informações pelos estados pertencentes à Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos.

O estudo molecular em elementos dentários que estiveram submetidos a condições ambientais diversas é um grande desafio, por se tratar de um DNA que é potencialmente degradado e imerso em um conjunto de potenciais contaminantes, além de estarem envoltos por uma matriz mineralizada que dificulta a recuperação do DNA. Vários fatores, quer sejam químicos, físicos ou biológicos, agem no elemento dentário, que além dos fatores idiossincráticos causam diversas alterações em sua microestrutura e na perda de células e conseqüentemente na qualidade e quantidade de DNA.

Um dos fatores relacionados à recuperação do perfil genético de amostras degradadas diz respeito ao sucesso da amplificação por meio de marcadores genéticos autossômicos, em virtude do tamanho dos fragmentos de DNA. Outras variáveis importantes são os métodos de pré-tratamento e extração, haja vista a necessidade da otimização dos procedimentos para a recuperação do material genético.

Devido à necessidade da obtenção de protocolos para a obtenção de DNA de elementos dentários por métodos eficientes, a proposta central desse trabalho foi a otimização dos métodos de extração (orgânica, purificação automatizada e Chelex), submetidos aos pré-tratamentos de pulverização e descalcificação, para a recuperação, identificação do material genético e determinação da provável origem ancestral de indivíduos não reclamados e não identificados (NRNI) da Seção de Odontologia Legal do Instituto Médico Legal de São Luís do Maranhão (IML/SLZ-MA), através de marcadores microssatélites STRs e Y-STRs.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Os altos índices de violência resultam na aniquilação de indivíduos que podem ser inumados como indigentes, em virtude da impossibilidade de se estabelecer a sua identidade. A obtenção de perfis genéticos resulta na possibilidade da identificação dos cadáveres, através da comprovação do vínculo genético ou da relação de parentesco obtida após a reclamação por seus familiares.

Os protocolos adotados para a identificação de indivíduos não reclamados e não identificados (NRNI) da Seção de Odontologia Legal do Instituto Médico Legal de São Luís do Maranhão (IML –SLZ/MA) incluem a coleta de elementos dentários como meio de salvaguardar a sua identificação após a inumação. Esses materiais são encaminhados ao Instituto de Genética Forense (IGF), órgão oficial responsável pela análise de perfis genéticos de vestígios criminais e identificação humana de todo o estado do Maranhão.

A identificação humana de indivíduos por meio de ossadas e elementos dentários envolve a avaliação de diversos protocolos de extração de DNA, a análise qualitativa das amostras e verificação da eficácia dos marcadores genéticos comumente empregados para esta finalidade. Em virtude das diversas condições ambientais às quais as amostras forenses estão sujeitas, a fragmentação e a

degradação do DNA são fatores que dificultam a obtenção do perfil genético de um indivíduo por meio de marcadores autossômicos (e.g. STRs, repetições curtas em tandem, do inglês *short tandem repeats*). O uso de marcadores Y-STRs auxilia na investigação e na determinação de parâmetros de ancestralidade.

Tendo em vista a necessidade da padronização dos métodos analíticos para a análise de amostras críticas adotados pelo Instituto de Genética Forense do Maranhão (IGF/MA), a realização deste trabalho terá como principal subproduto o estabelecimento de protocolos que permitam a recuperação do DNA e consequente obtenção de perfis genéticos a partir de elementos dentários de indivíduos não reclamados e não identificados (NRNI) da Seção de Odontologia Legal do Instituto Médico Legal de São Luís do Maranhão (IML-SLZ/MA).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Obter perfis genéticos a partir dos elementos dentários de indivíduos não reclamados e não identificados, depositados na Seção de Odontologia Legal do Instituto Médico Legal (IML-SLZ-MA), para fins de identificação e de inferência de origem ancestral.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e otimizar diferentes métodos analíticos de pré-tratamento e extração de DNA, visando obter perfis genéticos em quantidade e qualidade adequadas para a identificação humana;

- Obter perfis genéticos das amostras forenses por meio de marcadores autossômicos, correlacionando-os com metadados contidos nos exames odontológicos de cadáveres;

Inferir a provável origem ancestral dos indivíduos através da análise de marcadores de linhagem Y-STRs para a determinação de parâmetros de ancestralidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS DA COLONIZAÇÃO BRASILEIRA

A colonização brasileira foi pautada pela miscigenação de uma grande variedade de grupos ameríndios, que totalizavam, segundo os historiadores, cerca de 2,5 milhões de indivíduos à época da descoberta europeia, no início do século XV. A vinda de nove milhões de africanos entre os séculos XVI e XIX foi somada à migração europeia que ocorreu durante todo o processo de ocupação territorial do Brasil colônia. A colonização europeia inicial estava geralmente relacionada a indivíduos do sexo masculino, que geraram descendentes após o cruzamento com mulheres africanas ou indígenas.

Os 500.000 portugueses que vieram ao Brasil entre os anos de 1500-1800 eram majoritariamente indivíduos do sexo masculino (FRANCEZ *et al.*, 2012; CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001). Os portugueses foram, até 1.808, a única fonte significativa de imigrantes europeus. A fuga da família imperial para o Brasil, naquele ano, resultou na abertura dos portos para o comércio internacional e incentivou a chegada de colonos de outros países. No período de 1820 a 1975, cerca de 5.600 imigrantes vieram para as terras brasileiras, sendo em sua maioria italianos (34%) e portugueses (29%), seguidos de espanhóis (14%), alemães (4%), sírios e libaneses (2%), entre outros (12%). A miscigenação resultante da interação entre diferentes grupos étnicos resultou na formação de uma população multiétnica, que resultou em um dos povos mais miscigenados do mundo (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001; CALLEGARI-JACQUES *et al.*, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2002; PENA *et al.*, 2009).

As cinco áreas geopolíticas do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul) apresentaram características próprias relacionadas aos diferentes processos de colonização e povoamento, que se refletiram na estruturação genética da população brasileira atual (FERREIRA *et al.*, 2002; ALVAREZ *et al.*, 2016).

A variabilidade genética pode ser demonstrada por meio dos polimorfismos de patrilinearidade (cromossomo Y) e matrilinearidade (DNA mitocondrial). Estes são excelentes marcadores de linhagem estável, por serem transmitidos em blocos de genes (haplótipos) ao longo das gerações. As mutações que ocorrem no DNA mitocondrial e no cromossomo Y podem ser específicas para certas regiões do

território brasileiro, fornecendo, deste modo, informações complementares para a rastreabilidade da origem ancestral por gerações e servindo como marcadores geográficos. Por outro lado, os marcadores moleculares autossômicos são expostos à um alto nível de recombinação, sendo importantes para a individualização (PENA et al., 2009).

Em estudos realizados por Pena *et al.* (2009), foram analisados os polimorfismos do cromossomo Y de 200 homens não aparentados de quatro regiões brasileiras e de 93 portugueses do sexo masculino. Foi observado que não houve diferenciação significativa entre as regiões brasileiras ou das frequências de haplogrupos no Brasil e Portugal. Os resultados confirmaram a predominância da origem europeia, apenas 2% do haplogrupo E3a* (África Subsaariana) e nenhum haplogrupo ameríndio (Q3*).

Em um estudo de Alvarez et.al (2016) envolvendo a análise de 1.217 homens não relacionados das cinco regiões geopolíticas brasileiras por meio de 41 Y-SNPs (do inglês, *Y-specific Single Nucleotide Polymorphisms*), observou-se que as diferenças genéticas observadas entre as regiões foram consistentes com a história de colonização brasileira.

Pena et al. (2009) analisaram a contrapartida materna na formação da população brasileira por meio do DNA mitocondrial. Este estudo revelou que 33% das matrilineagens eram de origem ameríndia, 39% europeia e 28% africana. As linhagens matrilineares da região amazônica eram de origem ameríndia, enquanto a africana era predominante no Nordeste (44%) e os haplogrupos europeus predominavam na Região Sul (66%). A análise do cromossomo Y e do DNA mitocondrial apontam para cruzamento direcional entre homens europeus e mulheres africanas e ameríndias, que reforçam a história de povoamento do Brasil ao longo dos séculos, com brasileiros de linhagens materna e paterna de diferentes origens filogeográficas (PENA, et.al, 2009).

2.2 PROCESSO DE OCUPAÇÃO TERRITORIAL DO MARANHÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Maranhão está localizado na Região Nordeste do país e estabelece fronteira com os Estados do Piauí (leste), Tocantins (sul e sudoeste) e Pará (oeste), conforme ilustrado na Figura 1. Possui uma área territorial de 331.937,450 Km², sendo o segundo maior estado do Nordeste, o oitavo maior estado brasileiro e detentor da segunda maior faixa

litorânea do Brasil. Possui cinco mesorregiões, 21 microrregiões, 217 municípios e uma população de 7.035.055 habitantes. Apresenta predominância do clima tropical zona equatorial com clima semiúmido e quatro a cinco meses secos.

Em comparação com outras áreas do Brasil, o processo de colonização maranhense ocorreu mais tardiamente. Há relatos que antes de Cabral surgir no Brasil, as terras maranhenses foram visitadas por outros navegadores que ansiavam chegar ao Peru, sem fixação em suas terras. A ocupação francesa foi oficializada em 1612, mas sabe-se que os franceses visitavam o litoral maranhense desde o ano de 1524. Os altos rendimentos dos produtos tropicais serviram de estímulo para a ocupação da ilha do Maranhão (situada entre a foz dos rios Anil e Bacanga), por uma expedição comandada por Daniel de La Touche, Senhor de La Ravardiere, composta por três navios e com cerca de 300 homens (TROVÃO, 2008).

Figura 1 – Localização geográfica do Estado do Maranhão.



Fonte: Wikipedia. Disponível em: < <https://pt.wikipedia.org/wiki/Maranh%C3%A3o>>. Acesso em: 16.03.2019.

Na figura 1 mostra o Estado do Maranhão que está situado na região nordeste do Brasil, tendo como estados vizinhos Pará, Piauí e Tocantins. É o segundo maior estado da região nordeste e apresenta a segunda maior faixa litorânea do Brasil.

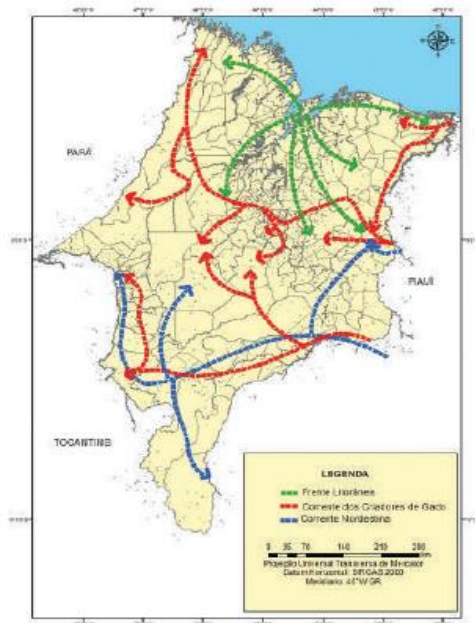
A ocupação do território maranhense se deu em duas frentes geográficas distintas: a da planície do litoral (Golfão Maranhense), que era ligada ao domínio europeu (francês, holandês e português), e a do planalto do sertão (Vale do Rio Parnaíba), conforme indicado na Figura 2. A primeira decorreu da economia de agroexportação da cana-de-açúcar e do algodão, enquanto a última surgiu em virtude do desenvolvimento da pecuária. Uma das ramificações de ocupação definida pela costa oriental buscou o desenvolvimento da pecuária e a comunicação com o Ceará

e Pernambuco. Outra vertente do litoral alcançou o Rio Itapecuru, com a ocupação entre 1.641 e 1.644 pelos holandeses, enquanto o Rio Mearim foi colonizado pelos franceses. Durante todo o processo de ocupação, diversas comunidades indígenas foram dizimadas. A corrente pastoril foi tardia e surgiu apenas 118 anos após a ocupação do litoral, em virtude da importância do gado para a expansão econômica açucareira e pelo baixo investimento, que servia como transporte, força motriz para os engenhos, fonte alimentícia e de insumos (TROVÃO, 2008).

Segundo dados do IBGE, o Maranhão apresenta-se como um dos estados mais miscigenados do Brasil, apresentando 68,02% de pardos autodeclarados. Esta proporção decorreu provavelmente da alta concentração de escravos recebidos no Maranhão durante o processo de colonização. Dados adicionais revelaram que 19.68% da população se declarou branca, 11.73% pretos, 0.04% amarelos e 0.53% indígenas. A população branca declarada é composta principalmente por descendentes de portugueses. Por outro lado, o baixo índice da população indígena autodeclarada corrobora com dados históricos que retratam a aniquilação dessas comunidades no período colonial brasileiro (TROVÃO, 2008).

Na figura 2 o mapa descreve as frentes de ocupação maranhense. Observa-se em verde a ocupação litorânea, em vermelho a frente pecuária e em azul a frente nordestina (mais tardia). As correntes de ocupação apresentam regiões de convergência, que podem ser identificadas no mapa.

Figura 2 – Frente de ocupação do território maranhense.



Fonte: Trovão (2008).

Dados mais recentes revelaram que a população do Maranhão teve um aumento crescente em números absolutos da população urbana desde a década de 1950 (com o surgimento das rodovias) até 2010, passando de menos de 2 milhões de habitantes para mais de 4 milhões. O aumento populacional, seguido da baixa qualificação profissional, propiciou o crescimento desordenado das cidades e o aumento da violência urbana. De acordo com dados do Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, a migração interestadual no período de 2005 a 2010 apresentou maior índice de emigração em todas as mesorregiões do Estado.

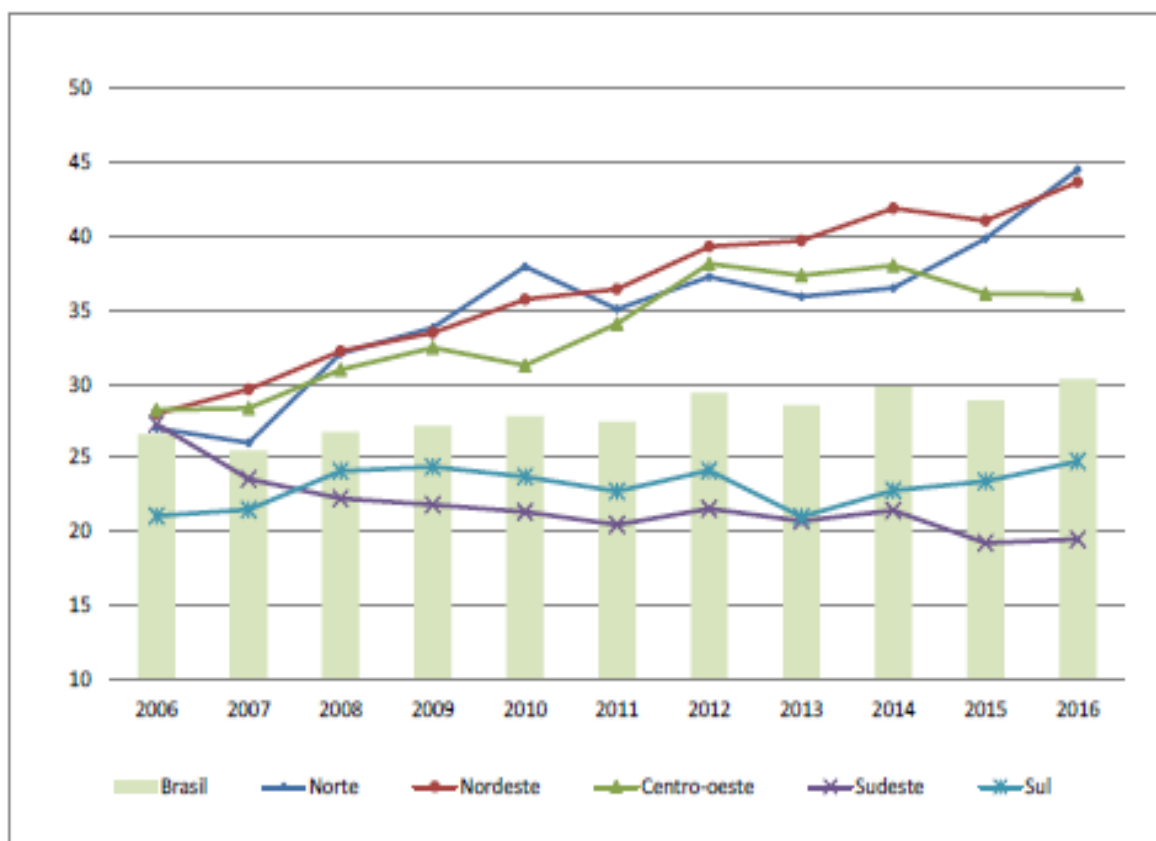
2.3 VIOLÊNCIA, CRIMINALIDADE E A PERÍCIA CRIMINAL

Com o aumento da população, estratégias são necessárias para disciplinar a convivência e atender ou regular as necessidades sociais. A manutenção da paz e da ordem social exige a adoção de medidas diversas, principalmente no que tange ao combate à violência e à criminalidade. Diversos instrumentos são adotados com esse intuito, por meio de organizações integradas que são responsáveis pelo controle da segurança pública, da criminalidade e da aplicação da justiça (OLIVEIRA, 2013).

Dados do Atlas da Violência (2018) demonstraram que o Brasil apresentou um crescente aumento da violência entre os anos de 2006 a 2016, conforme demonstrado na Figura 3. Dos 62.517 homicídios ocorridos em 2016, 72% foram decorrentes de lesões produzidas por armas de fogo. O homicídio foi a causa de mortalidade de 56,5% dos homens com faixa etária de 15 a 19 anos, sendo que a taxa de homicídios de indivíduos negros foi pelo menos 2,5 vezes superior à de indivíduos de outras etnias, demonstrando que o grupo de jovens negros são as maiores vítimas de homicídios no Brasil. Esses dados evidenciam a necessidade de prevenção da violência, a efetiva segurança e o estabelecimento de políticas públicas para a população negra brasileira. Em termos regionais, pode-se observar uma estabilidade das taxas de homicídio para as regiões Sudeste e Centro-Oeste, e um aumento das taxas de homicídio para as demais regiões, sobretudo Norte e Nordeste (ATLAS DA VIOLÊNCIA, 2018).

Na figura 3 observa-se um aumento nas taxas de homicídio para as Regiões Norte (em azul) e Nordeste (em vermelho), entre os anos de 2006 e 2016.

Figura 3 – Evolução da taxa de homicídios no Brasil e nas regiões geopolíticas brasileiras.



Fonte: Mapa da violência, 2018.

Apesar da redução da violência nos últimos anos, o Maranhão ainda apresenta uma taxa de homicídios superior à média nacional (34,6 e 30,3 / 100.000 habitantes respectivamente). Os dados do Maranhão reiteram os índices nacionais, tendo como principais protagonistas da violência urbana indivíduos jovens e negros. O Maranhão ainda se destaca como um dos Estados com maior aumento na violência armada e vítimas de homicídio por arma de fogo no Brasil (ATLAS DA VIOLÊNCIA, 2018).

Os dados apresentados demonstram a necessidade do combate imediato à violência, de modo a reprimir a reincidência dos crimes. Desse modo, as organizações responsáveis pelo controle da segurança pública necessitam de modernização para o enfrentamento dessa realidade (OLIVEIRA, 2013). Dentre os suportes de controle para a administração da Justiça Penal, a prova técnica tem grande destaque (HAMMERSCHMIDT, 2012). Em países que promovem a integração do conhecimento técnico-científico à investigação criminal, pode-se constatar que há um maior índice de resolução dos crimes. Tal integração promove a complementariedade

dos trabalhos investigatório e pericial, resultando no enriquecimento do valor probatório da justiça e consequente redução da impunidade (OLIVEIRA, 2013).

Ao longo do tempo, diversos métodos técnicos-científicos têm sido utilizados com o propósito de esclarecer um crime, tanto por meio da materialidade e da dinâmica dos fatos, quanto dos indícios de autoria. Diversas ciências contribuíram para o avanço da Criminalística, quando o discurso científico passou a decifrar o ato criminoso (GRIZA, 1999). A apuração dos atos criminosos inclui a identificação humana que pode ser obtida por meios diversos, dentre os quais pode-se destacar os métodos de identificação individual, como a papiloscopia, a análise da arcada dentária e o exame de DNA. Fatores relacionados ao estado de conservação do cadáver e o tempo de execução do exame são determinantes para a escolha do método científico mais apropriado (INTERPOL, 2009).

2.4 ESTADOS DE DECOMPOSIÇÃO

A decomposição é um processo natural que ocorre após a morte e que se caracteriza como um fenômeno contínuo, estendendo-se por um determinado período após a cessação das funções vitais. A fase primária da decomposição corresponde à morte somática (perda da atividade dos órgãos vitais), a segunda fase representa a morte celular (autólise, com a falência das células) e o processo de decomposição ocorre até a fase de esqueletização (HAU et al, 2014).

A ausência de movimentos respiratórios e cardíacos, a cessação dos movimentos e de resposta a estímulos dolorosos, a flacidez, a ausência de tônus muscular e dos reflexos são sinais de cessação das funções vitais. De início, a degradação ocorre ao nível celular, sendo invisível a olho nu. Essas alterações, com o passar do tempo, são observadas macroscopicamente e configuram as mudanças *post mortem*. O processo de decomposição continua após a esqueletização e ocorre em uma taxa mais lenta, resultando em um processo cíclico que consiste na reciclagem de energia e nutrientes ao ecossistema (HAU et al, 2014; GELDERMAN et al, 2018).

Entender as mudanças sofridas por um cadáver é essencial para a estimativa do intervalo *post mortem* (IPM), caracterizado entre o tempo de falecimento até o encontro do corpo. Essa estimativa é de suma importância em investigações criminais e no estabelecimento da dinâmica dos crimes. As estimativas IPM mais confiáveis são

aquelas baseadas na análise do local de crime, das condições ambientais e dos exames perinecrocópico e necrocópico (DIX; GRAHAM, 2000). Em termos gerais, quanto maior o tempo de morte menos precisa será a estimativa do IPM. Ao atingir o estágio de esqueletização, a estimativa do IPM torna-se mais difícil, em virtude dos fatores ambientais relacionados (HAU et.al, 2014; GELDERMAN et.al, 2018).

A deterioração dos tecidos depende de fatores intrínsecos e extrínsecos que interagem entre si. Os fatores intrínsecos estão relacionados à idade, tamanho físico do cadáver, condições de saúde *ante mortem*, vestimenta e conteúdo gástrico. Os fatores extrínsecos, por sua vez, relacionam-se à variação de temperatura ambiental, clima, condições de sepultamento, composição e pH do solo, fluxo de ar e fauna cadavérica (HAU et al., 2014; IOAN et al., 2017). Destes, a temperatura é uma das variáveis mais importantes, por ser um fator que está relacionado às atividades biológicas e às reações químicas: quanto maior a temperatura ambiente, mais rápida será a decomposição, por favorecer a proliferação de microrganismos (GELDERMAN et al., 2018).

O processo de decomposição geralmente ocorre através da autólise e da putrefação. A autólise corresponde à autodestruição celular, decorrente da ação de enzimas hidrolíticas celulares. Inicia-se dentro das células metabolicamente ativas, em órgãos com alta produção de adenosina trifosfato (ATP) e transporte de membrana, como o fígado e o cérebro. Esse tipo de degradação é observado ao nível histológico (HAU et al., 2014).

O bloqueio dos sistemas respiratório e cardiovascular interrompe o suprimento de oxigênio, levando a uma condição anaeróbica. A glicólise do mecanismo anaeróbico funciona como fonte alternativa de energia, com a produção de dióxido de carbono e lactato. Consequentemente, a queda do pH celular leva à ruptura da membrana celular e consequente liberação das enzimas hidrolíticas que destroem as estruturas celulares. Os restos celulares servem como fontes de nutrientes e energia para as reações microbiológicas que ocorrem no processo de putrefação. Portanto, a putrefação é a degradação tecidual pela atividade de microrganismos presentes no corpo humano (HAU et al., 2014).

As etapas correspondentes ao processo de decomposição são: à fresco; inchaço; decaimento ativo; decaimento avançado; e esqueletização. As primeiras reações *post mortem* observadas em cadáveres frescos correspondem ao *algor*

mortis, *rigor mortis* e *livor mortis* e as alterações tardias correspondem a quebra do tecido mole com mudanças macroscópicas (DIX; GRAHAM, 2000).

O *algor mortis* é a diminuição da temperatura corporal até a temperatura ambiente, por meio da perda de calor através da radiação, convecção, condução e evaporação dos fluidos. Quanto maior a diferença entre a temperatura corporal e a temperatura ambiente, mais rápido será o resfriamento. A diminuição da temperatura corporal varia conforme a presença ou a ausência de vestimentas no indivíduo, do tamanho e peso do cadáver e das condições ambientais. Alguns fatores (e.g. insolação, febre, toxinas, atividades físicas *ante mortem*, idade e asfixia) podem levar a uma temperatura corporal inicial anormal (HAU et al., 2004). O *algor mortis* é o principal fenômeno para a determinação do IPM nas primeiras 24 horas após o falecimento do indivíduo (POPOSKA et al., 2013).

O *rigor mortis* é caracterizado pela rigidez do cadáver em virtude do desaparecimento do ATP dos músculos, da desidratação e do acúmulo de ácido láctico. Inicia-se com a autólise do retículo sacorplasmático e liberação de íons cálcio que promovem a ligação da actina e miosina no tecido muscular, formando um composto contrátil (actomiosina). Depois de algum tempo após a morte, o ATP remanescente no músculo é destruído e a actina assume a forma de uma substância geleificada e firme. Em seguida, ocorre a progressiva desintegração das proteínas e a perda progressiva da rigidez, resultando na flacidez cadavérica (HAU et al, 2014). Esse fenômeno tem início de duas a quatro horas após a morte e atinge a intensidade máxima de 13 a 24 horas, desaparecendo no início da decomposição (BARTOLOMUCCI, 2008).

O *livor mortis* ou hipóstase é a descoloração do corpo após a morte. Ocorre devido ao assentamento gravitacional do sangue, sendo considerado um processo mecânico e dependente da posição em que o cadáver se encontra (DIX; GRAHAM, 2000). O sangue originário dos vasos sanguíneos aparece visível na pele na cor rosa, azulada ou arroxeada em virtude da presença da desoxiemoglobina (HAU et al., 2014). Os livores cadavéricos surgem de 15 minutos a duas horas e se tornam fixos de 12 a 16 horas após a morte. Esta é uma importante etapa para o exame de local de crime, em casos de mudança na posição do cadáver (BARTOLOMUCCI, 2008; HAU et al, 2014).

As etapas de decomposição tardia correspondem aos fenômenos destrutivos ou transformativos. A destruição celular pela ação de microrganismos e a fermentação

promovem a dissolução dos tecidos em gases, líquidos e sais. O inchaço (período enfisematoso ou gasoso) resulta da liberação dos gases que promovem a distensão das partes do corpo devido ao acúmulo dos produtos de decomposição produzidos pelos microrganismos em putrefação anaeróbia. A decomposição ativa se dá com a saída dos gases do interior do corpo, promovendo o desinchaço e geralmente ocorre ao final de uma semana. A decomposição avançada (coliquativo ou liquefação) segue do oitavo ao décimo quarto dia, com intensa migração larvar e destruição dos tecidos moles (CRAVO, 2015).

A ruptura da pele propicia o aumento de microrganismos e a liquefação dos tecidos corpóreos, promovendo a exposição óssea. O estágio seco ocorre quando os restos mortais atingem o estágio de pele seca, cartilagens e ossos. A denominação “restos esqueletizados” é referente ao cadáver com uma grande exposição óssea (CRAVO, 2015). Ao atingir o estágio esqueletizado, a decomposição diminui drasticamente, sendo evidenciada no decorrer de anos ou décadas. O processo de esqueletização passa por vários estágios até a completa decomposição (BARTOLOMUCCI, 2008; HAU et al, 2014; CRAVO, 2015).

2.5 IDENTIFICAÇÃO HUMANA ATRAVÉS DO EXAME DE DNA

A identificação humana pode ser tratada como um procedimento para estabelecer a identidade inequívoca de um indivíduo (CARVALHO, 2009). A identidade, por sua vez, corresponde ao conjunto das características e das circunstâncias que individualizam e diferenciam uma pessoa da outra (JOBIM, 2012). A identificação do indivíduo é essencial em todas as suas relações, quer social ou jurídica, de modo a preservar seus direitos e deveres, em vida ou após a morte (CARVALHO, 2009). A identificação humana de restos mortais envolve ainda questões humanitárias e emocionais. Para a família, o luto se inicia com a suspeita da perda, mas somente a identificação propicia o direito ao verdadeiro luto e à justiça, em casos de atos criminosos (INTERPOL, 2015).

Quando uma pessoa é declarada desaparecida, ou quando os seus restos mortais são encontrados, mecanismos nacionais devem ser estabelecidos de modo que as informações sejam centralizadas e comparadas. Apesar dos avanços tecnológicos, as investigações de pessoas desaparecidas permanecem, na maior parte dos casos, sem solução (INTERPOL, 2015).

Em alguns casos, a incerteza da identificação torna-se ainda mais difícil do que a própria confirmação da identidade (BEAUTHIER, et al, 2009). Para a perícia criminal, um procedimento de identificação deve ser dado por meio de um método que possa individualizar inequivocamente as coisas ou pessoas entre si, de modo a estabelecer uma identidade (ARAUJO, PASQUALI 199-?). Segundo DEL-CAMPO (2006), um método de identificação para ser aplicável deve apresentar as seguintes características:

- Unicidade (ou individualidade): representa uma característica que seja pertencente somente àquele indivíduo;
- Imutabilidade: corresponde à propriedade de determinada característica não se alterar no decorrer do tempo;
- Perenidade: diz respeito à capacidade de determinada característica em resistir ao tempo;
- Praticabilidade: representa a aplicabilidade do processo na rotina pericial, de modo que não seja complexo;
- Classificabilidade: diz respeito à possibilidade de classificação dos registros e rapidez de localização;
- Reprodutibilidade: Consiste na obtenção dos resultados de modo fiel e contínuo.

Dentre as principais técnicas de identificação do fenótipo, pode-se destacar a antropológica, os métodos bioquímicos e a análise do DNA. Um dos métodos antropológicos de grande importância é a análise da impressão digital. Apesar da alta variabilidade na população, a superfície de contato das impressões digitais não é muito extensa e pode ser destruída por acidente. Outra desvantagem deste método refere-se à dificuldade de se estabelecer relações de parentesco (BRDICKA; NURNBERG, 1993).

Para os métodos bioquímicos, a eficiência depende do grau de polimorfismo do marcador utilizado (BRDICKA; NURNBERG, 1993). A análise dos polimorfismos do Sistema ABO, descoberto por Karl Landsteiner no início do século XX, possibilitou a resolução de crimes. Entretanto, as quatro possibilidades fenotípicas para os grupos ABO (A, B, AB e O) resultavam em dados pouco informativos, especialmente pelo fato de cerca de 40% da população geral ser do tipo sanguíneo O (BUTLER, 2005). Apesar

de ser um sistema pouco informativo, destacou-se principalmente em casos de exclusão (BUTLER, 2005; JOBLING; GILL, 2004).

Os avanços da biologia molecular resultaram na descoberta dos marcadores moleculares e das impressões digitais do DNA (*DNA fingerprinting*). A análise dos diversos vestígios pelo exame de DNA envolve técnicas bastante sensíveis e que contribuem para o esclarecimento da dinâmica dos crimes, determinação da autoria positiva ou negativa dos delitos, bem como o estabelecimento de vínculos de parentesco.

Vários países estabeleceram programas nacionais de análise de DNA para pessoas desaparecidas, sendo que a padronização deve ser estabelecida para que a identificação seja eficiente. A coleta de dados deverá incluir, sempre que possível, amostras diretas da pessoa relatada (e.g. objetos de uso pessoal e materiais de biopsia) e de referência dos membros da família. Estes últimos com o objetivo de atestar o vínculo de parentesco, bem como apoiar a autenticidade das amostras de referência direta (INTERPOL, 2015).

2.6 DNA NO CONTEXTO FORENSE

O grande avanço que possibilitou o uso do DNA para fins forenses foi o descobrimento de locos hipervariáveis (JEFFREYS et al, 1985a) que resultavam na obtenção de verdadeiras “impressões digitais” do DNA (JEFFREYS *et al.*, 1985b). Jeffreys et al. (1985) reportaram um método de detecção de diversos *locus* hipervariáveis no genoma humano (VNTRs, do inglês *variable number of tandem repeats*, ou repetição em tandem de número variável), por meio de sondas multilocus (MLP, do inglês *multi locus probe*) derivadas do gene da mioglobina humana (JEFFREYS et al., 1985a). As regiões hipervariáveis do DNA foram reportadas em 1980 (WYMAN; WHITE, 1980). Pouco tempo depois, Nakamura e colaboradores (1987) utilizam o termo VNTR (do inglês *variable number of tandem repeats*) para descrever padrões de polimorfismos de alguns genes, relacionados à variação no número de repetições em tandem de uma sequência curta de DNA. A grande importância desse experimento foi o desenvolvimento de uma técnica que permitisse detectar padrões distintos entre os indivíduos e que foi utilizada em testes de identificação genética para fins forenses (GILL et al, 1985; BUTLER, 2005).

A tecnologia empregada por JEFFREYS e colaboradores (1985a) teve início com o desenvolvimento de marcadores de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP, do inglês *restriction fragment length polymorphism*), quando BOTSTEIN et al. (1980) propuseram a técnica pioneira para detectar polimorfismos de DNA na construção do primeiro mapa molecular do genoma humano (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

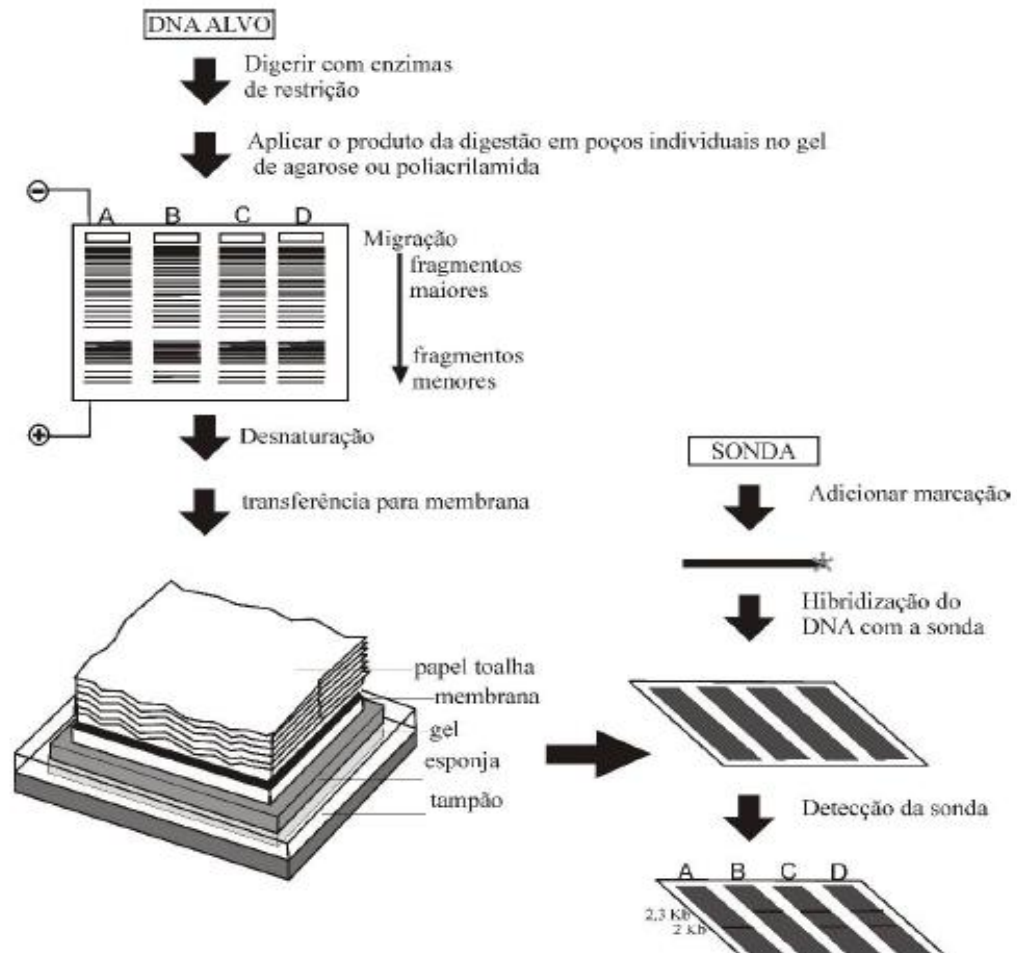
A técnica de RFLP (Figura 4) consiste na digestão enzimática do DNA por uma ou mais enzimas de restrição que flanqueiam as VNTRs. O reconhecimento da enzima de restrição por uma determinada sequência específica do DNA resulta em fragmentos de diferentes tamanhos. A diferença entre os alelos decorre de mutações, quer sejam substituições, deleções ou inserções (JEFFREYS et.al, 1986; BRDICKA; NURNBERG, 1993).

Os fragmentos são separados quando submetidos à eletroforese e posteriormente impermeabilizados em uma membrana (*Southern blotting*). A detecção dos fragmentos se dá por meio de sondas radioativas que se ligam à membrana e podem ser visualizadas por meio da autorradiografia (GROVER; SHARMA, 2016; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017; PANNEERCHELVAM; NORAZMI, 2003).

O primeiro caso forense a utilizar a técnica do *DNA fingerprints* foi uma ocorrência de imigração, envolvendo um jovem inglês de origem ganense, que tentava regressar à Inglaterra (JEFFREYS; BROOKFIELD; SEMEONOFF, 1985). Entretanto, a primeira vez que um tribunal aceitou o exame de DNA como evidência criminal foi em um caso de duplo homicídio e violência sexual perpetrado contra as adolescentes Lynda Mann (1983) e Dwan Ashworth (1986). Os crimes ocorreram em dois vilarejos do Condado de Leicester, na Inglaterra, e se consagraram na Genética Forense por *Caso Leicester* (BUTLER, 2005).

Na figura 4 o DNA é submetido à digestão enzimática (enzimas de restrição) que flanqueiam o DNA alvo. Os fragmentos gerados pelas enzimas de restrição apresentam tamanhos distintos que são separados em gel de agarose ou poliacrilamida. Os fragmentos são transferidos para uma membrana e detectados por meio de sondas radioativas. Com a detecção da sonda, pode-se observar os indivíduos homozigotos (A e B) e heterozigotos (C e D).

Figura 4 – Representação esquemática da técnica de RFLP.



Fonte: Turchetto-Zolet et al. (2017).

Algumas considerações sobre esta investigação permitem refletir sobre a importância do exame genético para a resolução dos delitos, já que um indivíduo havia confessado o crime, mas o seu perfil genético não correspondia àquele recuperado das evidências coletadas das vítimas. Logo, mais de 4.000 homens tiveram o seu perfil genético analisado para confronto com o perfil genético desconhecido. O verdadeiro suspeito só apareceu um ano depois das coletas, quando uma mulher ouviu a confissão despretensiosa do criminoso em um bar, ao informar que o verdadeiro assassino não havia cedido o seu material biológico, pois um amigo havia doado em seu lugar. O caso foi relatado à polícia e Colin Pitchfork foi condenado pelo crime (BUTLER, 2005).

A partir de 1987, os exames de DNA começaram a ser admitidos como prova material nos Estados Unidos e Inglaterra (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017). Entretanto, em virtude das características peculiares das amostras forenses (e.g. degradação, exiguidade e contaminação), nem todos os casos obtinham sucesso na

análise pelo método RFLP. Os primeiros marcadores desenvolvidos consistiam de 30 a 100 unidades de repetição em tandem que demandavam uma grande quantidade de DNA – de 20 a 30 mg (PANNEERCHELVAM; NORAZMI, 2003), além de ser uma técnica bastante laboriosa (GIARDINA; NOVELLI, 2011).

O desenvolvimento da PCR (MULLIS; FALOONA, 1987) e o uso de sondas de *locus* simples (SLPs, do inglês *single-locus probes*) aumentaram o poder de discriminação dos resultados e a sensibilidade do método, sendo particularmente útil para a obtenção do perfil genético de amostras degradadas, além de reduzir o tempo de resposta na análise. Atualmente, diversos kits comerciais são validados para a prática forense, utilizados na resolução dos casos criminais (EKERT, 2017).

2.7 ELEMENTOS DENTÁRIOS COMO FONTE DE MATERIAL GENÉTICO

Os elementos dentários são estruturas bastante rígidas e resistentes, que permanecem intactos e bem preservados comparados a outros tecidos humanos (ZOLEDZIEWSKA et al., 2002). O fato de os elementos dentários estarem localizados na mandíbula, favorece a sua preservação (HIGGINS; AUSTIN, 2013). Entretanto, alguns fatores externos podem influenciar na preservação dos dentes, resultando em análises variáveis e imprecisas (ZOLEDZIEWSKA et al., 2002; HIGGINS et al., 2011). Se por um lado, o DNA preservado em um elemento dentário se mantém estável por centenas de anos, os elementos que promovem essa proteção tornam o processo de recuperação do DNA um procedimento bastante complexo. A quantidade e integridade do DNA recuperado é um fator limitante na pesquisa arqueológica e forense. Após a morte, o DNA é rapidamente degradado em fragmentos menores por hidrólise, ação de nucleases, por modificações oxidativas dos nucleotídeos ou por ataques microbianos, quando ocorre a degradação das proteínas e da mineralização. O DNA se liga à hidroxiapatita, formando um composto denominado bioapatita. Desse modo, uma das etapas necessárias para a recuperação do DNA é a descalcificação, onde o EDTA é um dos agentes descalcificantes mais utilizados (ZOLEDZIEWSKA et al., 2002; ADLER et al., 2011).

As diferenças na degradação do DNA são atribuídas a fatores ambientais, em especial a temperatura, além do tempo de morte. A estimativa da quantidade do DNA é diretamente relacionada ao fragmento do alvo. A degradação do DNA em amostras

antigas é avaliada por meio da quantidade de DNA que é diretamente proporcional ao fragmento alvo (ADLER et al., 2011).

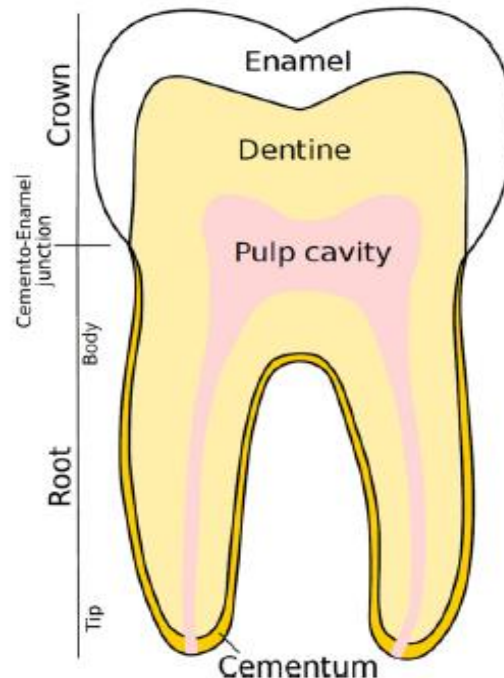
Os dentes podem ser divididos em duas partes principais: a coroa e a raiz (Figura 5). A coroa é a porção do dente que se encontra exposta na cavidade bucal, enquanto a raiz se encontra envolta pelo osso alveolar presente na mandíbula (HIGGINS; AUSTIN, 2013). A raiz dentária é formada pelos elementos cimento, dentina e polpa.

O DNA presente no dente está presente nas células da polpa (fibroblastos, macrófagos, linfócitos, etc), no cimento e dentina (cementoblastos e odontoblastos, respectivamente). A matriz celular é cercada por uma matriz mineral que a protege contra o ambiente. (HERVELLA et al., 2015). O cimento é um tecido mineralizado e avascular, composto de 45 a 50% por hidroxiapatita, colágeno e matriz proteica. Pode ser do tipo celular (região apical das raízes e furca) ou acelular (região anterior) (HIGGINS; AUSTIN, 2013). As células mineralizadas presentes no cimento são os cementoblastos e os cementócitos, localizados em pequenos canais próximos à superfície de contato com a dentina. Apesar do cimento ser o melhor tecido dentário para se extrair o DNA, sua localização eleva o risco de exposição e contaminação (ADLER et al, 2011). O cimento aumenta em espessura ao longo da vida e tem maior densidade celular na ponta da raiz, e aumenta significativamente a chance de obter mtDNA nessas regiões (HIGGINS; AUSTIN, 2013; ADLER et al., 2011). O DNA pode ser obtido a partir de qualquer tipo de dente, independente da idade do indivíduo (SIVAGAMI; RAJESWARA; VARSHNEY, 2000).

A dentina é o elemento que reveste a cavidade pulpar, rica em células odontoblásticas mineralizadas, composta principalmente de cristais de hidroxiapatita (65%), colágeno e água (HIGGINS; AUSTIN, 2013; ADLER et al., 2011). O corpo do odontoblasto (que contém o DNA) está localizado na polpa dentária e túbulos odontoblásticos (ricos em mtDNA) se estendem na dentina mineralizada. A dentina é protegida por uma cobertura de esmalte e cimento, um calcificado com alta densidade que cobre a raiz do dente. Dentro da dentina há de três a quatro vezes mais túbulos odontoblásticos que no corpo da raiz, enquanto que no cimento é o oposto. A dentina é também exposta ao ambiente exterior por meio de uma abertura da cavidade pulpar na ponta da raiz apical (ADLER et al., 2011).

Na figura 5 o dente possui duas regiões anatômicas principais: a coroa (porção externa) e raiz (porção interna). Observa-se a localização dos elementos da raiz cemento, polpa e dentina. Na região da coroa, destaca-se a presença do esmalte.

Figura 5 - Estrutura anatômica do elemento dentário.



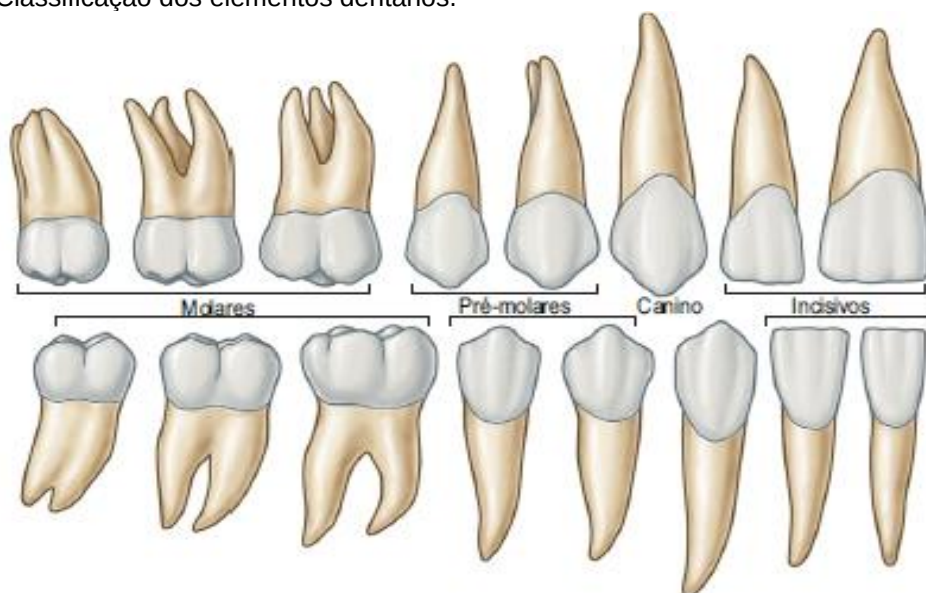
Fonte: Adler et al., 2011.

A polpa é um tecido altamente vascularizado e innervado. Juntos, a polpa e a dentina, contribuem com cerca de dez vezes mais DNA que a coroa (HIGGINS; AUSTIN, 2013). O componente predominante da coroa é o esmalte, o tecido mais resistente do corpo humano. O esmalte é um tecido acelular, de baixa permeabilidade, composto por 96% de minerais, que funciona como uma barreira física para proteger as células da região interna dos dentes de agressões externas (HIGGINS; AUSTIN, 2013; SMITH *et al.*, 1993).

Os dentes humanos são classificados em quatro tipos (Figura 6): molares, pré-molares, caninos e incisivos, que diferem quanto à morfologia, tamanho e função. Os dentes que possuem a maior polpa possuem maiores fontes de DNA. Portanto, a ordem de preferência para a recuperação do DNA corresponde aos molares, pré-molares, caninos e incisivos (HIGGINS; AUSTIN, 2013).

Na figura 6 os dentes são classificados em molares, pré-molares, caninos e incisivos. A preferência para recuperação do DNA segue essa ordem.

Figura 6 - Classificação dos elementos dentários.



Fonte: Disponível em: < <https://www.anatomiaonline.com/de-ntes/> >. Acesso em: 03 abr. 2019.

A recuperação do DNA a partir de restos dentários representa um grande desafio em virtude da concentração do DNA, dos níveis de degradação e contaminação, bem como da amostragem (ZGONJANIN, et.al, 2017). Estudos de dentes armazenados à temperatura ambiente por um período de um a 18 meses demonstraram uma diminuição de 50% da concentração de DNA no primeiro mês. A análise da polpa dentária em condições climáticas distintas (verão e inverno) em um experimento realizado por Duffy e colaboradores (1991), demonstrou que o tempo de estabilidade das células não ultrapassou catorze dias, por se tratar de um tecido mole e sujeito à degradação (DUFFY; SKINNER; WATERFIELD, 1991). Outros estudos demonstram que a polpa dentária se mantém biologicamente viável (pelo menos 50% de células viáveis) por mais de 12 h após a morte, e algumas células viáveis após 24 horas *post-mortem*. As condições ambientais podem favorecer a dessecação da polpa – ambiente seco – ou a proliferação de microrganismos – ambiente úmido. (HIGGINS; AUSTIN, 2013).

A degradação dos dentes é, portanto, influenciada pelo tempo de morte, iniciando-se com a liberação de enzimas celulares (e.g. lipases, nucleases e proteases) e de enzimas exógenas produzidas por microrganismos e invertebrados e pela ação de fatores ambientais. Uma das grandes dificuldades na análise de ossadas, em especial dentes humanos, decorre do aumento da idade cronológica. Com o passar dos anos, ocorre a diminuição do volume da polpa dentária, dos restos celulares e a deposição contínua da dentina e cemento. Por outro lado, o tecido se

torna cada vez mais fibroso e o esmalte mais desmineralizado, apesar de se perder por atrito. Fatores relacionados ao desgaste dentário devem ser levados em consideração na escolha do elemento dentário para análise de DNA (HIGGINS; AUSTIN, 2013).

As doenças dentárias, como a cárie, resultam na dissolução e destruição dos tecidos calcificados dos dentes. Desse modo, a entrada de bactérias na polpa dentária promove a morte celular. Em resposta a essa ação, a polpa se retrai e ocorre a deposição de dentina terciária, uma estrutura menos organizada que pode resultar no encapsulamento dos corpos celulares pelo tecido mineralizado. Entretanto, o cemento celular só pode ser afetado por cáries se for exposto à cavidade oral (HIGGINS; AUSTIN, 2013).

A preservação dos dentes contra a proliferação de microrganismos muito se dá pela reserva mineral e pela adsorção de hidroxiapatita, bem como da formação de agregados cristalinos entre as fibrilas de colágeno que preservam o DNA, tornando-o mais estável, já que o colágeno é protegido da hidrólise e dissolução pelos próprios minerais presentes no dente. A degradação do colágeno é mais dependente das condições ambientais que do intervalo *post-mortem*. A solubilidade da hidroxiapatita é influenciada pela presença de água, pH e porosidade do tecido mineralizado. A presença de água promove a dissolução de íons minerais e aumenta com a diminuição do pH (HIGGINS; AUSTIN, 2013).

2.8 MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares correspondem a qualquer característica fenotípica ou região cromossômica que seja analisável, herdada por meio da segregação mendeliana dos alelos localizados em *loci* individuais, que é repassada da geração parental aos descendentes. O *locus* pode ser definido como uma região do genoma para a qual vários estados de ocupação, ou alelos, são possíveis. Os marcadores moleculares de uso forense são aqueles que apresentam uma grande variabilidade entre os indivíduos, em virtude do alto grau de polimorfismo observado em regiões do DNA que sofreram mutações, e que possibilitam a identificação humana com um alto poder de discriminação (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017; PINTO; GUSMÃO; AMORIM, 2014; HARES, 2012).

A Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG, do inglês *International Society of Forensic Genetics*) publica regularmente orientações e recomendações acerca da aplicação de polimorfismos de DNA e do uso de marcadores moleculares (GUSMÃO *et al.*, 2006). Os polimorfismos definem a existência de diferentes tipos de genótipos, em virtude da variação de alelos em um dado *locus* de interesse. Para que um polimorfismo seja caracterizado, deve-se existir pelo menos dois alelos, dos quais o mais raro não seja oriundo de uma mutação recorrente. As regiões hipervariáveis podem apresentar dois tipos de polimorfismos: polimorfismos de sequência e polimorfismos de comprimento (BONACCORSO, 2005; BUTLER, 2005).

2.9 POLIMORFISMOS DE SEQUÊNCIA

Os polimorfismos de sequência correspondem a regiões de alelos alternativos caracterizados por substituições, deleções ou adições de pares de bases. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single-nucleotide polymorphisms*) são polimorfismos de posição cuja variabilidade genética é expressa em virtude da alteração de uma base, correspondendo geralmente a variações bialélicas (GROVER; SHARMA, 2016; SILVA, 2011).

O uso de SNPs em casos forenses apresenta algumas vantagens: maior abundância no genoma humano em relação aos demais marcadores de polimorfismos; baixa taxa de mutação; tamanho do amplicon pequeno (< 100pb) (KIM *et al.*, 2010; MURTHY *et al.*, 2015). Estes marcadores são, portanto, particularmente úteis na análise de amostras degradadas. Entretanto, considera-se que um único SNP apresenta baixo conteúdo informativo (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017), sendo necessária a combinação de vários marcadores para obter um valor de discriminação satisfatório (GIARDINA; NOVELLI, 2011).

A inserção ou deleção de pares de bases correspondem aos polimorfismos do tipo *indel*. Da mesma forma que os SNPs, apresentam um padrão bialélico e encontram-se amplamente difundidos no genoma (GIARDINA; NOVELLI, 2011). Os *indels* são a segunda maior variação genética presente no genoma humano. Na maior parte dos casos criminais, a exiguidade de material é um grande desafio. Estudos demonstraram que o uso de *indels* para a prática forense apresenta algumas vantagens, principalmente em virtude da baixa taxa de mutação, exclusiva atividade mutacional, tamanho do amplicon, aplicação das mesmas tecnologias utilizadas para

a genotipagem de STRs e amplificação de DNA de amostras degradadas. Entretanto, o grau de informatividade populacional pode variar entre as populações. A contaminação da amostra também poderia levar a uma falsa interpretação do resultado (MURPHY *et al.*, 2015).

2.10 POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO

O polimorfismo de comprimento refere-se a nucleotídeos que apresentam um padrão consecutivo de repetição. Esses marcadores diferem quanto ao número de blocos de uma sequência que se repete continuamente, conforme a quantidade das unidades de repetição (PANNEERCHELVAM; NORAZMI, 2003; BRDICKA; NURNBERG, 1993). A quantidade de unidades repetitivas corresponde à designação do alelo que pode conter unidades de repetição incompletas ou microvariantes (PANETO, 2003; BUTLER, 2005). Os polimorfismos de comprimento são classificados conforme o número das unidades de repetição em VNTRs e STRs (SCHLÖTTERER, 2004).

Os minissatélites, ou VNTRs, são marcadores moleculares com unidades de repetição que variam de sete a 64 pares de bases. Apresentam um alto grau de polimorfismo que favorece a identificação genética. Os VNTRs foram amplamente utilizados na técnica do “*DNA fingerprints*”. Entretanto, o padrão complexo das bandas dificultava a interpretação dos resultados, além de apresentar a desvantagem das grandes quantidades de DNA necessárias à sua análise (SCHLÖTTERER, 2004).

Os microssatélites ou STRs (do *inglês short tandem repeats* ou repetições curtas em tandem) correspondem a fragmentos de 80 a 400 pares de bases que possuem de duas a seis unidades de repetição (di, tri, tetra, penta ou hexaméricas). São marcadores codominantes, multialélicos e, quando combinados, conferem um alto poder de discriminação. Correspondem a cerca de 3% do genoma humano e estão distribuídos de modo não uniforme dentre os cromossomos (FAN; CHU, 2007; CHEN *et al.*, 2009).

Os marcadores STRs apresentam uma nomenclatura padrão, composta por quatro codificações: a letra “D” (DNA), cromossomo de localização, a letra “S” (*single copy sequence*) e o número do *locus* no qual o marcador foi descrito (BUTLER, 2005; FAN; CHU, 2007). Outras STRs são nomeadas conforme a sequência de repetição (GATA), ou conforme a localização de determinada sequência gênica, a exemplo do

marcador TH01, que está localizado no íntron 1 do gene tirosina hidroxilase (BUTLER, 2005).

Os *loci* dos marcadores STRs dos kits comerciais estão localizados em cromossomos distintos, de modo que é possível assumir que a sua segregação ocorre independentemente durante a meiose. Alguns marcadores moleculares podem se encontrar no mesmo cromossomo (e.g. CSF1PO/D5S818, cromossomo 5; Penta D/D21, cromossomo 21). Entretanto, a distância entre eles (respectivamente 26,3 Mb e 24,4 Mb) garante a independência da segregação dos seus alelos (BUTLER, 2006; GILL, 2002).

As STRs podem ser classificadas, conforme o tipo de repetição neles encontradas, em perfeito, imperfeito, interrompido ou composto. As STRs do tipo perfeito apresentam sequência de bases que se repetem continuamente e sem interrupção. As imperfeitas possuem um nucleotídeo diferente entre as unidades de estrutura repetitiva. As STRs interrompidas, por sua vez, são àquelas cuja unidades de repetição apresentam uma pequena quantidade de nucleotídeos que diferem da unidade repetitiva. E, finalmente, as STRs compostas possuem mais de um tipo de repetição em série adjacente (BHARGAVA; FUENTES, 2009).

O grande número de divisões celulares aumenta a probabilidade de ocorrerem as mutações esporádicas, resultantes de falhas nos mecanismos de contenção celulares. A variação alélica das STRs decorre de *crossover* desigual ou escorregamento de replicação e envolve a perda ou ganho de números de unidades de repetição, consistentes com as mudanças de comprimento que surgem principalmente por uma troca desigual de material genético na meiose. A instabilidade germinativa deve ser levada em consideração quando da interpretação dos resultados em análises de vínculos genéticos (JEFFREYS, 1998). A taxa de mutação das STRs difere em virtude de alguns fatores (e.g. *locus*, alelos, número de repetições, tipos de microssatélites, tamanho do alelo, posição do cromossomo ou heterosigiosidade), variando de 10^{-5} a 10^{-2} de eventos de mutação por *locus* por geração (BHARGAVA; FUENTES, 2009).

Apesar de os dinucleotídeos serem os tipos de repetições mais abundantes no genoma, os tetranucleotídeos são os marcadores empregados em kits validados para o uso forense (FAN; CHU, 2007; CHEN *et al.*, 2009). Quanto mais marcadores STRs forem utilizados em uma análise, maior o poder de discriminação, já que a probabilidade de um indivíduo possuir o mesmo número de repetições em todos os

marcadores que um outro na população geral é extremamente baixa (PANNEERCHELVAM; NORAZMI, 2003).

2.11 STRS AUTOSSÔMICOS DE USO FORENSE

Os primeiros marcadores STRs autossômicos de sistema multiplex utilizados na identificação humana foram descritos na década de 1990, incluindo um sistema de quatro *loci* (TH01, VWA, FES/FPS E F13A1). Uma segunda geração multiplex (SGM, do inglês *second generation multiplex*) consistiu dos marcadores TH01, VWA, FGA, D8S1179, D18S51 e D21S11. Em 1995, surgiu um sistema SGM com a amelogenina, que possibilitou a determinação do gênero dos indivíduos. Outros marcadores moleculares importantes surgiram, como os PENTA (Promega), que apresentam grande variabilidade e baixo índice de *stutter*.

Em 1996, o laboratório do FBI (do inglês, *Federal Bureau of Investigation*) fomentou uma campanha para a validação dos *loci* STRs para a análise de vestígios criminais. Os *loci* STRs avaliados foram: CSF1PO; F13AO1; F13B; FES/FPS; FGA; TH01; LPL; TPOX; vWA; D3S1358; D5S818; D7S820; D8S1179; D13S317; D16S359; D18S51; e D21S11. Destes, 13 loci foram selecionados: CSF1PO; FGA; TH01; TPOX; vWA; D3S1358; D5S818; D7S820; D8S1179; D13S317; D16S359; D18S51; e D21S11 (BUDOWLE et al., 1998).

Atualmente, 20 marcadores são utilizados pelo sistema CODIS (CSF1PO; FGA; TH01; TPOX; VWA; D3S1358; D5S818; D7S820; D8S1179; D13S317; D16S539; D18S51; D21S11; D1S1656; D2S441; D2S1338; D10S1248; D12S391; D19S433; e D22S1045), juntamente com a amelogenina. O aumento do número de marcadores possibilitou a ampliação do poder de discriminação. O acréscimo de novos marcadores foi justificado pelo grau de informatividade, poder de discriminação, baixa taxa de mutação e desempenho para a resolutividade dos casos forenses (HARES, 2012).

As primeiras STRs admitidas na Comunidade Europeia foram os marcadores moleculares TH01 e vWA, recomendados a partir de dados experimentais colaborativos realizados em 1992 pela EDNAP (do inglês, *European DNA Profiling Group*). Em 1998, a Organização Internacional de Polícia Criminal (INTERPOL, do inglês, *The International Criminal Police Organization*) incentivou o uso das STRs TH01, vWA, FGA e DS21S11, para a identificação de agressores de abuso sexual

infantil e a criação de um banco de dados para esse fim. Esses marcadores foram multiplexados e denominados conjunto de *loci* Padrão Europeu (ESS, do inglês *European Standard Set loci*). Um ano depois, um conjunto de *loci*, que incluía os marcadores D3S1358, D8S1179 e D18S51, foi acrescentado aos marcadores da Interpol e posteriormente incluídos ao ESS por recomendação da Rede Europeia de Institutos de Ciências Forenses (ENFSI do inglês, *European Network of Forensic Science Institutes*) (MARTIN *et al.* 2001; SCHNEIDER, 2009).

Vários países europeus aderiram aos marcadores ESS, quando, em 2005, foi assinado o Tratado de Prüm, com o objetivo de intensificar a cooperação internacional contra o terrorismo, a criminalidade e a migração ilegal entre fronteiras. Nesse mesmo ano, o ENFSI e a EDNAP sugeriram a adição de novos marcadores, com o intuito de aumentar o poder discriminatório na identificação. Atualmente, a comunidade europeia tem como recomendação atual o uso das STRs FGA; TH01; VWA; D1S1656; D2S441; D3S1358; D8S1179; D10S1248; D12S391; D18S51; D21S11; D22S1045; bem como os *loci* adicionais D2S1338, D16S539, D19S433, SE33 (MARTIN *et al.*, 2001; SCHNEIDER, 2009).

Em virtude da abundância das STRs e a otimização dos processos laboratoriais pelo uso da PCR, os sistemas *multiplex* dos kits atualmente empregados no campo da genética forense tornaram-se uma importante ferramenta para a identificação de vestígios criminais (PLANZ; HALL, 2012). O uso de sistemas multiplex possibilita a amplificação simultânea de vários *loci* em uma única reação. A análise das STRs pelos laboratórios forenses em todo o mundo foi consolidada por meio de bancos de frequências alélicas populacionais, aliada à comercialização de kits forenses validados para essa finalidade (BUDOWLE, 2003).

Os marcadores com a maior taxa de mutação são os mais polimórficos e os que apresentam um maior número de alelos (*e.g.* SE33, FGA e D18S51). Em contrapartida, uma amplitude de alelos pode resultar em uma amplificação de moléculas maiores (*e.g.* FGA, 160 pb) que podem não amplificar tão satisfatoriamente como marcadores de baixo peso molecular. Nesses casos, a ocorrência de *dropout* é possível, sendo recomendado o uso de miniSTRs, especialmente em casos de amostras degradadas. Uma característica importante diz respeito a frequência de distribuição dos alelos. Marcadores moleculares, como o TPOX e TH01, apresentam uma frequência alélica superior a 60% em algumas populações. Entretanto, a menor taxa de mutação os torna importantes em casos de investigação de parentesco. Desse

modo, os testes de identidade humana podem diferir quanto às necessidades, por meio de marcadores STRs mais ou menos polimórficos (BUTLER, 2006; GILL, 2002).

2.12 CROMOSSOMO Y E MARCADORES Y-STRS

O sequenciamento do cromossomo Y foi concluído em 2003, por Skaletsky e colaboradores (SKALETSKY et al., 2003). O cromossomo Y apresenta cerca de 60 milhões de pares de bases (Mb), sendo um dos menores cromossomos humanos (~2% do DNA humano). É composto por duas regiões distintas: eucromatina (codificante) e heterocromatina (não codificante), conforme pode ser visto na Figura 7 (SILVA, 2011; QUINTANA-MURCI; KRAUSZ; MCELREAVEY, 2001; GUSMÃO; BRIÓN; GOMES, 2008).

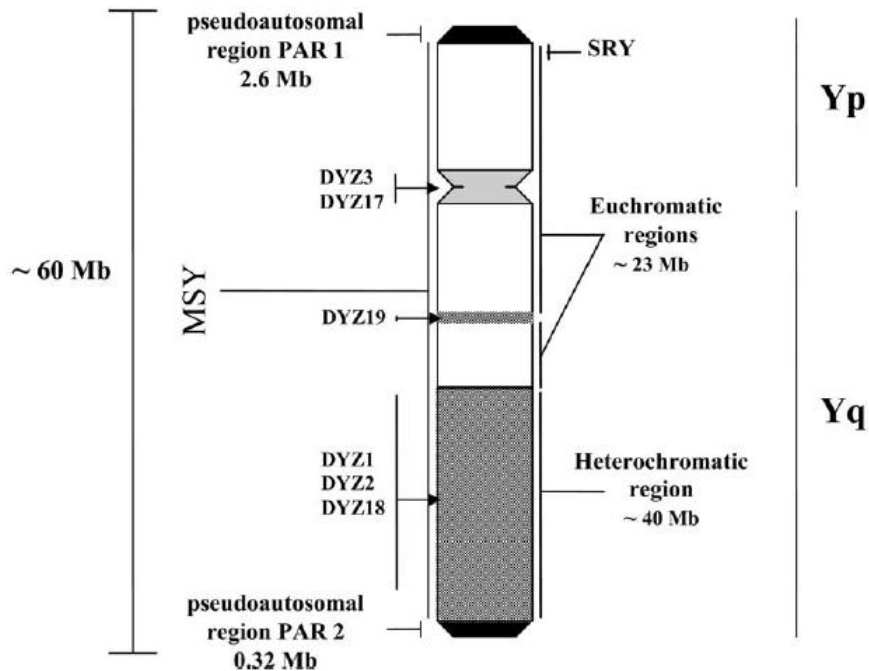
Estudos genômicos revelaram que a maior parte do cromossomo Y consiste em uma região não codificante (NRY) que é isenta de recombinação meiótica. Esta fração corresponde a 95% de seu comprimento (QUINTANA-MURCI; KRAUSZ; MCELREAVEY, 2001). Por se tratar de uma região de alta recombinação não homóloga que ocorre dentro desse local específico do cromossomo Y, atualmente é reconhecida como região específica masculina ou MSY (do inglês, *male-specific region*) (QUINTANA-MURCI; KRAUSZ; MCELREAVEY, 2001; BUTLER, 2005; ROHLFING et al., 2003; GUSMÃO; BRIÓN; GOMES, 2008).

O MSY é uma porção do cromossomo Y composta por regiões heterocromáticas (centrômero e porção distal e proximal do braço longo [Yq] do cromossomo Y) e eucromáticas (possui sequências homólogas ao cromossomo X, sequências repetitivas do Y e 27 genes codificadores de proteínas). A MSY é flanqueada em ambas extremidades por regiões pseudo-autossômicas, localizadas nas extremidades dos braços do cromossomo Y, denominadas PAR1 (2,6 Mb) e PAR2 (0,32 Mb), onde ocorre a recombinação da meiose masculina (QUINTANA-MURCI; KRAUSZ; MCELREAVEY, 2001; BUTLER, 2005; ROHLFING et al., 2003; GUSMÃO; BRIÓN; GOMES, 2008; IIDA; KISHI, 2005). Cerca de 70% do DNA do cromossomo Y é composto por regiões polimórficas que se repetem sequencialmente, em especial a região heterocromática do braço longo (MARTINS, 2008; GUSMÃO, BRÍON; GOMES, 2008; IIDA; KISHI, 2005).

A figura 7 demonstra a arquitetura do cromossomo Y e suas dimensões. Em destaque, a região MSY (região específica masculina) e as regiões recombinantes

PAR1 e PAR2. Pode-se observar o braço longo [Yq] do cromossomo Y, onde estão localizadas as famílias de DNA altamente repetitivo DYZ1, DYZ2 e DYZ18.

Figura 7 - Estrutura do cromossomo Y.

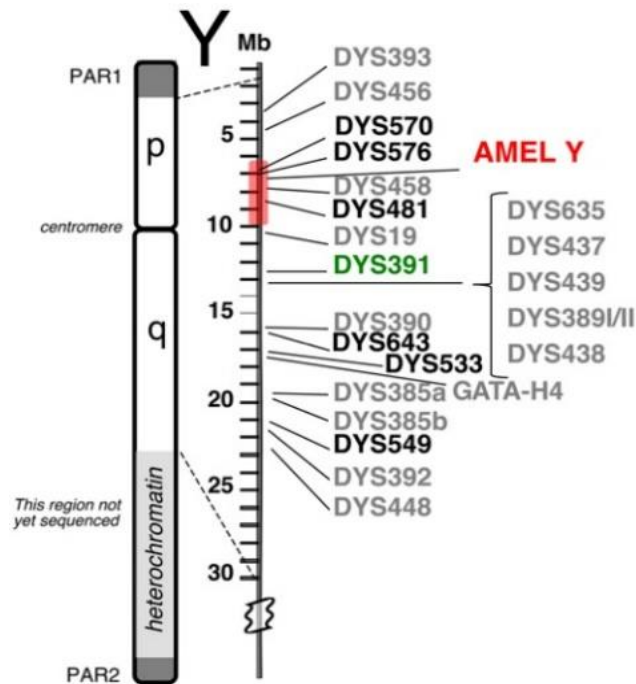


Fonte: Gusmão, 2008.

As Y-STRs são polimorfismos de STRs do cromossomo Y (haplótipos) localizados na região MSY e que correlacionam linhagens masculinas (Figura 8) (ALGHAFRI, 2017; IIDA; KISHI, 2005). A maior parte dos marcadores Y-STRs de uso forense são do tipo *loci* único (GUSMÃO *et al.*, 2006). Ainda que outras regiões do genoma contenham locais mais polimórficos, os marcadores Y-STRs possuem maior variação de frequências alélicas entre diferentes populações do que outros marcadores cromossômicos em virtude da deriva, da recombinação e da patrilocidade comum às populações humanas, além de possuírem a maior diversidade interpopulacional do genoma humano. As Y-STRs são, portanto, importantes no rastreamento da genealogia individual, do traçado histórico demográfico e da imigração humana (BALANOVSKY *et al.*, 2017). À exemplo do mtDNA, os haplótipos Y-STRs correspondem às informações de regiões não-recombinantes de linhagem que são compartilhadas por indivíduos, mas que não permitem a individualização obtida pelos marcadores STRs autossômicos (GUSMÃO *et al.*, 2006).

Na figura 8 o destaque em vermelho ao redor da AMEL Y pode estar ausente, resultando na falta de marcadores desta região em um perfil completo.

Figura 8 – Y-STRs de uso forense.



Fonte: <https://www.promega.com.br/resources/profiles-in-dna/2012/variability-of-new-str-loci-and-kits-in-us-population-groups/>.

As Y-STRs são utilizadas pela comunidade forense em apoio às STRs autossômicas para o estabelecimento de vínculos genéticos ou em casos de identificação humana. Apesar de não serem tão discriminatórias quanto às autossômicas, estes marcadores são particularmente úteis em casos de mistura, como em casos de violência sexual em que o material genético feminino é amplificado preferencialmente (ALSHAMALI *et al.*, 2004).

Os primeiros marcadores Y-STRs utilizados na prática forense foram descobertos em experimentos de clonagem ou recuperados *in silico* a partir do Banco de Dados do Genoma Humano (BALLANTYNE *et al.*, 2010). Os marcadores incluíam nove *loci* que foram selecionados na década de 1990 pela comunidade europeia e foram denominados haplótipos mínimos de *loci* (MHL, do inglês, *minimal haplotype loci*). Estes ainda constituem o núcleo dos kits Y-STRs de uso forense atual (DAEID; HOUCK, 2010). Os marcadores selecionados para compor o MHL foram os Y-STRs tetranucleotídeos DYS19, DYS389/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS385a/b e o Y-STR trinucleotídeo DYS392. Em 2003, o uso dos marcadores DYS438 e DYS439 foi recomendado pelo SWGDAM (do inglês, *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*) (BUTLER, 2006; GILL, 2002).

Diversos kits multiplex vêm sendo desenvolvidos com a inserção de novos marcadores Y-STRs, a exemplo de seis marcadores altamente polimórficos (DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, Y GATA H4, DYS635), desenvolvidos pela *Applied Biosystems*, e seis Y-STRs altamente discriminativas (DYS481, DYS533, DYS549, DYS570, DYS576 e DYS643), desenvolvidas pela Promega Corporation. Estes últimos, apresentam uma ampla diversidade gênica e um alto poder de discriminação entre indivíduos do sexo masculino não relacionados, em virtude da alta taxa de mutação (THOMPSON *et al.*, 2012). O sequenciamento da região eucromática tornou mais viável a busca por novos marcadores Y-STRs, sendo possível a identificação de marcadores RM Y-STRs (PURPS; SIEGERT; WILLUWEIT, 2014). Os marcadores de rápida mutação (RM-YSTRs) apresentam taxa de mutação acima de 10^{-2} por geração, sendo particularmente úteis em casos de identificação de parentes do sexo masculino de mesma linhagem (ALGHAFRI *et al.*, 2017; BALLANTYNE *et al.*, 2012).

Em contrapartida, as Y-STRs apresentam taxa de mutação de cerca de 10^{-3} por geração, sendo utilizadas na determinação de linhagens paternas, e a taxa de mutação de Y-STRs é cerca de 10^5 maior do que as de YSNPs (GUSMÃO *et al.*, 2006).

A grande diversidade das Y-STRs decorre das taxas de mutação e aumento da diversidade alélica. Assim como as STRs autossômicas, o número de repetições por *locus*, a complexidade do STR e o tamanho das unidades de repetição contribui para o aumento da taxa de mutação (BALLANTYNE *et al.*, 2010). Como o haplótipo é transmitido como um único bloco, as estimativas de frequência devem ser definidas para o haplótipo como um todo. Almeja-se que o potencial de distinção entre parentes pertencentes da mesma linhagem seja alcançado, em virtude da acumulação de mutações entre as gerações (GUSMÃO *et al.*, 2006; BALLANTYNE *et al.*, 2010). Nos testes de paternidade, a aplicabilidade dos Y-STRs é limitada, sendo considerado um exame excludente e capaz de correlacionar indivíduos de mesma patrilinearidade (GUSMÃO; BRIÓN; GOMES, 2017). As taxas de mutação devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados de Y-STRs, haja vista que uma discordância de um alelo de pai para filho, pode significar tão somente a ocorrência de uma mutação (PINTO; GUSMÃO; AMORIM, 2014).

Um estudo realizado por Jannuzzi e colaboradores (2017), avaliou os perfis de 25 Y-STRs obtidos por meio do Kit comercial *YFiler® PLUS PCR Amplification Kit* (Applied Biosystems), de um total de 518 indivíduos do sexo masculino sem relação

de parentesco, provenientes do Maranhão (N = 114), Espírito Santo (N = 76), São Paulo (N = 126) e Rio de Janeiro (N = 126). A análise da distância genética indicou homogeneidade entre as populações testadas. No total, 14 haplótipos foram compartilhados entre dois indivíduos oriundos do Espírito Santo (1), Maranhão (5) e Rio Grande do Sul (8). Os mesmos indivíduos foram analisados considerando-se os 16 marcadores Y-STRs presentes no kit comercial AmpFLSTR Yfiler PCR Amplification kit (Applied Biosystems) e foi relatado o aumento de haplótipos coincidentes dos indivíduos provenientes do Espírito Santo (2), Maranhão (7) e Rio Grande do Sul (11). Esses dados permitiram inferir sobre o aumento do poder de discriminação dentro das populações (JANNUZZI *et al.*, 2017).

A determinação das frequências do haplótipo Y-STR em diferentes populações é importante para a interpretação do perfil genético coincidente ou não entre dois ou mais indivíduos do sexo masculino e são dados de rotina na prática forense (GUSMÃO; BRIÓN; GOMES, 2007). A base de dados disponível no site www.yhrd.org (Y-STR Haplotype Reference Database) é a maior base populacional mundial que dispõe de informações acerca das taxas de mutação e outras informações de dados populacionais das frequências alélicas utilizadas para o uso genealógico e filogenético (GIARDINA, NOVELLI; 2011; PINTO; GUSMÃO; AMORIM, 2014).

2.13 HAPLÓTIPOS E HAPLOGRUPOS

Pode-se definir haplótipos como um grupo de alelos correlacionados, geralmente herdados como uma unidade que raramente sofre recombinação. Estes alelos tendem a ser transmitidos em bloco, delimitados por pontos de recombinação (*hotspots*), que correspondem a cerca de 6% da sequência do genoma. Em virtude da proximidade física entre os alelos presentes no bloco, o que dificulta a recombinação, estes podem ser tratados como um *locus* altamente polimórfico (NATA; BRINKMANN; ROLF, 2003). Cerca de 60% da recombinação do genoma ocorre nos *hotspots*. Portanto, a variabilidade genética aumenta em virtude da quantidade de marcadores presentes nos haplótipos, sendo possível determinar a origem ancestral de amostras desconhecidas (GIARDINA; NOVELLI, 2011).

As árvores filogenéticas possibilitam a visualização da evolução, que pode ser observada através das relações de linhagem paterna por meio do cromossomo Y. O

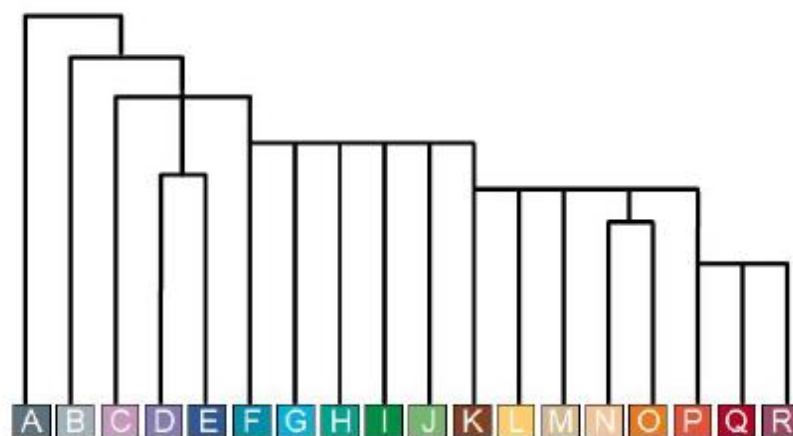
teste genealógico dos haplótipos do cromossomo Y pode ocorrer por meio da observação dos segmentos Y-STRs, haja vista ocorrerem pequenas alterações entre as gerações. O conjunto de haplótipos semelhantes que compartilham um ancestral comum caracteriza um haplogrupo, que é utilizado para definir as populações (RUZGAR; ERCIYES, 2001).

A filogenia do cromossomo Y possui 18 haplogrupos principais, relacionados às letras maiúsculas A – R (Figura 9). Os haplogrupos se originam a partir do A, seguindo-se as ramificações em subclados. A letra Y corresponde ao haplogrupo mais inclusivo e inclui os demais supracitados. Cada subclado é nomeado por um sistema alfanumérico composto por letras minúsculas. Outra nomenclatura sugere o maior haplogrupo seguido da informação de mutação terminal. Os haplogrupos e a geografia geralmente estão correlacionados, podendo-se avaliar os padrões de migração, subestrutura populacional e miscigenação (GUSMÃO; BRIÓN; GOMES, 2007).

Estudos comparativos entre os haplogrupos das cinco populações geopolíticas do Brasil demonstraram que a variação haplotípica entre os Y-STRs não é significativa, sugerindo-se o uso de uma mesma frequência alélica populacional brasileira para marcadores Y-STRs (GRATTAPAGLIA *et al.*, 2005). Apesar de estudos genéticos das populações da Região Nordeste do Brasil apresentarem algumas semelhanças entre as regiões brasileiras, considera-se a necessidade de obter resultados mais representativos e estratificados da população maranhense.

Na figura 9 os haplogrupos se originam a partir do A, quando ocorrem as ramificações subsequentes que formam novos haplogrupos.

Figura 9 - Filogenia simplificada do Cromossomo Y demonstrando os principais haplogrupos.



Fonte: Ruzgar; Erciyes, 2011.

2.14 BANCOS DE PERFIS GENÉTICOS

Os bancos de dados de perfis genéticos são instrumentos utilizados para colaborar com a resolução de crimes por meio do confronto automatizado de perfis genéticos de diversas fontes de vestígios de locais de crimes, suspeitos, condenados e pessoas desaparecidas e seus familiares. Estes bancos de dados são regulados conforme a legislação de cada país, que estabelece, por exemplo, o número mínimo de STRs admitidos para a inclusão nos bancos de dados (SCHNEIDER, 2009). A primeira legislação relacionada ao uso do banco de dados foi aprovada nos Estados Unidos em 1989, no Estado da Virgínia, e permitia a coleta e o armazenamento de amostras de DNA dos condenados (BONACCORSO, 2010).

A primeira base nacional de perfis genéticos STRs foi criada em 1995, no Reino Unido (MARTIN; SCHMITTER; SCHNEIDER, 2001; BONACCORSO, 2010). Ao final de 1999, o banco já contava com mais de 700 mil perfis genéticos. Em 1998, outros três países europeus criaram os seus bancos de dados (Holanda, Alemanha e Áustria). Como cada banco de perfil genético é regulado conforme a legislação de cada país, os tipos de marcadores STRs utilizados na Alemanha diferiam dos demais, respectivamente (TH01, vWA, FGA, D8S1179, D18S51 e D21S11; TH01, vWA, FGA, SE33 e D21S11). Entretanto, em todos os casos, se houvesse uma correspondência entre perfis genéticos constantes no banco, a confirmação ocorria por meio de outro conjunto de *loci* (SCHNEIDER, 2009; MARTIN; SCHMITTER; SCHNEIDER, 2001).

O uso dos marcadores STRs para fins criminais tornou-se possível em virtude de as informações genéticas serem traduzidas em dados não relacionados às características fenotípicas do indivíduo. A admissão de informações que pudessem ser traduzidas em características físicas (e.g. cor dos olhos, cor da pele, estatura, entre outras) poderiam levar à estigmatização e discriminação, posturas contrárias às Declarações da UNESCO sobre o tema: Genoma Humano e os Direitos Humanos (1997); Dados Genéticos Humanos (2003); e Bioética e Direitos Humanos (2005).

O CODIS foi o programa criado pelo FBI para a comparação de perfis genéticos de DNA (PANNEERCHELVAM; NORAZMI, 2003). Por ser um sistema integrado, o CODIS possibilita a comunicação de dados em âmbitos local, estadual e nacional, por meio da comparação de perfis de DNA. A troca de informações entre os bancos nacionais e internacionais ocorre por meio da INTERPOL (BUDOWLE *et al.*, 1998). As informações depositadas no CODIS apresentam apenas um código anônimo individualizador, haja vista, como afirma Nunes (2012):

“O perfil genético constitui um valor em si próprio que comporta a dignidade do ser humano como indivíduo singular e a dignidade da espécie humana como um todo, que deve ser respeitado e protegido”.

O Banco de Perfil genético da Interpol (do inglês, *INTERPOL'S DNA DATABASE*) contém mais de 180 mil perfis e 84 países membros. Atualmente, 52 países utilizam o CODIS.

No Brasil, o Ministério da Justiça (MJ), por meio da Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP), financia, desde 2002, a implantação e adequação dos laboratórios de Genética Forense no Brasil. Cursos de capacitação nesta temática foram disponibilizados aos estados brasileiros, bem como a doação de equipamentos para a implantação dos laboratórios estaduais. O uso do CODIS no Brasil foi autorizado pelo FBI em maio de 2010. Nessa mesma época, 18 peritos estaduais e dois peritos federais foram capacitados para utilizarem os servidores que foram enviados aos estados. O sistema CODIS apresenta dois módulos independentes, um que gerencia o perfil genético de vestígios e outro de pessoas desaparecidas, familiares e restos mortais não identificados (FIGUEIREDO, 2010). Os bancos estaduais sincronizam ao menos uma vez na semana as suas informações com o Banco Nacional de Perfis Genéticos. A INTERPOL gerencia as informações entre os bancos internacionais (FIGUEIREDO, 2010).

Em 12 de março de 2013, foi instituída (Decreto nº7950/2013-MJ) a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG). A RIBPG tem como principal objetivo manter, compartilhar e comparar os perfis genéticos em colaboração à investigação criminal e à instrução penal, definir as medidas de segurança para o sigilo das informações (direito à intimidade genética) e o respeito aos direitos e as garantias individuais nos procedimentos que envolvem o banco de dados (BRASIL, 2013).

Há três categorias principais para a inserção de amostras no CODIS: categorias relacionadas a casos criminais; categorias relacionadas a pessoas desaparecidas e outras categorias. As categorias relacionadas a casos criminais correspondem à inserção de amostras relacionadas com ilícitos penais. A segunda categoria está relacionada a amostras de pessoas desaparecidas, vítimas de acidentes e seus parentes biológicos. Outras categorias correspondem ao perfil genético da equipe e dos profissionais que atuam no local de crime (exclusão). A comparação entre os perfis genéticos ocorre entre índices pré-estabelecidos (COMITÊ GESTOR RIBPG, 2017), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Índices de confronto dos indexadores CODIS.

	Vestígio, vestígio parcial e vestígio com mistura	Condenado, identificado criminalmente e decisão judicial	Restos mortais não identificados	Pessoa de identidade desconhecida	Referência direta de pessoa desaparecida	Familiares de pessoas desaparecidas e árvore genealógica	Equipamento e exclusão
Vestígio, vestígio parcial e vestígio com mistura	X	X	X				X
Condenado, identificado criminalmente e decisão judicial	X	X	X				X
Restos mortais não identificados	X	X	X	X	X	X	X
Pessoa de identidade desconhecida			X	X	X	X	X
Referência direta de pessoa desaparecida			X	X			X

Familiares de pessoas desaparecidas e árvore genealógica		X		X				X
Equipe e exclusão	X	X	X	X	X	X	X	X

Se por um lado, o CODIS auxilia nas investigações criminais, por outro, constitui um importante instrumento de busca de pessoas desaparecidas e restos mortais não identificados por familiares. O índice de pessoas desaparecidas auxilia na busca e identificação, em especial em corpos carbonizados, fragmentados ou em elevado estado de decomposição, por meio do intercâmbio de perfis genéticos entre os estados ou países. Em muitos casos, ossadas e corpos não identificados seriam enterrados como indigentes (HENINGER; HANZLICK, 2011).

Os bancos de dados de perfis genéticos são utilizados em diversos países. Borovko e colaboradores (2009), reportaram a criação do Banco de Dados de pessoas desaparecidas na República da Bielorrússia. Nesse estudo, mais de 350 corpos não identificados desde 1997 foram exumados para obtenção e inserção dos perfis no banco de perfis genéticos. Um software foi criado para comparar os perfis de STRs dos corpos não identificados e os parentes das pessoas desaparecidas. A programação consistia em: pelo menos 13 loci inseridos de cada perfil, perfil ideal de 15 STRs, uma incompatibilidade foi considerada como não exclusão. Todos os parentes disponíveis foram testados. Apesar das inconsistências entre os perfis STRs de restos mortais e parentes das pessoas desaparecidas, esses bancos de dados provou ser uma ferramenta útil em situações de guerras e acidentes em massa, ou casos de identificação humana (BOROVKO *et al.*, 2009).

Atualmente no Brasil, a Secretaria Nacional de Segurança Pública continua a fomentar políticas para o fortalecimento da RIBPG.

3 MÉTODO

Neste trabalho realizou-se a análise das STRs autossômicas e do cromossomo Y (Y-STRs) de elementos dentários de 52 indivíduos, cedidos pelo IML-SLZ/MA, com o intuito de estabelecer protocolos operacionais padrão (POPs) para a identificação de restos mortais humanos. Todos os procedimentos técnicos aqui descritos foram conduzidos no Instituto de Genética Forense do Maranhão – IGF/MA. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, Processo nº 2.625.726 (Anexo A), em conformidade com a Resolução CNS Nº 340, de 8 de julho de 2004.

3.1 CASUÍSTICA

Foram encaminhados 155 elementos dentários pertencentes a um total de 52 indivíduos NRNI, que foram recebidos pelo IML-SLZ no período de janeiro de 2015 a julho de 2017. Os dentes (Apêndice A, Figura 11) foram acautelados pelo IGF/MA para fins identificatórios e de inclusão no Sistema Combinado de Índices de DNA – CODIS.

3.2 CARACTERIZAÇÃO

Dos dados contidos nos laudos cadavéricos do Setor de Odontologia Legal do Instituto Médico Legal de São Luís (Maranhão), foram recuperadas as seguintes informações (compiladas na Apêndice B):

- Sexo;
- Origem geográfica;
- *Causa mortis*;
- Data de entrada no IML-SLZ/MA;
- Cor da pele (melanoderma, faioderma e leucoderma);
- Estatura;
- Estado de decomposição (rigidez cadavérica, flacidez, putrefação, coliquativa, gasosa, esqueletização);
- Identidade (NRNI e NR).

3.3 DESCONTAMINAÇÃO E SECCIONAMENTO

Os dentes eram originalmente armazenados à temperatura ambiente, em tubos de ensaio com tampa. O protocolo de descontaminação adotado foi proposto por Gaytmenn (2003). Cada dente foi descontaminado à temperatura ambiente por meio da imersão do elemento dentário em hipoclorito 5,25% (20 minutos), água livre de DNA (20 minutos) e lavagem em etanol 95%.

Os elementos dentários permaneceram em processo de secagem de um dia para o outro, sendo em seguida armazenados à temperatura ambiente. Os dentes de cada indivíduo foram classificados em molar, pré-molar, canino e incisivo (Tabela 8, Apêndice C). A escolha dos elementos dentários submetidos à extração seguiu a ordem de classificação supracitada, que priorizou a análise de dentes que supostamente forneceriam quantidades mais expressivas de DNA.

Cada dente foi imobilizado com chave inglesa, para facilitar o seu manuseio. Baseado no seccionamento proposto por Gaytmenn e Sweet (2003), a coroa de cada dente foi fracionada da raiz, por meio do instrumento Dremel 3000 (Bosch), com disco de corte reforçado (Heavy Duty), conforme demonstrado na Figura 12 (Apêndice D). A raiz foi, sempre que possível, fracionada em duas porções. Para fins de análise, optou-se pela raiz, por sabidamente conter maior concentração de DNA. Antes e após cada uso, a chave inglesa e o dremel eram descontaminados com soluções de hipoclorito 2% e álcool 70%.

3.4 PRÉ-TRATAMENTO

As raízes dos elementos dentários foram submetidas a dois tipos de pré-tratamento: pulverização e desmineralização, de acordo com os procedimentos descritos nos itens a seguir:

3.4.1 Pulverização

A pulverização tinha como objetivo aumentar a superfície relativa de contato, favorecendo a cinética de reação para a lise do DNA. O fragmento foi inserido no recipiente metálico (Grinding Jar, S Steel – 10 mL) contendo uma *bead* metálica de 20 mm (*Grinding ball* – 20mm) e posicionado no pulverizador Tissue Lyser II (Qiagen). As

raízes eram trituradas a uma frequência de 30 Hz por 10 segundos. As amostras pulverizadas foram transferidas para microtubos individuais de 2,0 mL, que eram rotulados e armazenados à temperatura ambiente.

Os recipientes e a *beads* foram descontaminados segundo as orientações do fabricante, usando-se água destilada e detergente neutro. Em seguida, eram incubados por um minuto em HCl 0,4 M, à temperatura ambiente (15 a 25°C), com a finalidade de degradar o DNA e evitar a contaminação cruzada. As peças foram lavadas em água livre de DNA para remoção do HCl e mantidas à temperatura ambiente. Antes e após o uso, foram submetidas à luz UV durante 15 minutos (QIAGEN, 2018).

3.4.2 Desmineralização

A desmineralização tinha como objetivo a destruição da porção inorgânica dos dentes, por meio da remoção do cálcio (descalcificação). Os protocolos aqui descritos utilizaram o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) como agente quelante dos íons bivalentes Mg^{+2} e Ca^{+2} , favorecendo o acesso ao material orgânico.

As raízes foram incubadas em EDTA, conforme metodologia proposta por Loirelle (2007). Foi utilizada a proporção de 15 mL de EDTA 0,5 M para cada grama de dente; as raízes eram mantidas à temperatura ambiente em solução por 120 horas. Lâminas da amostra foram feitas com bisturi estéril e transferidas para microtubos (2,0 mL), identificadas e mantidas à temperatura ambiente.

3.4.3 Extração

O processo de extração consistiu em duas etapas principais: rompimento das membranas celulares e purificação do DNA. Os elementos dentários foram submetidos ao processo de extração por três métodos distintos, com o objetivo de avaliar qual destes protocolos era mais indicado para a recuperação de DNA: 1) extração orgânica; 2) Chelex; e 3) sistema automatizado de purificação. Os métodos de extração orgânica e automatizado foram testados com amostras em suas versões pulverizada e desmineralizada, enquanto a extração por Chelex o foi apenas nas amostras pulverizadas.

3.4.4 Extração Orgânica

A primeira etapa da extração orgânica visava lisar as membranas plasmáticas, nucleares e de organelas por meio da ação do dodecil sulfato de sódio (SDS) e ditioneína (DTT) em uma solução tamponante (pH = 8,0) para liberar o DNA para a fase aquosa. A opção por este valor de pH justificou-se por ser àquele ideal para a purificação de DNA. Em faixas de pH mais baixas, o DNA tende a se deslocar para a interface ou até mesmo a se desnaturar e migrar para a fase orgânica (pH < 7,0).

O DNA liberado foi submetido a um processo de purificação e isolamento (eliminação dos restos celulares, compostos por proteínas, carboidratos e lipídios). As proteínas e as enzimas foram desnaturadas por meio do uso da Proteinase K (Qiagen) acrescentada ao tampão de lise. O EDTA presente na solução tampão atuou como agente quelante dos íons bivalentes Mg^{+2} e Ca^{+2} , cofatores de enzimas nucleares que podem degradar o DNA.

A purificação do material foi realizada por meio do uso de uma solução composta por fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1 v/v). A separação foi realizada através do emprego de uma solução heterogênea na qual as proteínas se depositavam na interface da fase orgânica (fenol e clorofórmio), enquanto o DNA permanecia na fase aquosa (camada superior). O álcool isoamílico foi adicionado para evitar a formação de espuma pela centrifugação e para remover o fenol remanescente. As amostras de DNA foram recuperadas através da membrana concentradora Microcon™ (Millipore), com a finalidade de concentrar e recuperar o DNA.

O protocolo utilizado foi o proposto por Ricaut et al. (2004), Malaver e Yunis (2003), Smith et al. (1993), com modificações. Em tubos de 2,0 mL, identificados e contendo 200 mg de cada amostra, foram adicionados 600 µL de tampão de extração (10mM Tris HCl, 10mM EDTA, 100mM NaCl, SDS 2%, pH 8,0), 60 µL de Proteinase K e 30µL de DTT, que permaneciam em incubação por um período de 24 horas a 56°C em ThermoStat C (Eppendorf).

Após a incubação, foram adicionados 600 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 v/v) e os microtubos eram submetidos à agitação em vortex MixMate (Eppendorf) até a formação de uma emulsão leitosa. As amostras foram centrifugadas por sete minutos a 9.700 G em centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf).

A fase aquosa (camada superior) foi transferida para um microtubo (Microcon™) e filtrado a 500 G por oito minutos, à temperatura de 25°C. O líquido filtrado foi desprezado e foram efetuadas mais duas lavagens com 500 µL de TE⁻⁴ (10mM Tris HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,5). O DNA foi recuperado em outro microtubo após a adição de 50 µL de TE⁻⁴ e inversão da membrana, após a centrifugação a 1.000g por dois minutos.

3.4.5 Extração por Chelex

O Chelex é uma resina composta por copolímeros de estireno-divenilbenzeno que possuem íons iminodiacetato que atuam como agentes quelantes de íons metálicos polivalentes, prevenindo a degradação do DNA. A proteinase K é associada à resina para a desnaturação das proteínas. Esse protocolo utiliza a temperatura para romper a membrana celular e desnaturar o DNA.

As amostras foram extraídas conforme o protocolo proposto por Tsuchimochi et al. (2002). Em microtubos de 1,5 mL, foram acrescentados 1 mL de TE⁻⁴ e 50 mg da amostra, que eram submetidos à agitação em vórtex MixMate (Eppendorf) por 10 segundos. O material permanecia à temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação à 110 RPM em Thermoshaker (Eppendorff) e posterior centrifugação (microcentrífuga Kasvi) por cinco minutos a 10.000 G. Os sobrenadantes eram descartados, adicionando-se 150 µL de Chelex 100 5% e 50 µL de proteinase K (2mg/mL). As amostras foram incubadas em ThermoStat C (Eppendorf) a 56 °C por 30 minutos e submetidas à agitação em vórtex MixMate (Eppendorf) por 10 segundos. Em seguida, o material foi incubado a 100 °C por oito minutos, submetido a vórtex por 10 segundos e centrifugação à 10.000 G por cinco minutos em microcentrífuga (Kasvi).

3.4.6 Extração por sistema automatizado de purificação de amostras forenses

O uso do sistema automatizado de purificação de amostras forenses consistiu na lise manual e na purificação automatizada e validada para uso forense. A purificação dos produtos lisados foi realizada por meio da filtração por partículas magnéticas, nas diversas etapas de lavagem, e remoção dos inibidores.

Foram transferidos 50 mg de cada dente microtubos de 1,5mL, aos quais foram acrescentados 220 μ L de solução PrepFiler BTA™ Lysis Buffer e 3 μ L de DTT 1M e 7 μ L de Proteinase K. As amostras foram vortexadas em MixMate (Eppendorf) e incubada em ThermoMixer C (Eppendorf) a 56 °C e 1100 RPM por 18 horas. As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf) por 90 segundos a 10.000 G e os lisados foram transferidos para microtubos sem tampa. O referido material foi purificado no equipamento Automate Express™ por meio do protocolo BTA, seguindo as recomendações do fabricante (Automate Express BTA).

3.4.7 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA objetivou determinar a concentração das amostras, visando avaliar comparativamente a eficácia dos métodos de extração anteriormente descritos. Um dos principais desafios encontrados diz respeito às características intrínsecas dos materiais forenses (exiguidade, degradação, contaminação, etc.), que podem influenciar a eficiência da amplificação. A quantificação das amostras foi realizada através da PCR em tempo real, que possibilitou o monitoramento da amplificação do produto amplificado. A análise da progressão decorreu do aumento da fluorescência de cada amostra durante os ciclos de amplificação. Por ser uma reação de amplificação, a PCR teve como principais componentes: primers (iniciadores); Taq polimerase; dNTPs; tampão; sondas marcadas; e o DNA alvo.

Foram utilizadas sondas do tipo *TaqMan*®, que hibridizam em regiões STRs específicas do DNA humano (Tabela 2). Estas sondas possuem moléculas denominadas *Quencher* (Q), localizadas nas extremidades 3', e repórter (R), nas extremidades 5'. A aproximação das duas moléculas promove a inibição da fluorescência do R pelo Q. Na etapa de alongamento, a Taq polimerase hidrolisava as sondas hibridizadas em virtude da sua atividade exonucleotídica, promovendo a separação das moléculas e a liberação do R, que passou a emitir a fluorescência. Esta fluorescência era proporcional ao produto amplificado.

A quantificação do material genético foi obtida por meio do Quantifiler Trio DNA Quantification kit (Applied Biosystems) no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Importantes parâmetros foram obtidos por meio da quantificação, em virtude das propriedades das sondas empregadas, conforme

demonstrado na Tabela 3: quantidade de DNA; nível de degradação da amostra; proporção de DNA masculino e feminino; e presença de inibidores.

Na tabela 2 os alvos SA e Y são amplicons curtos, úteis para quantificar amostras degradadas. O alvo LA é utilizado para avaliar o índice de degradação, por meio da razão entre a concentração de SA e LA. O IPC é um DNA sintético que indica a presença de inibidores.

Tabela 2 – Componentes do Sistema TaqMan do Quantifiler Trio DNA Kit; alvos do DNA humano *Small Autosomal Target* (SA), *Large Autosomal Target* (LA) e DNA do cromossomo masculino (Y), Controle Interno de PCR (IPC), bem como os respectivos tamanhos dos amplicons, Reporter (molécula fluorescente) e Quencher (molécula inibidora de fluorescência).

Alvo	Tamanho do amplicon (pb)	Reporter	Quencher
Small Autosomal Target (SA)	80	VIC™	MGB
Large Autosomal Target (LA)	214	ABY™	QSY™
DNA do cromossomo masculino (Y)	75	FAM™	MGB
IPC Controle interno de PCR	130	JUN™	QSY™

Fonte: Userguide Quantifiler Trio (modificado). Disponível em <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf>.

A quantidade de DNA foi um parâmetro importante de avaliação, uma vez que os kits de amplificação funcionam em uma faixa de intervalo de concentração ótima, que é determinada pela validação interna de cada laboratório. Conforme a recomendação do fabricante, a concentração do DNA para amplificação deve ser normalizada para 1 ng de DNA. Valores acima do ideal propiciam o surgimento de artefatos que dificultam a interpretação dos resultados. Por outro lado, a quantidade reduzida de DNA resulta na possibilidade de *dropout*, o que representa a incerteza de um determinado alelo ser ou não homozigoto.

O índice de degradação da amostra foi calculado por meio da razão entre dois alvos autossômicos do DNA humano: *Small Autosomal Target* (SA) e *Large Autosomal Target* (LA). O LA é um fragmento de 214 pb, mais susceptível à degradação, sendo indicado para a avaliação de amostras degradadas. A proporção entre a quantidade dos dois marcadores permite inferir o nível estimado de degradação. O controle interno de PCR (IPC, do inglês, *Internal PCR Control*) é um controle artificial que responde quanto ao nível de inibidores presentes. Valores de

IPC acima de 29, por exemplo, indicam a presença de inibidores que prejudicam a eficiência da amplificação.

Na tabela 3 adotou-se o valor de Slope -3,32 (SA), tomando-se como parâmetro a eficiência da amplificação em 100% de reação.

Tabela 3 – Especificação dos valores de slope para os alvos Small Autosomal Target (SA), Large Autosomal Target (LA) e DNA do cromossomo masculino (Y) do kit de quantificação Quantifiler Trio DNA.

Alvos	Intervalo de Slope	Valor ótimo de slope
Small Autosomal Target (SA)	-3,0 a -3,6	-3,3
Large Autosomal Target (LA)	-3,1 a -3,7	-3,4
DNA do cromossomo masculino (Y)	-3,0 a -3,6	-3,3

Fonte: Userguide Quantifiler Trio (modificado). Disponível em <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf>.

A reação quantitativa absoluta se deu por meio da extrapolação do número de ciclos obtidos na curva de calibração, de modo a obter a concentração da amostra de interesse. A curva de calibração é um gráfico de C_t (do inglês, *Cycle Threshold*) de quantificação das reações dos padrões de diluição pré-definida e a quantidade inicial dos padrões, conforme a fórmula de regressão linear $C_t = m [\log (Q_{ty})] + b$, onde: m = inclinação da reta; b = interceptação de y; Q_t = quantidade inicial de DNA. Os valores estabelecidos para a análise da regressão linear são obtidos por meio da análise dos seguintes parâmetros:

- R^2 , que mede a proximidade da linha de regressão da curva padrão. Um valor de 1,0 significa a perfeita sobreposição entre a linha de regressão e os dados obtidos. Neste estudo, foram considerados os valores de $R^2 \geq 0,98$, como valores de ajuste entre a linha de regressão da curva de calibração e os valores de C_t obtidos dos padrões da curva de calibração.

- Coeficiente de regressão:
- *Slope*: corresponde à eficiência da amplificação da PCR (Tabela 2).

Foram adotados como referência o valor de slope do alvo SA, conforme a indicação do fabricante.

- *Y intercept*: corresponde ao valor esperado de C_t para uma amostra de $Q_{ty} = 1$.

A curva de calibração foi preparada por meio da diluição do padrão positivo (Quantifiler™ THP DNA Standard) e diluente (*Quantifiler™ THP DNA Dilution Buffer*), conforme descrito na Tabela 6. Para o *Quantifiler Trio DNA Quantification kit*, a curva padrão é linear, de 5 pg/μL a 100 ng/μL. Valores fora dessa faixa de concentração podem apresentar coeficientes de variação (CV) maiores que àqueles obtidos dentro daquele intervalo. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços. As amostras foram distribuídas conforme a Figura 10. A curva de calibração e o controle positivo foram quantificados em duplicata, seguindo a recomendação do fabricante.

O preparo do mix consistiu na adição de 8 μL de *Quantifiler™ Trio Primer Mix* (Applied Biosystems) e 10 μL de *Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix* (Applied Biosystems). O volume resultante (18 μL) foi pipetado nos poços correspondentes à curva de calibração, NTC e amostras. O volume de 2 μL foi adicionado em cada poço, dependendo do tipo de material quantificado (curva de calibração, NTC ou amostra), resultando no volume final de 20 μL. As amostras foram submetidas, então, a 95°C por dois minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por nove segundos e 60°C por 30 segundos.

Na tabela 4 curva de calibração serve como parâmetro analítico para a obtenção da concentração das amostras de interesse, por meio da diluição seriada do DNA padrão e dos seus respectivos ciclos de threshold (Ct) observados durante a quantificação absoluta. Os valores de Ct obtidos para as amostras de interesse são confrontados com os da curva padrão e por meio da extrapolação dos dados determina-se a concentração da amostra.

Tabela 4 – DNA de concentração conhecida utilizado para a diluição da curva de calibração do kit de quantificação *Quantifiler Trio DNA*.

Padrão	Concentração (ng/uL)	Fator de diluição
Std.1	50,0	2x
Std.2	5,0	10x
Std.3	0,50	10x
Std.4	0,05	10x
Std.5	0,005	10x

Fonte: Userguide Quantifiler Trio (modificado). Disponível em <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf>.

Na figura 10 em azul, observa-se a curva de calibração, realizada em duplicata. Em verde, controle negativo, também em duplicata. As amostras foram distribuídas nos poços destacados em rosa.

Figura 10 – Esquematisação da placa de quantificação das amostras forenses.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1	Std1										
B	Std2	Std2										
C	Std3	Std3										
D	Std4	Std4										
E	Std5	Std5										
F												
G												
H												

Legenda:

- Curva de calibração
- Controle negativo (NTC)

3.4.8 Amplificação

A técnica da PCR objetivou a produção de cópias do DNA alvo *in vitro* para que essas moléculas pudessem ser identificadas por meio da genotipagem. A amplificação ocorreu por meio das reações exponenciais que se processam em um gradiente de temperatura, sendo dividida em três etapas principais e que se repetem por diversos ciclos sucessivos (30 a 40 ciclos):

- Desnaturação: ocorreu a uma temperatura em torno de 95 °C, objetivando desnaturar a fita dupla de DNA por meio do rompimento das pontes de hidrogênio;
- Anelamento: etapa de ligação dos primers em sítios específicos do DNA de interesse. Ocorreu em uma faixa de temperatura em torno de 60 °C;
- Extensão: objetivou ativar a Taq polimerase, enzima responsável pela síntese da fita de DNA, por meio da incorporação de dNTPs, em torno de 60 °C.

3.4.8.1 Powerplex ®Fusion 6 C System (Promega Corporation)

O sistema multiplex *PowerPlex ®Fusion 6 C System* possibilita a co-amplificação da amelogenina (marcador que permite a identificação de gênero da

amostra), 23 *loci* STRs (CSF1PO; FGA; TH01; vWA; D1S1656; D2S1338; D2S441; D3S1358; D5S818; D7S820; D8S1179; D10S1248; D12S391; D13S317; D16S539; D18S51; D19S433; D21S11; Penta D; Penta E; D22S1045; TPOX e SE33) e 3Y-STRs (DYS391;DYS570; e DYS576).

A reação foi realizada após a adição de 5 µL de PowerPlex®Fusion 6C 5X Master Mix, 5 µL de PowerPlex ®Fusion 6C 5X Primer Pair Mix e até 15 µL de DNA. As amostras foram amplificadas, submetidas a um passo inicial de 96°C por 43 segundos, seguido de 30 ciclos de 96 °C por cinco segundos, 60 °C por um minuto e um ciclo de 60 °C por 20 minutos em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

3.4.8.2 *Ampflstr®Yfiler® Plus Pcr Amplification Kit (Applied Biosystems)*

O sistema multiplex *YFiler® PLUS PCR Amplification Kit* (Applied Biosystems) permite a co-amplificação de 25 *loci* gênicos específicos do cromossomo Y: DYS476; DYS389I; DYS635; DYS389II; DYS627; DYS460; DYS458; DYS19; Y-GATAH4; DYS448; DYS391; DYS456; DYS390; DYS438; DYS392; DYS518; DYS570; DYS437; DYS385; DYS449; DYS393; DYS439; DYS481; DYF387S1 e DYS533.

A amplificação do mix contendo 10 µL de *AmpFISTR®Yfiler®PCR Reaction Mix* e 5 µL de *AmpFISTR®Yfiler®Primer Set* e até 10 µL de DNA ocorreu a 95°C por um minuto, seguido de 30 ciclos de 94°C por quatro segundos, 61,5 °C por um minuto e um ciclo de 60 °C por 22 minutos em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

3.4.9 Genotipagem

A genotipagem pode ser compreendida como sendo a migração diferencial dos fragmentos de DNA amplificados em um capilar preenchido por uma matriz viscosa (polímero). A migração é promovida pela alta voltagem aplicada entre os tampões (cátodo e ânodo), de modo que as moléculas de DNA (que apresentam carga residual negativa) se deslocam a uma velocidade dependente da massa em sentido ao pólo positivo (ânodo). Os marcadores fluorescentes dos fragmentos são detectados após a excitação das moléculas por um laser, sendo a luz emitida em determinado comprimento de onda capturada por um detector de fluorescência. Os

kits comerciais possuem escadas alélicas que calibram a corrida (por pares de base) dos produtos de amplificação, que se traduz por uma análise computacional em picos no eletroferograma. O uso de sistemas de multiplexação possibilita a amplificação de vários *loci* simultâneos e possui um alto poder de discriminação em uma única análise.

Em uma placa de 96 poços, foram acrescentados 9,5uL de Formamida Hidi, 0,5 uL Wen IIs 500 e 1 uL das amostras amplificadas (*Powerplex® Fusion 6 c System*) ou 9,6uL de formamida Hidi, 0,4uL de GeneScan™–600 LIZ™ Size Standard e 1uL das amostras amplificadas (*YFiler® PLUS PCR Amplification Kit*). A análise dos fragmentos amplificados se deu por meio da genotipagem no equipamento Genetic Analyzer® ABI3500 (Applied Biosystems).

3.4.10 Análise dos resultados da genotipagem

Os resultados foram analisados através do Software GeneMapper ID® (Applied Biosystems), que possibilita a obtenção os perfis autossômicos STRs e Y-STRs. Os haplótipos de Y-STRs que apresentaram mais de doze marcadores Y-STRs (EMMEROVA et al., 2017) foram obtidos por meio do Y-DNA Haplogroup Predictor – NEVGEN.

4 RESULTADOS

Com base no exame odontolegal dos cadáveres, constatou-se que 25 dos indivíduos eram NRNI, enquanto 17, apesar de identificados, não foram reclamados. Em nove dos exames periciais não se dispôs de informação acerca da identidade. A maior parte dos indivíduos correspondia a faioderma (44%), seguido de melanoderma (27%), sem caracterização ou não informado (25%) e leucoderma (4%). Foi observado que a identificação racial de 11 indivíduos foi prejudicada em virtude do avançado estado de decomposição dos corpos. Dois indivíduos não foram caracterizados quanto à cor da pele e nem ao estado de decomposição. Quanto ao estado de decomposição, observou-se que em 40% dos indivíduos não havia informações acerca desse parâmetro. Dos restantes, 31% se apresentavam em decomposição tardia (putrefação, fase gasosa ou esqueletização) e 29% nas fases iniciais de decomposição (rigidez e flacidez).

As principais causas de morte foram as enfermidades e as lesões por arma de fogo. Entretanto, 20 indivíduos foram vítimas de morte violenta ou não natural (61,5%). A *causa mortis* de 19 indivíduos não foi apresentada no exame odontolegal procedido. Dos indivíduos restantes, 10 vieram à óbito por causas naturais e três por causas indeterminadas.

Para a análise dos dados obtidos na quantificação, foram considerados os valores de *slope* (-3,348) e de *Y intercept* (26,344). A concentração das amostras foi obtida por meio da expressão **Concentração (ng/uL) = $10^{(C_T-b)/m}$** , conforme descrito na seção metodológica. A maior parte das amostras apresentou IPC inferior a 29, evidenciando a eficiência dos métodos de extração e pré-tratamento e a ausência de inibidores de PCR (Tabela 9, Apêndice E). Dos métodos avaliados, as amostras pulverizadas extraídas por Chelex indicaram o IPC superior a 29 em 10 amostras analisadas. Apenas duas amostras pulverizadas e recuperadas por meio da purificação automatizada revelaram valor de IPC superior a 29.

A Tabela 10 (Apêndice F) apresenta a concentração das amostras extraídas, conforme o valor de SA (ng/μL) observado. Assumindo-se o valor de quantificação 0,01ng/uL como a concentração que se aproxima dos limites de detecção da maioria dos kits de amplificação de marcadores STRs forenses, a pulverização, seguida da purificação automatizada, foi o procedimento que obteve melhor resultado (98%), seguido da extração orgânica de amostras descalcificadas (72%), purificação

automatizada de amostras descalcificadas (51%) e extração orgânica de amostras pulverizadas (42%). A extração por Chelex apresentou rendimento inferior de reação e um maior número de amostras não amplificadas (98,0%), conforme pode ser visualizado no Gráfico 5. Para fins de análise, não foram consideradas as amostras descalcificadas para essa metodologia.

Ao serem analisados os dois protocolos de pré-tratamento (pulverização e descalcificação) em relação ao método de extração orgânico, pode-se observar conforme demonstrado nos Gráficos 1 e 2, que o protocolo de descalcificação foi mais eficiente na recuperação do DNA, observa-se a dispersão dos dados em torno do IPC Ct = 28 e as amostras apresentando concentrações acima de 0,067ng/uL..

A mesma comparação foi realizada em relação à purificação automatizada, podendo-se observar que, apesar dos maiores valores de IPC obtidos, as amostras pulverizadas apresentaram concentrações de DNA extraído superiores às das amostras descalcificadas. Esses resultados são apresentados nos Gráficos 3 e 4. As amostras pulverizadas e extraídas por Chelex apresentaram o maior número de amostras não amplificadas e altos índices de degradação, indicando a presença de inibidores (Gráficos 5 e 6).

Gráfico 1 – Relação entre o IPC (Ct) x concentração (ng/uL) de amostras descalcificadas e extraídas pelo método orgânico.

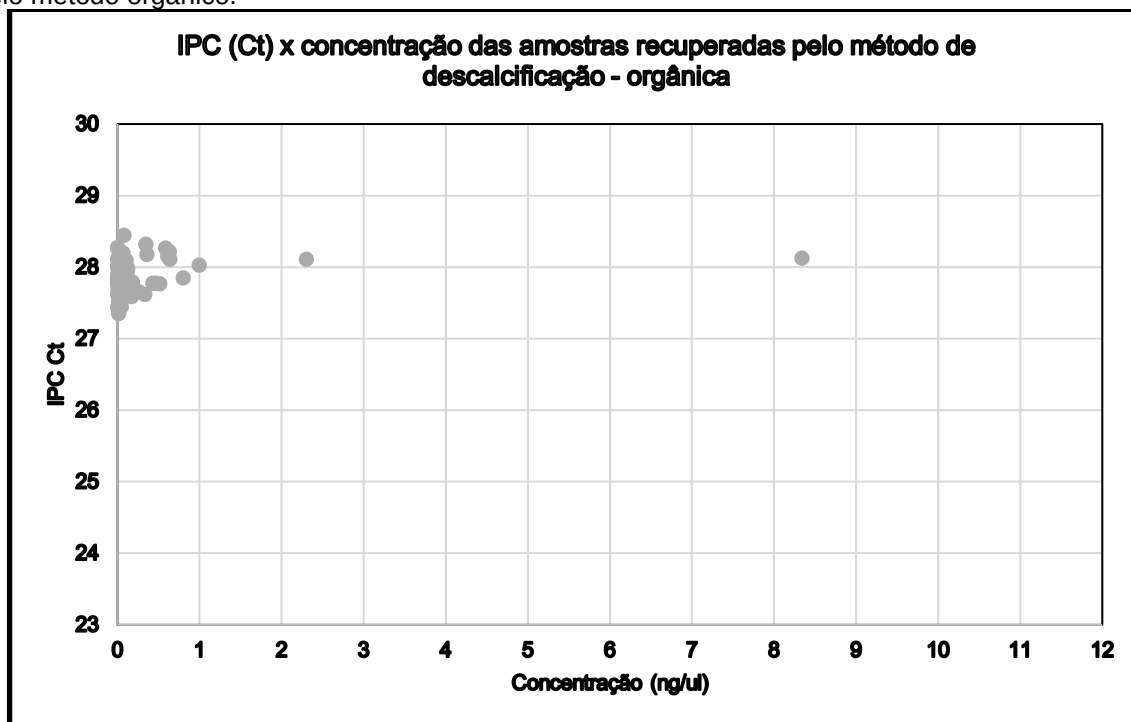


Gráfico 2 – Relação entre o IPC (C_i) x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e extraídas pelo método orgânico.

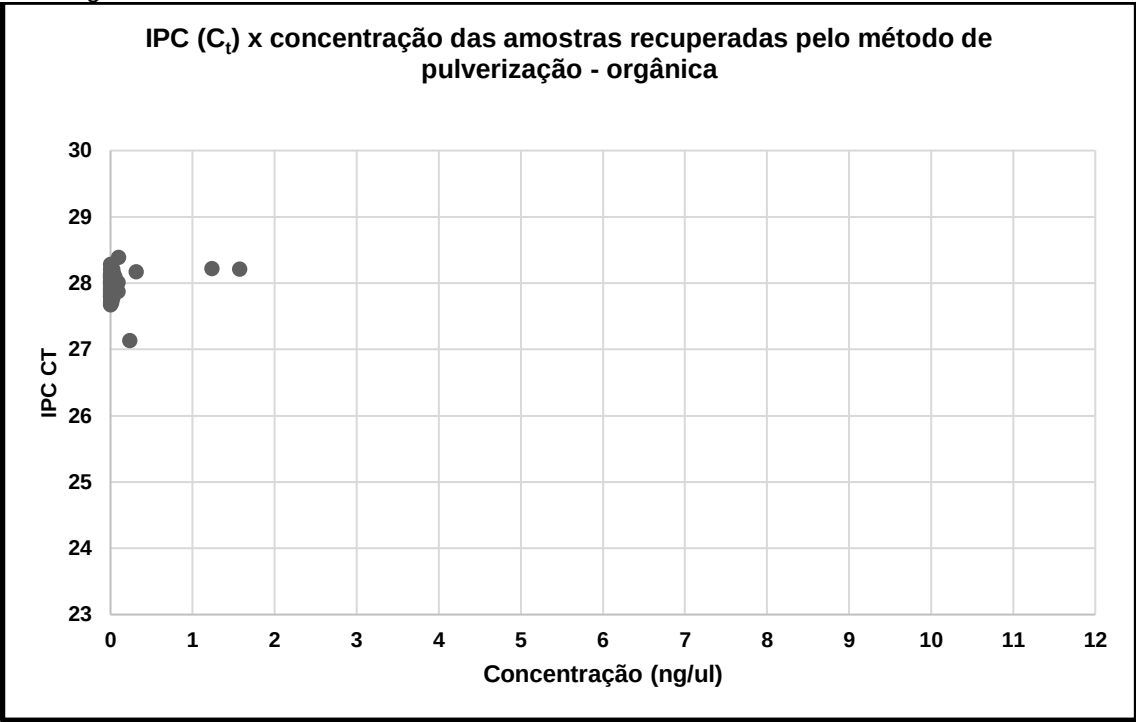


Gráfico 3 – Relação entre o IPC (C_i) x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e purificadas pelo método automatizado.

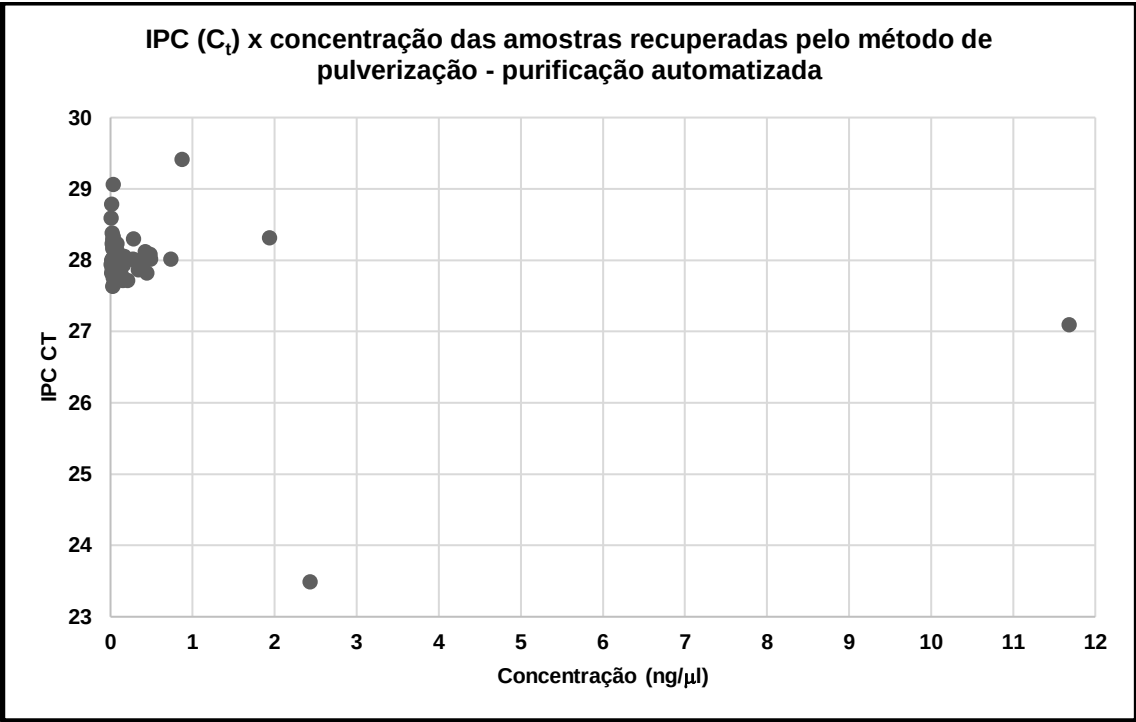


Gráfico 4 – Relação entre o IPC (C_t) x concentração (ng/uL) de amostras descalcificadas e purificadas pelo método automatizado.

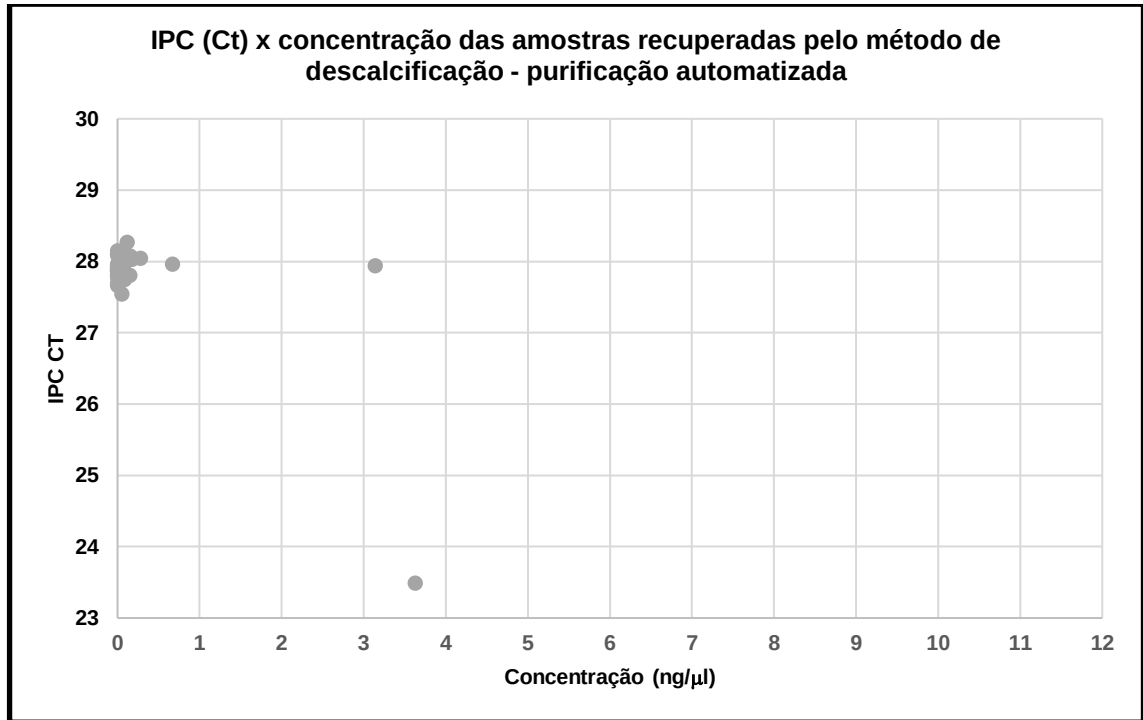


Gráfico 5 – Relação entre o IPC (C_t) x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e extraídas pelo método de Chelex.

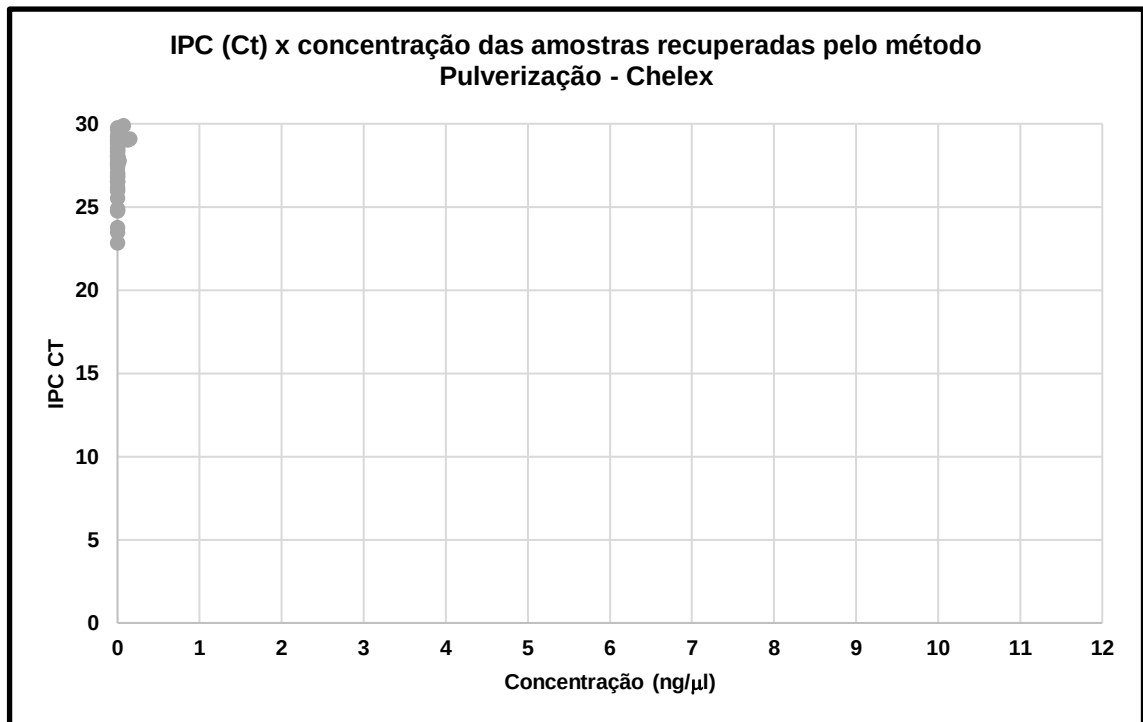


Gráfico 8 – Índice de degradação x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e purificadas de modo automatizado.

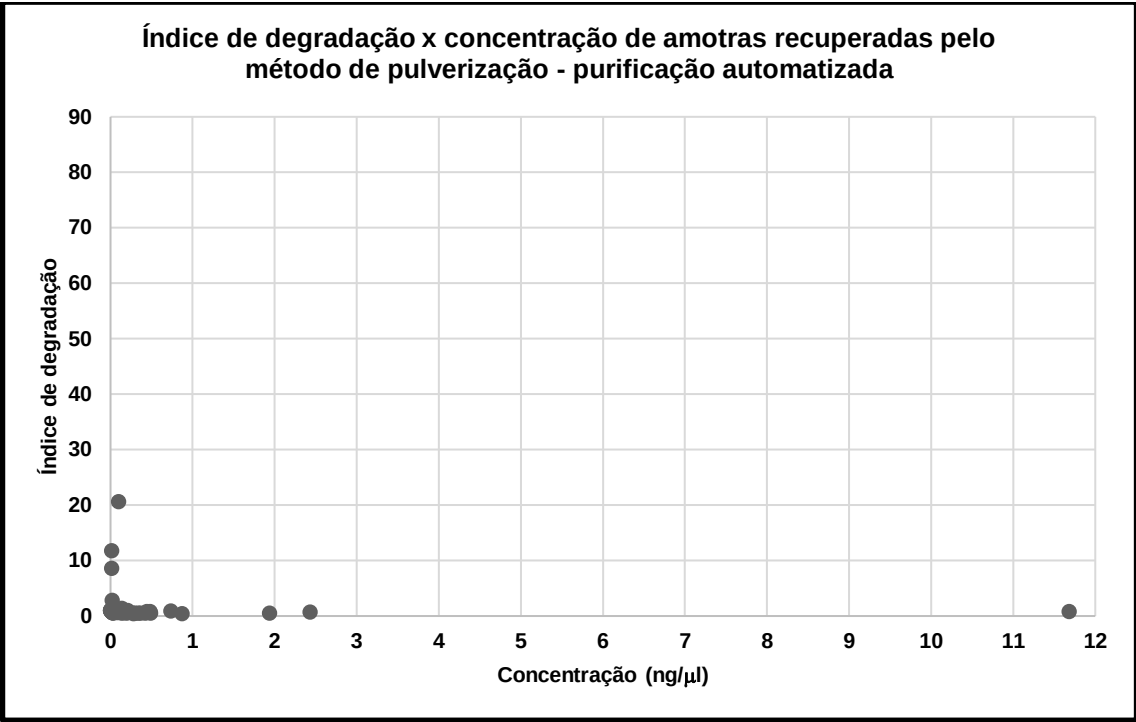
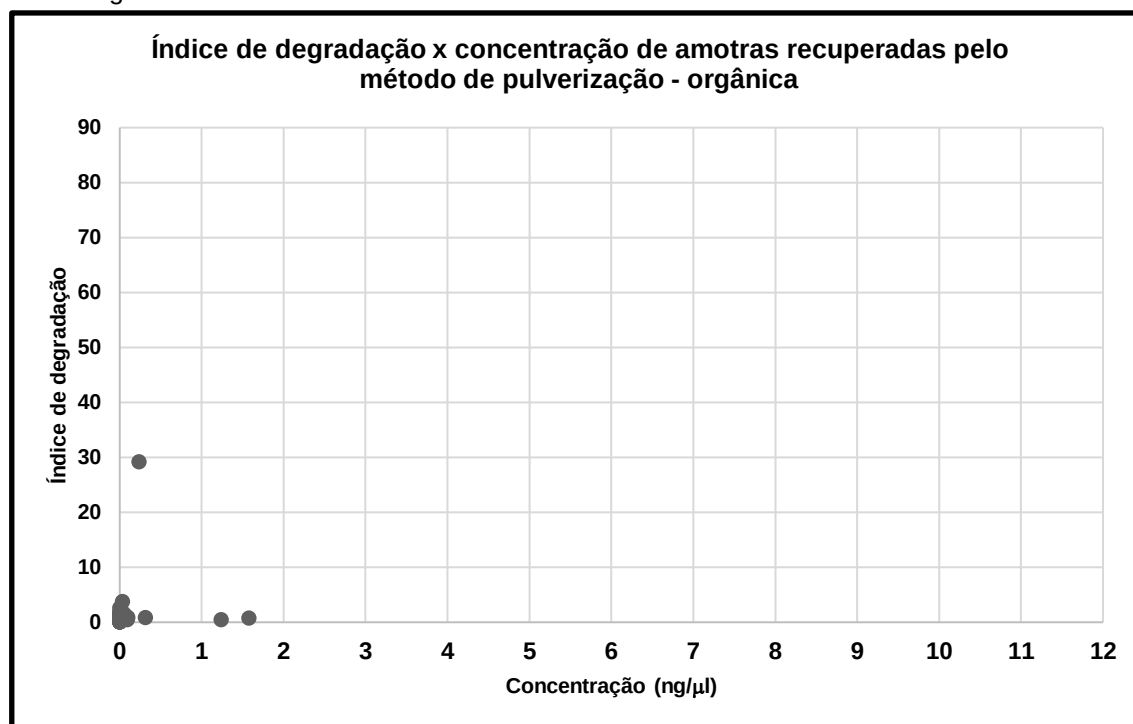


Gráfico 9 – Índice de degradação x concentração (ng/uL) de amostras descalcificadas e extraídas pelo método orgânico.



Gráfico 10 – Índice de degradação x concentração (ng/uL) de amostras pulverizadas e extraídas pelo método orgânico.



As amostras dos 52 indivíduos NRNI/NR que apresentaram concentração superior a 0,01 ng/uL e índice de degradação menor que 3,0 foram amplificadas pelo Kit PowerPlex®Fusion 6C. A amplificação da região da amelogenina, que determina a presença do cromossomo X e Y, foi bem sucedida em todas as amostras que apresentaram perfil genético amplificado (completo ou parcial), sendo possível caracterizar, deste modo, o sexo do indivíduo. Três pessoas eram do sexo feminino, de acordo ao declarado no exame odontológico de cadáver emitido pelo IML-SLZ/MA. Os resultados obtidos na genotipagem de STRs dos 52 elementos dentários são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Genotipagem dos marcadores STRs autossômicos para 52 indivíduos NRNI/NR.

Indivíduo	Classificação do elemento dentário	Quantidade de marcadores	Método extrativo	Quantificação (ng/uL)	Índice de degradação	Perfil genético de STRs	Amel
1	12.1-15: Pré-Molar Inferior	26/26	Automatizado e pulverizado	0,1374	0,5348	Completo	XY
2	25.4-15: Pré-Molar Inferior	26/26	Automatizado e pulverizado	0,8739	0,3898	Completo	XY
3	29.1-15: Canino Superior	26/26	Orgânica e descalcificado	0,6325	0,5690	Completo	XX
4	31.1-15: Pré-Molar Superior	26/26	Orgânica e pulverizado	0,0152	0,6529	Completo	XY

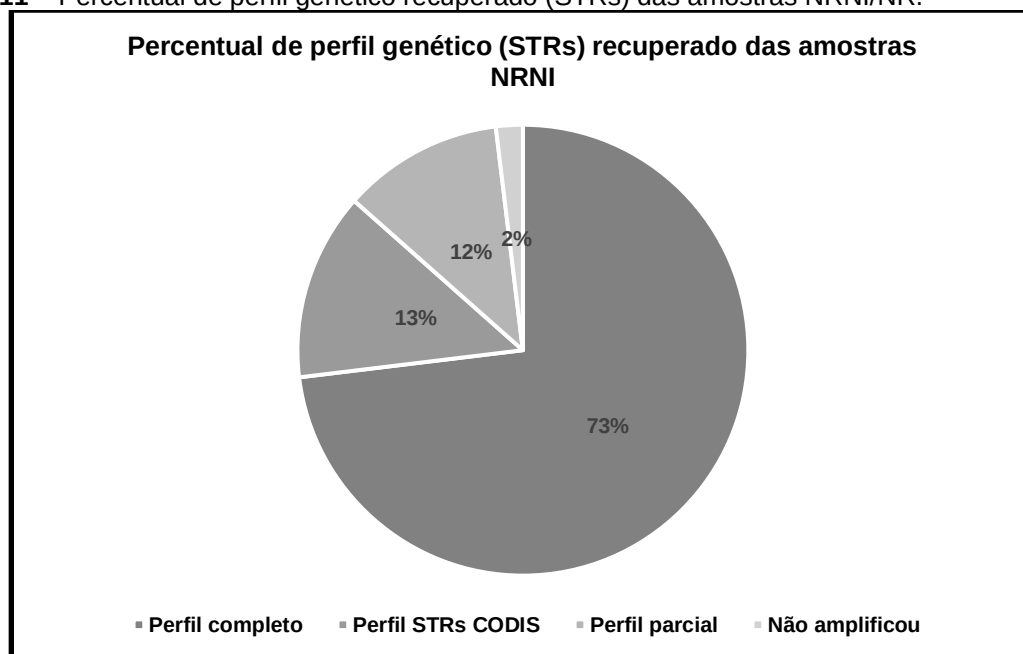
5	32.3-15: Pré-Molar Inferior	26/26	Orgânica descalcificado	e	0,0695	0,1867	Completo	XY
6	40.3-15: Pré-Molar Inferior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,0347	0,6095	Completo	XY
7	41.2-15: Pré-Molar Inferior	5/26	Automatizado pulverizado	e	0,0100	0,8080	Parcial	XY
8	43.3-15: Pré-Molar Inferior	26/26	Orgânica descalcificado	e	2,3046	0,7807	Completo	XY
9	62.1-15: Pré-Molar Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e			Completo	XX
10	67.3-15: Pré-Molar inferior	26/26	Orgânica descalcificado	e	0,1141	1,1011	Completo	XY
11	74.1-15: Molar Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e	11,6816	0,8192	Completo	XY
12	77.1-15: Incisivo Central Superior	26/26	Automatizado descalcificado	e			Completo	XY
13	85.2-15: Pré-Molar Inferior	26/26	Orgânica descalcificado	e	0,8444	2,9038	Completo	XY
14	89.1-15: Incisivo Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,0782	0,7970	Completo	XY
15	92.1-15: Canino Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,1555	1,2041	Completo	XY
16	95.2-15: Molar Superior	26/26	Orgânica pulverizado	e	0,0935	0,8715	Completo	XY
17	99.1-15: Pré-Molar Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,0271	0,6179	Completo	XY
18	118.3-15: Incisivo Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,4904	0,5132	Completo	XY
19	19.3-16: Canino Superior	13/26	Automatizado pulverizado	e	0,0181	11,7299	Parcial	XY
20	35.1-16: Incisivo Central Superior	20/26	Automatizado descalcificado	e	0,0133	2,1876	Marcadores CODIS completo	XY
21	40.1-16 Molar Superior	26/26	Orgânica pulverizado	e	0,3180	0,7807	Completo	XY
22	45.1-16: Pré-Molar Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,1992	0,4503	Completo	XY
23	49.2-16: Incisivo Inferior	20/26	Orgânica pulverizado	e	0,0322	3,6687	Marcadores CODIS completo	XY
24	50.2-16: Molar Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,1748	0,7491	Completo	XY
25	53.1-16: Pré-Molar Inferior	26/26	Orgânica descalcificado	e	0,8047	0,8420	Completo	XY
26	55.1-16: Pré-Molar Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e			Completo	XY

27	57.2-16: Pré-Molar Superior	26/26	Orgânica pulverizado	e	0,4073	1,2207	Completo	XY
28	58.1-16: Pré-Molar Superior	12/26	Automatizado descalcificado	e	0,0026	7,9805	Parcial	XY
29	60.1-16: Canino Superior	7/26	Automatizado pulverizado	e	0,0014	2,0873	Parcial	XY
30	61.2-16: Molar Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,5864	1,8317	Completo	XY
31	62.3-16: Canino Superior	26/26	Automatizado descalcificado	e	0,2829	0,5808	Completo	XX
32	73.1-16: Pré-Molar Inferior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,0219	0,6053	Completo	XY
33	90.3-16: Molar Superior	22/26	Automatizado descalcificado	e	0,0177	2,6521	Marcadores CODIS completo	XY
34	96.2-16: Pré-Molar Inferior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,3430	0,4597	Completo	XY
35	98.2-16: Pré-Molar Inferior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,0885	0,5729	Completo	XY
36	99.1-16: Pré-Molar Superior	26/26	Orgânica descalcificado	e	0,6413	1,1958	Completo	XY
37	103.2-16: Pré-Molar Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,0658	1,1240	Completo	XY
38	105.1-16: Pré-Molar Inferior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,0755	1,0786	Completo	XY
39	112.1-16: Pré-Molar Inferior	25/26	Automatizado pulverizado	e	0,0457	2,6574	Completo para marcadores STRs CODIS	XY
40	116.3-16: Pré-Molar Superior	2/26	Automatizado pulverizado	e	0,0049	2,0168	Parcial	XY
41	121.3-16: Pré-Molar Inferior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,0139	0,9145	Completo	XY
42	124.2-16: Pré-Molar Inferior	0/26	Orgânica pulverizado	e	0,0005	0,6395	Não amplificou	-
43	125.1-16: Pré-Molar Superior	26/26	Orgânica descalcificado	e	0,1724	0,9729	Completo	XY
44	130.1-16: Pré-Molar Inferior	26/26	Orgânica descalcificado	e	0,2605	0,9020	Completo	XY
45	132.2-16: Pré-Molar Superior	26/26	Automatizado pulverizado	e	0,1598	0,6095	Completo	XY

46	03.3-17: Pré-Molar Inferior	26/26	Automatizado e pulverizado	2,4350	0,7238	Completo	XY
47	07.2-17: Molar Inferior	12/26	Automatizado e descalcificado	0,0036	3,0261	Parcial	XY
48	11.3-17: Pré-Molar Superior	26/26	Automatizado e pulverizado	0,0619	0,9796	Completo	XY
49	27.1-17: Molar Superior	26/26	Automatizado e pulverizado	0,0861	0,7042	Completo	XY
50	28.1-17: Pré-Molar Superior	22/26	Orgânica pulverizado	0,0098	2,1714	Marcadores CODIS completo	XY
51	30.3-17: Molar Superior	23/26	Automatizado e pulverizado	0,1173	2,7090	Marcadores CODIS completo	XY
52	34.3-17: Pré-Molar In	25/26	Automatizado e pulverizado	0,0279	2,7595	Marcadores CODIS completo	XY

A Tabela 6 demonstra que das 52 amostras analisadas, 38 apresentaram perfil genético completo. Das 13 amostras que apresentaram perfil parcial, sete possuíam os 13 marcadores CODIS obrigatórios, sendo possível a sua inclusão no banco de dados de perfis genéticos. Uma amostra não foi amplificada. Os percentuais dos perfis genéticos recuperados das amostras NRNI/NR, foram demonstrados no Gráfico 11.

Gráfico 11 – Percentual de perfil genético recuperado (STRs) das amostras NRNI/NR.



A Tabela 6 e o Gráfico 17 exibem os resultados de genotipagem dos marcadores Y-STRs. Foram recuperados perfis genéticos completos em 37 amostras (71%). Das sete amostras não amplificadas (15%), três apresentavam perfil genético feminino confirmado (não amplificado) por meio dos marcadores autossômicos STRs. Houve sete amostras cujos resultados não foram interpretáveis.

Os perfis genéticos foram inseridos no banco de dados de haplótipos do cromossomo Y (<http://www.nevgen.org>) para serem analisados qualitativamente. Houve predominância do haplogrupo R1b (17 indivíduos), seguido dos haplogrupos E1b1a (6 indivíduos) e E1b1b (5 indivíduos), conforme demonstrado no Gráfico 12.

Gráfico 12 – Percentual de perfil genético recuperado (Y-STRs) das amostras NRNI/NR.

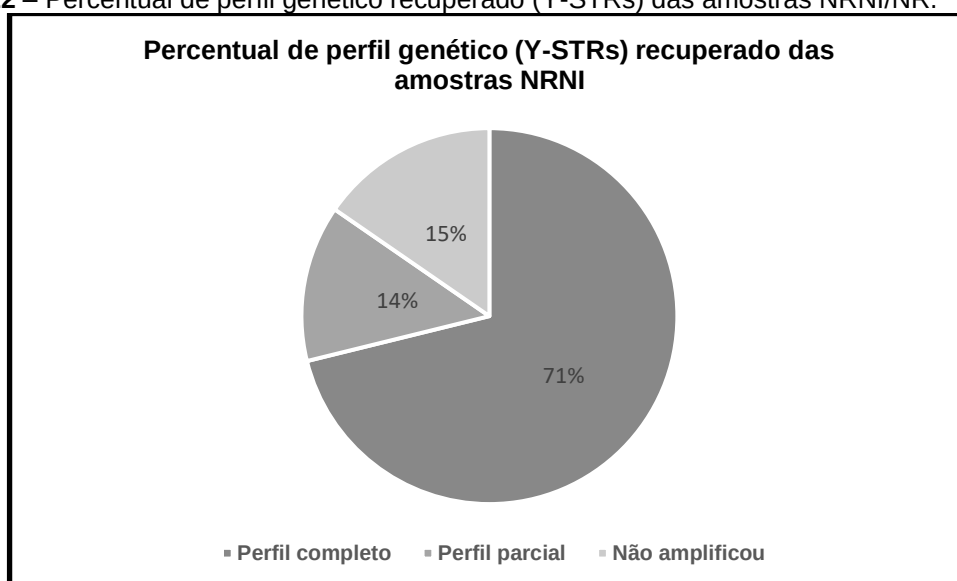


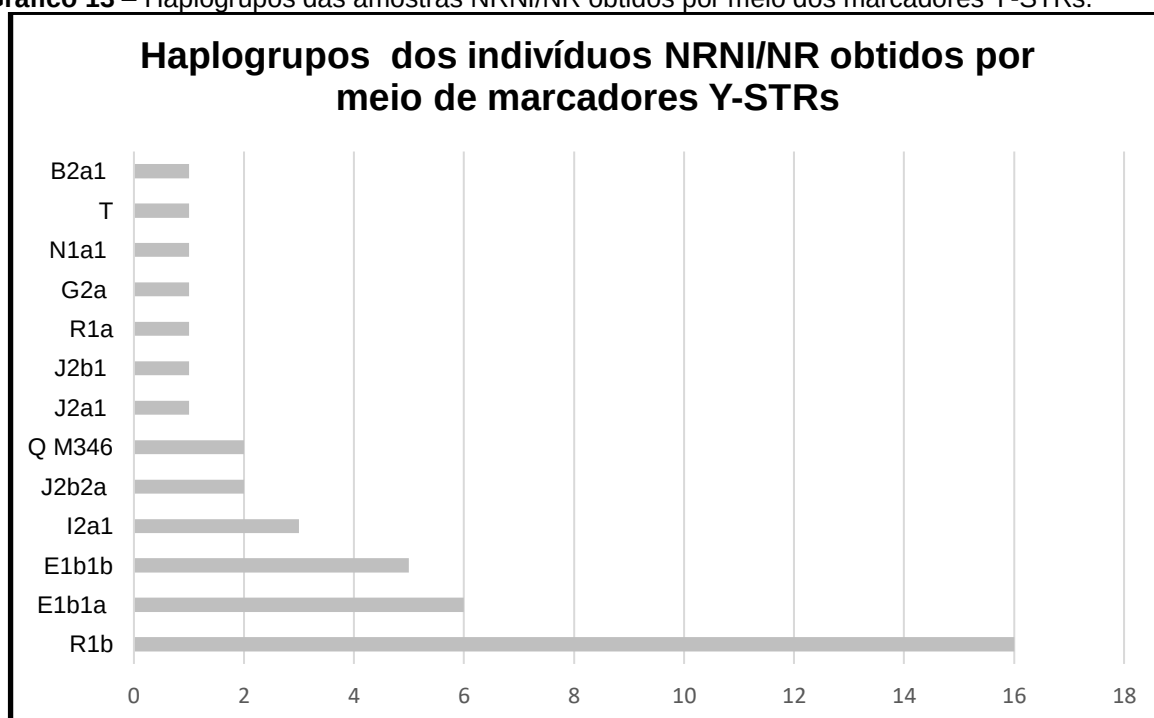
Tabela 6 – Genotipagem e haplogrupos dos marcadores Y-STRs para os 52 indivíduos NRNI/NR.

INDIVÍDUO	Classificação do elemento dentário	Quantidade de marcadores	Perfil genético de STRs	Amel	Haplogrupo estimado	Raça
1	12.1-15: Pré-Molar Inferior	0/27	Não amplificou	XY		
2	25.4-15: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	E1b1a V38	
3	29.1-15: Canino Superior	0/27	Não amplificou	XX		
4	31.1-15: Pré-Molar Superior	27/27	Completo	XY	R1b	
5	32.3-15: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	R1b	
6	40.3-15: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	E1b1b	
7	41.2-15: Pré-Molar Inferior	0/27	Não amplificou	XY		

8	43.3-15: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	J2b2a M241
9	62.1-15: Pré-Molar Superior	0/27	Não amplificou	XX	
10	67.3-15:Pré-Molar inferior	27/27	Completo	XY	E1b1b
11	74.1-15: Molar Superior	27/27	Completo	XY	R1b
12	77.1-15: Incisivo Central Superior	27/27	Completo	XY	E1b1b
13	85.2-15: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	Clade indefinida
14	89.1-15: Incisivo Superior	27/27	Completo	XY	J2b2a M241
15	92.1-15: Canino Superior	27/27	Completo	XY	E1b1a V38
16	95.2-15: Molar Superior	27/27	Completo	XY	R1b
17	99.1-15: Pré-Molar Superior	27/27	Completo	XY	J2a1 M319
18	118.3-15: Incisivo Superior	27/27	Completo	XY	Q M346>> M3
19	19.3-16: Canino Superior	17/27	Parcial	XY	R1b
20	35.1-16: Incisivo Central Superior	0/27	Não amplificou	XY	
21	40.1-16 Molar Superior	27/27	Completo	XY	I2a1a Sardinian M26
22	45.1-16: Pré-Molar Superior	27/27	Completo	XY	J2b1 M205
23	49.2-16: Incisivo Inferior	3/27	Parcial	XY	
24	50.2-16: Molar Superior	27/27	Completo	XY	R1b
25	53.1-16: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	R1b
26	55.1-16: Pré-Molar Superior	27/27	Completo	XY	R1a
27	57.2-16: Pré-Molar Superior	27/27	Completo	XY	E1b1b
28	58.1-16: Pré-Molar Superior	0/27	Não amplificou	XY	
29	60.1-16: Canino Superior	27/27	Completo	XY	I2a1 Isles
30	61.2-16: Molar Superior	27/27	Completo	XY	G2a >> PF3359
31	62.3-16: Canino Superior	0/27	Não amplificou	XX	
32	73.1-16: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	R1b
33	90.3-16:Molar Superior	27/27	Completo	XY	E1b1a V38
34	96.2-16: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	E1b1a V38
35	98.2-16: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	R1b
36	99.1-16: Pré-Molar Superior	27/27	Completo	XY	R1b
37	103.2-16: Pré-Molar Superior	26/27	Parcial	XY	R1b

38	105.1-16: Pré-Molar Inferior	25/25	Completo	XY	R1b
39	112.1-16: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	Q M346>> Z780
40	116.3-16: Pré-Molar Superior	15/27	Parcial	XY	R1b
41	121.3-16:Pré-Molar Inferior	18/27	Parcial	XY	R1b
42	124.2-16: Pré-Molar Inferior	0/27	Não amplificou	-	
43	125.1-16: Pré-Molar Superior	27/27	Completo	XY	N1a1 M46
44	130.1-16: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	E1b1b
45	132.2-16: Pré-Molar Superior	27/27	Completo	XY	E1b1a V38
46	03.3-17: Pré-Molar Inferior	27/27	Completo	XY	I2a1a Sardinian M26
47	07.2-17: Molar Inferior	0/27	Não amplificou	XY	
48	11.3-17: Pré-Molar Superior	27/27	Completo	XY	T>PF5633
49	27.1-17: Molar Superior	27/27	Completo	XY	B2a1 M218
50	28.1-17: Pré-Molar Superior	27/27	Completo	XY	E1b1a V38
51	30.3-17: Molar Superior	20/27	Parcial	XY	R1b
52	34.3-17: Pré-Molar In	27/27	Completo	XY	R1b

Gráfico 13 – Haplogrupos das amostras NRNI/NR obtidos por meio dos marcadores Y-STRs.



5 DISCUSSÃO

Santos et al. (2013) reportaram as informações acerca da identidade racial de indivíduos submetidos à necrópsia pelo IML de Salvador (BA), no ano de 2007 e, por meio das fontes documentais e entrevistas, constataram que a identificação da cor da pele era omissa ou imprecisa, resultando na declaração de óbito com dados imprecisos e resultados estatísticos pouco confiáveis. Os indivíduos classificados como faiodermas nos laudos cadavéricos correspondiam a pretos e pardos, em geral relacionados às vítimas morte violenta, enquanto que os indivíduos brancos a morte de causa acidental. Este trabalho trouxe consigo uma reflexão sobre as consequências da ausência de dados confiáveis relacionados à cor da pele e o que há por trás dessa falta de informação: a indiscriminação da cor e a marginalização de um grupo carente de direitos, cidadania e identidade.

A ausência de informações que possibilitem diferenciar grupos vulneráveis, dificulta ainda mais o estabelecimento de políticas públicas e o acesso aos bens e serviços. O presente estudo não versou sobre os laudos cadavéricos (responsáveis por determinar a *causa mortis*), baseando-se em dados observados no exame odontolegal de cadáver (exame de identificação odontolegal); com base no que foi verificado para o grupo de indivíduos NRNI aqui analisados, as informações sobre a cor da pele estão de acordo com o que foi reportado por Santos et al. (2013). Ainda que os dados publicados pelo IBGE (2016) reportem que 68,08% dos indivíduos maranhenses são autodeclarados pardos, dados do Atlas da Violência (2018) demonstram que a maior causa de mortalidade em jovens do sexo masculino foi o homicídio e com grande destaque as lesões provenientes de arma de fogo, em especial perpetradas contra jovens negros.

A maior parte dos indivíduos NRNI/NR avaliados neste trabalho foram vítimas de morte violenta, em especial homicídio. Matte et al. (2007) ressaltaram sobre a importância da individualização da pena da vítima de homicídio para persecução penal, sem o qual o inquérito policial ou o processo criminal torna-se prejudicado. Alonso et al. (2005) sugeriram que a coleta de amostras de DNA deve ser realizada ainda que a identificação seja positiva, para um futuro confronto genético caso necessário. Este foi o caso dos indivíduos não reclamados pertencentes ao grupo analisado neste estudo.

A identificação dos indivíduos NRNI/NR versou sobre a coleta de material para exame de DNA como modo de salvaguardar as famílias que por ventura viessem procurar por seus familiares desaparecidos. O estado de decomposição em que grande parte dos corpos se encontrava, dificultou o reconhecimento visual que corrobora com os exames de identificação, embora outros métodos secundários, como o reconhecimento de pertences, vestes, tatuagens ou outras características, possam orientar essa busca, conforme preconizado pelo Guia de Identificação das Vítimas de Desastre da Interpol (2009), mas que não possuem rigor técnico ou científico. Um dos propósitos de se resguardar a coleta do material genético é a possibilidade da inclusão dos perfis genéticos em um banco específico para esse fim, cujas regras são preconizadas pelo Comitê Gestor da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos – RIBPG.

O DNA apresenta a vantagem de ser analisável após a morte. Entretanto, a identificação genética de restos mortais torna-se um grande desafio, em virtude das diversas condições aos quais os cadáveres encontram-se expostos, que podem interferir na qualidade e quantidade do DNA interpretável. O sucesso da recuperação do DNA está intrinsecamente relacionado ao pré-tratamento do material e à técnica de extração adotada. A recuperação do DNA em elementos dentários é extremamente variável, sendo observadas diferenças de concentração entre os elementos dentários do mesmo indivíduo, entre regiões distintas do mesmo dente ou até com a idade do indivíduo, conforme relatado por Higgins et al. (2011).

Uma das grandes dificuldades encontradas na análise de amostras como ossadas e dentes, diz respeito à escolha do método de extração. Higgins e Austin (2013), destacaram que os protocolos forenses de extração de dentes e ossos desconsideram a morfologia e bioquímica distinta entre estes tecidos. Muitos dos protocolos de extração não distinguem a estrutura morfológica do dente, resultando na co-extração de compostos inibitórios de PCR, como cálcio (presente principalmente no esmalte dentário) e colágeno. Segundo esses autores, o resultado da análise genética está intimamente relacionado à quantidade de DNA, à eficiência de amostragem e o método de extração utilizado. Os autores sugeriram que o conhecimento das informações *post-mortem* e a avaliação dessas alterações podem contribuir para as análises forenses e para a escolha da técnica utilizada ou até mesmo o uso de subamostragens. Neste mesmo trabalho, os autores indicaram que o melhor método de extração de DNA é aquele que consegue maximizar o rendimento

da reação, ser econômico e rápido, permitir o uso de automação e ser eficiente para a remoção de inibidores e contaminantes externos e internos.

Segundo Budowle e Brown (2001), o método de extração ideal deve ser aquele que além de fácil execução, seja de baixo custo e aplicável para o maior número de amostras possíveis. De acordo com Schmerer (2001), a otimização dos métodos de pré-tratamento e extração são importantes para a recuperação de DNA em quantidades e qualidades satisfatórias, garantindo a reprodutibilidade dos resultados de genotipagem em materiais degradados ou antigos e evitando a ocorrência de dropouts (falso homozigotos).

Através do presente estudo, buscou-se avaliar os métodos de extração orgânica, Chelex e purificação automatizada a partir de amostras que foram submetidas a dois métodos de pré-tratamento distintos: pulverização e descalcificação. Optou-se pela seleção dos dentes (molar, pré-molar, canino e incisivo) e a secção da raiz e coroa como modo de minimizar a interferência dos elementos constituintes do esmalte dentário e a otimização do protocolo de pré-tratamento, levando-se em consideração o custo benefício entre resposta-tempo.

Adler et al (2011) ressaltaram que os métodos de pré-tratamento (pulverização e descalcificação) são etapas necessárias para permitir a digestão proteolítica eficiente dos componentes celulares, que independe do método de extração utilizado para isolar o DNA. Entretanto, os resultados observados na análise genética dos indivíduos NRNI/NR permitiram concluir que houve distinção entre os métodos de análise.

Observou-se que o método de extração orgânico de amostras descalcificadas apresentou um menor rendimento comparado às amostras pulverizadas e purificadas por automação, cujos dados estão de acordo com o estabelecido por Higgins e Austin (2013). Apesar de parte da literatura sugerir o maior rendimento de DNA em ossadas descalcificadas, os autores afirmam que a descalcificação inclui uma etapa adicional de manipulação, aumenta o risco da contaminação do material, tornando o processo mais demorado e pouco receptivo à automação. O fenolclorofórmio apresenta a desvantagem de ser tóxico, e o método envolve uma série de lavagens que podem aumentar a possibilidade de contaminação.

Holland et al. (2003) destacaram que os métodos utilizados na recuperação de DNA de fontes ósseas devem levar em consideração, além dos fatores ambientais, os inibidores inerentes aos ossos, como o colágeno e íons cálcio, compostos

presentes nas amostras de dentes. Ressaltaram ainda que o uso de EDTA como agente quelante e outros agentes usados para a remoção de inibidores, podem resultar na perda excessiva de DNA, não sendo recomendado para análises em grande escala.

As concentrações de DNA obtidas pela quantificação por PCR em tempo real revelaram que as amostras pulverizadas e purificadas por automação apresentaram o melhor rendimento e um menor índice de degradação (menor presença de inibidores). Barbaro et al (2011) avaliaram a eficiência do tampão BTA™ *lysis buffer* em amostras forenses diversas, comprovando a capacidade de remoção de inibidores e obtiveram resultados satisfatórios na recuperação do DNA com pureza elevada, menor inibição e rapidez na execução. O método de purificação apresentou algumas vantagens, como a possibilidade de automação e tampão de lise eficiente e com boa taxa de recuperação.

A pulverização propicia a exposição das células, aumentando a superfície de contato dos reagentes. Entretanto, para que o método seja eficiente, o método de extração deve ser capaz de remover de modo eficiente os interferentes. Uma das grandes vantagens da pulverização é a simplicidade na execução, o baixo custo e o tempo de execução. Desse modo, as amostras pulverizadas submetidas à extração orgânica apresentaram menor rendimento de reação, provavelmente em virtude da etapa de extração durante a ultrapurificação e apenas uma etapa de extração com fenolclorofórmio, enquanto Smith et al. (1993) e Malaver e Yunis (2003) sugeriam três extrações sucessivas. Outro fator pode estar relacionado a presença de íons não caotrópicos com o cloreto de sódio, que co-purificam inibidores de PCR (ROHLAND; HOFREITER, 2007).

Esses dados estão de acordo com o que foi reportado por Fischer et al. (1993), ao demonstrar que em amostras ósseas antigas de soldados da Guerra Civil estadunidense, os métodos de pré-tratamento de descalcificação e pulverização seguido de extração orgânica, o DNA recuperado de amostras pulverizadas foi duas vezes maior que as amostras calcificadas. Estudos semelhantes foram realizados por Pfeiffer e colaboradores (1999) em elementos dentários.

As amostras extraídas por Chelex apresentaram um baixo rendimento de reação e um alto índice de inibição, ao contrário do que foi proposto por Woodward e colaboradores (1994), que relataram bons resultados em extrações de DNA de dentes

antigos pelo método chelex. Dados semelhantes foram obtidos por Tsuchimochi et al (2002), quando analisou elementos dentários submetidos ao calor.

Valores de IPC elevados no método de extração por Chelex indicaram a presença de inibidores que afetaram a quantificação. Conforme reportado por Fondevila (2008), os inibidores diminuem a eficiência de PCR em amostras degradadas e amplicons com maiores números de pares de base, seja em virtude do menor alvo inicial não degradado ou pela ineficiente polimerização do DNA. Pajnič (2017) reportou que um dos problemas na amplificação de ossos e dentes resulta da co-extração de inibidores de baixo peso molecular que inibem a PCR.

Inibidores de PCR podem interferir na lise celular, degradar o DNA ou interferir na captura do DNA ou inibir a atividade da Taq polimerase. As amostras que contém inibidores podem apresentar resultados parciais, do mesmo modo que as amostras de DNA degradado (BUTLER, 2005). A amplificação do DNA em baixa concentração (cerca de 100 pg de DNA), promove a observação de *dropin* e *dropout*, falhas na amplificação e na interpretação de seus resultados, conforme reportado previamente por Holland et al. (2003).

Para as amostras dos elementos dentários, houve amplificação preferencial para os marcadores menores como D3S1358, D16S539, D8S1179, e demonstra que os danos causados indicam que os fatores ambientais afetam na fragmentação do DNA.

Foi possível recuperar e obter o perfil genético completo dos marcadores autossômicos de 73% das amostras estudadas e de 71% dos marcadores Y-STRs. Dos perfis genéticos parciais, houve a amplificação preferencial de marcadores moleculares de baixo peso molecular. Observou-se que além da concentração observada, o índice de degradação foi um importante parâmetro de avaliação da qualidade do eletroferograma.

Fondevila et al. (2008) ressaltou que a qualidade da genotipagem depende, em parte, dos processos de degradação que podem afetar a estrutura do DNA por danos oxidativos, ação de nucleases ou pelo efeito inibitório de agentes co-extraídos ou subprodutos de reação que dificultam a PCR. Essa extensão do processo de degradação depende tanto do tempo de morte quanto das condições ambientais. Afirma ainda que não existe correlação direta entre o tempo desde a morte e a extensão de degradação, sendo difícil estabelecer regras.

Putkonen et al. (2010) destacaram que o sucesso na amplificação do DNA é influenciado pela conservação do material e depende de fatores como a quantidade de DNA recuperável, nível do dano no DNA, presença de agentes inibidores, a química e métodos usados na amplificação. Os autores também comentaram acerca dos efeitos estocásticos observados nas análises de amostras exíguas. A degradação foi um fator mais preocupante que a inibição, sugerindo o uso de amplicons mais curtos. Os artefatos presentes na genotipagem de STRs são observados em materiais altamente degradados, afetando a reprodutibilidade dos resultados. A quantidade e a frequência desses artefatos estão diretamente relacionadas à qualidade e quantidade do DNA amplificado.

A utilização de SNPs e Indels podem ser úteis em casos em que o DNA é altamente degradado e fornecer informações acerca da ancestralidade. Em casos em que há pouco DNA nuclear, o DNA mitocondrial também pode ser útil (HIGGINS; AUSTIN, 2013).

Observou-se nesse estudo que a contribuição genética dos europeus foi maior que a dos africanos e ameríndios. Dos haplogrupos observados, o mais representativo correspondeu ao R1b, presente em maior proporção na população europeia ocidental (ROOTSI, et al. 2004). Outros haplogrupos encontrados (R1a e I2a1) também estão presentes na população europeia. O segundo haplogrupo mais observado foi o E1b1, encontrado na África (TROMBETTA et al, 2011). O haplogrupo J é o mais comum no Sul e Leste da Europa (SEMINO, et al. 2004). O haplogrupo Q corresponde a contribuição ameríndia (FRANCEZ, 2012).

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, acredita-se que os metadados obtidos da análise do exame odontológico de cadáver permitiu inferir acerca do grupo vulnerável a qual pertencem as vítimas não identificadas e não reclamadas. Observou-se que o pré-tratamento de pulverização, seguida da purificação com automação, apresentou maior eficiência dos resultados de amplificação e possibilita nortear um fluxo da conduta laboratorial, haja vista tratar-se de um método que otimiza o número de etapas, minimiza os riscos de contaminação do material e apresenta rápida execução. A obtenção de perfil genético de elementos dentários está sujeita à interferentes. Entretanto, houve a amplificação de grande parte das amostras analisadas. O haplótipo mais comum observado para os indivíduos NRNI/NR foi o R1b, característico da Europa Ocidental, o que pode corroborar com os dados históricos da colonização brasileira.

Os resultados aqui descritos mostram que o protocolo alternativo utilizado para análise genética de dentes baseada em uma etapa de desmineralização de todo o espécime antes da realização de extração de DNA, é capaz de extrair DNA em quantidade e qualidade suficientes para a produção de um perfil genético em casos de identificação humana forense com uma taxa de sucesso de 95% para perfis genéticos completos. Mesmo no caso de obtenção de perfil genético parcial, foi possível realizar a identificação da vítima.

REFERÊNCIAS

- ADLER, et al. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones *Journal of Archaeological Science*, v 38, 2011, p 956-964.
- ALGHAFRI, R. *et al.* Rapidly mutating Y-STR analyses of compromised forensic samples. **Int. J. Legal Med.**, v.132, n.2, p.397-403, 2018.
- ALONSO, A. *et al.* Challenges of DNA Profiling in Mass Disaster Investigations, **Croatian Medical Journal**, v. 46, n.4, p. 540-548, 2005.
- ALSHAMALI, F. *et al.* Y chromosome in forensic casework and paternity testing. **International Congress Series**, v. 1261, n. C, p. 353–356, 2004.
- ALVAREZ, L. *et al.* Male Lineages in Brazil: Intercontinental Admixture and Stratification of the European Background. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. 1-17, 2016.
- ARAÚJO, M.E.C.; PASQUALI, L. **Histórico dos processos de identificação.** Instituto Nacional de Identificação Diretoria Técnica Científica Departamento de Polícia Federal e Laboratório de Pesquisa em Avaliação e Medida – LabPAM Instituto de Psicologia, UnB.199-?. Disponível em: http://www.institutodeidentificacao.pr.gov.br/arquivos/File/forum/historico_processos.pdf. Acesso em: 28-07-2018, às 20h17.
- ATLAS DA VIOLÊNCIA, 2018. **Fórum Brasileiro de Segurança Pública**, Rio de Janeiro: IPEA, 2018. 92 p.
- BALANOVSKY *et al.* Phylogeography of human Y-chromosome haplogroup Q3-L275 from an academic/ citizen science collaboration. **BMC Evolutionary Biology**, v.17, n.18, p.1-15, 2017.
- BALLANTYNE, K. N. *et al.* Mutability of Y-chromosomal microsatellites: Rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, n. 3, p. 341–353, 2010.
- BALLANTYNE, K.N. *et al.* A new future of forensic Y-chromosome analysis: Rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages. **Forensic Science International**, v.6, p. 208-218, 2012.
- BARBARO, A.; CORMACI, P.; FALCONE, G. Validation of BTATM lysis buffer for DNA extraction from challenged forensic samples. **Forensic Science International: Genetics Supplement**, v.3, p.61-62, 2011.
- BARTOLOMUCCI, R. **Preservação óssea: um estudo tafonômico dos remanescentes ósseos humanos dos sambaquis fluviais do vale do Ribeira de**

Iguape. 2008. 118f. Dissertação (Mestrado em Arqueologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BEAUTHIER, J.P. et. al. Mass Disaster Victim Identification: The Tsunami Experience. **The Open Forensic Science Journal**. v.2, p. 54-62. 2009.

BHARGAVA, A.; FUENTES, F. F. Mutational dynamics of microsatellites. **Molecular Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 250–266, 2009.

BONACCORSO, N.S. **Aplicação do exame de DNA na elucidação de crimes.** 2005. 191p. Dissertação (Mestrado em Medicina Forense). – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **Am J. Hum. Genet.**, n.32, p. 314-331, Jan.1980.

BOROVKO, S.R. *et al.* Missing people: Problems of identification of unknown bodies using DNA database. **Forensic Science International: Genetics Suupplement Series**, v.2, n.1, p.260-262, 2009.

BRASIL. Decreto Federal no 7.950, de 12 de março de 2013. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 mar. 2012. Seção 1.

BRDICKA, R. & NURNBERG, P. Checking of individuality by DNA profiling. **Journal of chromatography**, Amsterdam, n.618, p.167-179. 1993.

BUDOWLE, B. et al. CODIS and PCR-based short tandem repeat loci: law enforcement tools. Proceedings of the Second European Symposium on Human Identification. p. 73–88, 1998.

BUDOWLE, B. Population studies on 17 STR loci routinely used in forensic analyses. **International Congress Series**, v. 1239, n. C, p. 71–74, 2003.

BUTLER, M.J. **Forensic DNA Typing: biology, technology, and genetics of STR markers.** 2ed. Burlington: Elsevier, 2005. 660 p.

_____. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. **Journal of Forensic Sciences**, v. 51, n. 2, p. 253–265, 2006.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. et al. Historical genetics: Spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, v. 15, n. 6, p. 824–834, 2003.

CARVALHO, S. P. M. **Avaliação da qualidade do DNA obtido de saliva humana armazenada e sua aplicabilidade na identificação forense em Odontologia Legal.**

2009.189 f. Dissertação (Mestrado em Ortodontia e Odontologia em Saúde Coletiva) - Universidade de São Paulo, Bauru, 2009.

CARVALHO-SILVA, D.R., et. al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, v.68, p.281-286, 2001.

CHEN, D. P. et al. Use of X-linked short tandem repeats loci to confirm mutations in parentage caseworks. **Clinica Chimica Acta**, v. 408, n. 1–2, p. 29–33, 2009.

COMITÊ GESTOR RIBPG. VII Relatório da rede integrada de banco de perfis genéticos (RIBPG) Dados estatísticos e resultados relativos a 28 de maio de 2017. **Rede Integrada De Bancos De Perfis Genéticos (Ribpg)**, p. 18, 2017.

CRAVO, L.A.S. **Estudo experimental sobre decomposição cadavérica usando carcaças de *Sus scrofa domestica***. 2015. 160f. Dissertação (Mestrado em Antropologia) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015.

DAEID, N.N.; HOUCK, M. **INTERPOL'S FORENSIC SCIENCE REVIEW**. CRC PRESS, 2010.

DEL-CAMPO, E.R.A. **Medicina Legal**. 2 ed. São Paulo: Saraiva, 2006. 57-59p.

DIX, J.; GRAHAM, M. **Time of Death, Decomposition and Identification. An Atlas**. Londres: CR Press, 2000.117p.

DUFFY, J. B.; SKINNER, M. F.; WATERFIELD, J. D. Rates of putrefaction of dental pulp in the Northwest coast environment. **Journal of forensic sciences**, v. 36, n. 5,p. 1492-1502, 1991.

EMMEROVA, B. et al. Comparison of Y-chromosomal haplogroup predictors. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 6, p. 145-147, 2017.

EKERT, M.H.F. **Marcadores moleculares : aplicação na identificação humana e prospecção na infecção por HPV**. 2017. 86f. Tese (Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

FAN, H.; CHU, J. Y. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 5, n. 1, p. 7–14, 2007.

FERREIRA, A. C. S. et al. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 2, p. 444–461, 2002.

FIGUEIREDO, T. É oficial: Brasil possui banco de perfis genéticos. **REVISTA PERÍCIA FEDERAL**, Brasília, n.27, Páginas inicial-final, jul. 2010.

FISCHER, D.L. et al. *Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone*. **J Forensic Sci**, v.38, n.1, p. 60-68, 1993.

FRANCEZ, P.A.C., et al. Haplotype diversity of 17 Y-str loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Biology**, Macapá, v.35, n.1m p.45-52, set. 2012.

GAYTMENN, R.; SWEET, D. Quantification of Forensic DNA from Various Regions of Human Teeth. **Journal of forensic sciences**, v. 48, n. 3, p. 1-4. 2003.

GELDERMAN, H. T. et al. The development of a post-mortem interval estimation for human remains found on land in the Netherlands. **International Journal of Legal Medicine**, v. 132, n. 3, p. 863–873, 2018.

GIARDINA, E. & NOVELLI, G. Past, present and future of forensic DNA typing. **Nanomedicine**, Rome, v.2, n.6, p.257-270. 2011.

GILL, P; JEFFREYS, A. J. & WERRET, D.J. Forensic application of DNA 'fingerprinting'. **Nature**, Berkshire, v.318, p.577-579. 1985.

GILL, P. Review role of Short Tandem Repeat DNA in forensic casework in the UK — Past , present , and future perspectives. **Differences**, v. 385, n. February, 2002.

GRATTAPAGLIA, D. et al. Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. **Forensic Science International**, v. 149, n. 1, p. 99–107, 2005.

GRIZA, A. **Polícia, Técnica e Ciência: O processo de Incorporação dos Saberes Técnico-Científicos na Legitimação do Ofício do Policial**. 1999. 189 f. Dissertação (Mestrado em Sociologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

GROVER, A & SHARMA, P.C. Development and use of molecular markers: past and present. **Crit Rev Biotechnol**, New Delhi, v.02, n.36, p.290-302. 2016.

GUSMÃO, L. et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. **Int J Legal Med**. v. 120, p. 191–200, 2006.

GUSMÃO, L.; BRIÓN, M.; GOMES, I. Chapter 30 The human Y chromosome male-specific polymorphisms and forensic genetics. **Handbook of Analytical Separations**, v. 6, p. 969–1000, 2008.

HAMMERSCHMIDT, D. **Identificación, genética, discriminación y criminalidad**. Curitiba: Juruá, 2012. 180 p.

HARES, D. R. Expanding the CODIS core loci in the United States. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 1, p. 52–54, 2012.

HAU, T. C. et. al. Decomposition Process and Post Mortem Changes : Review. **Sains Malaysiana**, v. 43, n. 12, p. 1873–1882, 2014.

HENINGER, M.; HANZLICK, R. The Fulton County Medical Examiner's Experience With the Federal Bureau of Investigation National Missing Person DNA Database Program 2004-2007. **Am J Forensic Med Pathol**. v. 32, Number 1, p. 78-82. 2011.

HERVELLA, M. et al. Nondestructive Methods for Recovery of Biological Material from Human Teeth for DNA Extraction. **J. Forensic Sci.**, v. 60, n. 1, p.136-141, 2015.

HIGGINS, D. et.al. Dentine and cementum as sources of nuclear DNA for use in human identification. **Journal of Forensic Sciences**, v. 43, n.4, p. 287-295. 2011.

HIGGINS, D.; AUSTIN, J.J. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. **Science and Justice**, n.53, p. 433-441,2013.

HOLLAND, M.M. et al. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. **Croat Med J**, v. 44, n. 3, p. 264-272, 2003.

INTERPOL – International Criminal Police Organization. **DISASTER victim identification guide**. [S.l.]: INTERPOL, 2009. 55 p.

_____. DNA monitoring expert group. **Best Practice Principles: Recommendations on the Use of DNA for the Identification of Missing Persons and Unidentified Human Remains**. [S.l.]: INTERPOL, 2015. 4 p.

IIDA, R.; KISHI, K. Identification, characterization and forensic application of novel Y-STRs. **Legal Medicine**, v. 7, n. 4, p. 255–258, 2005.

IOAN, B. G. et al. The Chemistry Decomposition in Human Corpses. **Revista de Chimie**, v. 68, n. 6, p. 1352–1356, 2017.

JEFFREYS, A.L.; BROOKFIELD,J.F.Y; SEMEONOFF R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. **Nature**, Leicester, v. 317, p.818-819, 1985.

JEFFREYS, A.J.; WILSON,V.; THEIN, S.L. Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. **Nature**, Leicester, v.314, n.7, p.67-73, mar. 1985a.

_____. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. **Nature**, Leicester, v.316, n.7, p.76-79, jul. 1985b.

JEFFREYS, A.J. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. **Nature**, v.332, p. 278-281, 1988.

JOBLING, M.A.; GILL, P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nature Reviews**, Leicester, v.5, p.739-752, out. 2004.

KIM, J.J. et al. Development of SNP-based human identification system. **Int. J. Legal Med.**, v.124, n.2, p. 125-131, 2010.

LOIRELLE, O.M. et. al. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. **Forensic Science International**, v.1, n.2, p. 191-195, 2007.

MALAYER, P.C.; YUNIS, J.J. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. **Forensic Sciences**, v. 44, n. 3, p. 306-309, 2003.

MARANHÃO. Diversidades do Maranhão: Subsídios para formulação dos planos de desenvolvimento urbano e regional. **Secretaria de Estado das Cidades e Desenvolvimento Urbano**.

MARTIN, P.D.; SCHMITTER, H.; SCHNEIDER, P.M. A brief history of the formation of DNA databases in forensic Science within Europe. **Forensic Science International**, n.119, p. 225-223, 2001.

MARTINS, M.V. **Y-miniSTR: alternativa para a análise de amostras“complicadas” - Estudo da população do Norte de Portugal**.2008.84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Forenses) – Universidade do Porto, Porto, 2008.

MATTE, C.H, F *et al.* A utilização da análise de DNA em desastres em massa: participação Brasileira na Identificação dos corpos do incêndio no Paraguai. Instituto Geral de Perícias. Revista do IPG, R.S, ano 3, janeiro 2007.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods in enzymology**, v.115, p.335-350, 1987.

MURTHY, V. et al. Forensic Identification by Using Insertion-deletion Polymorphisms. **Int. J. Hum. Genet.**, v.15, n.2, p.55-59, 2015.

NAKAMURA, Y. et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, v.235p.1616-1622, 1987.

NATA, M. BRINKMANN, B. ROLF, B. Y-Chromosomal STR haplotypes in a population from north West Germany. **Int. J. Legal. Med.**, v.112, p. 406-408, 1999.

NUNES, R.F. **Bancos de dados genéticos para fins criminais: aspectos bioéticos e biopolíticos**. 2012. 88f.

OLIVEIRA, J. L. M. **Perícia e investigação criminal uma proposta de melhoria do modelo organizacional visando a otimização de resultados**. 2013. 158 f.

PAJNIČ, I.Z. Evaluation of the quality of bone powder for successful STR typing of human skeletal remains. **Rom. J. Leg. Med.**, v.25, p.92-98, 2017.

PANETO, G.G. **Utilização do dna mitocondrial no contexto forense brasileiro**. 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

PANNEERCHELVAM, S. & NORAZMI, M.N. Forensic DNA profiling and database. **Malaysian Journal Sciences**, v.10,n.2, p.20-26, jul. 2003.

PENA, S.D.J.; BASTOS-RODRIGUES, L.; PIMENTA, J.R. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Braz. Biol. Res.**, v. 42, n.10, p.870-876, out. 2009.

PFEIFFER, H.; HUHNE, J.; BRINKMANN, B. Influence of soil storage and exposure period on DNA Recovery from teeth. **Int. J. Legal Med.**, n.112, p. 142-144, 1999.

PINTO, N.; GUSMÃO, L.; AMORIM, A. Mutation and mutation rates at y chromosome specific Short Tandem Repeat Polymorphisms (STRs): A reappraisal. **Forensic Science International: Genetics**, v. 9, n. 1, p. 20–24, 2014.

PLANZ, J. V.; HALL, T. A. Hidden Variation in Microsatellite Loci: Utility and Implications for Forensic DNA analysis. **Forensic Sci. Rev.**, v.24, n.2, p.27- 42, 2012.

POPOSKA, V, et. al. Estimation of Time Since Death by using Algorithm in Early Postmortem Period. **Global Journal of Medical Research**., v. 13, n.3., p.17-26, 2013.

PURPS, J.; SIEGERT, S.; WILLUWEIT. A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci. **Forensic Sci. Int. Genet.**, v. 12, p.12-23, 2014.

QIAGEN. **DNeasy Plant Handbook**. 2018. 67p. Disponível em:<<https://www.qiagen.com/kr/resources/faq?ID=efdf7c40-c2e9-4bb9-a4069618dd59654d&lang=en&Print=1>>. Acesso em: 01 abr. 2019.

QUINTANA-MURCI, L.; KRAUSZ, C.; MCELREAVEY, K. The human Y chromosome: Function, evolution and disease. **Forensic Science International**, v. 118, n. 2–3, p. 169–181, 2001.

RICAUT, Genetic analysis of a Scytho-Siberian Skeleton and Its Implications for Ancient Central Asian Migrations. **Human Biology**, v.76, n.1, p. 109-25, 2004.

ROHLAND, N.; HOFREITER, M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. **Nature protocols**, v. 2, n. 7, p. 1756-1762, 2007.

ROHLFING, T. et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature**, v. 423, n. 6942, p. 825–837, 2003.

ROOTSI, S. et al. Phylogeography of Y- chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. **Am. J. Hum. Genet.**, n.75, p. 128-137, 2004.

RUZGAR, E.; ERCIYES, K. Phylogenetic Tree Construction for Y-DNA Haplogroups. **Expert Systems with Applications**, n. April, 2011.

SANTOS, A.B.S.; COELHO, T.C.B.; ARAÚJO, E.M. Identidad racial y la producción de información en salud. **Interface (Botucatu)**, v.17, n.45, p.341-55, abr./jun., 2013.

SCHMERER, W. M. Optimized DNA extraction from ancient human bones improves the reproducibility of STR genotyping of highly degraded ancient DNA. **Technical Tips Online**, v. 6, n. 1, p. 41-45, 2001.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Reviews - Genetics**, v.05, p.63-69, jan. 2004.

SEMINO, O. Origin, diffusion, and differentiation of Y-chromosome haplogroups e and j: inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the mediterranean área. **Am. J. Hum. Genet.**, v.74, p. 1023-1034, 2004.

SILVA, C.I.V. **Métodos estatísticos para análise de Y-STRs em genética forense**. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioestatística) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

SKALETISKY. et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature**, v. 423, n. 6942, p. 825–837, 2003.

SMITH, B.C. et al. A systematic approach to the sampling of dental DNA. **Journal of Forensic Sciences**, v.38, n.5, p.1194-1209, 1993.

SCHNEIDER, P.M. Expansion of the European Standard Set of DNA database loci- the current situation. **Promega Corporation**, n.7, p.6-7, 2009.

SIVAGAMI, A.V.; REJESWARA, A. R.; VARSHNEY, U. 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 Science International.**, v. 110, p.107-115, 2000.

THOMPSON, Jonelle M. *et al.* - The PowerPlex® Y23 System: A New Y-STR Multiplex for Casework and Database Applications. 2012) 1–6.

TROMBETTA, B. *et al.* **A new topology of the human Y chromosome haplogroup E1b1 (E-P2) revealed through the use of newly characterized binary polymorphisms.**, v. 6, n. 1, p.1-4, 2011.

TROVÃO, J.R. O processo de ocupação do território maranhense. **Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos**. São Luis: Caderno do IMESC nº5, 2008.

TSUCHIMOCHI, T. *et al.* Chelating resin – based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v.23, n.3, p.268-271, 2002.

TURCHETTO-ZOLET, A; *et al.* **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

WOODWARD, S.R. *et al.* Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. **PCR Methods Appl.**, New York, v. 3, n. 4, p.244-247, 1994.

WYMAN, A. R.; WHITE, R. A highly polymorphic locus in human DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.77, n.11, p.6754-6758, ago. 1980.

ŻOŁĘDZIEWSKA, M.; GRONKIEWICZ, S.; DOBOSZ, T. Comparison of various decalcifiers in preparation of DNA from human rib bone. **Anthropological Review**, v. 65, p.75-80, 2002.

APÊNDICE A

FIGURA 11 – Elementos dentários NRNI/NR.



APÊNDICE B

TABELA 7 - Metadados das amostras de indivíduos NRNI/NR obtidos do exame odontológico de cadáver do IML-SLZ/MA

Amostra	NRNI	Data da Entrada	Origem	Sexo	Identidade	Causa mortis	Estatura (m)	Pele	Estado de Decomposição
1	12/15	09/03/2015	Socorrão II	F	NRNI	Arma branca	1,52	-	Putrefação
2	25/15	02/06/2015	Residência I Pirâmide	M	NRNI	Choque hipovolêmico	-	Faioderma	Putrefação
3	29/15	03/06/2015	Av. Guajajaras	F	NRNI	Politraumatismo por acidente de trânsito	-	Melanoderma	-
4	31/15	05/07/2015	Divineia	M	NRNI	*	-	-	Putrefação
5	32/15	05/07/2015	-	M	NRNI	*	-	Melanoderma	Putrefação
6	40/15	09/07/2015	Vila Magril	M	NR	Doença	1,6	Faioderma	-
7	41/15	09/07/2015	Mercado Municipal (Fonte das Pedras)	M	NRNI	Intoxicação	1,63	Leucoderma	-
8	43/15	-	Nova Terra	M	-	*	-	-	-
9	62/15	13/08/2015	Vila Embratel	M	NRNI	Arma de fogo	1,58	Faioderma	-
10	67/15	23/08/2015	Quebra Pote	M	NRNI	Arma de fogo	1,8	Faioderma	-
11	74/15	05/09/2015	Araçagy	M	NRNI	Arma de fogo	1,68	Melanoderma	Flacidez
12	77/15	26/09/2015	Centro	M	NRNI	Paulada	1,75	Melanoderma	-
13	85/15	19/10/2015	Socorrão II	M	NR	*	1,7	Melanoderma	-
14	89/15	13/09/2015	Unidade mista do Bequimão	M	NR	Doença	1,82	Faioderma	Putrefação
15	92/15	02/11/2015	Santa Inês	M	NRNI	Arma branca	1,63	Faioderma	-
16	95/15	05/11/2015	Estiva	-	NR	*	1,58	Melanoderma	-
17	99/15	22/11/2015	Estreito dos Mosquitos	M	NRNI	Afogamento	1,7	-	Gasosa
18	118/15	20/12/2015	São Cristóvão	M	NRNI	Arma de fogo	-	Faioderma	-
19	19/16	08/02/2016	Upa Bacanga	M	NR	Doença	1,7	Faioderma	-
20	35/16	21/03/2016	Barragem Bacanga	M	NR	*	1,75	-	Putrefação
21	40/16	30/03/2016	Zé Doca	M	-	*	-	Faioderma	Putrefação

22	45/16	07/04/2016	Maracana	M	-	*	1,7	-	Putrefação
23	49/16	21/03/2016	Vila República	M	NRNI	*	1,7	-	Putrefação
24	50/16	16/04/2016	Centro São José de Ribamar/M A	M	-	*	1,7	Faioderma	-
25	53/16	22/04/2016	Socorral II	M	NRNI	Morte natural	1,5	Faioderma	-
26	55/16	26/04/2016	Upa Cidade Operária Raposa/M A	M	NRNI	Doença	1,66	Faioderma	Rigidez cadaverica
27	57/16	06/05/2016	Rido dos Cachorros Porto - Grande	M	NR	*	1,6	Faioderma	Rigidez cadaverica
28	58/16	06/05/2016	Socorral I	M	NRNI	*	1,65	Melanoderma	Rigidez cadaverica
29	60/16	06/05/2016	Socorral II	M	NRNI	*	1,75	Melanoderma	Rigidez cadaverica
30	61/16	13/05/2016	Vila José I - Maiobao	M	NRNI	Espancamento Politraumatismo por acidente de trânsito	1,65	Faioderma	-
31	62/16	17/05/2016	Socorral I	F	NRNI	Arma de fogo	1,44	Melanoderma	Rigidez cadaverica
32	73/16	05/06/2016	Socorral I	M	NR	Arma de fogo	1,63	Faioderma	Rigidez cadaverica
33	90/16	03/08/2016	Cidade Operária Mauro Fecury Unidade Mista do Bequimaio	M	NRNI	Indeterminada	-	-	Putrefação
34	96/16	24/08/2016	Socorral I	M	NR	*	1,62	Melanoderma	Flacidez
35	98/16	31/08/2016	Socorral I	M	NRNI	*	1,6	Melanoderma	Rigidez cadaverica
36	99/16	09/09/2016	Socorral I	M	NR	Doença	1,6	Faioderma	Rigidez cadaverica
37	103/16	25/09/2016	Socorral I	M	NRNI	Arma branca	1,58	Faioderma	Rigidez cadaverica
38	105/16	04/10/2016	Socorral I	M	-	Morte natural	1,67	Faioderma	-
39	112/16	20/10/2016	Vila Nova	M	NR	Indeterminada	1,62	Faioderma	-
40	116/16	09/11/2016	Santa Rita/MA Bairro Vassoural (Paço do Lumiar/MA)	M	NRNI	Arma branca	1,66	Faioderma	-
41	121/16	12/11/2016	Porto do Jacamin	M	-	*	-	-	Esqueletização
42	124/19	02/12/2016	-	M	NR	*	-	-	-
43	125/16	05/12/2016	Rua dos Afogados	M	NR	*	1,64	Melanoderma	Putrefação
44	130/16	22/12/2016	Socorral II	M	NRNI	Arma branca	1,74	Melanoderma	-
45	132/16	25/12/2016	Socorral II	M	NR	Doença	1,78	Melanoderma	Flacidez
46	03r/17	07/02/2017	Socorral II	M	-	*	-	Faioderma	Rigidez cadaverica

47	07/17	24/01/2017	Socorrao II	M	NR	Morte natural	1,65	Leucoderma	-
48	11/17	03/02/2017	Vale	M	-	Soterramento	1,63	Faioderma	Flacidez
49	27/17	10/04/2017	Unidade Mista Bacanga Santa Inês/MA	M	NR	Morte natural	1,67	Faioderma	Flacidez
50	28/17	-	Pindaré Mirim/MA	M	-	*	-	-	Putrefação
51	30/17	04/04/2017	São Francisco	M	NR	Enforcamento	1,7	-	Putrefação
52	34/17	04/05/2017	Estrada do Maiobão	M	NRNI	Indeterminada	1,7		Putrefação

APÊNDICE C

TABELA 8 – Classificação dos elementos dentários

Amostras	Classificação	Amostras	Classificação
1	12.1-15: Pré-Molar Inferior 12.2-15: Pré-Molar Inferior 12.3-15: Molar Inferior	27	57.1-16: Incisivo Central Superior 57.2-16: Pré-Molar Superior 57.3-16: Pré-Molar Inferior
2	25.1-15: Pré-Molar Inferior 25.2-15: Pré-Molar Inferior 25.3-15: Molar Inferior 25.4-15: Molar Inferior	28	58.1-16: Pré-Molar Superior 58.2-16: Pré-Molar Inferior 58.3-16: Pré-Molar Inferior
3	29.1-15: Canino Superior 29.2-15: Não identificado	29	60.1-16: Canino Superior 60.2-16: Pré-Molar Superior 60.3-16: Molar Superior
4	31.1-15: Pré-Molar Superior 31.2-15: Pré-Molar Superior 31.3-15: Pré-Molar Superior	30	61.1-16: Pré-Molar Inferior 61.2-16: Molar Superior 61.3-16: Canino Superior
5	32.1-15: Pré-Molar Inferior 32.2-15: Incisivo Central Superior 32.3-15: Pré-Molar Inferior	31	62.1-16: Pré-Molar Inferior 62.2-16: Canino Superior 62.3-16: Pré-Molar Superior
6	40.1-15: Pré-Molar Superior 40.2-15: Pré-Molar Inferior 40.3-15: Pré-Molar Inferior	32	73.1-16: Pré-Molar Inferior 73.2-16: Canino Superior 73.3-16: Incisivo Central
7	41.1-15: Pré-Molar Superior 41.2-15: Pré-Molar Inferior 41.3-15: Pré-Molar Inferior 41.4-15: Incisivo Superior	33	90.1-16: Molar Superior 90.2-16: Molar Superior 90.3-16: Molar Superior
8	43.1-15: Molar Superior 43.2-15: Pré-Molar Superior 43.3-15: Pré-Molar Inferior	34	96.1-16: Pré-Molar Inferior 96.2-16: Pré-Molar Inferior 96.3-16: Pré-Molar Inferior
9	62.1-15: Pré-Molar Superior 62.2-15: Pré-Molar Inferior 62.3-15: Pré-Molar Superior	35	98.1-16: Pré-Molar Inferior 98.2-16: Pré-Molar Inferior 98.3-16: Pré-Molar Inferior
10	67.1-15: Molar Superior 67.2-15: Molar Superior 67.3-15: Pré-Molar Superior	36	99.1-16: Pré-Molar Superior 99.2-16: Pré-Molar Inferior
11	74.1-15: Molar Superior 74.2-15: Pré-Molar Inferior 74.3-15: Pré-Molar Inferior	37	103.1-16: Pré-Molar Superior 103.2-16: Pré-Molar Superior 103.4-16: Pré-Molar Superior
12	77.1-15: Incisivo Central Superior 77.2-15: Incisivo Central Superior 77.3-15: Incisivo Lateral Superior	38	105.1-16: Pré-Molar Inferior 105.2-16: Pré-Molar Inferior 105.3-16: Incisivo Superior
13	85.1-15: Canino Superior 85.2-15: Pré-Molar Inferior	39	112.1-16: Pré-Molar Inferior 112.2-16: Pré-Molar Inferior 112.3-16: Pré-Molar Inferior 112.4-16: Pré-Molar Inferior
14	89.1-15: Incisivo Superior 89.2-15: Incisivo Inferior 89.3-15: Incisivo Superior	40	116.1-16: Pré-Molar Superior 116.2-16: Pré-Molar Superior 116.3-16: Pré-Molar Superior
15	92.1-15: Canino Superior 92.2-15: Incisivo Superior 92.3-15: Pré-Molar Inferior	41	121.1-16: Incisivo Superior 121.2-16: Canino Superior 121.3-16: Pré-Molar Inferior
16	95.1-15: Molar Superior 95.2-15: Molar Superior 95.3-15: Pré-Molar Superior 95.4-15: Molar Superior	42	124.1-16: Pré-Molar Inferior 124.2-16: Pré-Molar Inferior 124.3-16: Pré-Molar Superior
17	99.1-15: Pré-Molar Superior 99.2-15: Pré-Molar Superior	43	125.1-16: Pré-Molar Superior 125.2-16: Pré-Molar Superior

18	99.3-15: Molar Superior 118.1-15: Incisivo Inferior 118.2-15: Incisivo Inferior 118.3-15: Incisivo Superior	44	125.3-16: Pré-Molar Superior 130.1-16: Pré-Molar Inferior 130.2-16: Pré-Molar Superior 130.3-16: Pré-Molar Superior
19	19.1-16: Pré-Molar Superior 19.2-16: Incisivo Inferior 19.3-16: Canino Superior	45	132.1-16: Pré-Molar Superior 132.2-16: Pré-Molar Superior 132.3-16: Pré-Molar Inferior
20	35.1-16: Incisivo Central Superior 35.2-16: Incisivo Inferior 35.3-16: Incisivo Lateral Superior	46	03.1-17: Pré-Molar Superior 03.1-17: Pré-Molar Superior 03.3-17: Pré-Molar Inferior
21	40.1-16: Molar Superior 40.2-16: Pré-Molar Superior 40.3-16: Pré-Molar Inferior	47	07.1-17: Fragmento Osso Alveolar 07.2-17: Molar Inferior 07.3-17: Pré-Molar Inferior
22	45.1-16: Pré-Molar Superior 45.2-16: Pré-Molar Inferior 45.3-16: Incisivo Inferior 45.4-16: Pré-Molar Superior	48	11.1-17: Pré-Molar inferior 11.2-17: Incisivo Lateral Superior 11.3-17: Pré-Molar Superior
23	49.1-16: Incisivo Inferior 49.2-16: Incisivo Inferior	49	27.1-17: Molar Superior 27.2-17: Pré-Molar Inferior
24	50.1-16: Pré-Molar Superior 50.2-16: Molar Superior 50.3-16: Pré-Molar Inferior	50	28.1-17: Pré-Molar Superior 28.2-17: Pré-Molar Superior 28.3-17: Pré-Molar Inferior
25	53.1-16: Pré-Molar Inferior 53.2-16: Incisivo Lateral Superior 53.3-16: Pré-Molar Inferior	51	30.1-17: Pré-Molar Superior 30.2-17: Pré-Molar Inferior 30.3-17: Molar Superior
26	55.1-16: Pré-Molar Superior 55.2-16: Canino Superior 55.3-16: Pré-Molar Inferior	52	34.1-17: Pré-Molar Superior 34.2-17: Canino Superior 34.3-17: Pré-Molar Inferior

APÊNDICE D

FIGURA 12 – Seccionamento dos elementos dentários.



APÊNDICE E

Tabela 9- Números de ciclos (Ct) necessários para atingir o threshold na amplificação do IPC das amostras NRNI/NR

		PRÉ-TRATAMENTO				
		DESCALCIFICAÇÃO		PULVERIZAÇÃO		
		MÉTODO DE EXTRAÇÃO		MÉTODO DE EXTRAÇÃO		
INDIVÍDUO	AMOSTRA	IPC ORGÂNICO A (Ct)	IPC AUTOMATIZADO T. (Ct)	IPC ORGÂNICO A (Ct)	IPC AUTOMATIZADO T. (Ct)	IPC CHELLEX (Ct)
1	12.1-15: Pré-Molar Inferior		27,79	28,01	27,78	29,17
	12.2-15: Pré-Molar Inferior	28,09				
	12.3-15: Molar Inferior			28,21	27,84	27,37
2	25.1-15: Pré-Molar Inferior	28,26				
	25.4-15: Molar Inferior		27,86	27,97	29,41	29,25
	29.1-15: Canino Superior	28,21				
3	29.2-15: Não identificado		27,75	27,7	28,38	29,06
	31.1-15: Pré-Molar Superior		27,93	27,92	27,82	26,75
	31.3-15: Pré-Molar Superior	27,89				
4	32.3-15: Pré-Molar Inferior	27,76		28,1	29,06	26,51
	40.1-15: Pré-Molar Superior		27,92		28,01	
	40.2-15: Pré-Molar Inferior	27,96				

7	40.3-15: Pré-Molar Inferior		28,1	28,2	26,51
	41.1-15: Pré-Molar Superior	27,78			
	41.2-15: Pré-Molar Inferior		23,49	28,12	28,59
8	43.2-15: Pré-Molar Superior		27,94	28,28	28,04
	43.3-15: Pré-Molar Inferior	28,1		27,13	28,95
	62.1-15: Pré-Molar Superior		28,15	28,08	28,12
9	62.2-15: Pré-Molar Inferior	27,78			28,28
10	67.3-15: 74.1-15: Molar	28,01	0		
11	Superior		27,96	28,21	27,09
	74.2-15: Pré-Molar Inferior	28,12			29,01
	77.1-15: Incisivo Central		27,94	25,74	28,31
12	Superior				29,87
	77.2-15: Incisivo Central				
	Superior	27,66			
13	85.1-15: Canino Superior		27,86	28	28,19
	85.2-15: Pré-Molar Inferior	28,15			27,78
	89.1-15: Incisivo Superior		27,68	27,82	28,23
14	89.3-15: Incisivo Superior	27,97			27,99

15	92.1-15: Canino Superior		27,66	28,21	27,71	24,77
	92.3-15: Pré-Molar Inferior	28,17				
16	95.2-15: Molar Superior	27,76		28,01		
	95.4-15: Molar Superior		27,8	27,98	28,08	28,01
17	99.1-15: Pré-Molar Superior		27,86	27,71	28,3	28,54
	99.2-15: Pré-Molar Superior	28,24				
18	118.2-15: Incisivo Inferior	27,84				
	118.3-15: Incisivo Superior		27,81	28,05	28,01	25,95
19	19.2-16: Incisivo Inferior	27,55				
	19.3-16: Canino Superior		27,69	27,91	28	23,75
20	35.1-16: Incisivo Central Superior		28,13	28,13	27,74	29,72
	35.3-16: Incisivo Lateral Superior	27,78				
21	40.1-16: Molar Superior		28,03	28,00		26,98
	40.2-16: Pré-Molar Superior	28,44				
22	45.1-16: Pré-Molar Superior		28,27	27,8	28,01	26,51
	45.2-16: Pré-Molar Inferior		27,94	28,39	28,01	27,59

	45.3-16: Incisivo Inferior	27,51				
23	49.1-16: Incisivo Inferior	27,66				
	49.2-16: Incisivo Inferior		27,91	27,77	27,83	27,76
24	50.2-16: Molar Superior		27,81	27,88	28,05	27,72
	50.3-16: Pré-Molar Inferior	27,89				
25	53.1-16: Pré-Molar Inferior	27,84	28,1	28,1	27,95	30,15
	53.3-16: Pré-Molar Inferior	27,61				
26	55.1-16: Pré-Molar Superior		27,9	27,72	28,33	28,29
	57.2-16: Pré-Molar Superior		27,88	27,67	27,96	28,07
27	57.3-16: Pré-Molar Inferior	27,44				
28	58.1-16: Pré-Molar Superior	27,98	28,09	28,03	27,66	25,51
29	60.1-16: Canino Superior	28,1				
	60.3-16: Molar Superior		28,02	27,95	28	28,76
30	61.1-16: Pré-Molar Inferior	28,31				
	61.2-16: Molar Superior		27,78	27,69	28,08	29,2
31	62.2-16: Canino Superior	28,19		27,87		

	62.3-16: Pré-Molar Superior		28,04		28,16	23,46
32	73.1-16: Pré-Molar Inferior		27,88	27,87	28,23	24,72
	73.2-16: Canino Superior	28,02				
33	90.1-16: Molar Superior					
	90.2- 16:Molar Superior		27,99	28,15	27,94	28,45
	90.3- 16:Molar Superior	27,58				
34	96.2-16: Pré-Molar Inferior		28,07	27,99	27,86	28,36
	96.3-16: Pré-Molar Inferior	27,77				
35	98.1-16: Pré-Molar Inferior	27,61		28,14		
	98.2-16: Pré-Molar Inferior		27,89	28,14	27,82	27,56
36	99.1-16: Pré-Molar Superior	28,1		27,93		
	99.3-16		27,86			
37	103.1-16: Pré-Molar Superior					
	103.2-16: Pré-Molar Superior		28,06	27,94	27,9	28,52
	103.3- 16:Pré- Molar Superior	28,06				
38	105.1-16: Pré-Molar Inferior		27,92	28,07	28,03	29,62
	105.2-16: Pré-Molar Inferior	27,83				

39	112.1-16: Pré-Molar Inferior	27,88	27,81	27,97	27,49
	112.3-16: Pré-Molar Inferior	27,61			
40	116.1-16: Pré-Molar Superior	27,69	27,79	27,88	30,08
	116.3-16: Pré-Molar Superior	27,86			
41	121.1-16: Incisivo Superior				
	121.2-16: Canino Superior	27,75			
	121.3-16: Pré-Molar Inferior	27,9	28,03	28,78	28,03
42	124.2-16: Pré-Molar Inferior	27,92	27,88	28,02	28,83
43	125.1-16: Pré-Molar Superior	27,58			
	125.3-16: Pré-Molar Superior	27,87	27,88	27,75	28,73
44	130.1-16: Pré-Molar Inferior	27,65			
	130.2-16: Pré-Molar Superior	27,79	28	27,93	25,99
45	132.1-16: Pré-Molar Superior	27,74		27,71	
	132.2-16: Pré-Molar Superior	28,27	28,12	28	28,3
46	03.3-17: Pré-Molar Inferior	27,93	28,08	23,49	27,9
47	07.1-17: Fragment o Osso Alveolar				

48	07.2-17: Molar Inferior		27,81	28,12	27,63	22,81
	07.3-17: Pré-Molar Inferior	28,01				
	11.1-17: Pré-Molar inferior	27,74				
	11.2-17: Incisivo Lateral Superior		27,96	27,78	27,82	
49	11.3-17: Pré-Molar Superior		27,83		27,98	26,79
	27.1-17: Molar Superior		28	28	28	29
	27.2-17: Pré-Molar Inferior	27,77				
	28.1-17: Pré-Molar Superior		27,88	27,85	27,95	26,89
50	28.2-17: Pré-Molar Superior	27,87				
	30.1-17: Pré-Molar Superior		27,87	27,85	27,85	27,04
	30.2-17: Pré-Molar Inferior	27,43				
	30.3-17: Molar Superior		27,54	28,10	27,95	24,87
51	34.2-17: Canino Superior		27,91	28,07	27,87	26,14
	34.3-17: Pré-Molar Inferior	27,34				
52						

APÊNDICE F

Tabela 10 - Concentração em ng/uL de dna extraído dos 52 indivíduos NRNI/NR conforme as duas etapas de pré-tratamento e três métodos de extração. Quantificação pelo método de PCR em tempo real com sonda específica para DNA humano (SA).

		PRÉ-TRATAMENTO				
		DESCALCIFICAÇÃO		PULVERIZAÇÃO		
INDIVÍDUO	AMOSTRA	MÉTODO DE EXTRAÇÃO [ORGÂNICA] (ng/uL)	[AUTOMAT.] (ng/uL)	MÉTODO DE EXTRAÇÃO [ORGÂNICA] (ng/uL)	[AUTOMAT.] (ng/uL)	[CHELLEX] (ng/uL)
1	12.1-15: Pré-Molar Inferior		0,0640	0,0257	0,1374	Indeterminado
	12.2-15: Pré-Molar Inferior	0,1065				
	12.3-15: Molar Inferior			0,0290	0,1095	0,0002
2	25.1-15: Pré-Molar Inferior	0,5905				
	25.4-15: Molar Inferior		0,0046	0,0017	0,8739	0,0012
	29.1-15: Canino Superior	0,6325				
3	29.2-15: Não identificado		0,0528	0,0177	0,0204	0,1544
	31.1-15: Pré-Molar Superior		0,0322	0,0152	0,4454	0,0006
	31.3-15: Pré-Molar Superior	0,1189				
5	32.3-15: Pré-Molar Inferior	0,1197		0,0562	0,0331	0,0004
	40.1-15: Pré-Molar Superior		0,0053		0,7409	
	40.2-15: Pré-Molar Inferior	0,0292				
6	40.3-15: Pré-Molar Inferior			0,0014	0,0347	Indeterminado
	41.1-15: Pré-Molar Superior	0,0013				
	41.2-15: Pré-Molar Inferior		3,6286	0,0031	0,0100	Indeterminado
8	43.2-15: Pré-Molar Superior		0,0133	0,0031	0,0424	0,0005
	43.3-15: Pré-Molar Inferior	2,3046		0,2366		
	62.1-15: Pré-Molar Superior		0,0031	0,0004	0,4245	0,0013
9	62.2-15: Pré-Molar Inferior	0,1872				
	67.3-15:	0,1141				

	74.1-15: Molar				
11	Superior	0,6729	1,5788	11,6816	0,1248
	74.2-15: Pré- Molar Inferior	8,3396			
12	77.1-15:	3,1406	3,1841	1,9406	0,0766
	77.2-15:	0,0082			
	85.1-15: Canino				
13	Superior	0,0037	0,0018	0,0627	Indeterminado
	85.2-15: Pré- Molar Inferior	0,6154			
	89.1-15: Incisivo				
14	Superior	0,0045	0,0041	0,0782	0,0006
	89.3-15: Incisivo				
	Superior	0,1292			
	92.1-15: Canino				
15	Superior	0,0063	0,0009	0,1555	Indeterminado
	92.3-15: Pré- Molar Inferior	0,3624			
	95.2-15: Molar				
16	Superior	0,5182	0,0935		
	95.4-15: Molar				
	Superior	0,1534	0,0124	0,4871	0,0021
	99.1-15: Pré- Molar				
17	Superior	0,0112	0,0010	0,0271	0,0034
	99.2-15: Pré- Molar				
	Superior	0,0106			
	118.2-15: Incisivo				
18	Inferior	0,0043			
	118.3-15: Incisivo				
	Superior	0,0138	0,0133	0,4904	Indeterminado
	19.2-16: Incisivo				
19	Inferior	0,0448			
	19.3-16: Canino				
	Superior	0,0088	0,0003	0,0181	0,0004
	35.1-16: Incisivo				
	Central				
20	Superior	0,0133	0,0157	0,1412	0,0007
	35.3-16: Incisivo				
	Lateral				
	Superior	0,0016			
	40.1-16: Molar				
21	Superior	0,1809	0,0003		0,0024

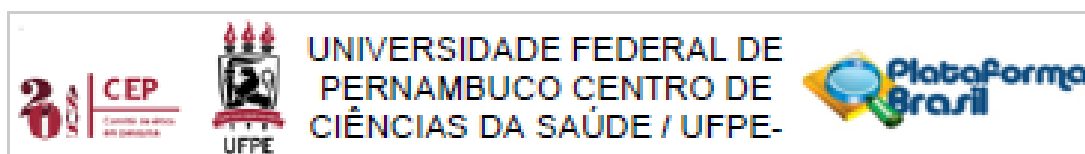
	40.2-16: Pré-Molar Superior	0,0843				
	45.1-16: Pré-Molar Superior		0,1206	0,0034	0,1992	0,0019
22	45.2-16: Pré-Molar Inferior		0,0074	0,0988	0,2752	0,0004
	45.3-16: Incisivo Inferior	0,0134				
	49.1-16: Incisivo Inferior					
23	49.2-16: Incisivo Inferior	0,0145				
	50.2-16: Molar Superior		0,0333	0,0322	0,1036	0,0219
24	50.3-16: Pré-Molar Inferior	0,0052	0,0031	0,0006	0,1748	Indeterminado
	53.1-16: Pré-Molar Inferior	0,8047	0,0048	0,0010	0,3674	0,0001
25	53.3-16: Pré-Molar Inferior	0,3337				
	55.1-16: Pré-Molar Superior		0,0025	Indeterminado	0,0388	Indeterminado
26	57.2-16: Pré-Molar Superior		0,0333	0,0007	0,0578	0,0001
27	57.3-16: Pré-Molar Inferior	0,0467				
	58.1-16: Pré-Molar Superior	0,0073	0,0026	0,0034	0,0424	Indeterminado
28	60.1-16: Canino Superior	0,0014				
29	60.3-16: Molar Superior		0,1103	0,0407	0,0941	0,0002
	61.1-16: Pré-Molar Inferior	0,3453				
30	61.2-16: Molar Superior		0,0059	0,0916	0,3030	0,0014
	62.2-16: Canino Superior	0,0677		0,0011		
31	62.3-16: Pré-Molar Superior		0,2829		0,0269	0,0002
32	73.1-16: Pré-Molar Inferior		0,0151	0,0106	0,0219	0,0006
	73.2-16: Canino Superior	0,9959				

33	90.2- 16:Molar Superior	0,0606	0,0338	0,0113	0,0011
	90.3- 16:Molar Superior	0,0177			
34	96.1-16: Pré- Molar Inferior				
	96.2-16: Pré- Molar Inferior	0,1598	0,0663	0,3430	0,0008
	96.3-16: Pré- Molar Inferior	0,4706			
35	98.1-16: Pré- Molar Inferior	0,0909	0,0003		
	98.2-16: Pré- Molar Inferior	0,0036	0,0003	0,0885	0,0004
36	99.1-16: Pré- Molar Superior	0,6413	0,0017		
	99.2-16: Pré- Molar Inferior				
	99.3-16	0,0030			
37	103.2-16: Pré-Molar Superior	0,0350	0,0086	0,0658	0,0003
	103.3-16:	0,0277			
38	105.1-16: Pré-Molar Inferior	0,0045	0,0002	0,0755	0,0001
	105.2-16: Pré-Molar Inferior	0,0006			
39	112.1-16: Pré-Molar Inferior	0,0088	0,0004	0,0457	0,0024
	112.3-16: Pré-Molar Inferior	0,0023			
40	116.1-16: Pré-Molar Superior	0,0043	0,0001	0,0206	0,0001
	116.3-16: Pré-Molar Superior	0,0347			
41	121.2-16: Canino Superior	0,1189			
	121.3-16: Pré-Molar Inferior	0,0048	0,0014	0,0139	0,0010
42	124.2-16: Pré-Molar Inferior	0,0034	0,0005	0,0264	0,0013
43	125.1-16: Pré-Molar Superior	0,1724			
	125.3-16: Pré-Molar Superior	0,0230	0,0202	0,0354	0,0003

	130.1-16: Pré-Molar					
44	Inferior	0,2605				
	130.2-16: Pré-Molar					
	Superior		0,0044	0,0009	0,1598	Indeterminado
	132.1-16: Pré-Molar					
45	Superior		0,0849		0,2134	
	132.2-16: Pré-Molar					
	Superior	0,0014	0,0161	0,0398	0,2829	0,0003
	03.3-17: Pré-					
46	Molar Inferior		0,0715	0,0442	2,4350	0,0007
	07.2-17:					
47	Molar Inferior		0,0036	0,0003	0,0296	Indeterminado
	07.3-17: Pré-					
	Molar Inferior	0,0006				
	11.1-17: Pré-					
48	Molar inferior	0,0010				
	11.2-17: Incisivo					
	Lateral					
	Superior		0,0030	0,0010	0,0137	
	11.3-17: Pré-					
	Molar					
	Superior		0,0380		0,0619	Indeterminado
	27.1-17: Molar					
49	Superior		0,0225	0,0072	0,0861	0,0009
	27.2-17: Pré-					
	Molar Inferior	0,4333				
	28.1-17: Pré-					
	Molar					
50	Superior		0,0054	0,0098	0,1065	0,0005
	28.2-17: Pré-					
	Molar					
	Superior	0,0410				
	30.1-17: Pré-					
	Molar					
51	Superior		0,0039	Indeterminado	0,0359	Indeterminado
	30.2-17: Pré-					
	Molar Inferior	0,0005				
	30.3-17: Molar					
	Superior		0,0582	0,0038	0,1173	0,0003
	34.2-17: Canino					
52	Superior		0,0078	Indeterminado	0,0279	0,0002
	34.3-17: Pré-					
	Molar Inferior	0,0133				

ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO DNA NUCLEAR E MITOCONDRIAL DE OSSOS HUMANOS (DENTES) DE PESSOAS NÃO RECLAMADAS DO SETOR DE ODONTOLOGIA LEGAL DO INSTITUTO MÉDICO LEGAL DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL

Pesquisador: Valdir de Queiroz

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 84801518.1.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.625.726

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa do Prof. Valdir de Queiroz, pertencente ao Departamento de Genética da UFPE. Este projeto se propõe a recuperar e identificar o material genético de restos mortais (dentes) de indivíduos não reclamados da Seção de Antropologia Forense do Instituto Médico Legal de São Luís, Maranhão (IML-SLZ/MA), através de marcadores microssatélites (autossômicos e do cromossomo Y) e de sequências do DNA mitocondrial. A pesquisa é justificada em função da necessidade de se estabelecer protocolos para a identificação de restos mortais, que serão adotados pelo Instituto de Genética Forense do Maranhão (IGF/MA).

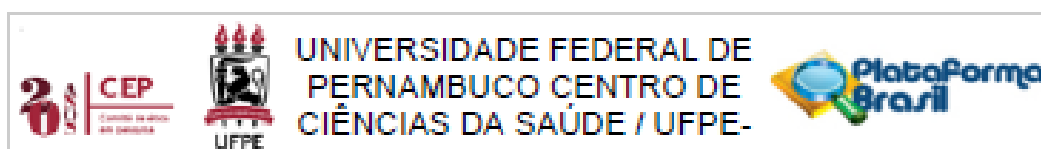
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Identificar o DNA nuclear e mitocondrial de ossos humanos (dentes) de indivíduos não reclamados do Setor de Odontologia Legal do Instituto Médico Legal de São Luís/MA, com o intuito de obter parâmetros sobre a ancestralidade matrilinear e patrilinear.

Objetivo Específicos:

1-Avaliar os metadados das amostras de interesse; 2-Validar os métodos analíticos de pré-tratamento e extração; 3- Obter o perfil genético das ossadas (marcadores autossômicos, marcadores Y e DNA mitocondrial compatíveis com os marcadores recomendados pelo CODIS).

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.625.726

com

finalidade identificatória; 4-Inferir a origem ancestral das amostras analisadas através de marcadores de linhagem (cromossomo Y e mtDNA).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador descreve que os riscos da pesquisa será o de poder gerar eventual dano intelectual, cultural e/ou espiritual, bem como desconforto ou constrangimento aos voluntários. Caso seja, identificado, tudo será esclarecido pelo pesquisador e a exclusão da pesquisa será imediata sem qualquer constrangimento com os pesquisadores. Os riscos poderão ser minimizados através da realização da coleta de dados pessoais em ambiente reservado, podendo o participante reivindicar a saída da pesquisa a qualquer momento. Não haverá nenhum risco relacionado à saúde dos voluntários, os quais doarão um elemento dental extraído, que seria descartado.

Os benefícios serão indiretos e estão bem detalhado no projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

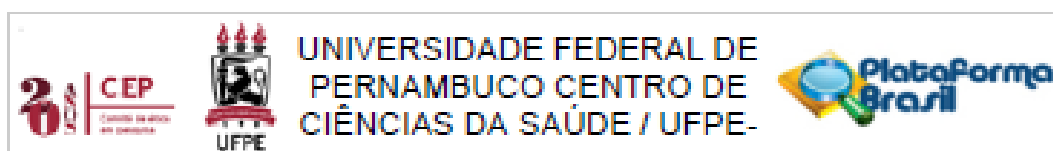
O pesquisador responsável acatou e corrigiu as pendências apresentadas, além de fazer a justificativa das incoerências que constavam do projeto original.

O estudo utilizará 55 dentes de cadáveres não reclamados, coletados pelo Instituto Médico Legal (IML) de São Luís/MA e acauteladas pelo Instituto de Genética Forense do Estado do Maranhão, e de 10 pessoas vivas que irão ceder voluntariamente o dente extraído após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras serão submetidas a um pré-tratamento e ao protocolo de extração orgânica, Fishing e chelex. Após a extração, as amostras serão quantificadas por PCR em tempo real, e os resultados serão analisados através do Software GeneMapper ID®. A análise do mtDNA será conduzida mediante a amplificação das regiões hipervariáveis HVSH e HVSH-II. A purificação do material será através do sistema de enzimas hidrolíticas Exonuclease I e SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (GE). Os marcadores restantes serão sequenciados de modo direto pelos produtos de PCR das fitas direta e reversa de cada amostra. As sequências serão analisadas com os programas Pregap4 v 1.5 e Gap4 incorporados no Staden Package (Staden, 1996), usando um ponto de corte de Phred 30. A confirmação da identidade dos produtos será efetuada contra sequências depositadas no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) através do programa Blast N (Altschul et al., 1990). Esta parte será realizada no Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (UFPE).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Acompanha o projeto a documentação necessária.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.025.726

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as Instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/OCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (Item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

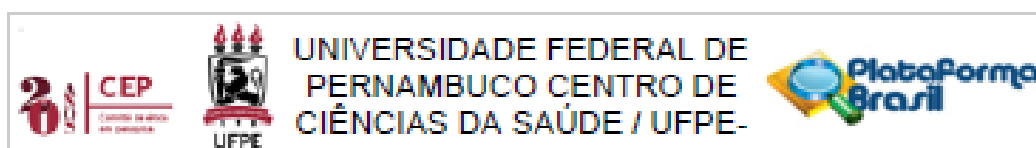
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (Item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/OCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Recurso do Parecer	recurso.pdf	26/04/2018 10:30:38		Aceito
Outros	Carta_Anuencia_MA.pdf	26/04/2018 10:30:15	Valdir de Queiroz	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2128-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br



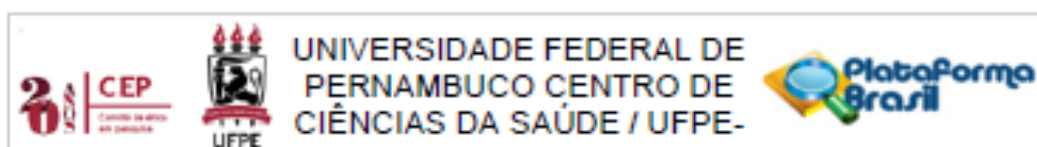
Continuação do Parecer: 2.025.720

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoV2.pdf	26/04/2018 10:29:45	Valdir de Queiroz	Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_Recurso_Pendencias.pdf	26/04/2018 10:29:30	Valdir de Queiroz	Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1087222.pdf	09/03/2018 11:15:54		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel_Legal.pdf	09/03/2018 11:14:29	Valdir de Queiroz	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/03/2018 11:14:17	Valdir de Queiroz	Acelto
Outros	Declaracao_Financiamento.pdf	09/03/2018 10:52:45	Valdir de Queiroz	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Maiores18anos.pdf	09/03/2018 10:47:25	Valdir de Queiroz	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_Menores7_18anos.pdf	09/03/2018 10:47:08	Valdir de Queiroz	Acelto
Outros	Carta_Anuencia.pdf	09/03/2018 09:09:57	Valdir de Queiroz	Acelto
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	09/03/2018 09:09:22	Valdir de Queiroz	Acelto
Outros	Carta_Anuencia_MA.pdf	08/03/2018 12:47:15	Valdir de Queiroz	Acelto
Outros	Termo_Compromisso_Confidencialidade.pdf	08/03/2018 11:47:03	Valdir de Queiroz	Acelto
Outros	Lattes_ValdirdeQueirozBabino.pdf	05/03/2018 05:06:18	Valdir de Queiroz	Acelto
Outros	CL_Ana_Sarah_Oliveira.pdf	05/03/2018 05:04:57	Valdir de Queiroz	Acelto
Outros	CL_Ana_Carolina_Mendes_Pinheiro.pdf	05/03/2018 05:04:30	Valdir de Queiroz	Acelto
Outros	CL_Tiago_dos_Anjos.pdf	05/03/2018 05:03:59	Valdir de Queiroz	Acelto
Outros	CL_Christiane_Pinto_Cutrim.pdf	05/03/2018 05:03:25	Valdir de Queiroz	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-6588 E-mail: cepcca@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.625.726

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RECIFE, 03 de Maio de 2018

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br