



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Instituto Biomédico  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular

**Avaliação do potencial uso de *swabs* de bexiga urinária na  
identificação humana de corpos carbonizados e putrefatos  
para aplicação em identificação de vítimas de desastres de  
massa**

**Felipe Carlos de Araujo Brito**

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Rodrigo Grazinoli Garrido

RIO DE JANEIRO  
2017

**Felipe Carlos de Araujo Brito**

**Avaliação do potencial uso de *swabs* de bexiga urinária na identificação humana de corpos carbonizados e putrefatos para aplicação em identificação de vítimas de desastres de massa**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grazinoli Garrido

RIO DE JANEIRO  
2017

B862 Brito, Felipe Carlos de Araujo  
Avaliação do potencial uso de swabs de bexiga urinária na identificação humana de corpos carbonizados e putrefatos para aplicação em identificação de vítimas de desastres de massa / Felipe Carlos de Araujo Brito. -- Rio de Janeiro, 2017.  
105 f.

Orientador: Rodrigo Grazinoli Garrido.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.

1. Bexiga urinária. 2. Identificação humana. 3. Swab. 4. DVI. 5. Genética forense. I. Garrido, Rodrigo Grazinoli, orient. II. Título.

**Felipe Carlos de Araujo Brito**

**Avaliação do potencial uso de *swabs* de bexiga urinária na identificação humana de corpos carbonizados e putrefatos para aplicação em identificação de vítimas de desastres de massa**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

**Banca examinadora:**

Dr. Rodrigo Grazinoli Garrido (Doutor em Ciências) UFRRJ

Dr. Frederico Augusto Vieira de Castro (Doutor em Bioquímica)  
UFRJ

Dra. Priscila Afonso Torres (Doutora em Ciências Biológicas) UFRJ

Dr. André Luiz Mencialha (Doutor em Biofísica) UFRJ



# DEDICATÓRIA

Dedico,

A minha noiva Marcelly pelo imenso carinho e companheirismo, que permaneceu sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos; além de me fazer feliz, ajudou-me, durante todo o percurso de minha vida acadêmica;

## AGRADECIMENTOS

A todos do Instituto de Pesquisas e Perícias em Genética Forense (IPPGF/PCERJ) pelos ensinamentos e oportunidades, e por acreditarem em meu potencial, em especial à perita Carolina C. Bottino Gruszkowski, que, com muita paciência e atenção, dedicou do seu tempo para me orientar neste trabalho, além disso, tanto tem me inspirado para que eu me torne um profissional melhor a cada dia. Ao meu orientador Prof. Rodrigo Grazinoli pelas conversas, pela atenção, pelos conselhos e, principalmente, por ter se importado comigo. Ao técnico David Borges pelas dicas e conversas, e pelo apoio imensurável prestado para a realização desse trabalho. Às estagiárias Tais Paredes, Renata Medina e Luana Rocha pela companhia, conversas e risadas, pela amizade e pelo auxílio imensurável na rotina laboratorial. E aos demais integrantes do IPPGF não citados aqui que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Serei eternamente grato;

A todos do Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto pela contribuição com a principal “matéria-prima” para a realização desse trabalho, em especial ao técnico de necropsia Marcilto por sua contribuição e dedicação sem medir esforços. Serei sempre grato;

Aos meus colegas de classe do programa Ana, Bruna, Caroline, Juliana, Lélío, Priscila, Rodolpho e Taiana pela grande amizade, pelos momentos bons e ruins que passamos ao longo do curso, pelo carinho, apoio, paciência e pelo auxílio na minha formação profissional e pessoal. Essa conquista eu compartilho com vocês com muita alegria, vocês são parte dessa vitória.

Agradeço também aos meus pais Jadir e Rosali, meu irmão Jairo e minha noiva Marcelly, que de forma especial e carinhosa me deram forças e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldade, pelos direcionamentos, pelas palavras de incentivo e por todos os momentos que estiveram ao meu lado.

À Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro pela oportunidade, pelo ambiente criativo e amigável que proporciona, à coordenadora do curso de pós-graduação em biologia molecular e celular Joelma Freire e à secretária Rosemere por todo apoio e atenção durante o curso;

Aos professores da pós-graduação pelos conhecimentos transmitidos e pela contribuição a minha formação acadêmica e pessoal.

À FAPERJ pelo apoio financeiro ao estudo de temas prioritários para o Governo do Estado do Rio de Janeiro.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

# ÍNDICE

DEDICATÓRIA .....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XIII
ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUÇÃO .....	3
1.1. IDENTIFICAÇÃO POR DNA .....	3
1.1.1. MARCADORES GENÉTICOS.....	5
1.1.1.1. VNTRs - <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> .....	6
1.1.1.2. STRs – <i>Short Tandem Repeats</i> .....	6
1.1.1.3. SNP – <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> .....	8
1.1.1.4. Y-STR e Y-SNP .....	9
1.1.1.5. DNA MITOCONDRIAL .....	9
1.1.1.6. Mini-STR .....	10
1.2. DVI E A ANÁLISE GENÉTICA PARA IDENTIFICAÇÃO HUMANA .....	11
2. OBJETIVOS .....	15
2.1. OBJETIVO GERAL .....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. COLETA DAS AMOSTRAS .....	16
3.2. EXTRAÇÃO DO DNA .....	18
3.2.1. AMOSTRAS DE OSSO .....	18
3.2.2. AMOSTRAS DE MÚSCULO .....	19
3.2.3. AMOSTRAS DE SWABS DA MUCOSA DA BEXIGA URINÁRIA.....	20
3.2.3.1. EXTRAÇÃO POR PCI.....	20
3.2.3.2. EXTRAÇÃO COM RESINA QUELANTE CHELEX® 100 .....	21
3.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA .....	21
3.4. AMPLIFICAÇÃO DO DNA .....	22
3.5. INTEGRIDADE DO DNA .....	22

3.6. ELETROFORESE CAPILAR .....	23
3.7. ANÁLISE DOS DADOS.....	24
4. RESULTADOS .....	27
4.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	27
4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4.3. AMPLIFICAÇÃO DO DNA E OBTENÇÃO DO PERFIL GENÉTICO .....	31
5. DISCUSSÃO .....	40
6. CONCLUSÃO .....	44
7. REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICES .....	52

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Porção de uma cadeia polinucleotídica de DNA, mostrando a ligação fosfodiéster que conecta os nucleotídeos e o pareamento das bases nitrogenadas, onde Adenina se liga com Timina, e Guanina se liga com Citosina através de ligações de hidrogênio, (fonte: Encyclopædia Britannica, inc)..... 4
- Figura 2: Esquema de marcadores minissatélites (VNTR) e microssatélites (STR) de DNA. Os *primers* de PCR são idealizados para ligarem-se às regiões flanqueadoras invariantes. O número de repetições em tandem nas regiões de repetição varia entre indivíduos, tornando-os marcadores úteis para a identificação humana, (Adaptado de Butler, 2005).. 8
- Figura 3: Esquema de polimorfismos de nucleotídeos único. Os SNPs são abundantes no genoma humano e como tal, estão sendo usados tanto para estudos de doenças genéticas como para identificações forenses, (Arquivo pessoal) ..... 9
- Figura 4: Esquema mostrando o genoma circular do DNA mitocondrial. A cadeia pesada é representada pela linha externa e contém um maior número de resíduos C-G do que a cadeia leve. As regiões de 37 genes de RNA e de codificação de proteína estão abreviadas em torno do mtDNA próximo da cadeia a partir da qual são sintetizadas. A maioria das análises forenses de mtDNA examina atualmente apenas HV1 e HV2 na região não codificante ou no anel de deslocamento mostrado no topo da figura. Devido a inserções e deleções que existem em torno do mtDNA, indivíduos diferentes nem sempre devem possuir 16569 pb, (Adaptado de Butler, 2005). ..... 10
- Figura 5: Um exemplo de *primer* Mini-STR comparado com o *primer* STR convencional. Os *primers* Mini-STR (setas menores) são adjacentes às repetições de seis nucleotídeos produzindo um produto de PCR menor em comparação com os *primers* STR convencionais (setas maiores), (Adaptado de Butler, 2005). ..... 11
- Figura 6: Imagem de navio em meio a destroços em Tacloban, cidade das Filipinas afetada pela passagem do tufão Haiyan, em 2013. Fonte: G1 (Foto: Erik de Castro/Reuters). .... 12

Figura 7: Equipes de resgate trabalham nos destroços do avião que transportava a delegação da Chapecoense para a Colômbia e caiu perto de Medellín. Fonte: G1 (Colombia National Police/via AP).....	12
Figura 8: Exemplo de cadáver putrefato apresentando enfisema gasoso subcutâneo, (Fonte: Blog webhorror).....	16
Figura 9: Cadáver feminino totalmente carbonizado, (Fonte: Blog do Álvaro Melo).....	17
Figura 10: Esfregaço da mucosa da bexiga urinária em cadáver carbonizado. (Fonte: acervo pessoal).....	18
Figura 11: Eletroferograma obtido com a utilização do kit PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation), demonstrando os 23 <i>loci</i> STRs analisados e o marcador de gênero Amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, <i>Relative Fluorescent Units</i> ), (Fonte: Acervo pessoal).....	24
Figura 12: Exemplo de eletroferograma com perfil completo, apresentando picos nos 23 <i>loci</i> STR mais o marcador de gênero amelogenina, (Fonte: acervo pessoal).....	25
Figura 13: Exemplo de eletroferograma com perfil parcial, apresentando picos em 12 <i>loci</i> STR mais o marcador de gênero amelogenina, (Fonte: acervo pessoal). ....	26
Figura 14: Exemplo de eletroferograma com perfil insuficiente para análise, apresentando picos em apenas 4 <i>loci</i> STR mais o marcador de gênero amelogenina, (Fonte: acervo pessoal).....	26
Figura 15: Variação na concentração de DNA dos diferentes tipos de amostras coletadas dos cadáveres carbonizados (A) e putrefatos (B). É possível observar a eficiência da metodologia PCI na recuperação de DNA em ambos os tipos de cadáveres, enquanto metodologia Chelex® apresentou baixo rendimento na recuperação de DNA. SO = <i>swabs</i> extraídos com o método PCI, SC = <i>swabs</i> extraídos com o método Chelex®, M = músculos e O = ossos. ....	29
Figura 16: Representação gráfica dos perfis genéticos obtidos através dos diferentes tipos de amostras coletadas dos cadáveres carbonizados (A) e putrefatos (B). ....	31

Figura 17: Eletroferogramas com perfis completos das amostras de osso (A), músculo (B) e <i>swabs</i> extraídos com PCI (C) e Chelex® (D) do cadáver carbonizado C2 mostrando a concordância entre eles. ....	34
Figura 18: Eletroferogramas com perfis completos das amostras de referência osso (A) e músculo (B), perfil parcial de <i>swab</i> extraído com PCI (C) e perfil insuficiente para análise de <i>swab</i> extraído com Chelex® (D) do cadáver carbonizado C3 mostrando a concordância entre o perfil parcial do <i>swab</i> e completo das referências.....	35
Figura 19: Eletroferogramas com perfis completos das amostras de referência osso (A) e músculo (B) e perfis parciais dos <i>swabs</i> extraídos com PCI (C) e Chelex® (D) do cadáver putrefato P1 mostrando a concordância entre os perfis parciais dos <i>swabs</i> e completos das referências. ....	36
Figura 20: Eletroferogramas com perfil insuficiente para análise da amostra de osso (A), perfil parcial de músculo (B) e perfis completos dos <i>swabs</i> extraídos com PCI (C) e Chelex® (D) do cadáver putrefato P3 mostrando a concordância entre os perfis completos dos <i>swabs</i> e parcial de músculo. ....	37
Figura 21: Eletroferogramas com perfis completos das amostras de osso (A), <i>swab</i> extraídos com PCI (C) e Chelex® (D) e perfil parcial de músculo (B) do cadáver putrefato P8 demonstrando a concordância entre eles.....	38
Figura 22: Gel de eletroforese gerado pelo Bioanalyser mostrando a integridade do DNA em alguns tipos de amostras dos cadáveres carbonizados e em putrefação.....	39



## LISTA DE TABELAS

Tabela I: Tabela de coleta de amostras <i>post mortem</i> para os diferentes tipos de cadáveres. ....	14
Tabela II: Localização cromossômica dos <i>loci</i> analisados, suas respectivas sequências e seus marcadores fluorescentes presentes no kit PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation). ....	23
Tabela III: Configurações recomendadas para eletroforese capilar utilizando o sistema de identificação humana PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation). ....	24
Tabela IV: Dados da quantificação de DNA das amostras de ossos, músculos e <i>swabs</i> da mucosa da bexiga urinária dos cadáveres carbonizados com o emprego do kit Investigator Quantiplex e o tipo de perfil genético adquirido de cada amostra. ....	28
Tabela V: Dados da quantificação de DNA das amostras de ossos, músculos e <i>swabs</i> da mucosa da bexiga urinária dos cadáveres putrefatos com o emprego do kit Investigator Quantiplex e o tipo de perfil genético adquirido de cada amostra. ....	28
Tabela VI: Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn das amostras dos cadáveres carbonizados obtidos através do software GraphPad Prism 5. ....	30
Tabela VII: Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn das amostras dos cadáveres em putrefação obtidos através do software GraphPad Prism 5. ....	30
Tabela VIII: Condição de cada perfil genético parcial obtido dos <i>swabs</i> dos cadáveres carbonizados, levando em consideração os loci amplificados, os loci não amplificados e os loci que apresentaram <i>drop-out</i> . ....	32
Tabela IX: Condição de cada perfil genético parcial obtido dos <i>swabs</i> dos cadáveres putrefatos, levando em consideração os loci amplificados, os loci não amplificados e os loci que apresentaram <i>drop-out</i> . ....	33

## ABREVIATURAS

Chelex® 100 – Resina quelante da empresa Bio-Rad (Hercules, Califórnia, EUA) usado para purificar outros compostos via troca iônica.

CODIS – Sistema Combinado de Índices de DNA, do inglês, *Combined DNA Index System*.

Ct – Ciclo de limiar, do inglês, Cycle Threshold. É definido como o número de ciclos necessários para que o sinal fluorescente atravesse o limiar, ou seja, exceda o nível de fundo.

DGPTC – Departamento Geral de Polícia Técnica Científica.

DNA – Ácido Desoxirribonucleico.

DTT – Ditioneitol.

DVI – Identificação de Vítimas de Desastres, do inglês, *Disaster Victim Identification*.

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetracético.

FBI – Departamento Federal de Investigação, do inglês, *Federal Bureau Investigation*.

GRC – Guia de Remoção de Cadáver.

IML – Instituto Médico Legal.

IMLAP – Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto.

INTERPOL – Polícia Internacional.

IPC – Controle Positivo Interno, do inglês, *Internal Positive Control*; controle interno do kit de quantificação.

IPPGF – Instituto de Pesquisa e Perícias em Genética Forense.

ISFG – Sociedade Internacional de Genética Forense, do inglês, *International Society for Forensic Genetics*.

mtDNA – DNA mitocondrial.

PBS – Tampão fosfato-salino.

PCERJ – Polícia Civil do Estado do Rio de Janeiro.

PCI – Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico, do inglês, *Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol*.

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*.

RFLP – Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição, do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*.

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio.

SC – *Swabs* cujo DNA foi extraído com o emprego da metodologia Chelex®.

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*.

SO – *Swabs* cujo DNA foi extraído com o emprego da metodologia PCI.

STR – Repetições Curtas em Sequências, do inglês, *Short Tandem Repeats* – microssatélites.

Tampão TE<sup>-4</sup> – Tampão Tris.EDTA

Tris-HCl – tris (hidroximetil) aminometano–cloridrato, do inglês, *tris (hydroxymethyl) aminomethane – (hydrochloric acid)*.

VNTR – Número Variável de Repetições em Sequência, do inglês, *Variable Number of Tandem Repeats*.

## RESUMO

BRITO, Felipe Carlos de Araujo. **Avaliação do potencial uso de swabs de bexiga urinária na identificação humana de corpos carbonizados e putrefatos para aplicação em identificação de vítimas de desastres de massa**. 2017. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular). Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

A identificação dos cadáveres em desastres de massa é um processo complexo, que envolve, além dos procedimentos médico-legais, questões sociais e humanitárias, além da necessidade de investigação civil e/ou criminal. Em desastres com grande número de vítimas, alguns cadáveres podem ficar expostos a um ambiente severo por dias ou meses. As condições ambientais em um desastre de massa muitas vezes resultam em severa fragmentação, decomposição e mistura dos restos das vítimas, tornando difícil a identificação através dos métodos tradicionais. Esta é a razão pela qual o exame de DNA tornou-se essencial e particularmente útil para a identificação de vítimas em desastres ou quaisquer casos forenses. Por estar protegida internamente, a localização da bexiga urinária reduz a possibilidade do DNA se degradar facilmente, resolvendo os problemas relacionados as condições ambientais inerentes a um desastre de massa. Este trabalho teve por objetivo padronizar o uso de *swabs* da mucosa da bexiga urinária como fonte de DNA para identificação de cadáveres humanos putrefatos e carbonizados por técnicas de Genética Forense. O DNA das amostras foi extraído utilizando os métodos PCI e Chelex®; quantificado pelo método da PCR em tempo real e submetido à amplificação com o kit de identificação humana PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation), para amplificação simultânea de 23 *loci* genéticos mais o marcador de gênero amelogenina. Os resultados deste estudo mostram que entre ambas metodologias utilizadas para a extração do DNA, o método PCI apresentou um alto rendimento em relação ao mínimo aceitável para a amplificação, enquanto o Chelex® embora não tendo um alto rendimento ainda possibilitou obter quantidades significativas de DNA para amplificação. Isto posto, o uso de *swabs* da mucosa da bexiga urinária provou ser uma fonte viável de DNA para identificação humana, pois além de apresentarem resultados reprodutíveis e confiáveis, este tipo de amostra permite uma redução significativa no tempo e no custo necessários para análise.

Palavras-chave: Bexiga urinária, Identificação humana, Swab, DVI, Genética forense.

## ABSTRACT

BRITO, Felipe Carlos de Araujo. **Evaluation of the potential use of urinary bladder swabs in the human identification of carbonized and rotting bodies for application in Disaster Victims' Identification.** 2017. 105 p. Dissertation (Master Science in Molecular and Cellular Biology). Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

The identification of corpses in mass disasters is a complex process that involves, in addition to medical and legal procedures, social and humanitarian issues, as well as the need for civil and / or criminal investigation. In disasters with large numbers of casualties, some corpses may be exposed to a harsh environment for days or months. Environmental conditions in a mass disaster often result in severe fragmentation, decomposition and mixing of the remains of the victims, making identification difficult through traditional methods. This is the reason why DNA testing has become essential and particularly useful for the identification of victims in disasters or any forensic cases. The urinary bladder location reduce the possibility of DNA degrading easily, because it is internally protected, solving problems related to the environmental conditions inherent in a mass disaster. The objective of this study was to standardize the use of urinary bladder swabs as a source of DNA for the identification of rotten and carbonized human cadavers by Forensic Genetic techniques. The DNA of the samples was extracted using the PCI and the Chelex® resin method; quantified by the real-time PCR method and subjected to amplification with the PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation) human identification kit for simultaneous amplification of 23 genetic loci plus the genomic marker amelogenin. The results of this study show that between the two methodologies used for DNA extraction, the PCI method presented a high yield in relation to the minimum acceptable for the amplification, while Chelex®, although not having a high yield, still allowed obtaining significant amounts of DNA for amplification. The use of bladder swabs has proven to be a viable source of DNA for human identification, since besides reproducible and reliable results, this type of sample allows a significant reduction in the time and cost required for analysis.

Key words: Urinary bladder, Human identification, Swab, DVI, Forensic genetics.

## 1. INTRODUÇÃO

Diante de uma sociedade, todas as pessoas precisam ter uma identificação que possibilite a preservação e o acesso a direitos fundamentais, tais como a liberdade e a dignidade. A identificação surgiu como referencial de conhecimento do indivíduo, ou seja, ser conhecido e reconhecido por toda sociedade, nacional e internacional, sendo um importante instrumento de que se utiliza para a aplicação dos direitos individuais e sociais (Manual do Departamento da Polícia Federal, 2004).

São diversos os atributos que tornam alguém igual apenas a si próprio, com exceção de gêmeos monozigóticos, tais como impressões digitais, arcada dentária e até mesmo o DNA. A identificação é caracterizada pelo uso de técnicas e meios propícios para se chegar à identidade, tendo a finalidade de determinar uma individualidade que a fazem diferente de todas as outras e igual apenas a si mesma (França, 2008).

Segundo Araújo e Pasquali (2006), dentre os primeiros processos de identificação, civil e criminal, até os atuais podemos destacar: o nome, as tatuagens, as fotografias, a arcada dentária, as impressões digitais e também o DNA.

### 1.1. IDENTIFICAÇÃO POR DNA

O DNA, ácido desoxirribonucleico (figura 1), é responsável por armazenar todas as informações genéticas que definem as características de cada organismo vivo. É uma macromolécula composta por partes menores denominadas nucleotídeos, estes são formados por um grupo trifosfato, um açúcar chamado desoxirribose e uma base nitrogenada, que pode ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) ou timina (T). Os nucleotídeos se unem em uma cadeia através de uma ligação covalente conhecida como ligação fosfodiéster que ocorre entre a hidroxila de um nucleotídeo com o grupamento trifosfato de outro nucleotídeo, formando uma fita simples de DNA. As bases nitrogenadas também se unem através de uma ligação fraca conhecida como pontes de hidrogênio, onde adenina sempre se ligará com timina e guanina sempre com citosina, exceto em casos de mutações, formando assim a dupla fita de DNA, que possui formato de hélice e cadeias antiparalelas como consequência estereoquímica da forma como as bases nitrogenadas se emparelham (Watson *et al.*, 2004). As várias combinações desses

nucleotídeos produzem as diversas diferenças biológicas entre os seres humanos e todas as criaturas vivas (Griffiths, 2009).

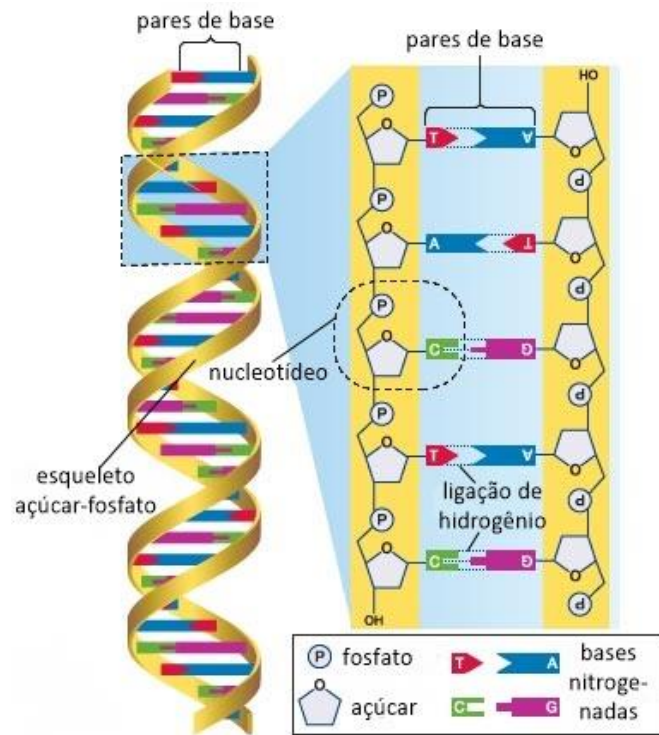


Figura 1: Porção de uma cadeia polinucleotídica de DNA, mostrando a ligação fosfodiéster que conecta os nucleotídeos e o pareamento das bases nitrogenadas, onde Adenina se liga com Timina, e Guanina se liga com Citosina através de ligações de hidrogênio, (fonte: Encyclopædia Britannica, inc).

A identificação por DNA foi descrita pela primeira vez pelo geneticista Sir Alec Jeffreys (1985), a técnica é conhecida hoje como "DNA fingerprinting" ou "tipagem de DNA". Jeffreys descobriu um conjunto de marcadores genéticos chamados minissatélites com um número variável de repetições em série (VNTRs – *Variable Number of Tandem Repeats*), que são altamente específicos para um indivíduo. Os VNTRs são regiões altamente polimórficas do DNA compostas por um conjunto de sequências repetitivas em um local definido no genoma, muito útil para diferenciar membros de uma população. Esta exclusividade se dá pela combinação do DNA dos progenitores e também pelo processo de recombinação gênica, que proporciona um alto grau de variabilidade entre os organismos vivos (Paradela, 2006). Atualmente, outros polimorfismos são conhecidos e utilizados na identificação de pessoas, tais como STR, SNP, mtDNA, entre outros.

Em 1983, Kary Mullis e colaboradores desenvolveram a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia de Polimerase), permitindo que pequenas quantidades de DNA fossem amplificadas, de maneira que fragmentos muito curtos de DNA pudessem ser utilizados (Moretti *et al.*, 2001; Tamaki e Jeffreys, 2005). Essa técnica usa a mesma enzima que participa da replicação do material genético nas células, a DNA polimerase. Atualmente, a DNA polimerase utilizada nas reações de PCR é a Taq DNA Polimerase, uma enzima termoestável derivada da bactéria *Thermus aquaticus*. A temperatura ótima de atividade da Taq é de 75-80 °C, com uma meia-vida superior a 2 horas a 92,5 °C, 40 minutos a 95 °C e 9 minutos a 97,5 °C, podendo replicar uma cadeia de 1000 pares de bases de DNA em menos de 10 segundos a 72 °C (Lawyer *et al.* 1993). Essa enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento, iniciador ou *primer*, já esteja pareado a uma das cadeias de DNA na região escolhida para o início da síntese (Mullis, 1990). Um *primer* é uma cadeia curta de RNA ou DNA (geralmente cerca de 18-22 bases) que serve como ponto de partida para a síntese de DNA. A técnica de PCR tem muitos benefícios, sendo crucial para a comunidade científica e judiciária na revelação dos perfis genéticos entre indivíduos (Silva e Queiroz, 2011).

A evolução no campo da identidade (cível e criminal) se destacou a partir do estudo do genoma humano. O avanço das técnicas de DNA contribuiu para um novo campo da criminalística – a Genética Forense – que passou a analisar os vestígios humanos com o uso de marcadores genéticos e polimorfismos do DNA que são de utilidade forense (Bonaccorso, 2005; Souza, 2011).

O que torna a análise genética importante é sua capacidade de discriminar e individualizar pessoas, de prover argumentos para a comprovação de culpabilidade ou de inocência de um indivíduo, assim como estabelecer uma conexão irrefutável entre a pessoa e sua presença na cena do crime, tornando-a uma ferramenta indispensável na área forense, e sendo aceita rotineiramente em processos judiciais em todo o mundo (Thompson, 2012; Machado, 2016).

### 1.1.1. MARCADORES GENÉTICOS

É considerado um marcador genético qualquer variação na sequência do DNA de um ser vivo que o diferencia de outro indivíduo ou grupo de indivíduos, ou que permita



a identificação de uma característica específica própria a esse ser (Butler, 2009). Vários marcadores genéticos podem ser utilizados em análises forenses, tais como, minissatélites ou VNTRs, microssatélites ou STRs, marcadores bi-alélicos como os SNPs, e também o DNA mitocondrial (mtDNA).

#### 1.1.1.1. VNTRs - *Variable Number of Tandem Repeats*

VNTR refere-se a um número variável de repetições em série, consiste em uma fração repetida de DNA denominadas minissatélites ou repetição em tandem de número variável (VNTR – “*variable number of tandem repeats*”). Os VNTRs exibem uma enorme variabilidade e são constituídos de 9 a 100 pares de bases repetidos sequencialmente em *loci* cromossômicos (Figura 1). As primeiras sequências VNTR descritas tiveram aplicação imediata na área forense, assim como no auxílio ao mapeamento do genoma humano (Góes, 2005). Para a análise dos marcadores VNTR é utilizada a técnica RFLP (Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição, do inglês, “*restriction fragment length polymorphism*”). De modo geral, os VNTRs apresentam probabilidades de paternidade/maternidade satisfatórias com utilização de poucas sondas. Índices tão elevados são decorrentes da alta variabilidade de *loci* VNTR (Morling e Hansen, 1993). Como desvantagem, o VNTR requer DNA íntegro e em grande quantidade (100-500 ng), tornando praticamente inviável a tipagem de amostras biológicas antigas, degradadas ou com pouca quantidade de DNA (Budowle *et al*, 1991). Atualmente, a metodologia é pouco utilizada em investigações genéticas.

#### 1.1.1.2. STRs – *Short Tandem Repeats*

Dentre os marcadores genéticos mais utilizados atualmente na área forense estão os microssatélites, também conhecidos pela sua sigla em inglês STRs - *Short Tandem Repeats*; em português, repetições de sequências simples ou repetições curtas em *tandem*. Os marcadores STRs correspondem a 3% do genoma humano e estão espalhados por todo o genoma, ocorrendo, em média, a cada 10.000 nucleotídeos (Butler, 2005). Os STRs são sequências genômicas formadas por repetições de 2 a 5 pares de bases, e o polimorfismo é baseado no número dessas repetições (figura 2). Devido ao pequeno tamanho dos alelos STR, aproximadamente 100-400 pb, em comparação com os alelos minissatélites VNTR,

aproximadamente 400-1000 pb, os marcadores STR tornaram-se melhores candidatos para uso em aplicações forenses onde o DNA degradado é comum (Butler, 2005). Esta característica permite que amostras com pouca quantidade de DNA, ou apresentando certo grau de degradação, possam ser analisadas com auxílio da técnica de PCR (Butler, 2005; Jarne e Lagoda, 1996). A análise automatizada de regiões STR é a metodologia mais aceita pela maioria dos países para identificação de indivíduos e tipagem de criminosos devido à rapidez, acuidade e alto poder de discriminação decorrente da análise de múltiplas regiões STR. (Budowle e Van Daal, 2008; Martins, 2008).

Na década de 1990, o FBI lançou um esforço nacional de ciência forense para estabelecer *loci* STRs para inclusão no banco de dados nacional conhecido como CODIS (Sistema Combinado de Índices de DNA, do inglês, *Combined DNA Index System*) que iniciou com 13 *loci* STRs. Esse sistema mistura a ciência forense e a tecnologia de computador em uma ferramenta para ligar crimes violentos. Ele permite que laboratórios forenses federais, estaduais e locais troquem e comparem perfis de DNA eletronicamente, relacionando assim crimes violentos em série entre si e com criminosos conhecidos, assim como também ajuda a identificar pessoas desaparecidas e não identificadas (Godinho, 2014; Hares, 2015). Atualmente mais de 50 países usam o software CODIS para suas próprias iniciativas de banco de dados, incluindo o Brasil. Em 2017 o CODIS ganhou mais sete *loci* STR possuindo no total 20 *loci* STR, são eles, CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA, D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 e D22S1045. Esses *loci* são reconhecidos nacional e internacionalmente como o padrão para a identificação humana (FBI, 2017).

O estudo de microssatélites aumentou consideravelmente com a introdução de sistemas de amplificação simultânea (multiplex) que permitem obter informação de vários *loci* numa única reação, diminuindo o tempo de estudo e reagentes. Deste modo, constitui um considerável avanço no âmbito da Genética e Biologia Forense (Silva e Queiroz, 2011).

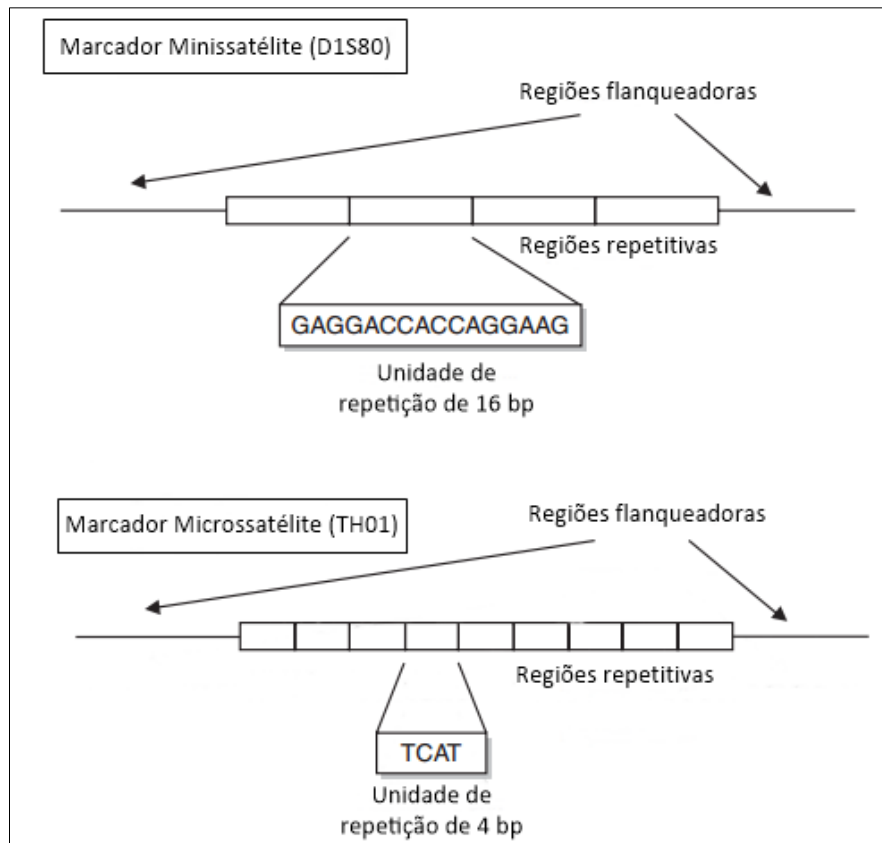


Figura 2: Esquema de marcadores minissatélites (VNTR) e microssatélites (STR) de DNA. Os *primers* de PCR são idealizados para ligarem-se às regiões flanqueadoras invariantes. O número de repetições em tandem nas regiões de repetição varia entre indivíduos, tornando-os marcadores úteis para a identificação humana, (Adaptado de Butler, 2005)

### 1.1.1.3. SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

SNPs (*single nucleotide polymorphism* ou, em português, polimorfismo de nucleotídeo único) são substituições, inserções ou deleções de bases que ocorrem em posições únicas no genoma humano (Figura 3). Aproximadamente 85% das variações do genoma são baseadas em SNPs, o que os torna úteis para a identificação humana. Entretanto, a maioria dos SNPs são bi-alelicos, tornando-os menos informativos para testes de identidade quando comparados com *loci* STR. Além disso, um grande número de SNPs, em torno 100 *loci*, são necessários para fornecer poder discriminatório suficiente para uma identificação positiva da vítima (Budowle, Bieber, & Eisenberg, 2005; Butler, 2005).

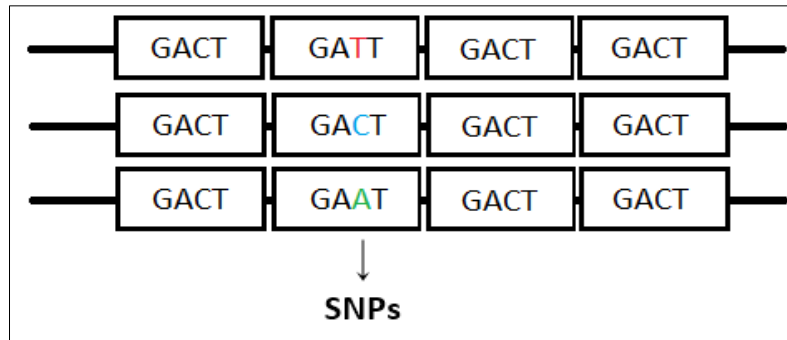


Figura 3: Esquema de polimorfismos de nucleotídeos único. Os SNPs são abundantes no genoma humano e como tal, estão sendo usados tanto para estudos de doenças genéticas como para identificações forenses, (Arquivo pessoal)

#### 1.1.1.4. Y-STR e Y-SNP

Localizados no cromossomo Y, os Y-STR e Y-SNP possuem diversas aplicações no âmbito forense, tais como em investigações de pessoas desaparecidas, crimes sexuais, testes de paternidade, investigações históricas e genealogia genética. Essas aplicações se devem ao fato de que a maioria dos cromossomos Y é passada de pai para filho homem sem alterações (exceto em casos de mutação), indicando uma linhagem patrilinear comum (Butler, 2003).

#### 1.1.1.5. DNA MITOCONDRIAL

O DNA mitocondrial (mtDNA) localiza-se na matriz mitocondrial como um genoma pequeno de, aproximadamente, 16.569 pb na forma circular (Figura 3). Segundo Steffens (1998), a análise do mtDNA é uma técnica excelente para usar na obtenção de informações nos casos em que a análise do DNA nuclear não é viável, pois o teste de mtDNA pode ser realizado em diversos tipos de amostras, as quais incluem manchas altamente degradadas, ossos, saliva, unhas e fios de cabelo. Uma vantagem do mtDNA é que este possui uma herança matrilinear. Sendo assim, mesmo parentes maternos distantes podem fornecer uma amostra de referência comparativa. Atualmente, o teste de mtDNA envolve o sequenciamento de duas regiões hipervariáveis (HV1 e HV2) na região de controle não codificante do mtDNA (Figura 4). Estas regiões são altamente variáveis na população devido à alta taxa evolutiva do DNA mitocondrial (Anderson *et al*, 1981; Machado, 2016).

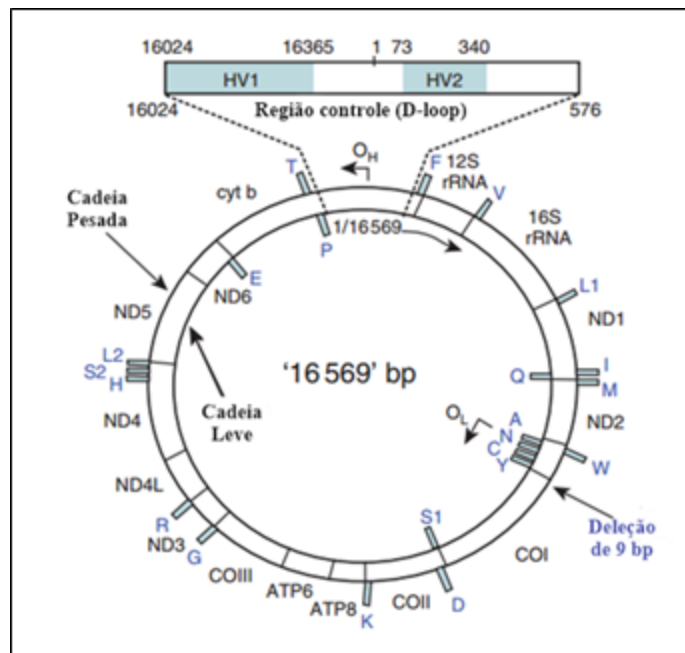


Figura 4: Esquema mostrando o genoma circular do DNA mitocondrial. A cadeia pesada é representada pela linha externa e contém um maior número de resíduos C-G do que a cadeia leve. As regiões de 37 genes de RNA e de codificação de proteína estão abreviadas em torno do mtDNA próximo da cadeia a partir da qual são sintetizadas. A maioria das análises forenses de mtDNA examina atualmente apenas HV1 e HV2 na região não codificante ou no anel de deslocamento mostrado no topo da figura. Devido a inserções e deleções que existem em torno do mtDNA, indivíduos diferentes nem sempre devem possuir 16569 pb, (Adaptado de Butler, 2005).

#### 1.1.1.6. Mini-STR

Os mini-STR são *loci* cujos pares de iniciadores foram redesenhados de forma a gerar produtos de PCR menores, isto é, menor número de pares de bases (Figura 5). Comumente, consideram-se mini-STRs *loci* cujos produtos de PCR se localizem em uma faixa alélica inferior a 200pb (Butler, Shen e Mccord, 2003). Diversos estudos têm demonstrado o sucesso na análise de DNA degradado proveniente de desastres em massa ou evidências forenses com a utilização de miniSTRs (Schneider *et al.*, 2004; Chung, *et al.*, 2004; Grubwieser *et al.*, 2006).

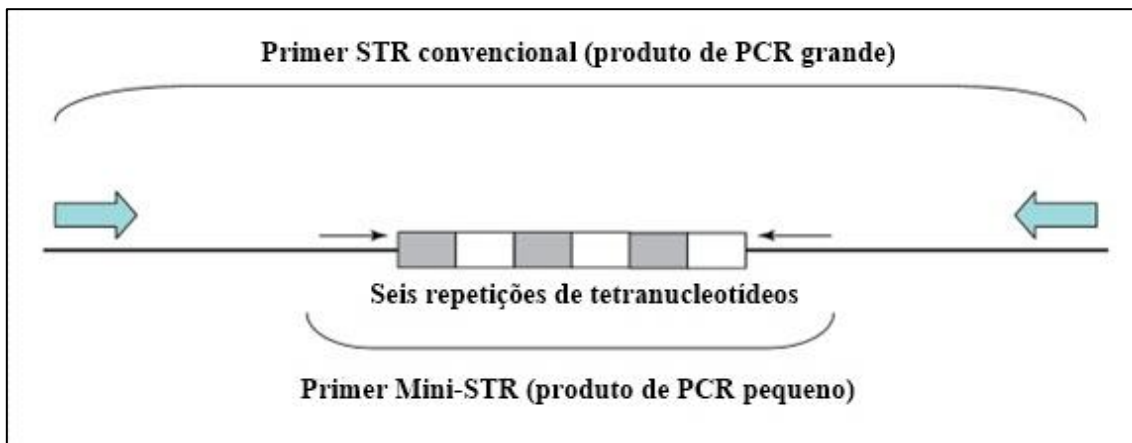


Figura 5: Um exemplo de *primer* Mini-STR comparado com o *primer* STR convencional. Os *primers* Mini-STR (setas menores) são adjacentes às repetições de seis nucleotídeos produzindo um produto de PCR menor em comparação com os *primers* STR convencionais (setas maiores), (Adaptado de Butler, 2005).

## 1.2. DVI E A ANÁLISE GENÉTICA PARA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

De acordo com o Manual da Interpol para Identificação de Vítimas de Desastres de Massa (2009), desastre é um evento inesperado causando a morte ou ferimentos a muitas pessoas. Pode ser classificado como um evento aberto – um grande evento catastrófico, que resulta na morte de um número desconhecidos de indivíduos, sendo difícil obter informações sobre o número real de vítimas após este tipo de evento (Funabashi *et al.*, 2009); tal cenário frequentemente ocorre em catástrofes naturais (Figura 6); ou um evento fechado – evento catastrófico, que resulta na morte de um número conhecido de indivíduos, tal como ocorre em uma queda de aeronave com lista de passageiros (Figura 7). Combinações destes dois eventos também são possíveis, por exemplo, acidente de avião em uma área residencial (Interpol, 2009).





Figura 6: Imagem de navio em meio a destroços em Tacloban, cidade das Filipinas afetada pela passagem do tufão Haiyan, em 2013. Fonte: G1 (Foto: Erik de Castro/Reuters).

A identificação dos cadáveres em desastres de massa é um processo complexo, que envolve, além dos procedimentos médico-legais, questões sociais e humanitárias. No processo de identificação é fundamental a obtenção de dados e informações *ante mortem* e *post mortem* das vítimas, incluindo a coleta das impressões digitais, se possível, o exame odontológico, a coleta de material biológico para exame de DNA e outros dados relevantes. A comparação das informações com as evidências é que possibilitará a efetiva identificação. (Benfica & Vaz, [s.d.]; Biancalana, 2015; Interpol, 2009).



Figura 7: Equipes de resgate trabalham nos destroços do avião que transportava a delegação da Chapecoense para a Colômbia e caiu perto de Medellín. Fonte: G1 (Colombia National Police/via AP).

Em desastres com grande número de vítimas, alguns cadáveres podem ficar expostos a um ambiente severo por dias e até meses. As condições ambientais em um desastre de massa muitas vezes resultam em severa fragmentação, decomposição e mistura dos restos das vítimas. Nessas situações, torna-se difícil a identificação das vítimas através dos métodos tradicionais de identificação baseados nas características antropológicas e físicas (Hartman *et al*, 2011; Lessig e Rothschild, 2012). Aliado a esses fatores, a longa exposição ambiental do DNA faz com que este seja degradado através de uma variedade de mecanismos incluindo processos enzimáticos e químicos, o que dificulta ainda mais o processo de identificação por análise de DNA (Butler, 2009). Esta é a razão pela qual o exame de DNA tornou-se essencial e particularmente útil para a identificação de vítimas em desastres ou quaisquer casos forenses (Ziętkiewicz *et al*, 2012).

Diversos tipos de amostras biológicas podem servir como fonte de DNA para análises genéticas, tais como tecidos moles, ossos, dentes, cabelos, saliva, urina, entre outros fluidos (Koch e Andrade, 2008; Decorte, 2010). Todavia, fatores como estado de conservação do cadáver, condições ambientais e outros relativos à natureza do evento podem prejudicar rigorosamente a qualidade do material genético obtido. Tentando contornar estes problemas, a Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG – *International Society for Forensic Genetics*) e a Interpol (2009) recomendam que diversas amostras biológicas distintas sejam coletadas do cadáver assim que possível, seguindo todos os cuidados necessários na sua identificação e conservação (Prinz *et al*, 2007). Dependendo da condição do cadáver, o tipo de amostra a ser recolhida para a análise de DNA irá variar. Normalmente é recolhido sangue (quando possível), músculo ou ossos já que a coleta de material biológico de cadáveres putrefatos ou carbonizados pode ser difícil (Owen *et al*, 2013). Tais casos podem exigir que vários tipos de amostras sejam coletados para análise, inclusive ambas as organizações sugerem a coleta de *swabs* da mucosa da bexiga urinária em cadáveres carbonizados (Tabela I).

A explicação para o uso da mucosa da bexiga urinária é a semelhança histológica desta com a mucosa oral (Lu *et al.*, 2010; Filipas *et al.*, 1999), que é frequentemente usada em casos forenses como amostras de referência (Senn & Stimson, 2010). Por estar protegida internamente, a localização da bexiga urinária reduz a possibilidade do DNA se degradar facilmente, resolvendo os problemas relacionados a fatores como estado de



conservação do cadáver, condições ambientais e outros relativos à natureza do evento ocorrido (França, 2008; Junqueira & Carneiro, 2013).

Tabela I: Tabela de coleta de amostras *post mortem* para os diferentes tipos de cadáveres.

<b>Condição do corpo</b>	<b>Amostras recomendadas</b>
Cadáveres completos sem sinal evidente de decomposição	Sangue ( <i>Swab</i> ou papel FTA) e esfregaços bucais
Cadáveres mutilados sem sinal evidente de decomposição	Se disponível: sangue e tecido muscular vermelho (~1,0 g)
Cadáveres completos em decomposição ou restos mutilados	Amostras de ossos longos ou curtos; ou Dentes saudáveis (de preferência molares); ou Qualquer outro osso disponível (~ 10 g, se possível, de preferência osso cortical com tecido denso);
Cadáveres severamente queimados	Todos os exemplos listados acima e dentes impactados ou raízes dos dentes se presente ou Esfregaços da bexiga.

Fonte: Interpol, 2009. Disaster Victim Identification Guide.

Embora a recomendação exista desde 2007, apenas em 2012 foi descrito um relato de caso no Japão no qual o uso de uma amostra da mucosa da bexiga urinária auxiliou na identificação genética de uma vítima carbonizada (Seo, 2012), e, em 2013, um trabalho de um grupo australiano, que demonstrou a viabilidade de usar esfregaços de bexiga identificando vítimas carbonizadas (Owen *et al*, 2013).

Considerando os motivos acima descritos, a padronização do uso de *swabs* de mucosa da bexiga urinária por exames de DNA cuja qualidade do material genético é prejudicada em razão do mau estado de conservação do cadáver pode contribuir para a melhora da rotina forense (Brito *et al*, 2015). Especialmente em casos de identificação de cadáveres carbonizados, tal como ocorre em incêndios, e cadáveres putrefatos, já que o clima tropical do Brasil e em especial o Rio de Janeiro é um fator potencializador dos fenômenos de decomposição natural do cadáver (Garrido & Naia, 2014).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar o uso de *swabs* de mucosa da bexiga urinária como fonte de DNA em casos de identificação de cadáveres humanos por técnicas de Genética Forense;

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a viabilidade do uso de *swabs* de mucosa da bexiga urinária como fonte de DNA em casos de identificação de cadáveres humanos carbonizados e putrefatos.

Comparar as técnicas de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico e Chelex® utilizadas para extração de DNA, avaliando a quantidade absoluta de DNA extraído em cada amostra e qual a que obtêm um maior percentual de perfis genéticos completos de STR autossômico.

Fornecer um padrão para a técnica de utilização deste material no âmbito do Instituto de Pesquisa e Perícias em Genética Forense (IPPGF) da Polícia Civil do Estado do Rio de Janeiro (PCERJ).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras biológicas utilizadas neste estudo foram coletadas durante necropsias realizadas no Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto (IMLAP) durante o mês de setembro de 2013, sendo a referida coleta feita sob a supervisão do Perito Legista responsável pela necropsia e a de um Perito do Instituto de Pesquisas e Perícias em Genética Forense (IPPGF).

Os cadáveres foram divididos em dois grupos, de acordo com seu estado de conservação: putrefatos (que consiste na decomposição fermentativa da matéria orgânica por ação de diversas bactérias e alguns fenômenos daí decorrentes; Figura 8) e carbonizados (processo químico de combustão incompleta quando submetidos ao calor elevado; Figura 9), sendo cada grupo composto por 10 cadáveres. Todas as amostras foram identificadas com o número da Guia de Remoção de Cadáver (GRC), sexo, e a data da coleta, porém foram nomeadas de outra forma devido ao sigilo das informações.



Figura 8: Exemplo de cadáver putrefato apresentando enfisema gasoso subcutâneo, (Fonte: Blog webhorror).



Figura 9: Cadáver feminino totalmente carbonizado, (Fonte: Blog do Álvaro Melo).

Após a necropsia foi localizada a bexiga e realizada uma incisão para expor a mucosa, em sequência foi realizado esfregaços com *swabs* na parte interna (Figura 10). Para cada cadáver foram coletados 4 (quatro) *swabs* de mucosa da bexiga urinária, os quais foram acondicionados secos dentro de microtubos de forma individualizada e conservados em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) até o momento de sua utilização.

Para amostra de referência, foi coletado um segmento ósseo e/ou um fragmento de músculo de cada cadáver, ambos escolhidos pelo perito legista. Estas amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) até o momento de sua utilização.

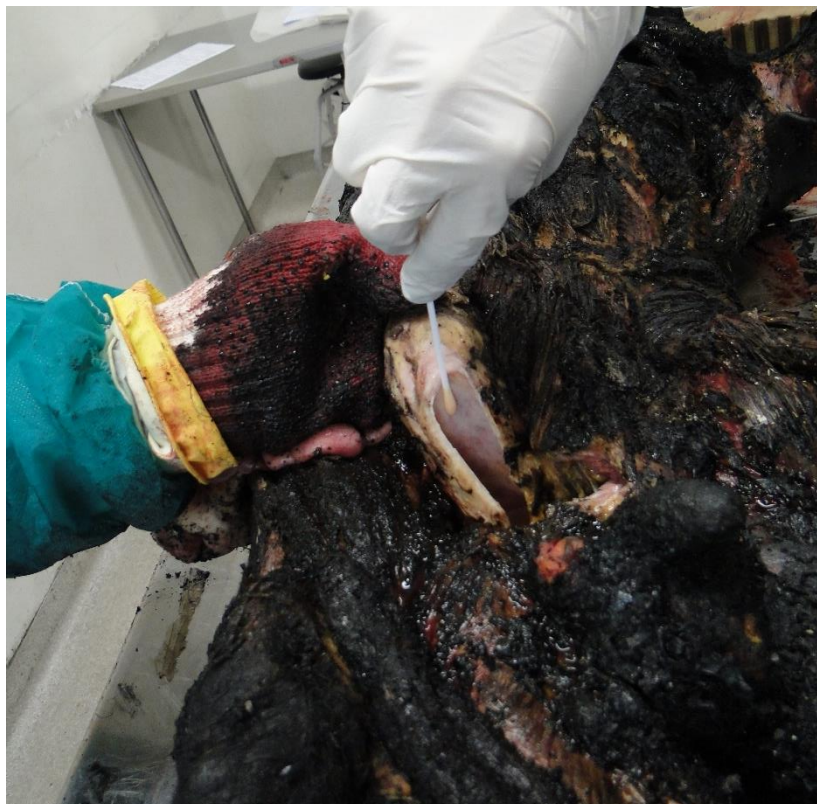


Figura 10: Esfregaço da mucosa da bexiga urinária em cadáver carbonizado. (Fonte: acervo pessoal)

## 3.2. EXTRAÇÃO DO DNA

### 3.2.1. AMOSTRAS DE OSSO

As amostras de ossos foram extraídas pelo método orgânico, também referida como extração por Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (PCI), conforme descrito por Butler (2009). Os segmentos ósseos foram limpos e cortados em segmentos de aproximadamente, 1 cm<sup>3</sup> com o auxílio de uma microrretífica e pulverizados no *6750 Freezer/Mill* (Spex Certiprep, Metuchen, EUA). Cerca de 1,5g a 2g de pó de osso foram incubados com 3 ml de Tampão de Incubação (Tris-HCl 10mM – NaCl 100mM – EDTA 10mM – SDS 2%, pH 8,0), 35 µl de Proteinase K (20mg/ml) e 40 µl de DTT (1 mol/l) durante a noite por aproximadamente 18h em banho-maria a 56°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 7.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um microtubo de 2 ml, onde foi adicionado igual volume de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1). A separação das fases orgânica e aquosa

foi realizada por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos na centrífuga HT MCD-2000. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, a qual foram adicionados 10% do volume obtido de NaCl (5mol/L) e 2x o volume obtido de etanol absoluto, seguida de uma incubação por 2 horas a -20°C para a precipitação do DNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C na centrífuga *Eppendorf Centrifuge 5804 R* (Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1 ml de etanol 70% gelado ao precipitado, seguido de uma segunda centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram centrifugadas no concentrador *Eppendorf Concentrator 5301™* (Hamburg, Alemanha) a 45°C por tempo variável para evaporação do etanol. O DNA obtido foi ressuspense em 30 µl de Tampão TE (Tris-HCl 10mM – EDTA 0,1mM, pH 8,0) e mantido a -20°C até o momento de uso.

### 3.2.2. AMOSTRAS DE MÚSCULO

Assim como as amostras de ossos, as amostras de músculos foram extraídas pelo método PCI conforme descrito por Butler (2009). As amostras de músculo (cerca de 200 mg) foram incubadas com 300 µl de Tampão de extração (Tris-HCl 10mM – NaCl 100mM – EDTA 10mM – SDS 1%, pH 8,0) e 24 µl de Proteinase K (20mg/ml), homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 56°C por 2 horas. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos na centrífuga HT MCD-2000 e o sobrenadante transferido para outro microtubo de 1,5 ml, onde foi acrescentado igual volume de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1). A separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos na centrífuga HT MCD-2000. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, a qual foram adicionados 10% do volume obtido de NaCl (5mol/L) e 2x o volume obtido de etanol absoluto, seguida de uma incubação por 2 horas a -20°C para a precipitação do DNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C na centrífuga *Eppendorf Centrifuge 5804 R* (Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1 ml de etanol 70% gelado ao precipitado, seguido de uma segunda centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram centrifugadas no concentrador *Eppendorf Concentrator 5301™* (Hamburg, Alemanha) a 45°C por tempo variável para evaporação do etanol. O DNA

obtido foi ressuspenso em 50 µl de Tampão TE (Tris-HCl 10mM,– EDTA 0,1mM, pH 8,0) e mantido a -20°C até o momento de uso.

### 3.2.3. AMOSTRAS DE SWABS DA MUCOSA DA BEXIGA URINÁRIA

As amostras de *swabs* da mucosa da bexiga urinária foram extraídas pelo método PCI, e pela metodologia com a resina quelante Chelex® 100 (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA), ambas as metodologias foram empregadas conforme descrito por Butler (2009), detalhadas a seguir:

#### 3.2.3.1. EXTRAÇÃO POR PCI

Os *swabs* foram incubados em 500 µl de Tampão de extração (Tris-HCl 10mM – NaCl 100mM – EDTA 10mM – SDS 1%, pH 8,0), 24 µl de Proteinase K (20 mg/ml) e 48 µl de DTT (1 mol/l) em banho-maria a 56°C por 2 horas. Após a incubação, os *swabs* foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos na centrífuga HT MCD-2000 e o sobrenadante transferido para outro microtubo, onde foi acrescentado igual volume de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1). A separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos na centrífuga HT MCD-2000, na qual a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e foram adicionados 10% do volume obtido de NaCl (5mol/L) e 2x o volume obtido de etanol absoluto, seguida de uma incubação por 2 horas a -20°C para a precipitação do DNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C na centrífuga *Eppendorf Centrifuge 5804 R* (Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1 ml de etanol 70% gelado ao precipitado, seguido de uma segunda centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram centrifugadas no concentrador *Eppendorf Concentrator 5301™* (Hamburg, Alemanha) a 45°C por tempo variável para evaporação do etanol. O DNA obtido foi ressuspenso em 30 µl de Tampão TE (Tris-HCl 10mM,– EDTA 0,1mM, pH 8,0) e mantido a -20°C até o momento de uso.

### 3.2.3.2. EXTRAÇÃO COM RESINA QUELANTE CHELEX® 100

A extração do DNA por resina Chelex® 100 (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) foi realizada conforme descrito por Butler (2009). A suspensão da resina foi preparada a 5% (p/v) na véspera de sua utilização. Os *swabs* foram hidratados em 1 ml de tampão PBS (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM; pH 7,2), agitados em vórtex e, em seguida, o líquido foi centrifugado a 10.000 rpm por 7 minutos na centrífuga HT MCD-2000. Cerca de 700 µl do sobrenadante foi descartado e o restante incubado com 100 µl de suspensão de resina Chelex® a 56°C por 30 minutos, seguido de uma segunda incubação em água fervente (100°C) por 8 minutos. Após a incubação em água fervente, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e posteriormente conservadas a -20°C até o momento de sua utilização.

### 3.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação de DNA foi realizada pelo kit Investigator Quantiplex (QIAGEN, Alemanha) o qual se baseia na utilização de PCR (Reação em cadeia da polimerase, do inglês, *Polimerase Chain Reaction*) em tempo real para amplificar de forma específica sequências presentes nos cromossomos autossômicos. O kit também apresenta um controle de amplificação interno balanceado (IC) que é usado para testar a amplificação e detecção de inibidores de PCR.

Os dados de PCR em tempo real são produzidos como gráficos de amplificação em forma sigmoideal (quando se utiliza uma escala linear), em que a fluorescência é representada em função do número de ciclos. O ciclo de limiar (valor CT) serve como uma ferramenta para o cálculo da quantidade inicial de molde em cada amostra. Deste modo, a definição de limiar ótimo foi ajustada de acordo com as reações utilizadas para PCR.

A quantificação foi realizada em duplicata no aparelho Rotor-Gene Q (QIAGEN, Alemanha), com a utilização do software Rotor Gene Q series para interpretação dos resultados, conforme as indicações do fabricante especificadas no manual de utilização.



### 3.4. AMPLIFICAÇÃO DO DNA

As amostras de DNA ossos, músculos e *swabs* foram submetidas à amplificação pelo método da PCR com emprego do sistema de identificação humana PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation).

Após a quantificação do DNA, todas as amostras foram normalizadas através de diluições visando atingir uma concentração final de 0.5ng/μl de DNA para posterior amplificação por técnica de PCR. As amostras que não apresentaram concentração de DNA suficiente entraram com quantidade máxima de DNA permitida na reação segundo recomendação do kit.

O PowerPlex® Fusion é um dos atuais kits megaplex no mercado, sendo sensível o suficiente para produzir perfis STR completos a partir de apenas 100 pg de DNA. Possui um sistema multiplex de 5 corantes e 24 *loci* STR para identificação humana, incluindo todos os 20 *loci* do CODIS. O sistema também inclui um *locus* específico masculino para identificar qualquer resultado de alelo Y nulo para a Amelogenina (Tabela II). Este kit, não só tem uma maior sensibilidade para o DNA, mas também contém 9 *loci* que estão abaixo de 215 pares de bases auxiliando na recuperação de DNA degradado, denominados mini-STR, são eles, Amelogenina (não é um STR), D3S1358, D1S1656, D16539, D18S51, TH01, vWA, D8S1179 e D12S391. O kit contém uma mistura principal (*master mix*) especializada capaz de superar níveis mais elevados de inibidores conhecidos, tais como hematina, ácido húmico e ácido tânico (Lawson *et al*, 2017; Oostdik *et al*, 2014). A reação foi realizada de acordo com as especificações do manual do kit.

### 3.5. INTEGRIDADE DO DNA

Para verificar a integridade dos DNAs extraídos efetuou-se uma análise utilizando o kit High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) conforme instruções do fabricante, utilizando o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Este ensaio permite analisar a degradação do DNA através de uma imagem de um gel virtual, bem como obter uma estimativa de concentração da amostra.

Tabela II: Localização cromossômica dos *loci* analisados, suas respectivas sequências e seus marcadores fluorescentes presentes no kit PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation).

<i>STR Locus</i>	Localização cromossômica	Sequências repetitivas 5'→3'	Marcador Fluorescente	
Amelogenina*	X: p22.1-22.3 Y	N/A		
D3S1358	3p21.31 (45.557Mb)	Complexo TCTA	Fluorescein	
D1S1656	1q42 (228.972Mb)	Complexo TAGA		
D2S441	2p14 (68.214Mb)	TCTA		
D10S1248	10q26.3 (130.567Mb)	GGAA		
D13S317	13q31.1 (81.62Mb)	TATC		
Penta E	15q26.2 (95.175Mb)	AAAGA		
D16S539	16q24.1 (84.944Mb)	GATA		
D18S51	18q21.33 (59.1Mb)	AGAA		
D2S1338	2q35 (218.705Mb)	TGCC/TTCC		JOE
CSF1PO	5q33.1 (149.436Mb)	AGAT		
Penta D	21q22.3 (43.88Mb)	AAAGA		
TH01	11p15.5(2.149Mb)	AATG		
vWA	12p13.31 (5.963Mb)	Complexo TCTA		
D21S11	21q21.1 (19.476Mb)	Complexo TCTA	TMR-ET	
D7S820	7q21.11 (83.433mb)	GATA		
D5S818	5q23.2 (123.139Mb)	AGAT		
TPOX	2p25.3 (1.472Mb)	AATG		
DYS391	Y	TCTA		
D8S1179	8q24.13 (125.976Mb)	Complexo TCTA	CXR-ET	
D12S391	12p12 (12.341Mb)	Complexo AGAT/AGAC		
D19S433	19q12 (35.109Mb)	Complexo AAGG		
FGA	4q28 (155.866Mb)	Complexo TTTC		
D22S1045	22q12.3 (35.779Mb)	ATT		

\* Amelogenina não é um STR.

### 3.6. ELETROFORESE CAPILAR

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese capilar no analisador genético 3500® (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e gerenciada utilizando o software Data Collection 3500-Series versão v3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Para a análise das amostras, 1 µl do produto de PCR foi diluído em 9,5 µl de formamida Hi-Di™, acrescido de 0,5 µl de padrão interno CC5 (Promega Corporation) em placas de 96 orifícios. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 minutos e, em seguida, mantidas a 4°C por igual período antes do início da eletroforese capilar.

A eletroforese capilar foi realizada de acordo com as recomendações feitas no manual do kit (Tabela III).

Tabela III: Configurações recomendadas para eletroforese capilar utilizando o sistema de identificação humana PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation).

Tipo de aplicação	HID
Comprimento do capilar	36 cm
Polímero	POP-4®
Configurações dos corantes ( <i>Dye Set</i> )	G5 (Promega G5 spectral)
Módulo de corrida	HID36_POP4(xl)
Tempo de injeção <sup>1</sup>	15 segundos no analisador genético 3500 (Applied Biosystems®)
Voltagem da injeção	1.2 kV
Voltagem da corrida	15 kV
Tempo de corrida	1.210 – 1.500 Segundos

<sup>1</sup> O tempo de injeção pode ser modificado para aumentar ou diminuir a altura dos picos.

### 3.7. ANÁLISE DOS DADOS

Após a eletroforese, os dados obtidos foram analisados utilizando o *software GeneMapper ID-X* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Foram considerados alelos com altura do pico em até 100 unidades fluorescentes relativas (RFU - Relative Fluorescent Units). A figura 11 exemplifica um eletroferograma, mostrando os 23 *loci* STR, assim como o marcador de gênero Amelogenina utilizados em casos forenses.

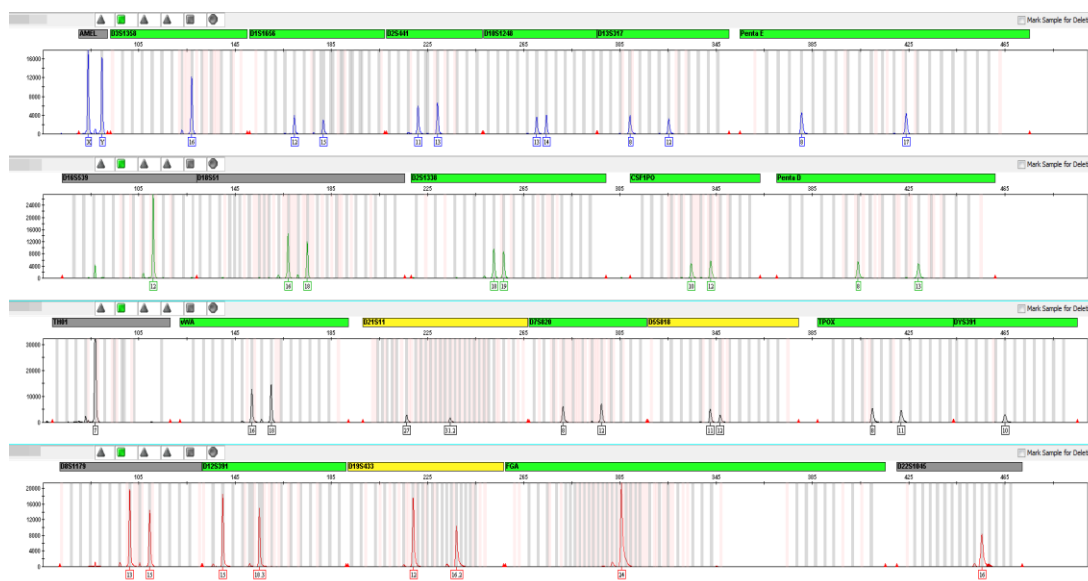


Figura 11: Eletroferograma obtido com a utilização do kit PowerPlex® Fusion System (Promega Corporation), demonstrando os 23 *loci* STRs analisados e o marcador de gênero Amelogenina. O eixo X

representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*), (Fonte: Acervo pessoal).

Para uma melhor representatividade dos resultados, os perfis genéticos provenientes das amostras foram classificados em três tipos: Perfil completo, quando apresentam picos nos 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogénina (Figura 12). Perfil parcial, quando apresentam picos entre 10 a 23 *loci* (Figura 13). E perfil insuficiente para análise, quando apresentam picos em até 9 *loci* (Figura 14).

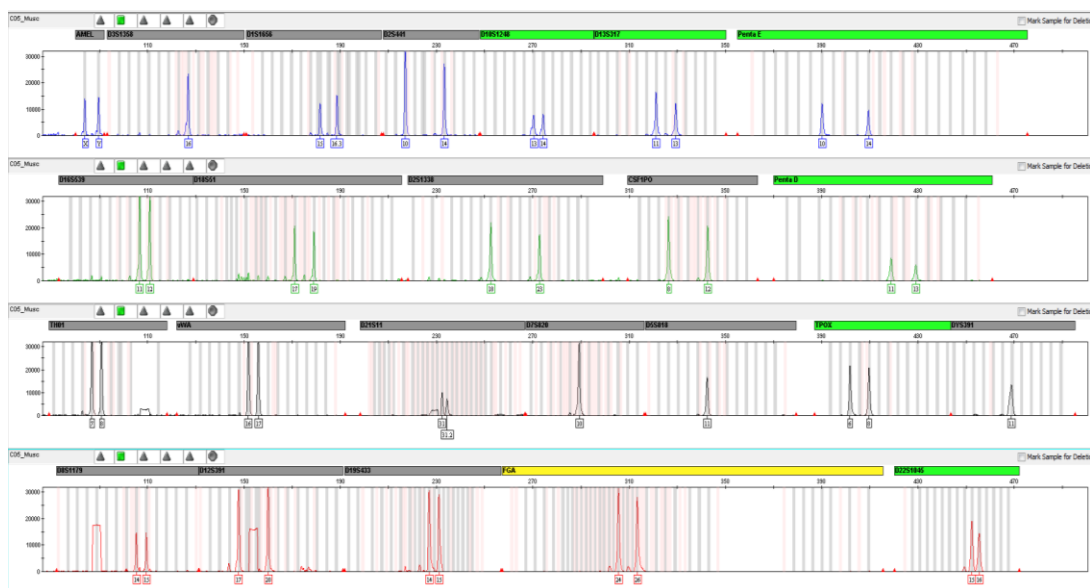


Figura 12: Exemplo de eletroferograma com perfil completo, apresentando picos nos 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogénina, (Fonte: acervo pessoal).

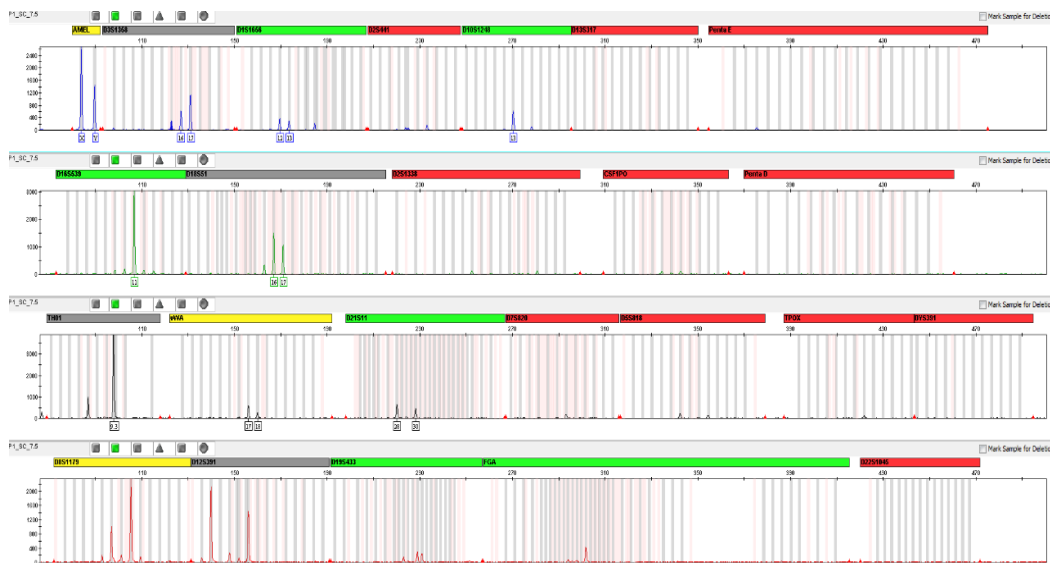


Figura 13: Exemplo de eletroferograma com perfil parcial, apresentando picos em 12 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina, (Fonte: acervo pessoal).

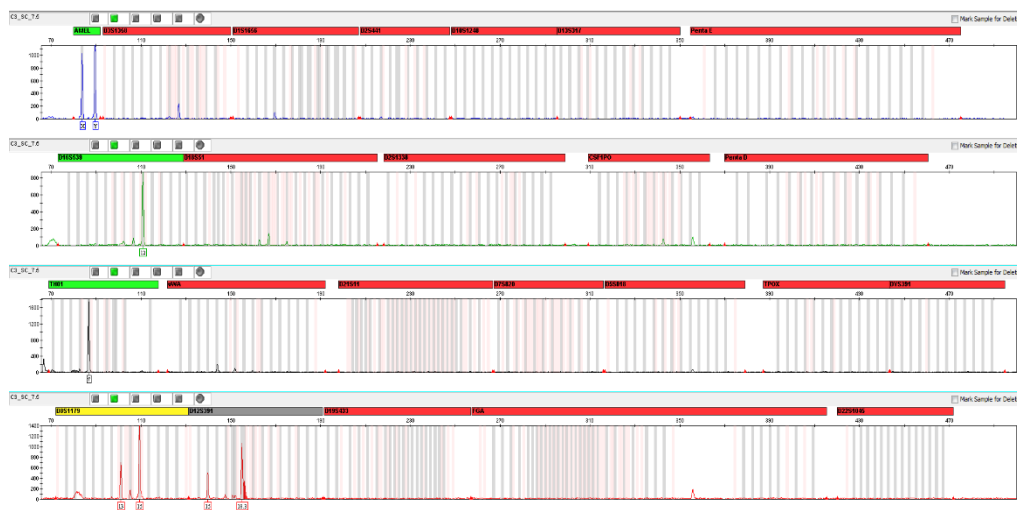


Figura 14: Exemplo de eletroferograma com perfil insuficiente para análise, apresentando picos em apenas 4 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina, (Fonte: acervo pessoal).

Considerando que os dados do presente trabalho não apresentam quantidades suficientes para afirmar que seguem uma distribuição normal, foi realizado, para a análise estatística, o teste de Kruskal Wallis com o auxílio do programa estatístico *GraphPad Prism 5 Demo*. Considerando estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ), seguido de comparações múltiplas utilizando o teste de Dunn.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Com o objetivo de verificar as concentrações de DNA obtidas a partir dos dois métodos de extração utilizados, PCI e Chelex®, foram estudadas 10 amostras de *swabs* de mucosa da bexiga urinária de cadáveres carbonizados e 10 *swabs* de cadáveres putrefatos, assim como suas respectivas amostras de referências, músculos e ossos (quando possíveis). Todas as amostras, exceto uma amostra de *swab* extraído com o método Chelex® (SC), dos cadáveres carbonizados apresentaram quantidades suficientes de DNA para análise (mais de 0,5 ng/μl). Já os corpos putrefatos apresentaram quatro amostras de *swabs* extraídos com o método PCI (SO) e oito de SC com quantidade abaixo do recomendado pelo kit (0,5 ng/μl), como visto nas tabelas IV e V. Entre os métodos de extração utilizados, a extração por PCI proporcionou melhor recuperação na concentração de DNA em ambos os tipos de cadáveres estudados, enquanto a extração por Chelex® apresentou baixa recuperação de DNA (tabelas IV e V).

As amostras #3\_SO, #8\_SC e #10\_SC dos cadáveres carbonizados, assim como a amostra #9\_SO dos cadáveres putrefatos, embora tivessem concentrações de DNA suficiente para análise, apresentaram perfis parciais devido a provável degradação do material genético. A amostra #8\_SO dos cadáveres putrefatos apresentou perfil completo (24/24 *loci*), mesmo tendo sua concentração de DNA abaixo do recomendado pelo kit de amplificação (0,14 ng/μl), isto se deve a provável ação de colocar o *input* de DNA máximo permitido pelo kit de amplificação. As amostras de músculos #3, #7, #8, #9 e #10 dos cadáveres putrefatos utilizadas como referências apresentaram perfis parciais mesmo tendo concentrações de DNA suficiente para análise como recomendado pelo kit de amplificação. Esse resultado deve-se a provável degradação do material genético, visto que provem de cadáveres já em estado de decomposição, demonstrando que as amostras de músculos não são recomendadas como amostras de referências nesses tipos de cadáveres. As amostras de ossos mostraram-se bastante eficientes como referências, visto que foi possível obter perfis completos em todas as amostras, exceto uma.

Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de inibidores de PCR, conforme a análise do padrão interno (IPC) (dados não mostrados). A figura 15 mostra a variação de concentração de DNA nos diferentes grupos analisados.

Tabela IV: Dados da quantificação de DNA das amostras de ossos, músculos e *swabs* da mucosa da bexiga urinária dos cadáveres carbonizados com o emprego do kit Investigator Quantiplex e o tipo de perfil genético adquirido de cada amostra.

#	<b>Swab da Bexiga (método PCI)</b>		<b>Swab da Bexiga (método Chelex®)</b>		<b>Músculo</b>		<b>Ossos</b>	
	Quantificação (ng/μl)	Perfil	Quantificação (ng/μl)	Perfil	Quantificação (ng/μl)	Perfil	Quantificação (ng/μl)	Perfil
1	1199,1617	C	0,8390	C	81,8064	C	36,8709	C
2	942,3144	C	1,6890	C	84,1010	C	34,3494	C
3	48,5124	P	0,0006	I	141,8347	C	73,7849	C
4	1090,9100	C	34,4994	C	244,2617	C	43,5187	C
5	61,3406	C	14,3902	C	113,5104	C	59,2170	C
6	209,5557	C	2,6536	C	175,7156	C	*	
7	549,5188	C	0,9422	C	411,3158	C	0,1201	C
8	171,8643	C	1,9989	P	69,0960	C	0,3313	C
9	62,8120	C	1,5669	C	1,9830	C	0,1657	C
10	95,0203	C	2,5335	P	67,8339	C	45,4282	C

\* - Não foi possível obter a amostra de osso. C - Completo, P - Parcial e I - Insuficiente para análise.

Tabela V: Dados da quantificação de DNA das amostras de ossos, músculos e *swabs* da mucosa da bexiga urinária dos cadáveres putrefatos com o emprego do kit Investigator Quantiplex e o tipo de perfil genético adquirido de cada amostra.

#	<b>Swab da Bexiga (método PCI)</b>		<b>Swab da Bexiga (método Chelex®)</b>		<b>Músculo</b>		<b>Ossos</b>	
	Quantificação (ng/μl)	Perfil	Quantificação (ng/μl)	Perfil	Quantificação (ng/μl)	Perfil	Quantificação (ng/μl)	Perfil
1	N/D	P	0,0111	P	0,1800	C	25,5456	C
2	0,1483	C	N/D	I	11,3322	C	35,0431	C
3	30,4889	C	0,6987	C	10,2664	P	0,3065	I
4	6,6625	C	0,1413	P	2,2498	C	51,5709	C
5	4,2919	C	N/D	I	N/D	I	*	
6	83,3441	C	0,0205	P	7,8185	C	50,5115	C
7	9,0781	C	0,0017	P	4,1197	P	3,5652	C
8	0,1479	C	0,7060	C	8,8095	P	0,0356	C
9	15,1377	P	N/D	I	97,3801	P	44,2583	C
10	0,2998	I	N/D	I	5,8094	P	*	

\* - Não foi possível obter a amostra de osso; N/D – Não detectado. C - Completo, P - Parcial e I - Insuficiente para análise.

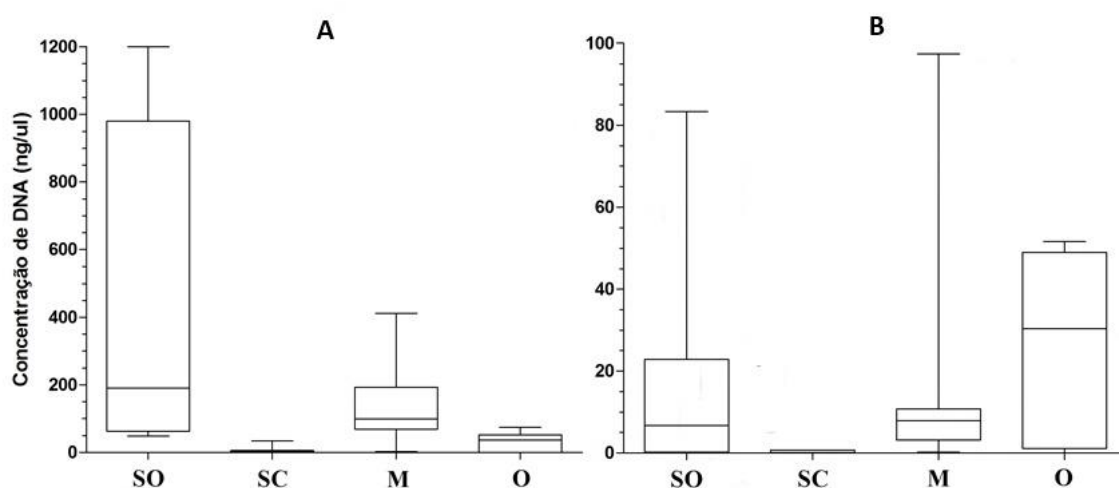


Figura 15: Variação na concentração de DNA dos diferentes tipos de amostras coletadas dos cadáveres carbonizados (A) e putrefatos (B). É possível observar a eficiência da metodologia PCI na recuperação de DNA em ambos os tipos de cadáveres, enquanto metodologia Chelex® apresentou baixo rendimento na recuperação de DNA. SO = *swabs* extraídos com o método PCI, SC = *swabs* extraídos com o método Chelex®, M = músculos e O = ossos.

#### 4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Levando-se em consideração a análise estatística das concentrações de DNA extraído das diferentes fontes de DNA (osso, músculo e *swab* da bexiga urinária), aplicando-se o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn para comparações múltiplas entre as amostras estudadas. Verificou-se que nos cadáveres carbonizados os *swabs* extraídos com a metodologia de PCI é tão eficiente quanto as amostras de músculos utilizadas como referência ( $p < 0,05$ ), ao mesmo tempo em que os *swabs* extraídos com o método Chelex® apresentaram diferenças significativas em relação ao restante das amostras, à exceção dos ossos (Tabela VI).

No que diz respeito aos cadáveres putrefatos, verificou-se que os *swabs* extraídos com a metodologia de PCI não possuem diferenças significativas quanto aos *swabs* extraídos com o método Chelex® e às amostras de músculos e ossos utilizadas como referência ( $p > 0,05$ ), em oposição aos *swabs* extraídos com o método Chelex® que apresentaram diferenças significativas em relação às amostras de referências, tais como músculos e ossos (Tabela VI).



Tabela VI: Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn das amostras dos cadáveres carbonizados obtidos através do software GraphPad Prism 5.

<b>Cadáveres: Carbonizados</b>			
<b>Teste de Kruskal-Wallis</b>		24,81	
<b>P valor</b>		<0,0001	
<b>As medianas variam significativamente (P &lt;0,05)</b>		Sim	
<b>Resumo do P valor</b>		***	
Teste de Comparação Múltipla de Dunn (grupos analisados)	Diferença na soma do ranking	Significante? (p<0,05)	Resumo
<b>SO vs SC</b>	21,65	Sim	***
<b>SO vs MUSC</b>	3,450	Não	ns
<b>SO vs OSSO</b>	17,18	Sim	**
<b>SC vs MUSC</b>	-18,20	Sim	**
<b>SC vs OSSO</b>	-4,472	Não	ns
<b>MUSC vs OSSO</b>	13,73	Não	ns

\*\*\* = Extremamente significativa (p<0,001); \*\* = Muito significativa (p entre 0,001 e 0,01); \* = significativa (p entre 0,01 a 0,05); ns = não significativa (p>0,05).

Tabela VII: Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn das amostras dos cadáveres em putrefação obtidos através do software GraphPad Prism 5.

<b>Cadáveres: Putrefatos</b>			
<b>Teste de Kruskal-Wallis</b>		10,39	
<b>P valor</b>		0,0156	
<b>As medianas variam significativamente (P &lt;0,05)</b>		Sim	
<b>Resumo do P valor</b>		*	
Teste de Comparação Múltipla de Dunn (grupos analisados)	Diferença na soma do ranking	Significante? (p<0,05)	Resumo
<b>SO vs SC</b>	11,89	Não	ns
<b>SO vs MUSC</b>	-1,22	Não	ns
<b>SO vs OSSO</b>	-3,32	Não	ns
<b>SC vs MUSC</b>	-13,11	Sim	*
<b>SC vs OSSO</b>	-15,21	Sim	*
<b>MUSC vs OSSO</b>	-2,1	Não	ns

\*\*\* = Extremamente significativa (p<0,001); \*\* = Muito significativa (p entre 0,001 e 0,01); \* = significativa (p entre 0,01 a 0,05); ns = não significativa (p>0,05).

#### 4.3. AMPLIFICAÇÃO DO DNA E OBTENÇÃO DO PERFIL GENÉTICO

Depois de realizadas as quantificações, o DNA das amostras foram submetidas à amplificação pelo método de PCR, seguidos de separação por eletroforese capilar e posteriormente analisados no software GeneMapper ID-X. Os resultados obtidos na amplificação das amostras confirmam a viabilidade dos protocolos de extração utilizados para os *swabs* da mucosa da bexiga urinária, visto que foi possível obter eletroferogramas de boa qualidade em 100% dos SO e 90% dos SC (considerando perfis completos e parciais) nas amostras de cadáveres carbonizados e em 90% dos SO e 50% dos SC nas amostras de cadáveres putrefatos, como visto na figura 18 e nos eletroferogramas adquiridos através do software GeneMapper ID-X (apêndices).

Todos os perfis genéticos dos *swabs* de mucosa da bexiga urinária estavam de acordo com suas respectivas amostras de referência (músculos e ossos), tanto os extraídos pela metodologia PCI quanto os extraídos pelo método Chelex®. Os perfis parciais obtidos também estavam de acordo com suas amostras de referência (figuras 19 a 23).

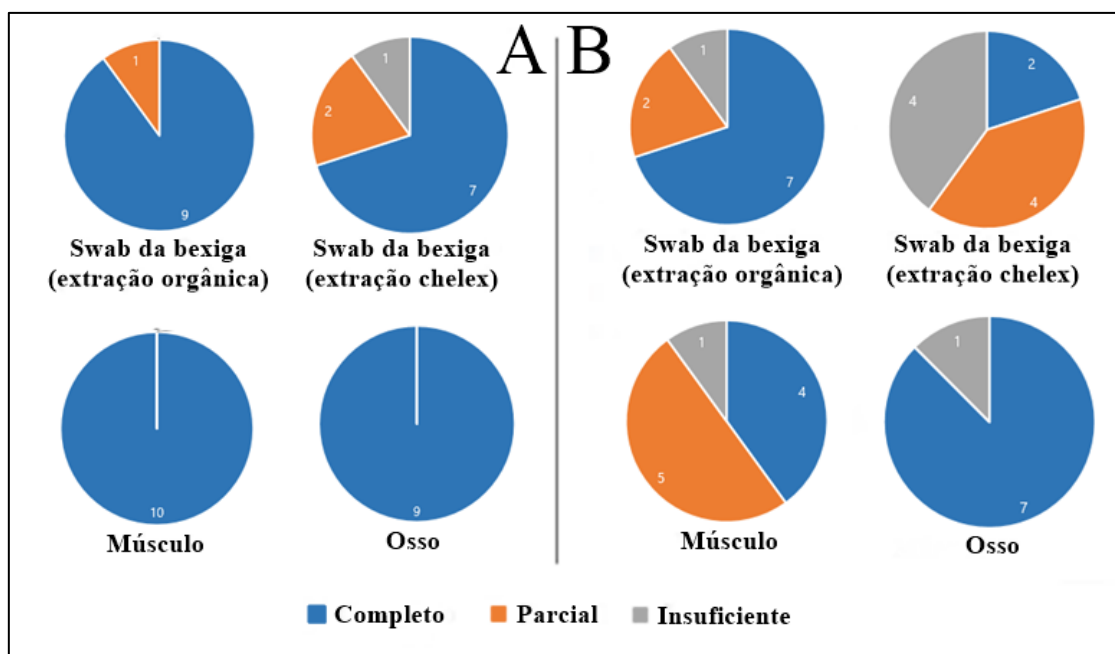


Figura 16: Representação gráfica dos perfis genéticos obtidos através dos diferentes tipos de amostras coletadas dos cadáveres carbonizados (A) e putrefatos (B).

É possível observar nas tabelas VIII e IX as condições de cada perfil genético parcial obtido dos *swabs* dos cadáveres carbonizados e putrefatos respectivamente, levando em consideração os *loci* amplificados, os *loci* não amplificados, os *loci* que apresentaram *drop-out* (*drop-out* é a falha de amplificação de alelos específicos. A possibilidade de ocorrer *drop-out* aumenta quando se utilizam pequenas quantidades de DNA, quando existe algum contaminante inibidor na amostra, ou quando as amostras estão degradadas ou comprometidas) e os *loci* que apresentaram *drop-in* (refere-se como *drop-in* quando alelos adicionais são observados a partir de uma contaminação esporádica, assim como ocorre quando o DNA se encontra degradado).

Tabela VIII: Condição de cada perfil genético parcial obtido dos *swabs* dos cadáveres carbonizados, levando em consideração os *loci* amplificados, os *loci* não amplificados e os *loci* que apresentaram *drop-out*.

Metodologia	Cadáver	<i>loci</i> não amplificados	<i>loci</i> com drop out	<i>loci</i> amplificados
Swab (extração PCI)	C3	PENTA D, D13S317, D22S1045 e FGA	Penta E, CSF1PO e TPOX	Amelogenina, D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D16S539, D18S51, D2S1338, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, DYS391, D8S1179, D12S391 e D19S433
Swab (extração Chelex®)	C8	DYS391	CSF1PO e D22S1045	Amelogenina, D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, Penta E, D16S539, D18S51, D2S1338, Penta D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433 e FGA
	C10		D22S1045	Amelogenina, D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, Penta E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, Penta D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, DYS391, D8S1179, D12S391, D19S433 e FGA

Tabela IX: Condição de cada perfil genético parcial obtido dos *swabs* dos cadáveres putrefatos, levando em consideração os loci amplificados, os loci não amplificados e os loci que apresentaram *drop-out*.

Metodologia	Cadáver	loci não amplificados	loci com <i>drop-out</i>	loci com <i>drop-in</i>	loci amplificados
Swab (extração PCI)	P1			TH01, D12S391	Amelogenina, D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, Penta E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, Penta D, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, DYS391, D8S1179, D19S433, FGA e D22S1045
	P9	D13S317, Penta E, TPOX, DYS391 e D22S1045	D10S1248, CSF1PO, Penta D e D21S11	D12S391	Amelogenina, D3S1358, D1S1656, D2S441, D16S539, D18S51, D2S1338, TH01, vWA, D7S820, D5S818, D8S1179, D19S433 e FGA
Swab (extração Chelex®)	P1	D2S441, D13S317, Penta E, D2S1338, CSF1PO, Penta D, D7S820, D5S818, TPOX, DYS391 e D22S1045	FGA		Amelogenina, D3S1358, D1S1656, D10S1248, D16S539, D18S51, TH01, vWA, D21S11, D8S1179, D12S391 e D19S433
	P4	Penta D, DYS391	Penta E	D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, TH01, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D19S433 e D12S391	Amelogenina, D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, vWA, D21S11, FGA e D22S1045
	P6	D10S1248, D2S1338, Penta E, Penta D, TPOX, D7S820, FGA, D21S11	D1S1656, D13S317, CSF1PO, D22S1045		Amelogenina, D3S1358, D2S441, D16S539, D18S51, TH01, vWA, D5S818, DYS391, D8S1179, D12S391 e D19S433
	P7	D13S317, Penta E, D2S1338, CSF1PO, Penta D, D21S11, TPOX, DYS391, D19S433, FGA, D22S1045	D1S1656, D7S820, D10S1248, D5S818,		Amelogenina, D3S1358, D2S441, D16S539, D18S51, TH01, vWA, D8S1179 e D12S391

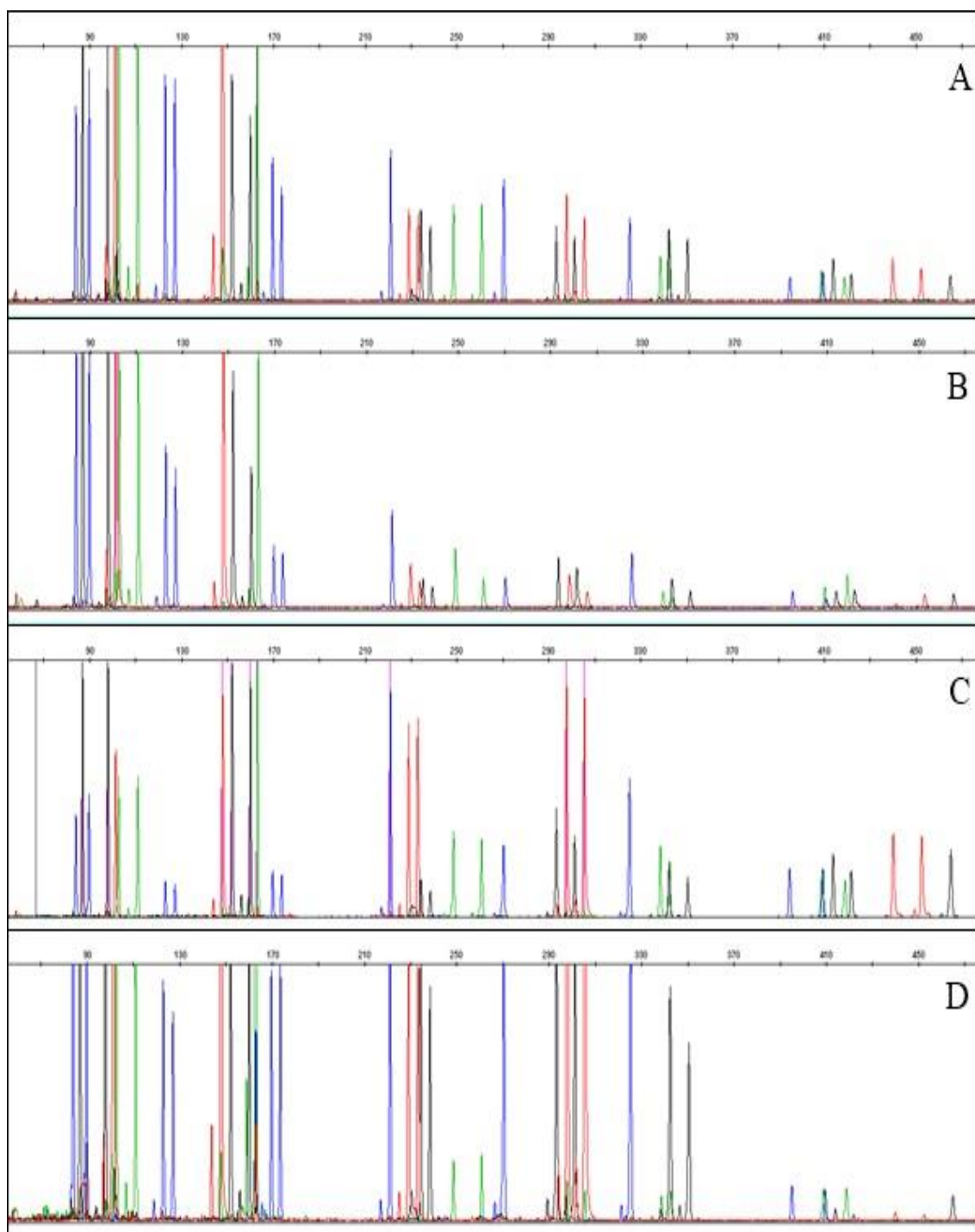


Figura 17: Eletroferogramas com perfis completos das amostras de osso (A), músculo (B) e *swabs* extraídos com PCI (C) e Chelex® (D) do cadáver carbonizado C2 mostrando a concordância entre eles.

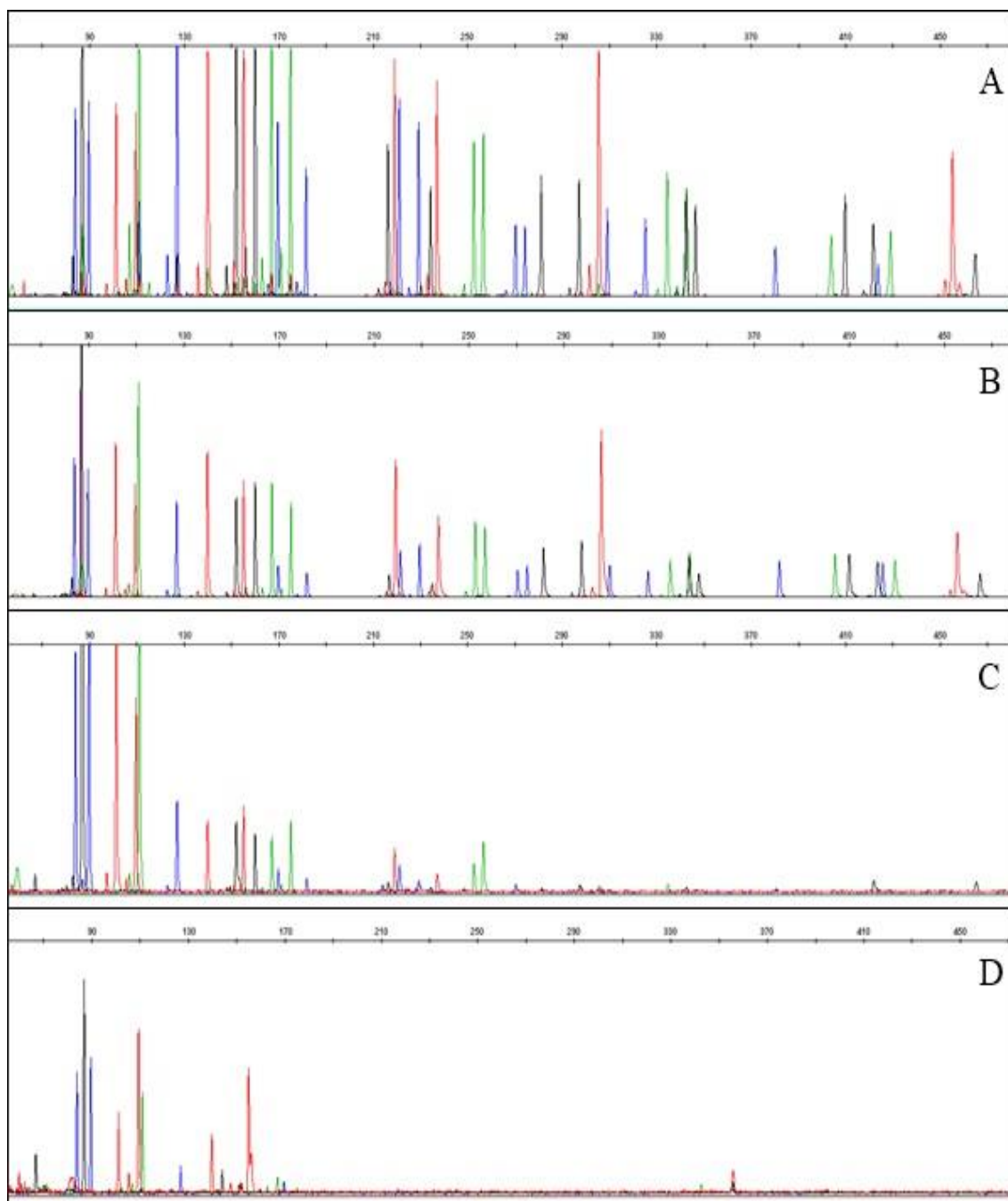


Figura 18: Eletroferogramas com perfis completos das amostras de referência osso (A) e músculo (B), perfil parcial de *swab* extraído com PCI (C) e perfil insuficiente para análise de *swab* extraído com Chelex® (D) do cadáver carbonizado C3 mostrando a concordância entre o perfil parcial do *swab* e completo das referências.

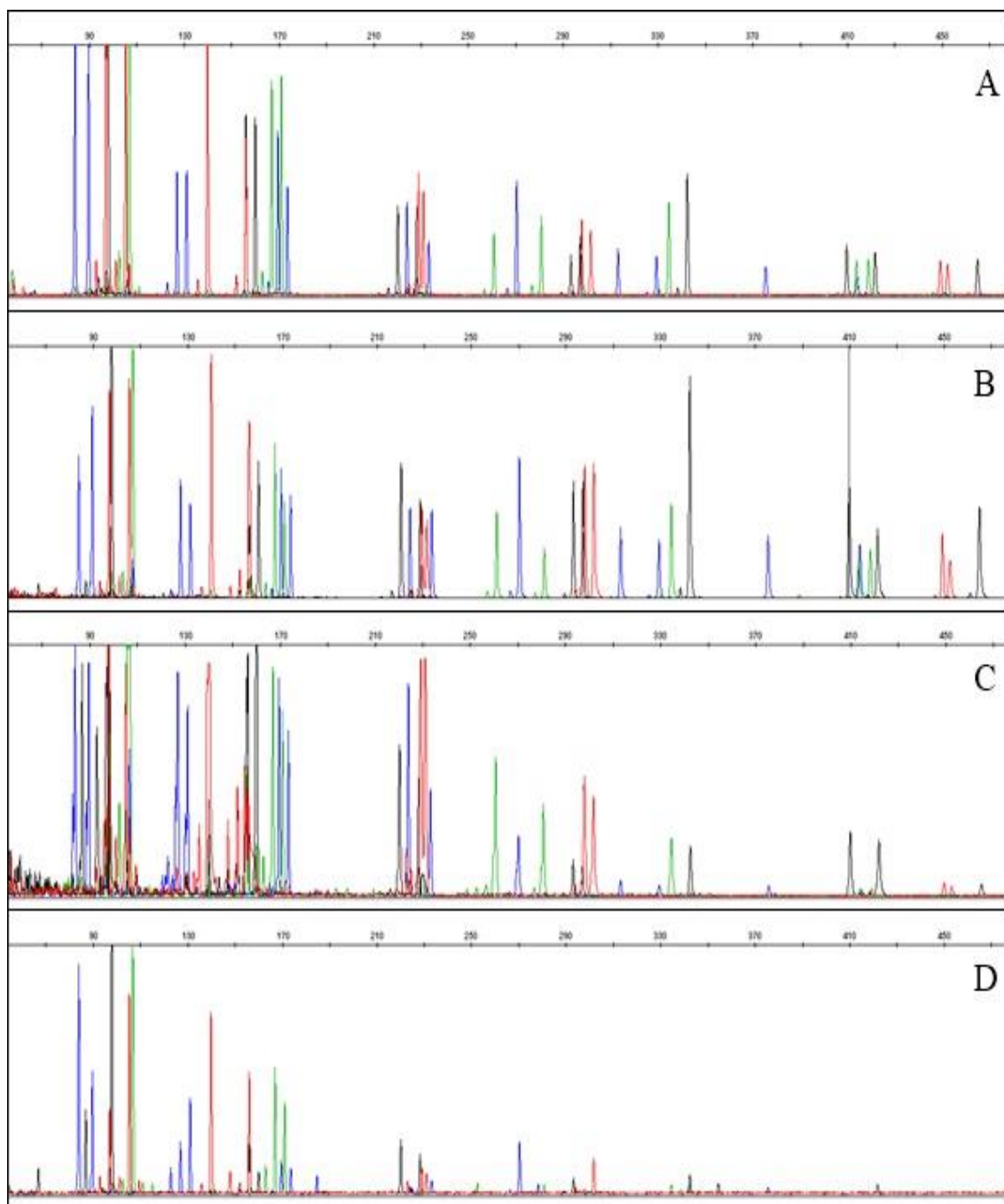


Figura 19: Eletroferogramas com perfis completos das amostras de referência osso (A) e músculo (B) e perfis parciais dos *swabs* extraídos com PCI (C) e Chelex® (D) do cadáver putrefato P1 mostrando a concordância entre os perfis parciais dos *swabs* e completos das referências.

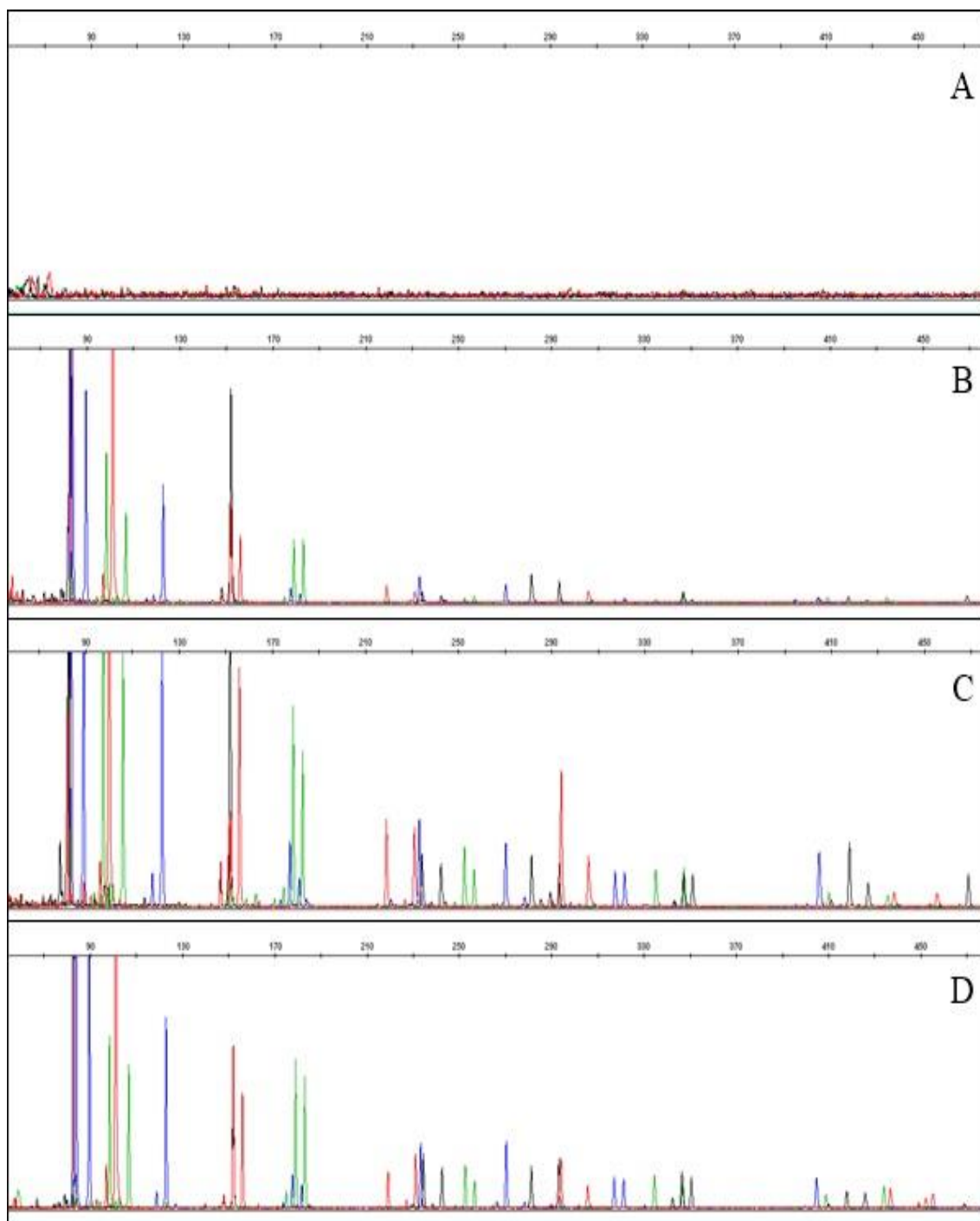


Figura 20: Eletroferogramas com perfil insuficiente para análise da amostra de osso (A), perfil parcial de músculo (B) e perfis completos dos *swabs* extraídos com PCI (C) e Chelex® (D) do cadáver putrefato P3 mostrando a concordância entre os perfis completos dos *swabs* e parcial de músculo.



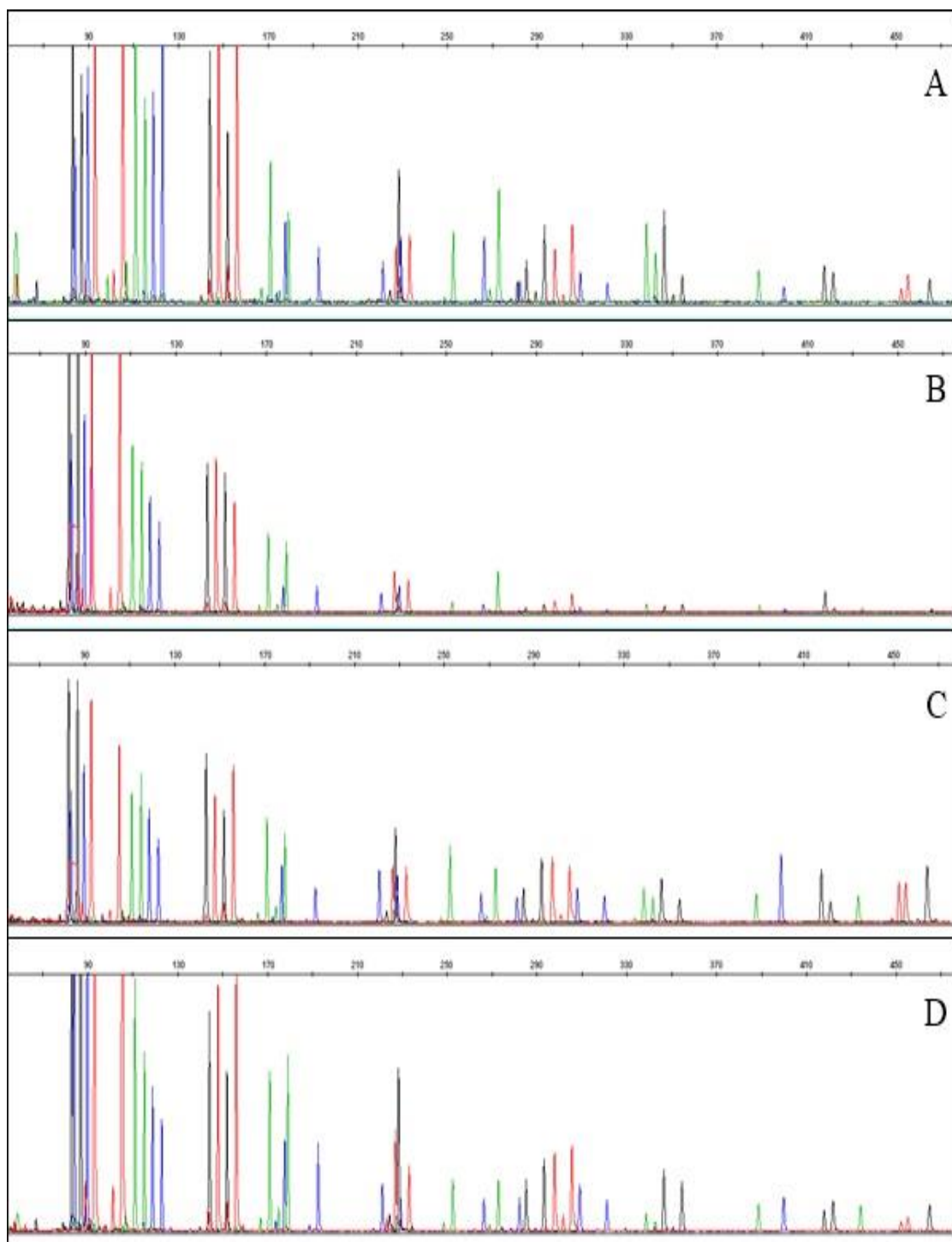


Figura 21: Eletroferogramas com perfis completos das amostras de osso (A), *swab* extraídos com PCI (C) e Chelex® (D) e perfil parcial de músculo (B) do cadáver putrefato P8 demonstrando a concordância entre eles.

#### 4.4. DEGRADAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

O ensaio do Bioanalyser mostra não apenas uma estimativa da quantidade de DNA, mas também pode fornecer uma visão sobre sua integridade. Como se vê na figura 21, duas de três amostras musculares (C02 e P04) apresentaram DNA de alta integridade, com fragmentos com comprimento superior a 3000 pb. Em oposição, a amostra muscular P05 apresentou altos níveis de degradação, com peso molecular médio de 35 pb. Esses resultados refletiram os perfis genéticos obtidos para estas amostras, pois foi possível obter eletroferogramas completos para as duas primeiras amostras, enquanto que a última mostrou um perfil insuficiente para análise (tabelas IV e V).

Entre os esfregaços da bexiga urinária, é possível observar que, mais importante do que obter altos rendimentos de DNA, sua integridade é crucial para a obtenção de perfis genéticos completos. Embora a extração por Chelex® produza, em geral, amostras com menores concentrações de DNA quando comparadas com a extração por PCI (por exemplo, P08), é possível obter um eletroferograma completo quando os fragmentos de DNA são suficientemente longos para suceder a amplificação por PCR.

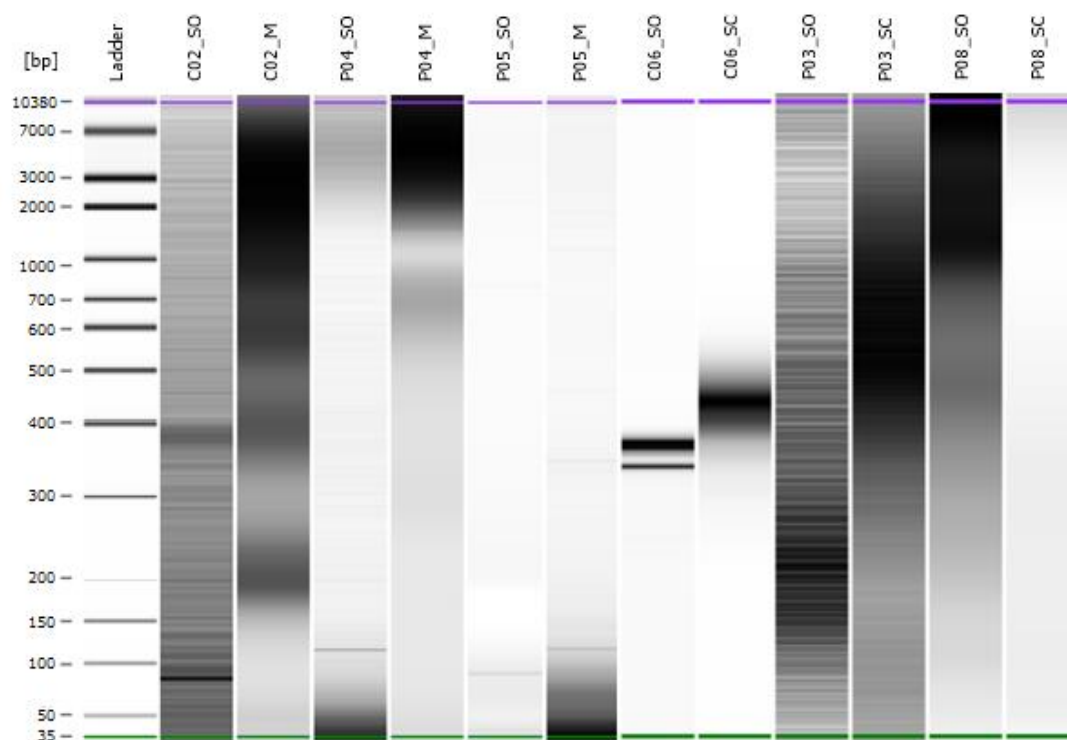


Figura 22: Gel de eletroforese gerado pelo Bioanalyser mostrando a integridade do DNA em alguns tipos de amostras dos cadáveres carbonizados e em putrefação.

## 5. DISCUSSÃO

Em casos de morte violenta ou suspeita, a necropsia é obrigatória (BRASIL, decreto-lei nº 3.689, 1941), sendo o músculo a amostra preferencialmente coletada. Todavia, podem ser colhidas amostras de osso se o músculo não é adequado, como por exemplo em casos avançados de decomposição (Benfica & Vaz, [s.d.]; Interpol, 2009). Por este motivo foram utilizadas amostras de músculos e ossos neste estudo como referências.

Os *swabs* da mucosa da bexiga urinária, apresentaram certas vantagens comparados aos materiais de rotina, tais como ossos e músculos. A principal vantagem é a facilidade e a rapidez na coleta do material, pois não é preciso serrar o osso ou cortar um pedaço do músculo do cadáver para a coleta do material após a necropsia, é feito somente uma incisão na bexiga urinária e realizado o esfregaço na parte interna. Outra vantagem dos *swabs* da bexiga é o transporte desses materiais e o armazenamento, pois são pequenos e não ocupam muito espaço, que, segundo a literatura, são problemas rotineiros em laboratórios forenses (Fonseca e Garrido, 2016). A rapidez na extração do material genético dos *swabs* de mucosa da bexiga urinária mostrou ser outra vantagem quando comparados aos materiais de rotina, pois os mesmos não precisam passar por uma pulverização e uma fase de lise mais brusca, por aproximadamente 18 horas, no caso de ossos, e a fácil manipulação do material em comparação aos músculos.

Comparando as metodologias empregadas para extração do DNA dos *swabs*, foi observado que os *swabs* extraídos com a metodologia PCI apresentaram um alto rendimento em relação ao mínimo aceitável para a amplificação do DNA. Enquanto os *swabs* extraídos com Chelex® mesmo não tendo um alto rendimento ainda possibilitaram obter quantidades significativas de DNA para amplificação (mais de 0,5 ng/μl; observável nas tabelas IV e V).

Chelex® é uma resina quelante utilizado para purificar compostos via troca iônica. Foi escolhido por causa das vantagens em relação ao método convencional baseado em PCI, uma vez que é um método de tubo único, rápido e fácil de realizar quando existe múltiplas amostras, além de ter um custo baixo (Walsh, Metzger, & Higuchi, 2013).

A metodologia de extração por Chelex® apresentou certas vantagens, tais quais a redução de custo, do tempo e do esforço, assim como na segurança do operador, já que não utiliza solventes orgânicos tóxicos, corroborando o estudo feito por Jung (1991),

sobre vantagens da extração pela resina Chelex® em relação à técnica de PCI. A redução do número de passos na preparação da amostra também reduz a possibilidade de contaminação por DNA introduzido pelo operador, assim como mistura de amostras, como demonstrado por Walsh, Metzger e Higuchi (2013). Apesar dessas vantagens apresentadas pela extração por Chelex®, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a metodologia PCI é a mais eficiente para as amostras de *swabs*, devendo ser a primeira e única técnica a ser escolhida em casos de cadáveres putrefatos, devido à grande quantidade de perfis completos adquiridos. Enquanto que a metodologia Chelex® se mostrou eficiente em cadáveres carbonizados, obtendo sete perfis completos dentre os dez cadáveres estudados, podendo ser a primeira técnica a ser utilizada para extração desses cadáveres, e caso apresente algum problema, a extração por PCI pode ser uma segunda alternativa para a melhoria do material genético.

Por mais que os resultados obtidos com a extração pelo método Chelex® tenham sido promissores, muito pouco é feito utilizando este método de extração em amostras de mucosa de bexiga. Brito e colaboradores (2015) demonstraram a viabilidade dos *swabs* da mucosa da bexiga urinária em cadáveres sem sinais evidentes de decomposição, como uma excelente fonte de DNA nos casos em que é difícil ou não é possível coletar outro tipo de amostra, assim como o custo-benefício dos *swabs* de mucosa da bexiga para identificação humana. Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho podem ser utilizados como referências para futuros estudos.

A grande variação entre as quantidades de DNA nas amostras do mesmo grupo pode ter ocorrido devido ao perfil dos cadáveres utilizados nesse estudo; no caso dos ossos, a variação pode ter ocorrido pelo fato de ter sido coletado ossos de diferentes regiões, por ordens do médico legista responsável devido normas do IMLAP, assim como o grau de putrefação (qualidade) das amostras foi diversificado (SEPP *et al.*, 1994). Segundo Solléro *et al.* (2004), a qualidade das amostras de DNA é caracterizada pela sua capacidade de ser utilizado para amplificação e poder ser submetidos à técnica de análise de fragmentos. À vista disso, as metodologias empregadas para os *swabs* da mucosa da bexiga urinária, demonstraram ser úteis por serem bastante sensíveis (à exceção da extração por Chelex® em cadáveres em putrefação), reprodutíveis e não apresentarem evidências de contaminação, podendo assegurar excelente material capaz de ser aplicado a rotina forense em casos de desastres de massa.

O sistema PowerPlex® Fusion aderiu a recomendação da comunidade forense europeia sobre a utilização de mini-STRs como o caminho a seguir para aumentar tanto a robustez como a sensibilidade da análise, o que melhorou bastante a obtenção de perfis genéticos com mais *loci* que os kits comerciais anteriores (Gill *et al.* 2006a, Gill *et al.* 2006b). Os mini-STRs presentes no sistema PowerPlex® Fusion se revelaram valiosos devido aumento do poder de discriminação oferecido pela recuperação de mais *loci* genéticos nos casos em que o DNA se encontrava com provável degradação (tabelas VI e VII). De acordo com a Comissão Internacional de Pessoas Desaparecidas (Parsons *et al.* 2007), a recuperação de mais *loci* genéticos, a separação e reassociação de restos altamente misturados com o uso de Mini-STR são claramente uma ferramenta importante e de baixo custo no tratamento de casos de amostras altamente degradadas, assim como a alta taxa de sucesso dos mini-STRs permitem que eles sejam um grande benefício (Coble e Just, 2009; Irwin *et al.*, 2007). Deste modo, o sistema PowerPlex® Fusion mostrou-se ser um multiplex robusto e confiável de análise de STR adequado para identificação humana.

Os mini-STRs têm um grande potencial e sua utilização em casos forenses aumentou nos últimos anos à medida que os novos e familiares *loci* autossômicos, *loci* dos cromossomos X e Y são projetados com produtos de PCR de tamanho reduzido (Butler, Shen e Mccord, 2003; Dixon *et al.* 2006; Grubwieser *et al.* 2006; Hill *et al.*, 2008; Parsons *et al.* 2007). À vista disso, o presente estudo demonstrou que a utilização de mini-STR para a avaliação dos *swabs* de mucosa da bexiga urinária pode garantir uma melhoria desse tipo de amostra em casos onde o material genético se encontra degradado.

O perfil genético obtido a partir do *swab* da bexiga, em geral, foi de qualidade similar quando comparado com a amostra de referência (Figuras 16 a 20), não obstante, algumas amostras apresentaram perfis parciais mesmo com concentrações acima do limite recomendado pelo kit PowerPlex® Fusion (Tabelas IV e V). O perfil genético do cadáver putrefato #7 com a metodologia Chelex® foi considerado parcial, uma vez que, se não existisse as amostras de referências não seria possível ter conhecimento dos *drop-out* apresentados.

Um perfil de DNA parcial ocorre quando não foi possível obter resultados para um ou mais dos *loci* STR ou o marcador de gênero. Isto pode acontecer quando a amostra que está sendo analisada se degrada após ter sido exposta a um ambiente severo por um período de tempo, e/ou quando há muito pouco material disponível (Foreman e Evett,

2001). Foreman e Evett (2001) observaram que perfis parciais ocorrem em aproximadamente 20% dos casos. Dado que muitas vezes não é possível saber quais alelos deveriam ter estado presentes se a amostra não tivesse sido degradada, a prática padrão é interpretar apenas os alelos detectados como sugerido por Butler (2005). Mesmo que os resultados sejam obtidos em apenas alguns *loci* STR, essas informações podem fornecer ampla assistência para identificação humana, incluir ou excluir um suspeito e, portanto, ajudar a resolver um caso (Butler, 2005).

Considerando o baixo rendimento da extração por Chelex® nas amostras que apresentaram perfis parciais ou insuficiente para análise devido a quantidade de DNA abaixo do proposto pelo kit de amplificação (menor que 0,5 ng/ul), foi possível melhorar a qualidade do perfil genético fazendo um ajuste na concentração de DNA na etapa de amplificação. Outra forma de melhorar a qualidade do perfil genético é aumentar os ciclos de amplificação em cinco ciclos, de forma a garantir a amplificação de DNA, caso este esteja presente e com qualidade para ser amplificado como sugerido por Shibata e colaboradores (1994).

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou a viabilidade do uso dos *swabs* de mucosa da bexiga urinária como fonte de DNA para a identificação humana de cadáveres carbonizados e putrefatos, possibilitando a obtenção de perfis genéticos de boa qualidade para utilização no laboratório. Em comparação com os materiais de rotina, tais como ossos e músculos, os *swabs* da bexiga provaram ser uma forma eficiente e de baixo custo para a identificação humana.

Entre as metodologias empregadas, o método PCI se mostrou o mais eficiente para a obtenção de perfis genéticos para ambos tipos de cadáveres aqui estudados, carbonizados e putrefatos. Enquanto que o método Chelex® se mostrou eficiente apenas para os cadáveres carbonizados com o intuito de uma primeira análise com o objetivo de reduzir o custo e tempo na obtenção dos perfis genéticos. A utilização destas metodologias não só é possível como viável em laboratórios de análises forenses, e a opção por uma delas fica a critério do laboratório, no que tange a fatores como custo e adaptação à técnica.

Os resultados desse estudo contribuem com a melhoria da qualidade e confiabilidade deste material quando outras amostras se encontram com dificuldades de coleta, assim como economia de tempo e gastos. As amostras utilizadas nesse estudo provaram ser altamente informativas e uma ferramenta importante na identificação humana, porém, estudos adicionais são necessários para melhorar a qualidade dos perfis genéticos obtidos através dos *swabs* da bexiga.

Em suma, o presente trabalho permite concluir que, esse tipo de material poderá atender não só aos interesses do Instituto de Pesquisa e Perícias em Genética Forense (IPPGF - DGPTC/PECERJ) como aos outros institutos forenses no desenvolvimento e no avanço na linha de investigação da Genética Forense.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGILENT HIGH SENSITIVITY DNA KIT GUIDE. Agilent Technologies. (2013). Disponível em <[http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90321\\_SensitivityDNA\\_KG\\_EN.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90321_SensitivityDNA_KG_EN.pdf)>. Acesso em 20 dez. 2016.
- ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G.; DE BRUIJN, M. H. L.; COULSON, A. R.; DROUIN, J.; EPERON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J. H.; STADEN, R.; YOUNG, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, v. 290, p. 457-465.
- ARAÚJO, M. E. C.; PASQUALI, L. *Histórico dos processos de identificação*. Disponível em <<http://www.papiloscopistas.org/historico.doc>>. Acesso em: 22 nov 2016.
- BENFICA, F. S.; VAZ, M. [s.d.]. Roteiro Médico-legal para Atendimento de Vítimas Fatais em Acidentes de Massa. Disponível em: <[http://www.disaster-info.net/lideres/portugues/curso-brasil08/documentos\\_e\\_artigos/Roteiro.pdf](http://www.disaster-info.net/lideres/portugues/curso-brasil08/documentos_e_artigos/Roteiro.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- BIANCALANA, R. C.; VIEIRA, M. G. D. M.; FIGUEIREDO, B. M. J.; VICENTE, S. A. F.; DEZEM, T. U.; SILVA, R. H. A. (2015). Desastres em massa: a utilização do protocolo de DVI da Interpol pela odontologia legal. *RBOL- Revista Brasileira de Odontologia Legal*, v. 2, n. 2.
- BONACCORSO, N. S. *Aplicação do exame de DNA na Elucidação de crimes*. 2005. 156 p. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Medicina Forense. São Paulo, SP, Brasil. 2005.
- BRASIL. Decreto-Lei 3689, de 3 de outubro de 1941. *Código de Processo Penal*. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/Del3689.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del3689.htm)>. Acesso em: 8 fev. 2017.
- BRITO, F. C. A.; PRATA, D. R. B. M.; MARTHA, S. F. P.; BOTTINO, C. G. (2015). Evaluation of the urinary bladder swabs as a source of DNA for human identification using two different extraction methods. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, v. 5, p. e484-e486.
- BUDOWLE, B.; DAAL, A. V. (2008). Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*, v. 44, n. 5 (Abr), p. 603–610.
- BUDOWLE, B.; BIEBER, F. R.; EISENBERG, A. J. (2005). Forensic aspects of mass disasters: Strategic considerations for DNA-based human identification. *Legal Medicine*, v. 7, n. 4, p. 230–243.



BUTLER, J. M. (2003). Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Forensic science review*, v. 15, n. 2, p. 91–111.

BUTLER, J. M.; SHEN, Y.; MCCORD, B. R. (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *Journal of Forensic Sciences*, v. 48, n. 5, p. 1054–1064.

BUTLER, J. M. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. v. 2. New York: Elsevier; 2005. 688 p.

BUTLER, J. M. *Fundamentals of forensic DNA typing*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2009. 500 p.

CHUNG, D. T.; DRÁBEK J.; OPEL K. L.; BUTLER J. M.; MCCORD, B. R. (2004). A Study on the Effects of Degradation and Template Concentration on the Amplification Efficiency of the STR Miniplex Primer Sets. *Journal of Forensic Sciences*. v. 49. p. 733-740.

COBLE, M. D.; JUST, R. S. Mini-STRs. In: JAMIESON, A. (Ed.), MOENSSENS, A. (Ed.). *Wiley Encyclopedia of Forensic Science*. West Sussex, UK: John Wiley and Sons Ltd., 2009.

DECORTE, R. (2010). Genetic identification in the 21st century - Current status and future developments. *Forensic Science International*, v. 201, p. 160-164.

DEPARTAMENTO de Polícia Federal. *Manual de Técnicas de Papiloscopia*. Brasília: Serviço Gráfico do DPF, 2004.

DIXON, L. A.; DOBBINS, A. E.; PULKER, H. K.; BUTLER, J. M.; VALLONE, P. M.; COBLE, M. D.; PARSON, W.; BERGER, B.; GRUBWIESER, P.; MOGENSEN, H. S.; MORLING, N.; NIELSEN, K.; SANCHEZ, J. J.; PETKOVSKI, E.; CARRACEDO, A.; SANCHEZ-DIZ, P.; RAMOS-LUIS, E.; BRION, M.; IRWIN, J. A.; JUST, R. S.; LOREILLE, O.; PARSONS, T. J.; SYNDERCOMBE-COURT, D.; SCHMITTER, H.; STRADMANN-BELLINGHAUSEN, B.; BENDER, K.; GILL, P. (2006). Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs-results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Science International*, v. 164, n. 1, p. 33–44.

FBI. Combined DNA Index System (CODIS). (2017). Disponível em: < <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

FILIPAS, D.; FISCH, M.; FICHTNER, J.; FITZPATRICK, J.; BERG, K.; STÖRKEL, S.; HOHENFELLNER, R.; THÜROFF, J. W. (1999). The histology and immunohistochemistry of free buccal mucosa and full-skin grafts after exposure to urine. *BJU International*, v. 84, n. 1, p. 108–111.

FONSECA, C.; GARRIDO, R. G. Lixo, restos humanos e genética forense: o caso de um laboratório de polícia do Rio de Janeiro. In: RIAL, C. (Org). *O poder do lixo: abordagens*

*antropológicas dos resíduos sólidos*. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Antropologia, 2016. p. 399-420.

FOREMAN, L. A.; EVETT, I. W. (2001). Statistical analyses to support forensic interpretation for a new ten-locus STR profiling system. *International Journal of Legal Medicine*. v. 114, n. 3, p. 147–155.

FRANÇA, G. V. *Medicina legal*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 629 p.

FUNABASHI, K. S.; MONTEIRO, A. C.; MORAES, D. A.; ROCHA, M. R.; MOREIRA, P. C. F.; IWAMURA, E. S. M. (2009). A importância da identificação humana nos desastres de massa naturais, acidentais ou provocados: uma abordagem multidisciplinar. *Saúde, Ética & Justiça*, v. 14, n. 2, p. 67-77.

GARRIDO, R. G.; NAIA, M. J. T. (2014). Cronotanatognose: a influência do Clima tropical na determinação do Intervalo post-mortem. *Lex Humana*. v. 6, nº 1, p. 180-195.

GILL, P.; FEREDAY, L.; MORLING, N.; SCHNEIDER, P. M. (2006a). The evolution of DNA databases – recommendations for new European loci. *Forensic Science International*. v. 156, 242–244.

GILL, P.; FEREDAY, L.; MORLING, N.; SCHNEIDER, P. M. (2006b). Letter to editor – new multiplexes for Europe: amendments and clarification of strategic development. *Forensic Science International*. v. 163, 155–157.

GODINHO, N. M. O. (2014). Banco de dados de DNA: Uma ferramenta a serviço da justiça. *Revista Brasileira de Estudos de Segurança Pública*, v. 7, n. 2.

GÓES, A. C. S. (2005). Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais. *Revista do Biomédico*. nº 65. Disponível em: < [http://www.crbm1.gov.br/bio65/artigocien\\_65.asp](http://www.crbm1.gov.br/bio65/artigocien_65.asp) >. Acesso em: 24 dez. 2016.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. Introdução à Genética. Tradução: Paulo Armando Motta. 9ª ed. Guanabara Koogan. 2009. 740 p.

GRUBWIESER, P.; MÜHLMANN, R.; BERGER, B.; NIEDERSTÄTTER, H.; PAVLIC, M.; PARSON, W. (2006). A new “miniSTR multiplex” displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. *International Journal of Legal Medicine*. v. 120. p. 115-120.

HARES, D. R. (2015). Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci. Int. Genetics*. v. 17, p. 33-34.

HARTMAN, D.; DRUMMER, O.; ECKHOFF, C.; SCHEFFER, J. W.; STRINGER, P. (2011). The contribution of DNA to the disaster victim identification (DVI) efforts. *Forensic Science International*, v 205, p. 52-58.

HILL, C. R.; KLINE, M. C.; COBLE, M. D.; BUTLER, J. M. (2008). Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *Journal of Forensic Sciences*, v. 53, n. 1, p. 73–80.

INTERPOL. Disaster Victim Identification Guide. Disponível em <[http://www.interpol.int/content/download/10461/74507/version/4/file/guide\[1\].pdf](http://www.interpol.int/content/download/10461/74507/version/4/file/guide[1].pdf)>. Acesso em: 10 set. 2015.

INVESTIGATOR® QUANTIPLEX HANDBOOK. Quiagen (2014). Disponível em <<https://www.qiagen.com/be/resources/download.aspx?id=6378fac5-aa2f-4140-9518-c0712ca317ae&lang=en>>. Acesso em 20 dez. 2016.

IRWIN, J. A.; LENEY, M. D.; LOREILLE, O.; BARRITT, S. M.; CHRISTENSEN, A. F.; HOLLAND, T. D.; SMITH, B.C.; PARSONS, T.J. (2007). Application of low copy number STR typing to the identification of aged, degraded skeletal remains, *Journal of Forensic Science*. v. 52 (6), p. 1322–1327.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, v. 11, n. 10, p. 424-429.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. (1985). Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature*, v. 316, p. 76–79.

JUNG, J. M.; COMEY, C. T.; BAER, D. B.; BUDOWLE, B. (1991). Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQa gene. *International journal of legal medicine*, v. 104, n. 3, p. 145-148.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 556.

KOCH, A.; ANDRADE, F. M. (2008). A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. *RBAC*, v. 40, n. 1, p. 17-23.

LAWSON, C.; MCGUCKIAN, A.; SIKORSKY, J. C.; SEFERYN, S. E.; STATON, P. (2017). Evaluation of PowerPlex® Fusion for the Recovery of DNA from Cartridges and Shell Casings. *Marshall University: Research and Seminar: Class of 2017*. Disponível em < [http://www.marshall.edu/forensics/files/Lawson\\_Final\\_Paper.pdf](http://www.marshall.edu/forensics/files/Lawson_Final_Paper.pdf) >. Acesso em: 28 fev. 2017.

LAWYER, F. C.; STOFFEL, S.; SAIKI, R. K.; CHANG, S. Y.; LANDRE, P. A.; ABRAMSON, R. D.; GELFAND, D. H. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a

truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome research*, v. 2, n. 4, p. 275-287.

LESSIG, R.; ROTHSCCHILD, M. (2012). International standards in cases of mass disaster victim identification (DVI). *Forensic Science and Medicinal Pathology*, v. 8, p. 197-199.

LU, M.; ZHOU, G.; LIU, W.; WANG, Z.; ZHU, Y.; YU, B.; ZHANG, W.; CAO, Y. (2010). Remodeling of buccal mucosa by bladder microenvironment. *Urology*, v. 75, n. 6, p. 1514.e7-1514.e14.

MACHADO, A.B. *O uso do DNA mitocondrial na análise forense*. 2016. 26 p. Monografia (Graduação) - Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2016.

MARTINS, J.A. Estudo de frequências alélicas de STRs do cromossomo X na população brasileira de Araraquara-SP. 2008. 122 p. Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara, SP, Brasil. 2008.

MORETTI, T. R.; BAUMSTARK, A. L.; DEFENBAUGH, D. A.; KEYS, K. M.; SMERICK, J. B.; BUDOWLE, B. (2001). Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal of forensic sciences*, v. 46, n. 3, p. 647-660.

MORLING, N.; HANSEN, H. E. (1993). Paternity testing with VNTR DNA systems. *International journal of legal medicine*, v. 105, n. 4, p. 189-196.

MULLIS, K. B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de biologie clinique*, v. 48, n. 8, p. 579-82.

OOSTDIK, K.; LENZ, K.; NYE, J.; SCHELLING, K.; YET, D.; BRUSKI, S.; STRONG, J.; BUCHANAN, C.; SUTTON, J.; LINNEN, J.; FRAZIER, N.; YOUNG, H.; MATTHIES, L.; SAGE, A.; HAHN, J.; WELLS, R.; WILLIAMS, N.; PRICE, M.; KOEHLER, J.; STAPLES, M.; SWANGO, K. L.; HILL, C.; OYERLY, K.; DUKE, W.; KATZILIERAKIS, L.; ENSENBERGER, M. G.; BOURDEAU, J. M.; SPRECHER, C. J.; KRENKE, B.; STORTS, D. R. (2014). Developmental validation of the PowerPlex® Fusion system for analysis of casework and reference samples: A 24-locus multiplex for new database standards. *Forensic Science International: Genetics*, v. 12, p. 69-76.

OWEN, R.; BEDFORD, P.; LEDITSCHKE, J.; SCHLENKER, A.; HARTMAN, D. (2013). Post mortem sampling of the bladder for the identification of victims of fire related deaths. *Forensic Science International*, v. 233, n. 1-3, p. 14-20.

PARADELA, E. R.; FIGUEIREDO, A. L. S.; SMARRA, A. L. S. (2006). A identificação humana por DNA: aplicações e limites. *Âmbito Jurídico*, Rio Grande, IX, n. 30, jun 2006.

Disponível em <[http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?-artigo\\_id=1175&n\\_link=revista\\_artigos\\_leitura](http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?-artigo_id=1175&n_link=revista_artigos_leitura)>. Acesso em: 16 nov. 2016.

PARSONS, T. J.; HUEL, R.; DAVOREN, J.; KATZMARZYK, C.; MILOS, A.; SELMANOVIC, A.; SMAJLOVIC, L.; COBLE, M. D.; RIZVIC, A. (2007). Application of novel “mini-amplicon” STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. *Forensic Science International: Genetics*. v.1, p. 175–179.

PRINZ, M.; CARRACEDO, A.; MAYR, W. R.; MORLING, N.; PARSONS, T. J.; SAJANTILA, A.; SCHEITHAUER, R.; SCHMITTER, H.; SCHNEIDER, P. M.; INTERNATIONAL SOCIETY FOR FORENSIC GENETICS. (2007). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Science International: Genetics*, v 1, p. 3-12.

POWERPLEX® FUSION SYSTEM (PROMEGA CORPORATION). Manual técnico. Disponível em <<https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/101/powerplex%20fusion%20system%20protocol.pdf#tmd039.0616.indd%3a.36849%3a1457>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

SCHNEIDER, P. M.; BENDER, K.; MAYR, W. R.; PARSON, W.; HOSTE, B.; DECORTE, R.; CORDONNIER, J.; VANEK, D.; MORLING, N.; KARJALAINEN, M.; MARIE-PAULE CARLOTTI, C.; SABATIER, M.; HOHOFF, C.; SCHMITTER, H.; PFLUG, W.; WENZEL, R.; PATZELT, D.; LESSIG, R.; DOBROWOLSKI, P.; O'DONNELL, G.; GARAFANO, L.; DOBOSZ, M.; KNIJFF, P.; MEVAG, B.; PAWLOWSKI, R.; GUSMÃO, L.; VIDE, M. C.; ALONSO, A. A.; FERNANDEZ, O. G.; NICOLÁS, P. S.; KIHGREEN, A.; BÄR, W.; MEIER, V.; TEYSSIER, A.; COQUOZ, R.; BRANDT, C.; GERMANN, U.; GILL, P.; HALLETT, J.; GREENHALGH, M. (2004). STR analysis of artificially degraded DNA – results of a collaborative European exercise. *Forensic sci. Int.* v. 139, p. 123-134.

SENN, D. R.; STIMSON, P. G. *Forensic dentistry*. 2ed. New York: CRC press, 2010. p. 470.

SEO, Y.; UCHIYAMA, D.; KUROKI, K.; KISHIDA, T. (2012). STR and mitochondrial DNA SNP typing of a bone marrow transplant recipient after death in a fire. *Legal Medicine*, v 14, p. 331-335.

SEPP, R.; SZABÓ, I.; UDA, H.; SAKAMOTO, H. (1994). Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *Journal of Clinical Pathology*.v.47, n. 4, p. 318-323.

SHIBATA, D. (1994). Extraction of DNA from paraffin-embedded tissue for analysis by polymerase chain reaction: new tricks for an old friend. *Human Pathology*, v. 25, n. 6 (Jun), p. 561-563.

SILVA, C. A. L.; QUEIROZ, P. R. (2011). Importância dos marcadores microssatélites como prova forense de DNA na investigação de vínculo genético. In: *Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás*, 6, 2011, Goiás. Disponível em: <<http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CHARLLEY%20ANCHIETA%20LOUREN%C3%87O%20SILVA%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

SOLLÉRO, B. P.; FARIA, D. A.; PAIVA, S. R.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; PAIXÃO, D. M. (2004). Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: *Congresso Brasileiro de Zootecnia- ZOOTEC*. Brasília, Maio, p. 1-4.

SOUZA, J. C.; QUEIROZ, P. R. (2010). Aplicações dos marcadores moleculares baseados em DNA nas questões de identificação humana no âmbito cível e forense. *Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás*, v.1, p. 26. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br/ArquivosUpload/1/File/V%20MOSTRA%20DE%20PRODUO%20CIENTIFICA/SAUDE/60.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2015.

STEFFENS, D. L.; ROY, R. (1998). Sequence analysis of mitochondrial DNA hypervariable regions using infrared fluorescence detection; *Biotechniques*, v. 24, p. 1044-1046.

TAMAKI, K.; JEFFREYS, A. J. (2005). Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Legal Medicine*, v.7, p. 244-250.

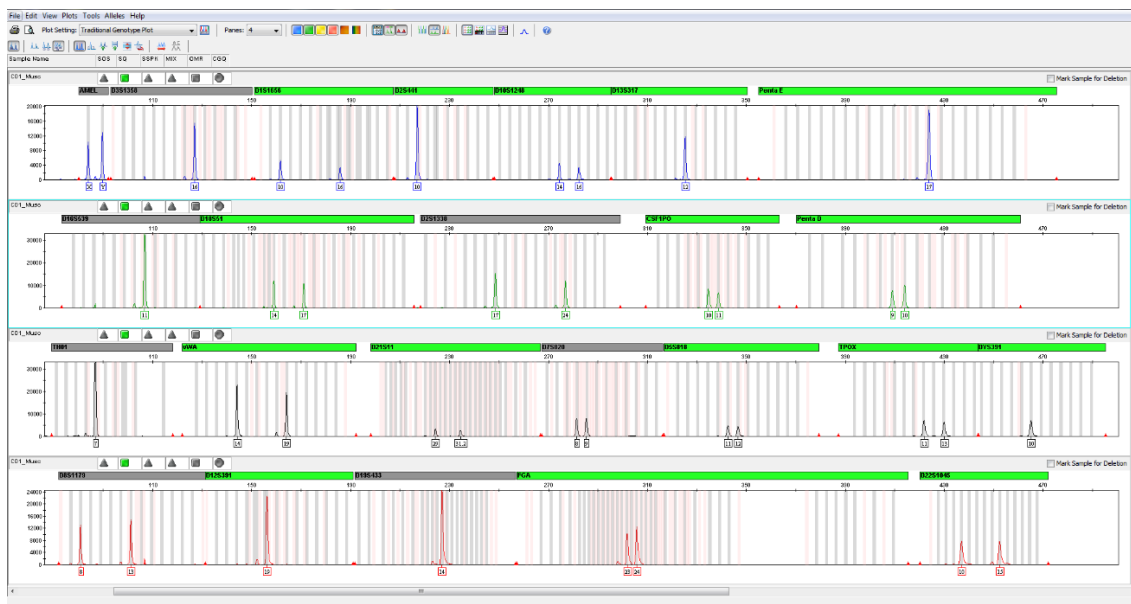
THOMPSON, R.; ZOPPIS, S.; MCCORD, B. (2012). An overview of DNA typing methods for human identification: past, present, and future. *Methods in molecular biology*, v. 830, p. 3-16.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. (2013). Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*, v. 54, n. 3 (Mar), p. 134-139.

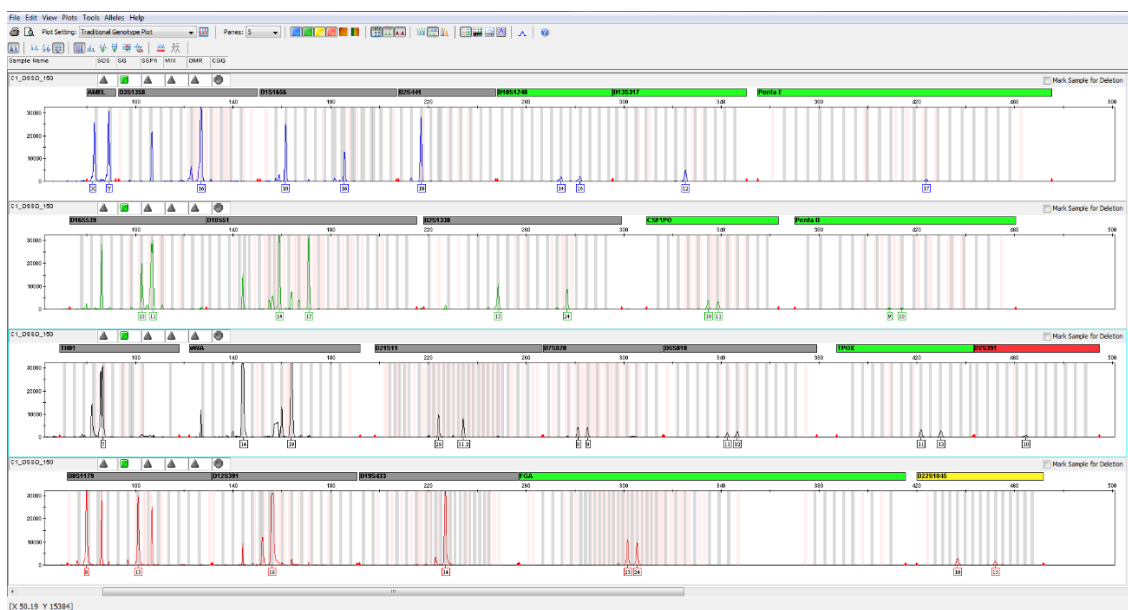
WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. *Molecular Biology of the Gene*. 5<sup>a</sup> ed. San Francisco, CA: Pearson Education, 2005. 732 p.

ZIĘTKIEWICZ, E. WITT, M.; DACA, P.; ZEBRACKA-GALA, J.; GONIEWICZ, M.; JARZĄB, B.; WITT, M. (2012). Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *Journal of Applied Genetics*, v 53, p. 41-60.

## APÊNDICES

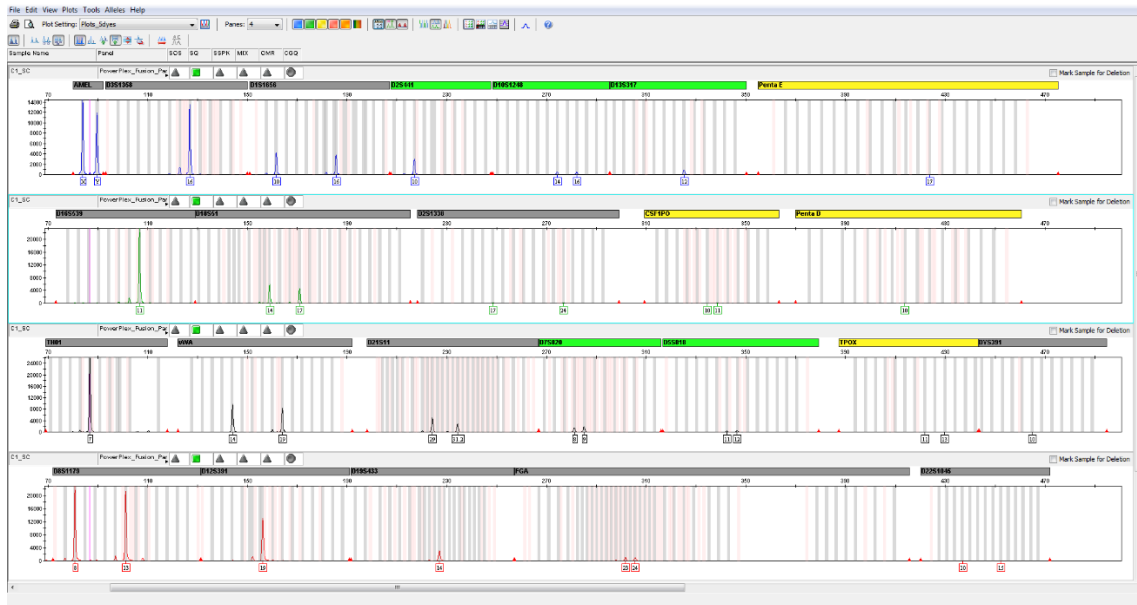


Apêndice 1: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver carbonizado #1, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

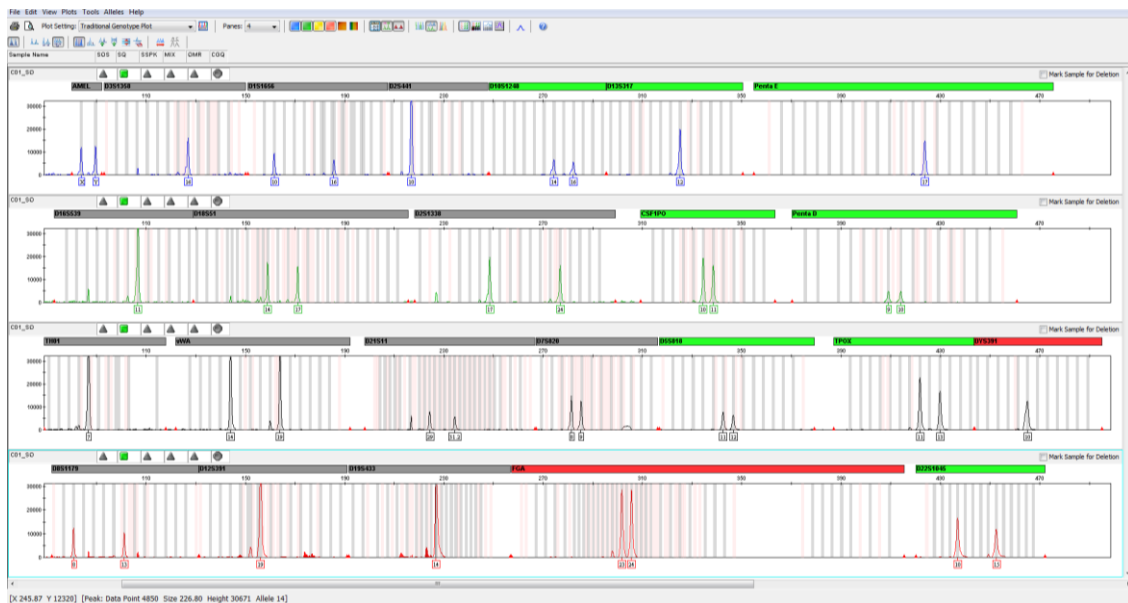


Apêndice 2: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver carbonizado #1, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

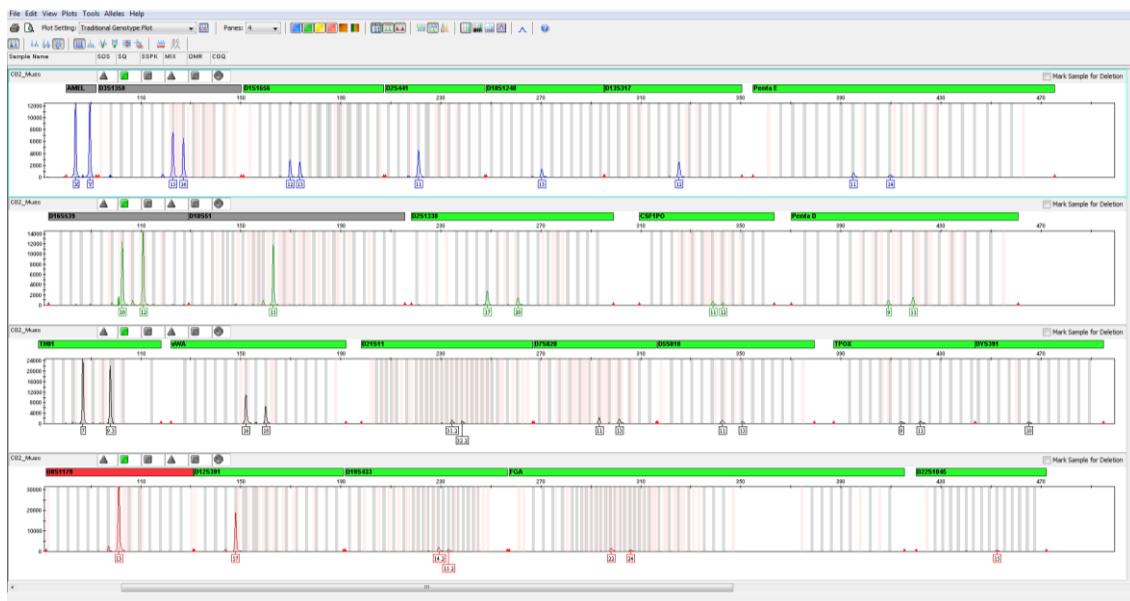




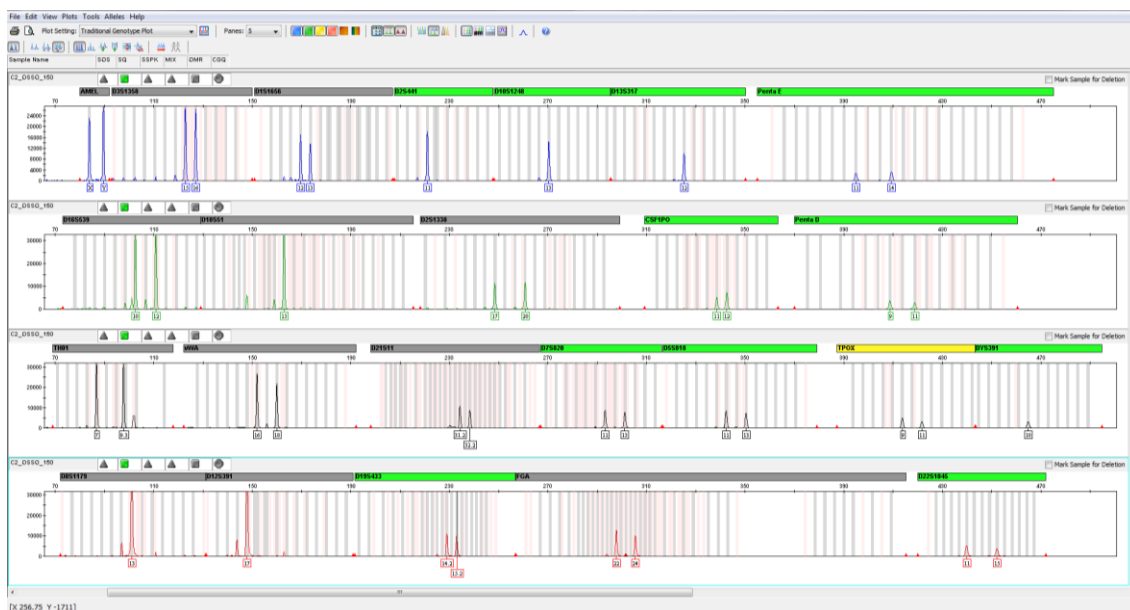
Apêndice 3: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver carbonizado #1, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



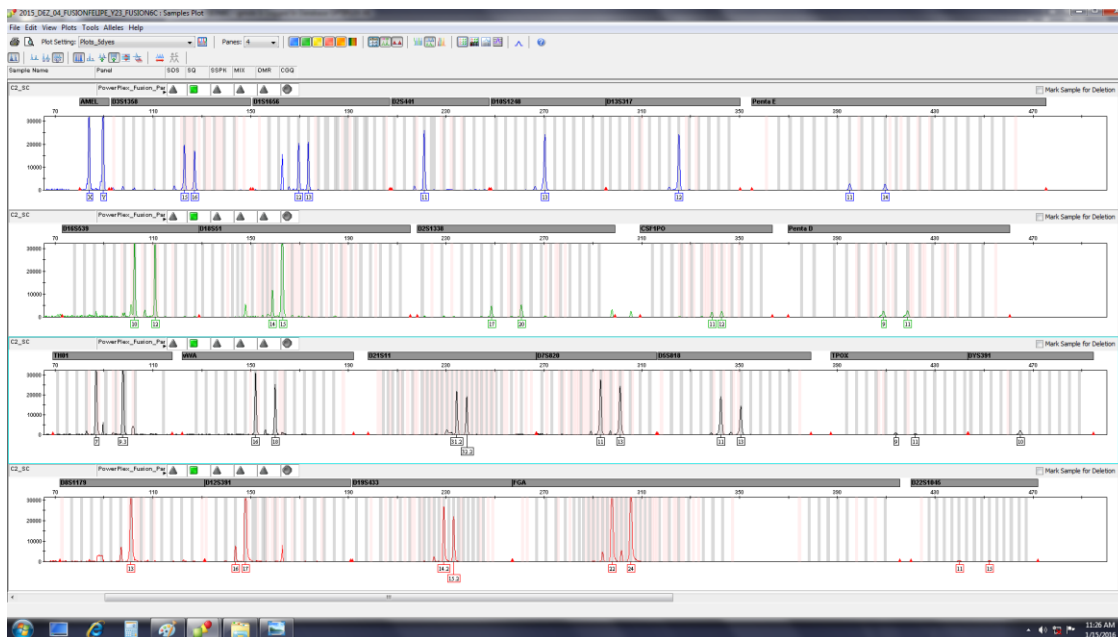
Apêndice 4: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver carbonizado #1, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



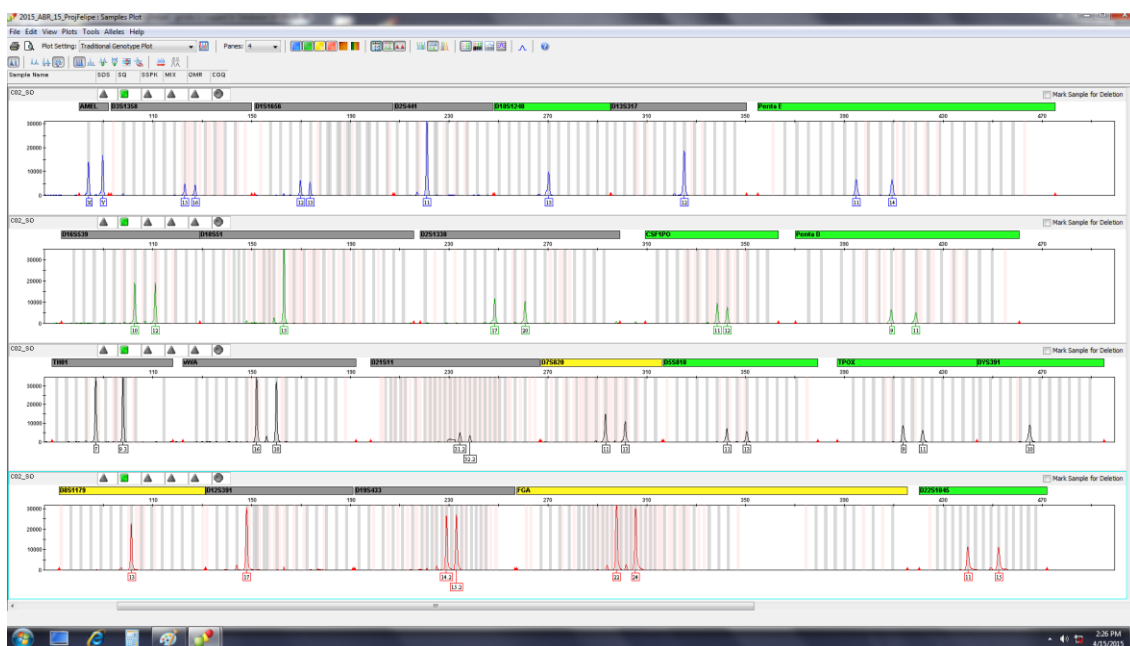
Apêndice 5: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver carbonizado #2, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



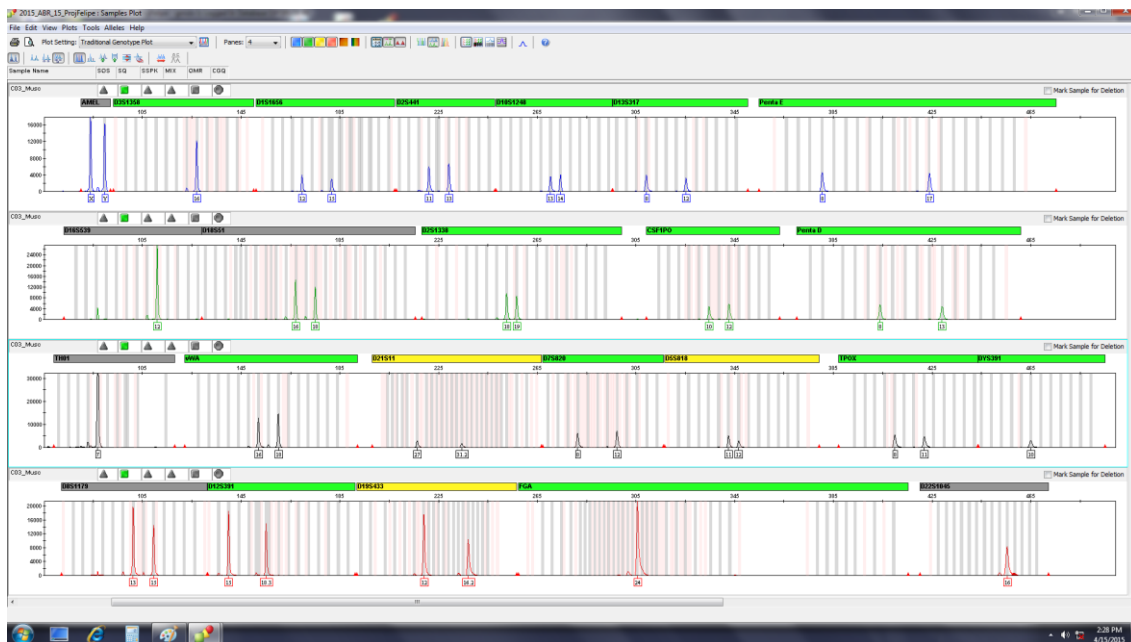
Apêndice 6: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver carbonizado #2, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



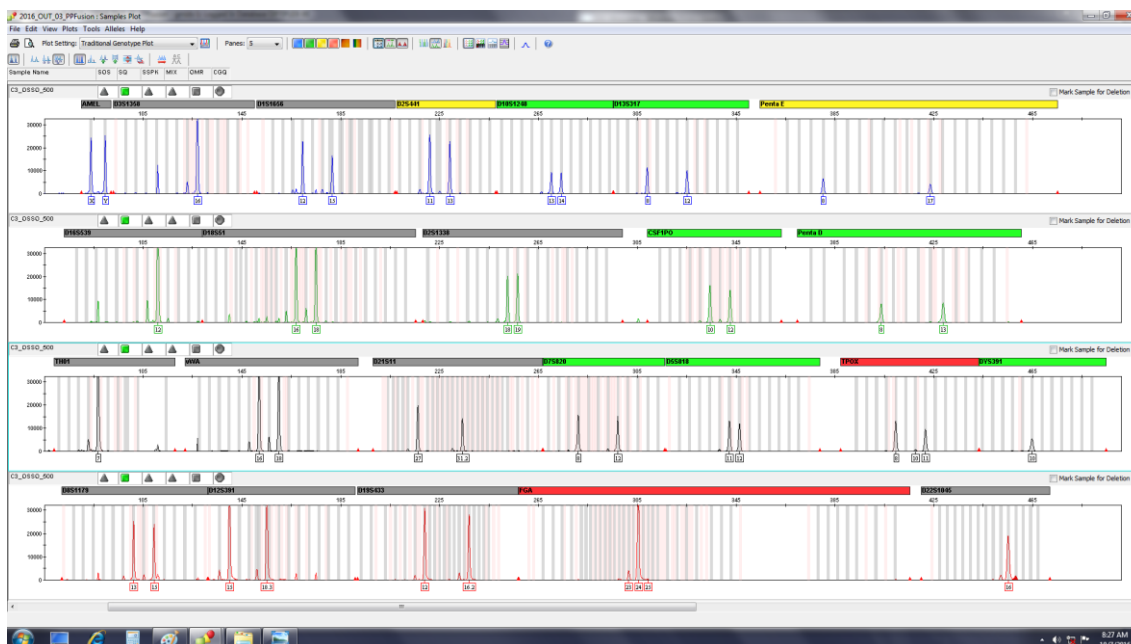
Apêndice 7: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver carbonizado #2, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



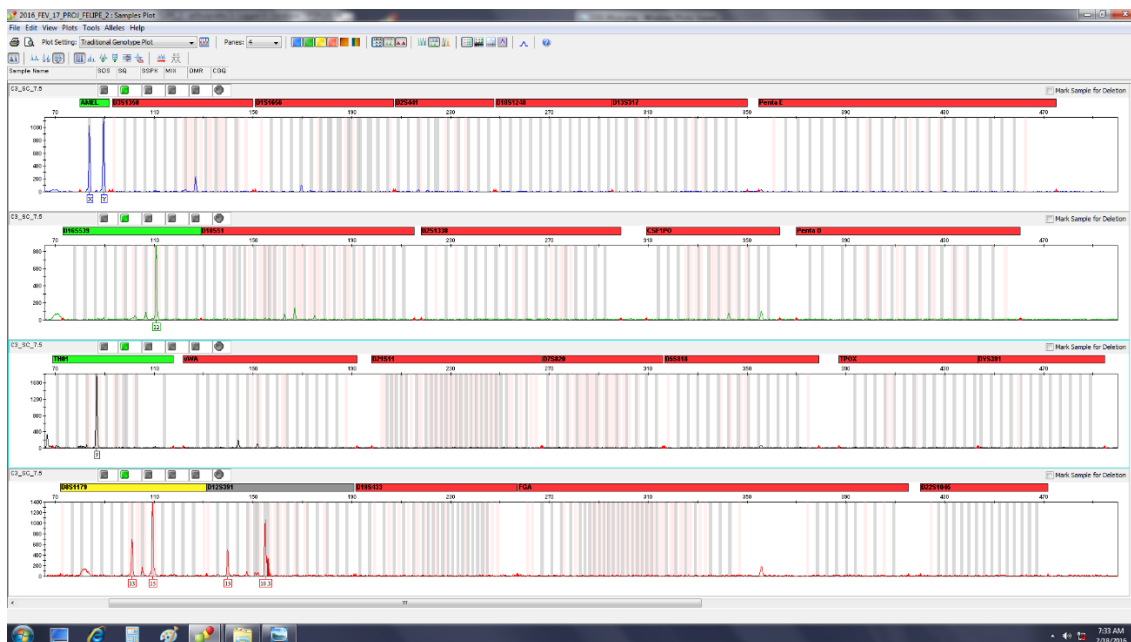
Apêndice 8: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver carbonizado #2, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



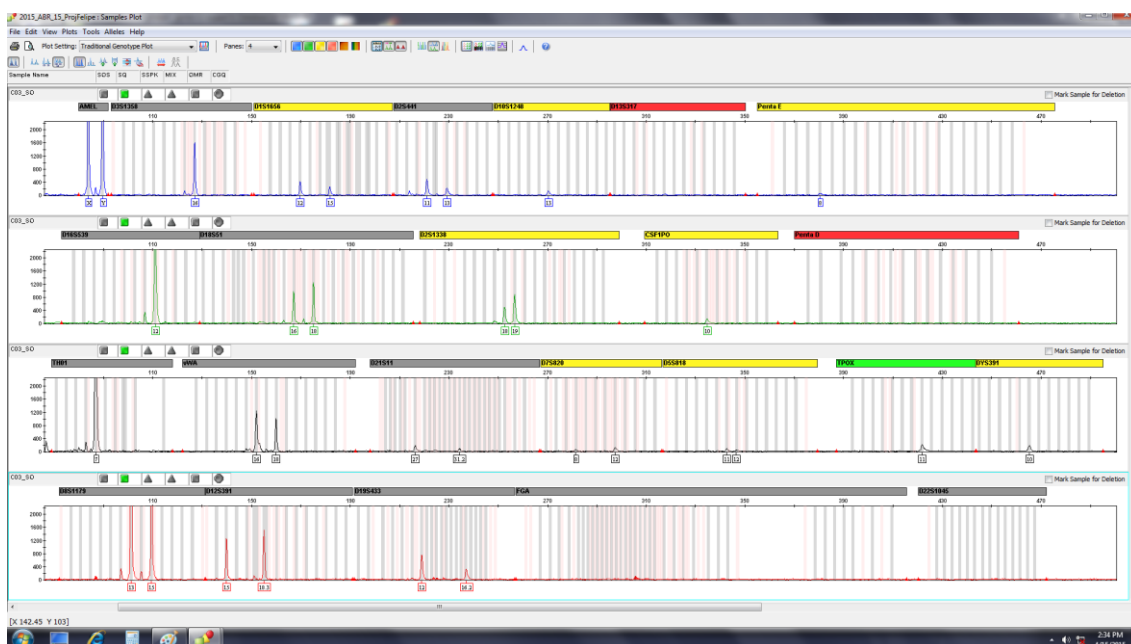
Apêndice 9: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver carbonizado #3, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



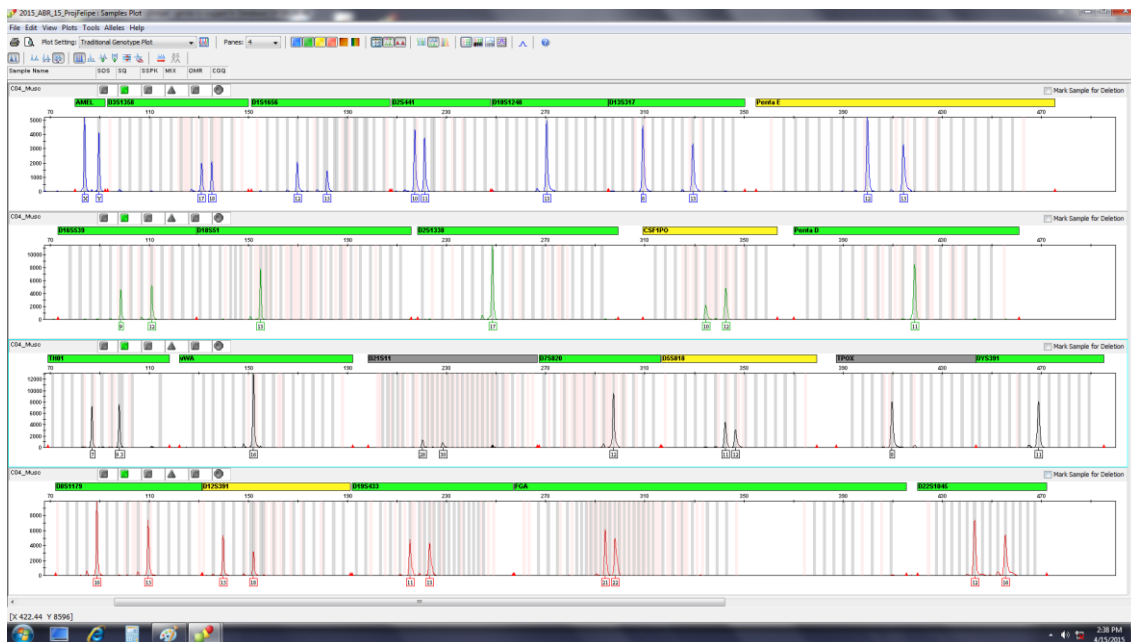
Apêndice 10: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver carbonizado #3, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



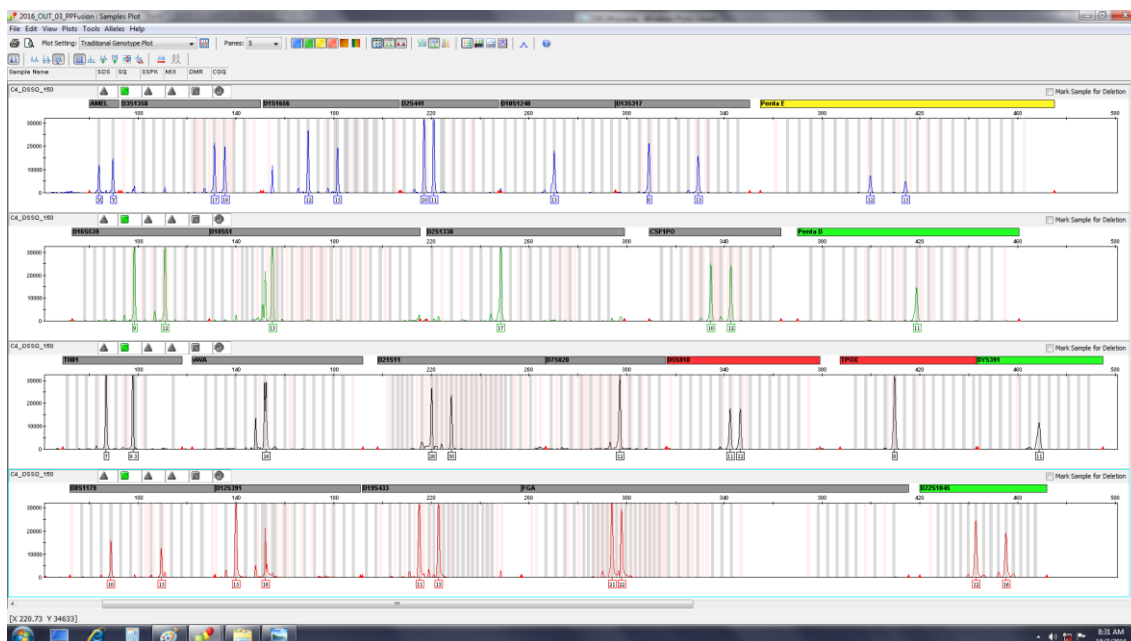
Apêndice 11: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver carbonizado #3, apresentando perfil genético insuficiente para análise com picos em 4 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



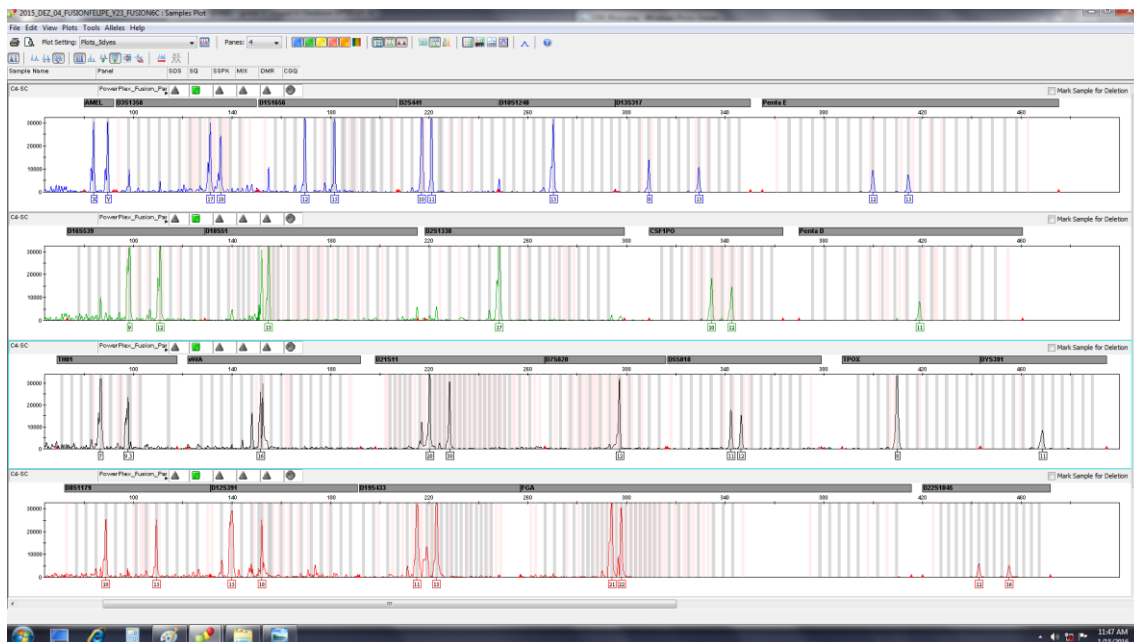
Apêndice 12: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver carbonizado #3, apresentando perfil genético parcial com picos em 19 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



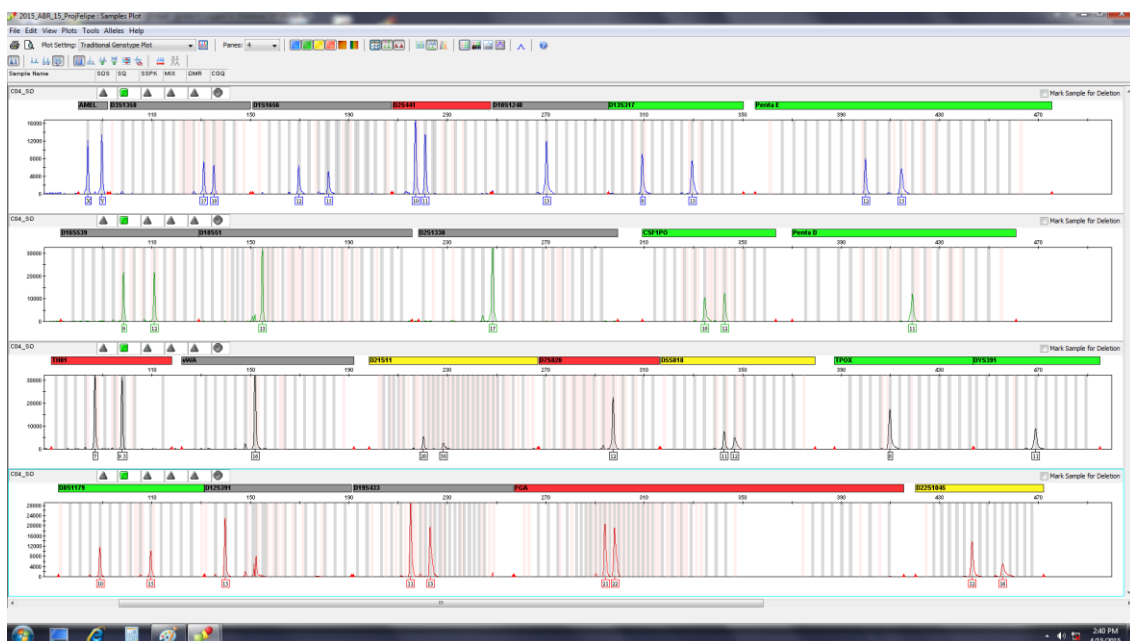
Apêndice 13: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver carbonizado #4, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



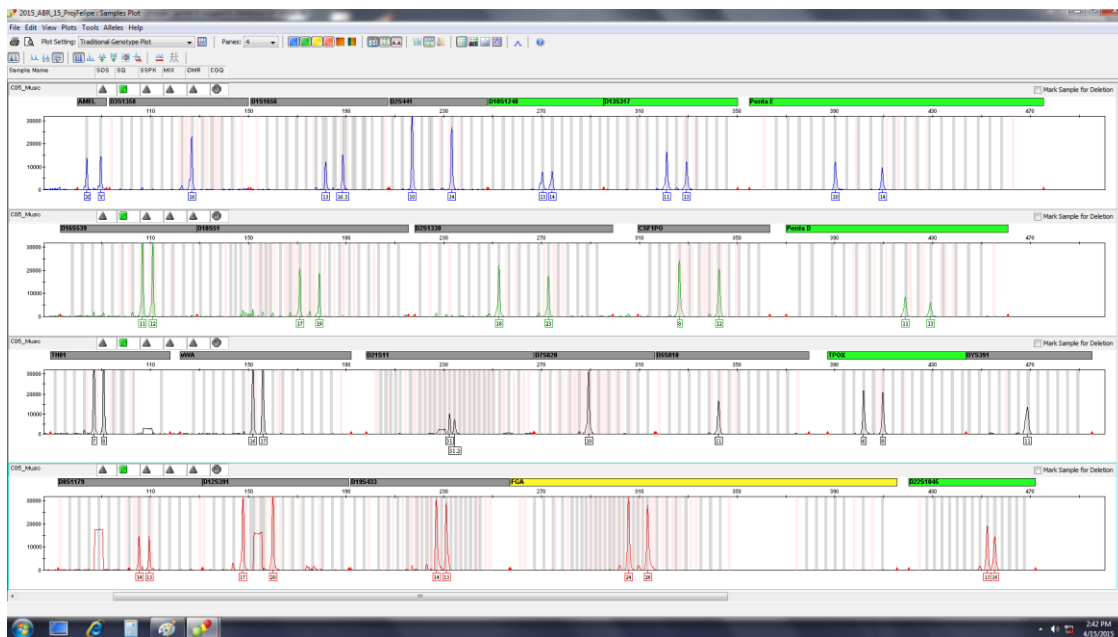
Apêndice 14: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver carbonizado #4, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



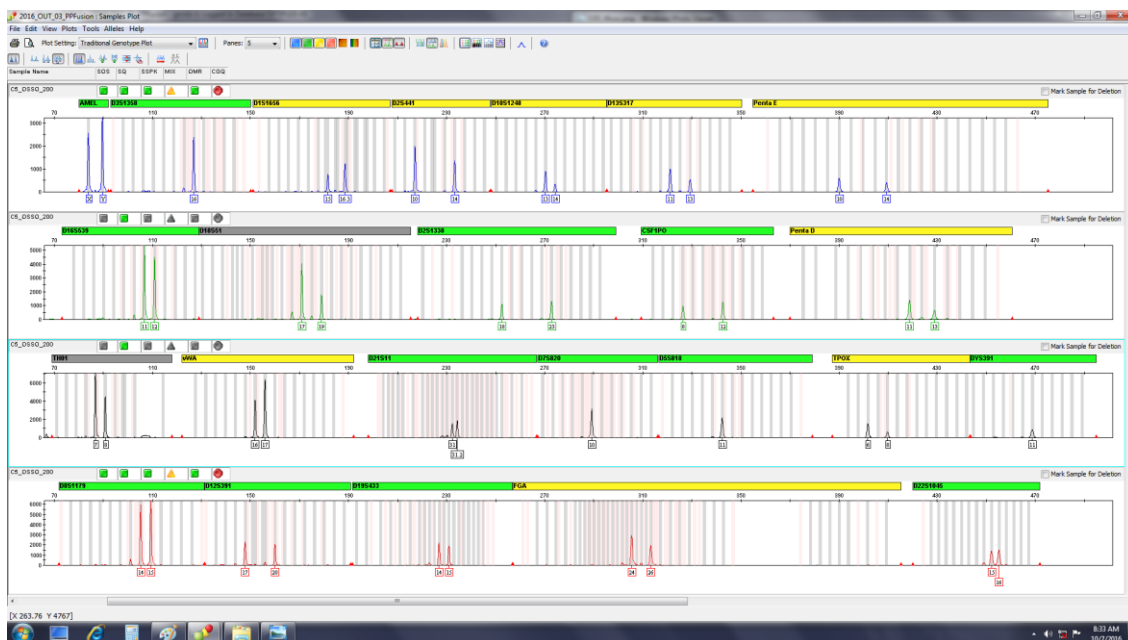
Apêndice 15: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver carbonizado #4, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 16: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver carbonizado #4, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

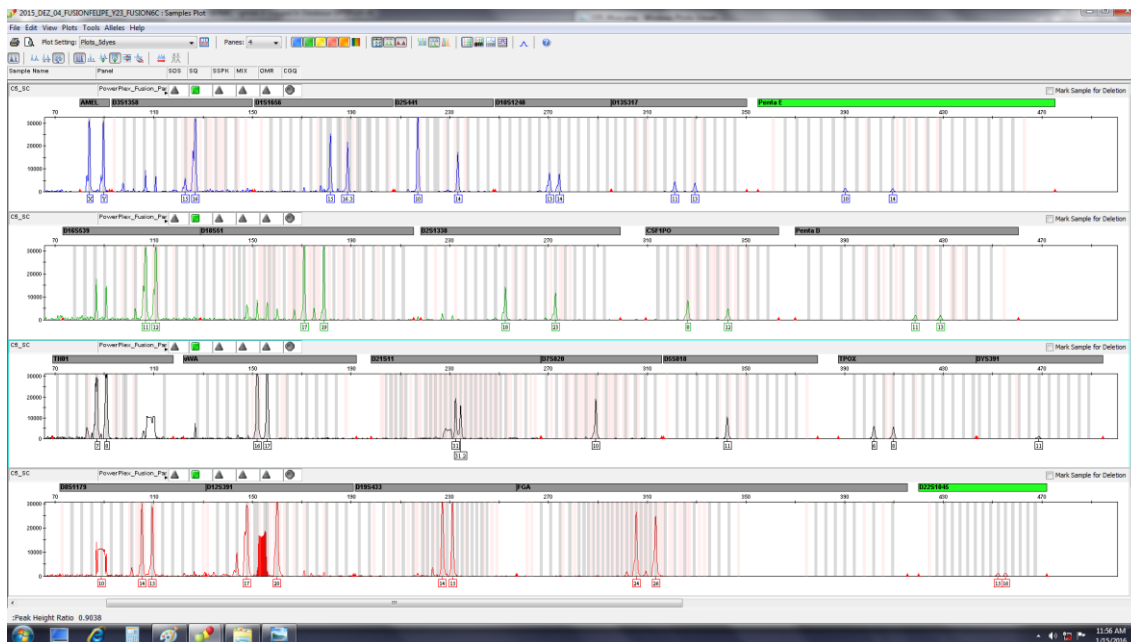


Apêndice 17: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver carbonizado #5, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

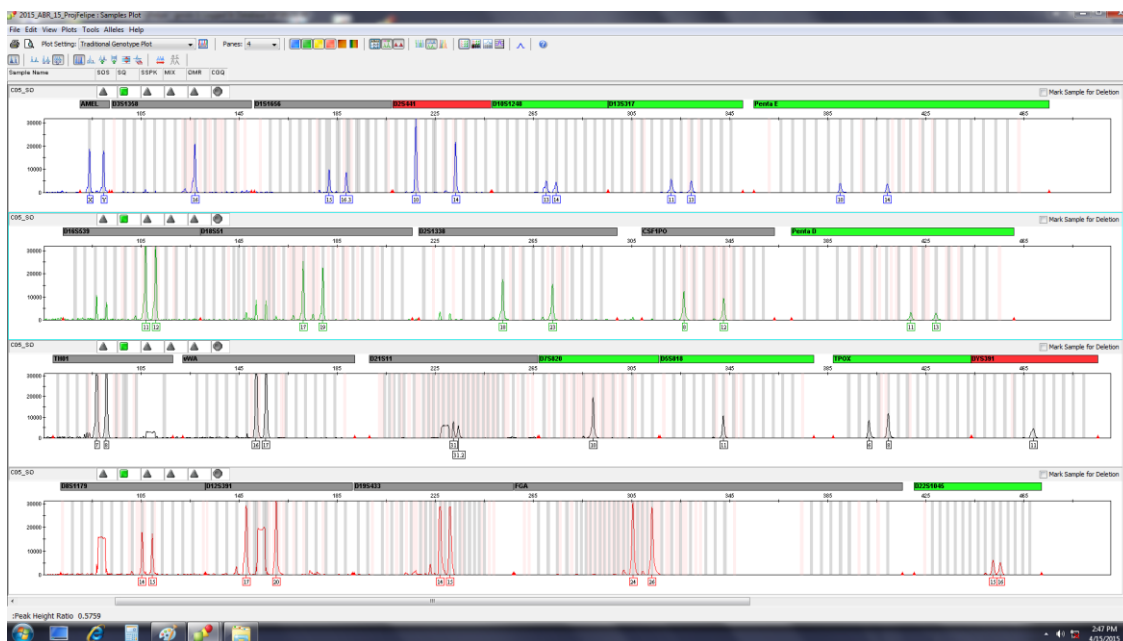


Apêndice 18: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver carbonizado #5, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

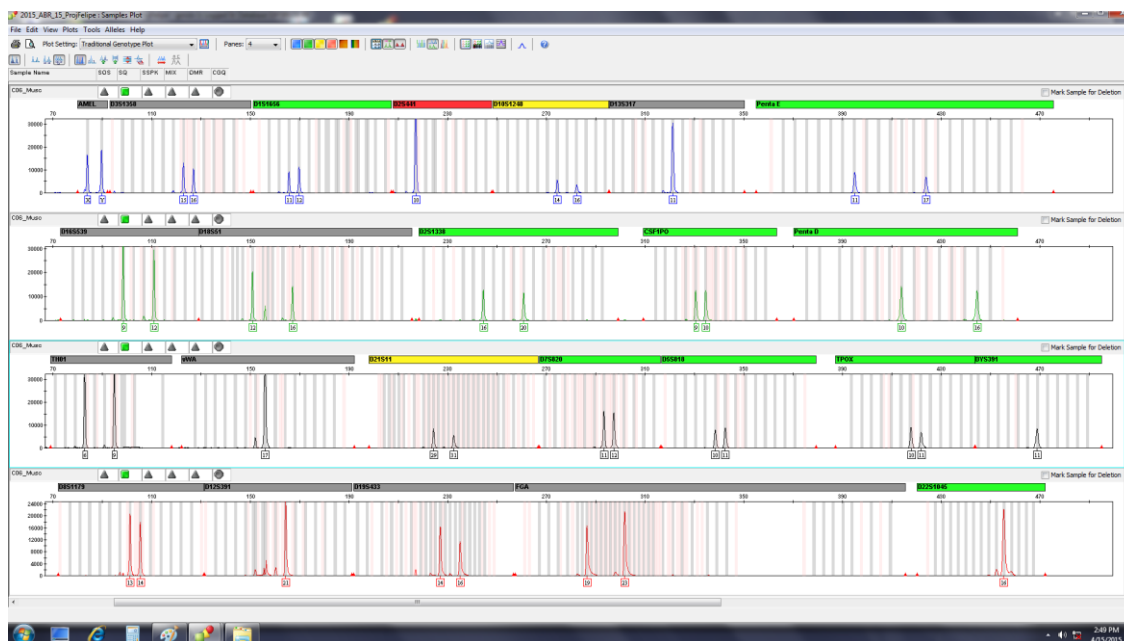




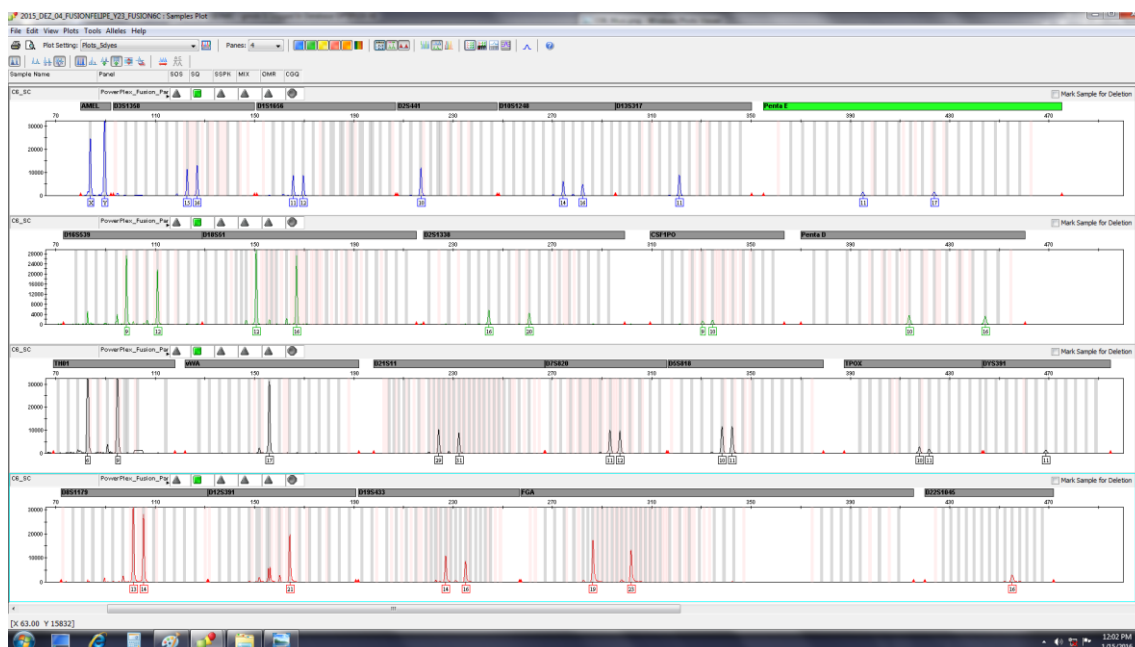
Apêndice 19: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver carbonizado #5, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



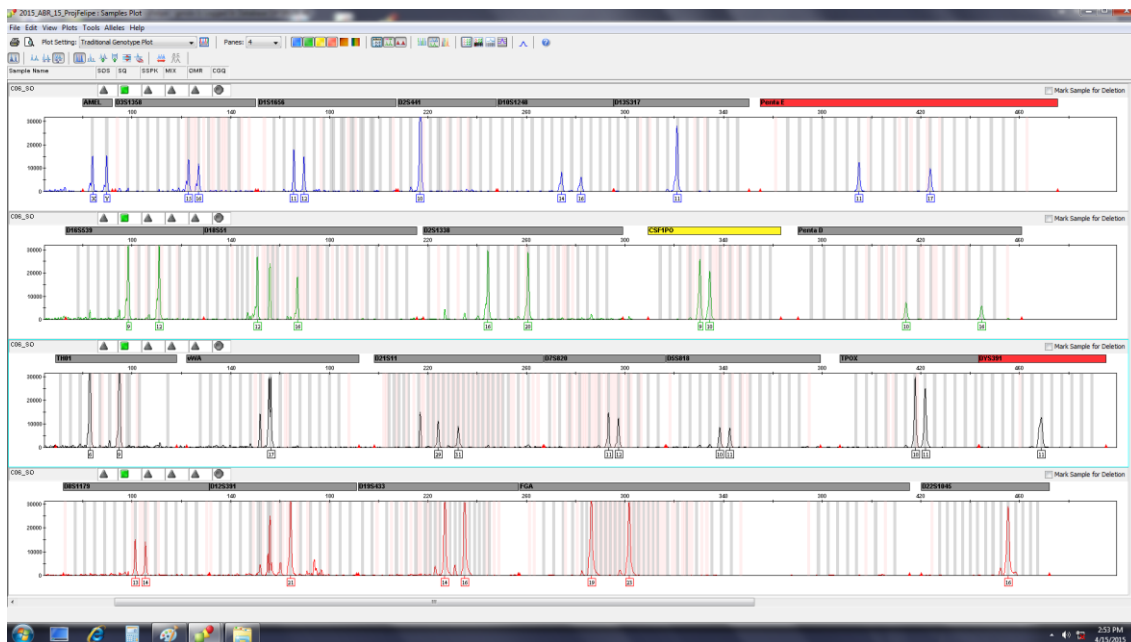
Apêndice 20: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver carbonizado #5, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



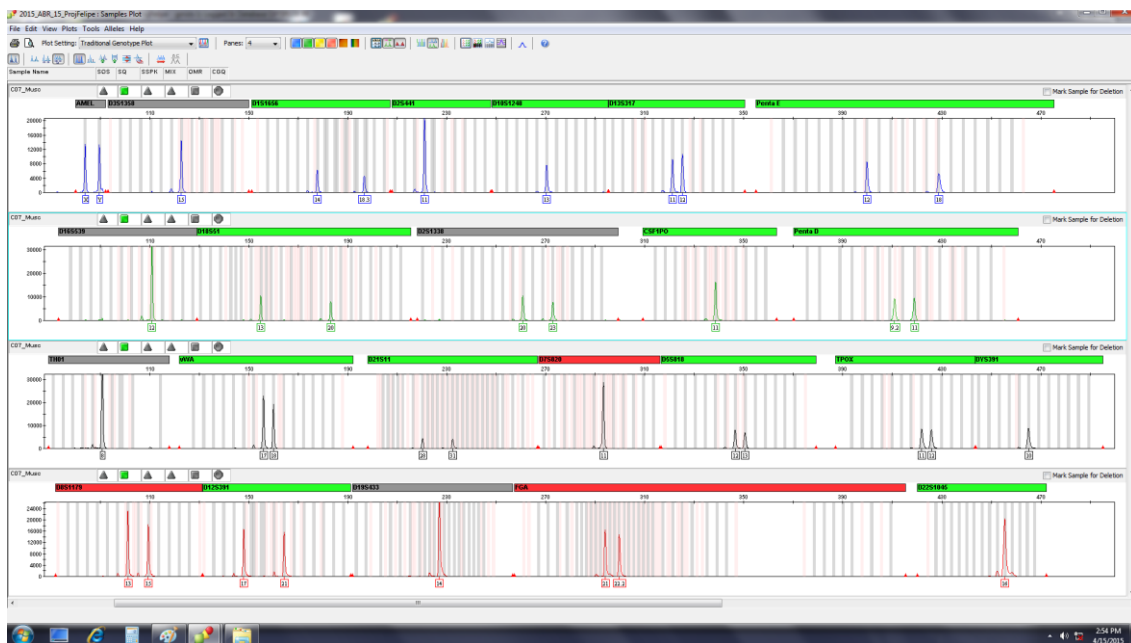
Apêndice 21: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver carbonizado #6, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



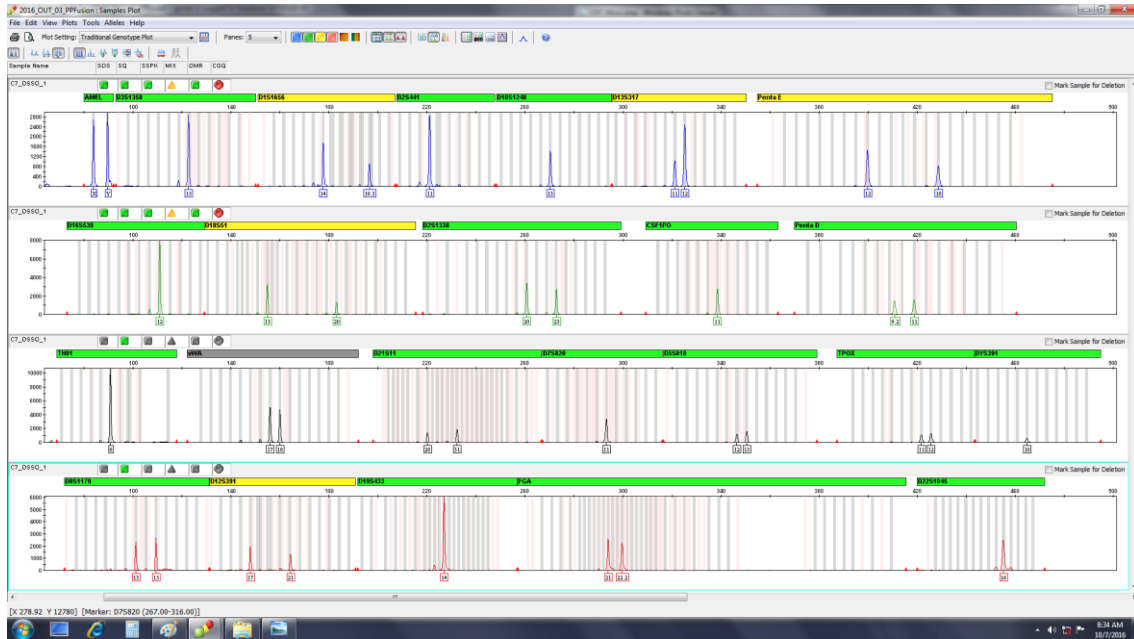
Apêndice 22: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver carbonizado #6, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



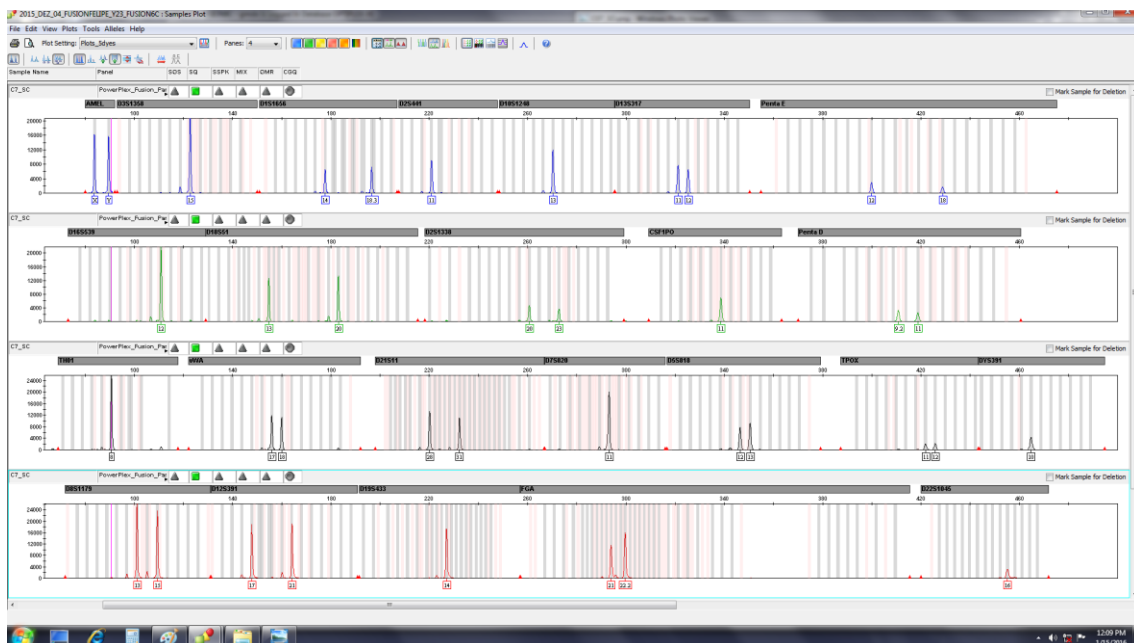
Apêndice 23: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver carbonizado #6, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



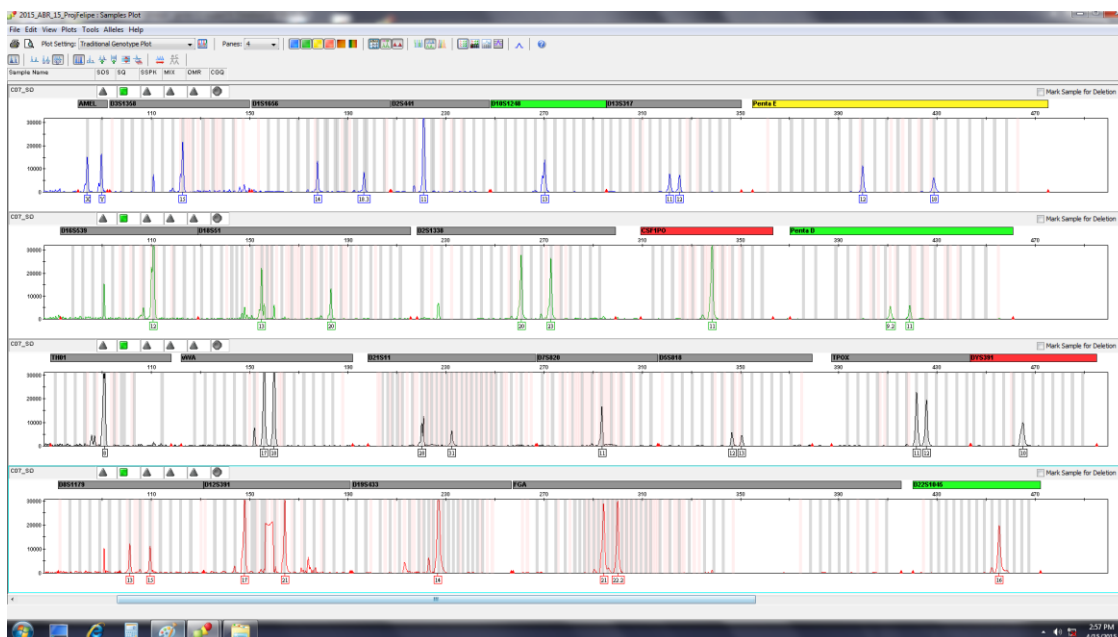
Apêndice 24: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver carbonizado #7, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



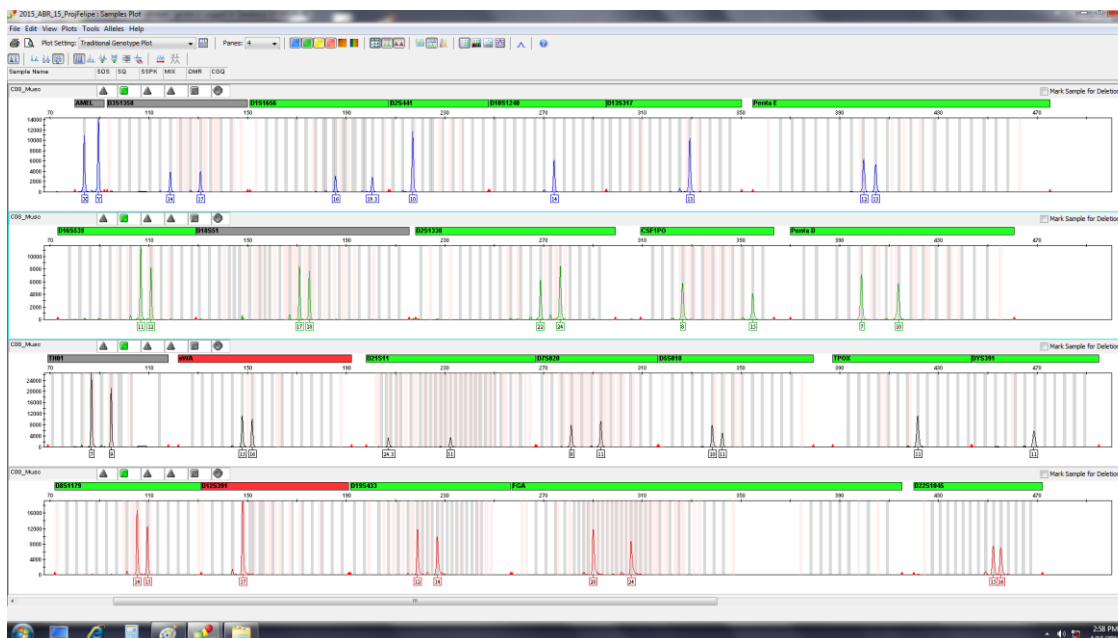
Apêndice 25: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver carbonizado #7, apresentando perfil genético completo com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 26: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver carbonizado #7, apresentando perfil genético completo com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



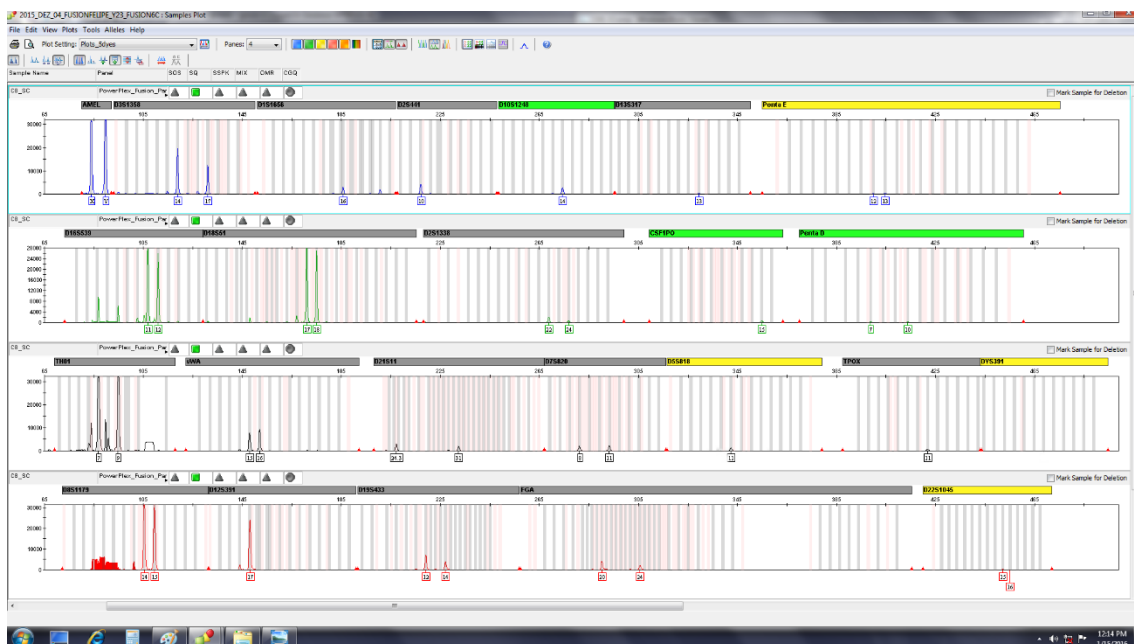
Apêndice 27: Eletroferograma da amostra de swab extraído com PCI do cadáver carbonizado #7, apresentando perfil genético completo com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



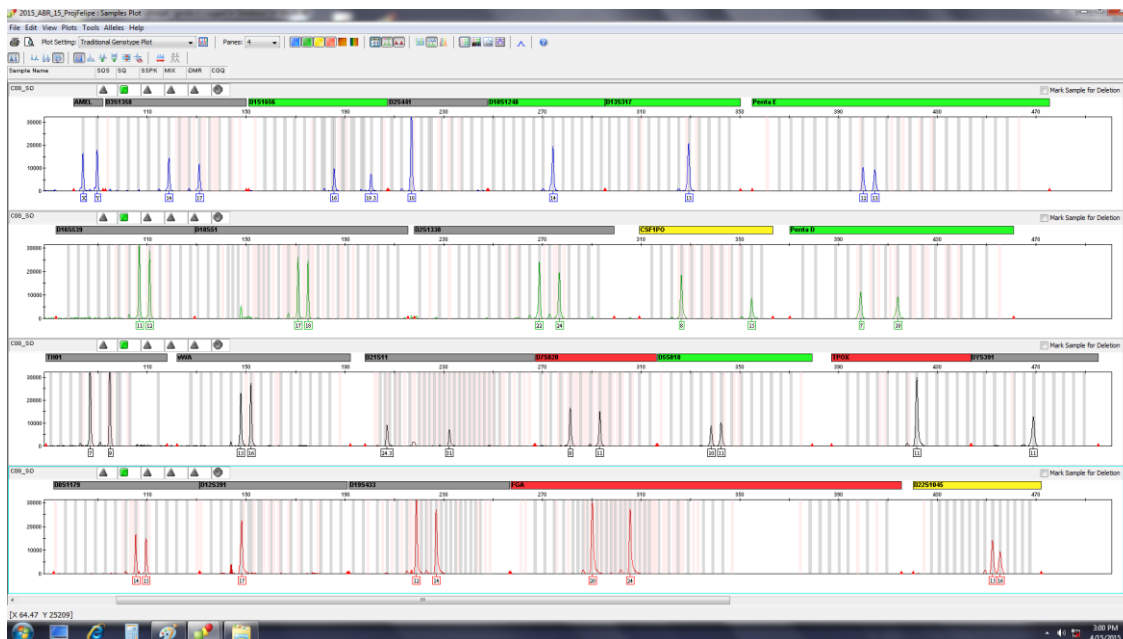
Apêndice 28: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver carbonizado #8, apresentando perfil genético completo com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



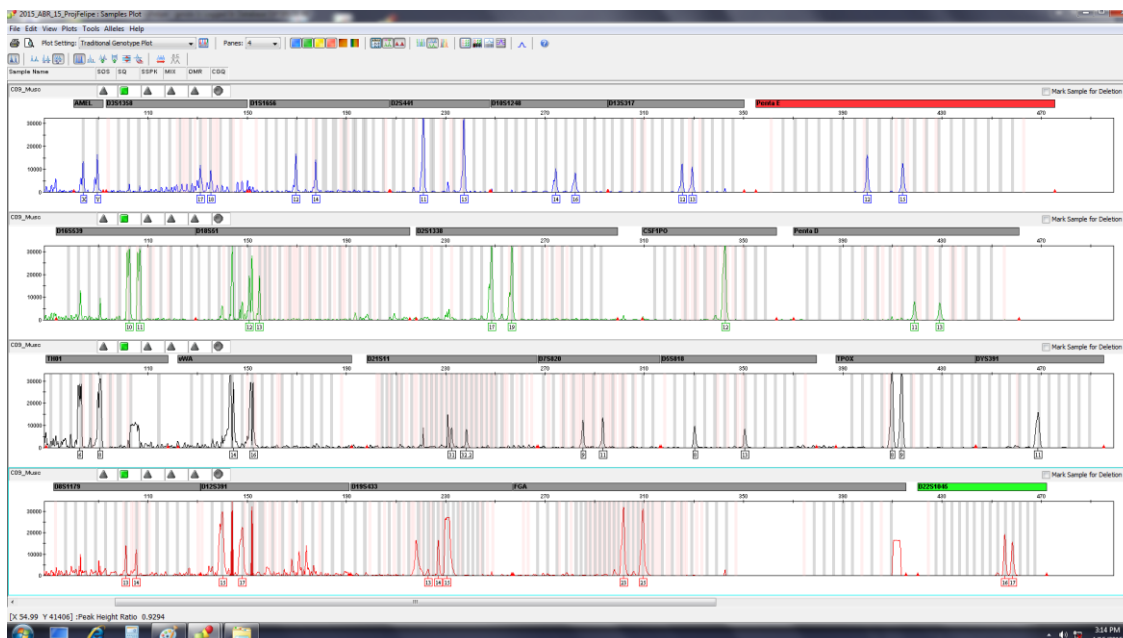
Apêndice 29: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver carbonizado #8, apresentando perfil genético completo com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



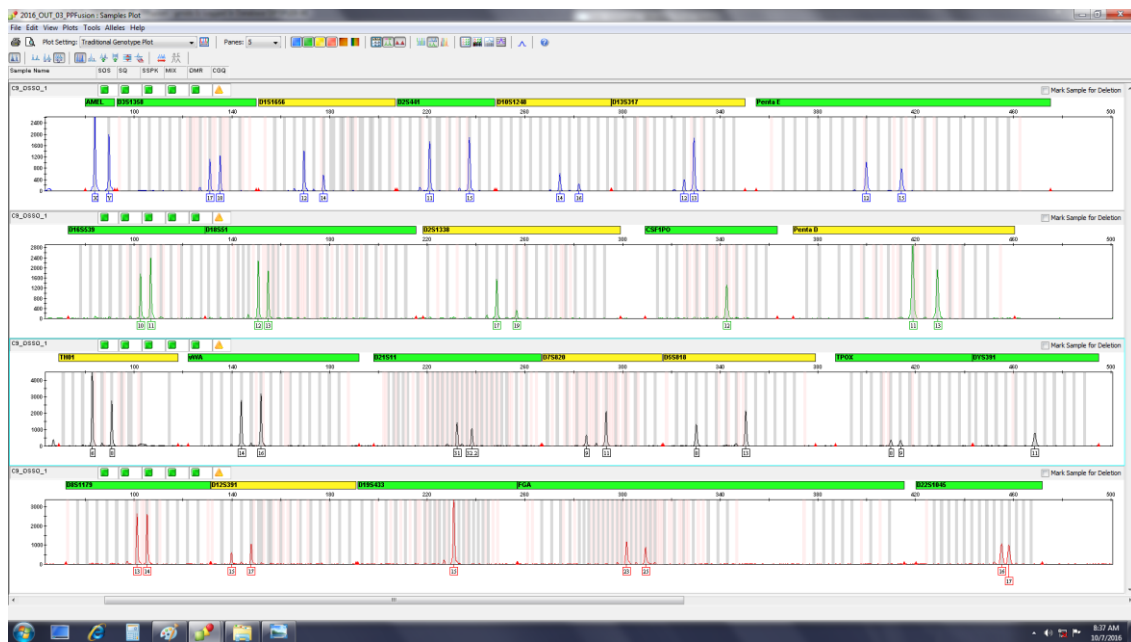
Apêndice 30: Eletroferograma da amostra de swab extraído com Chelex® do cadáver carbonizado #8, apresentando perfil genético parcial com picos em 22 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



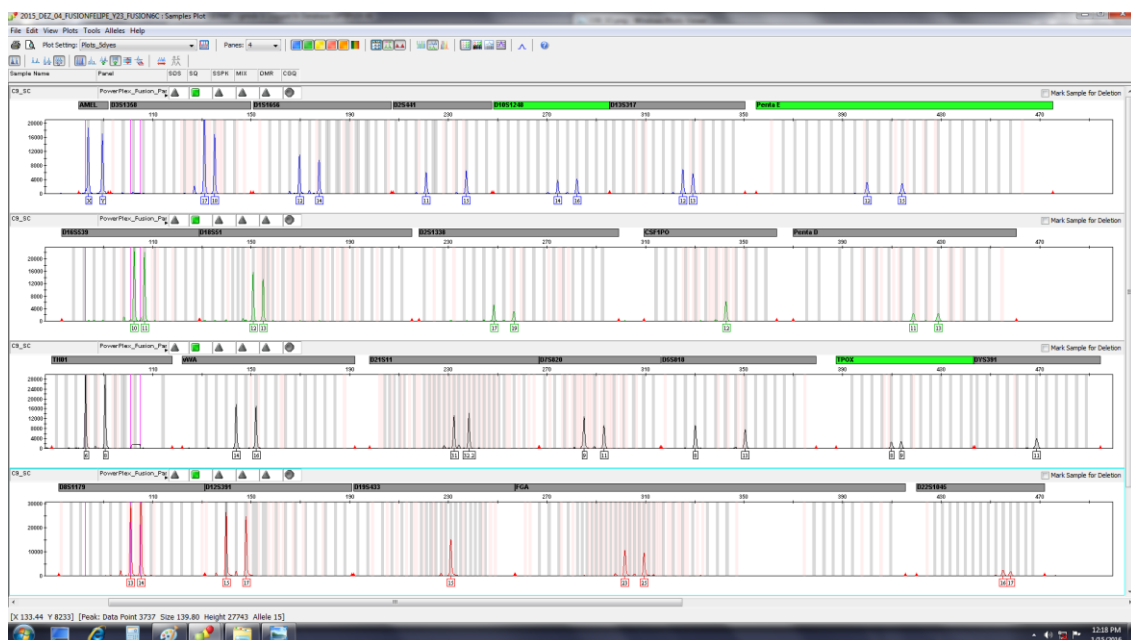
Apêndice 31: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver carbonizado #8, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 32: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver carbonizado #9, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

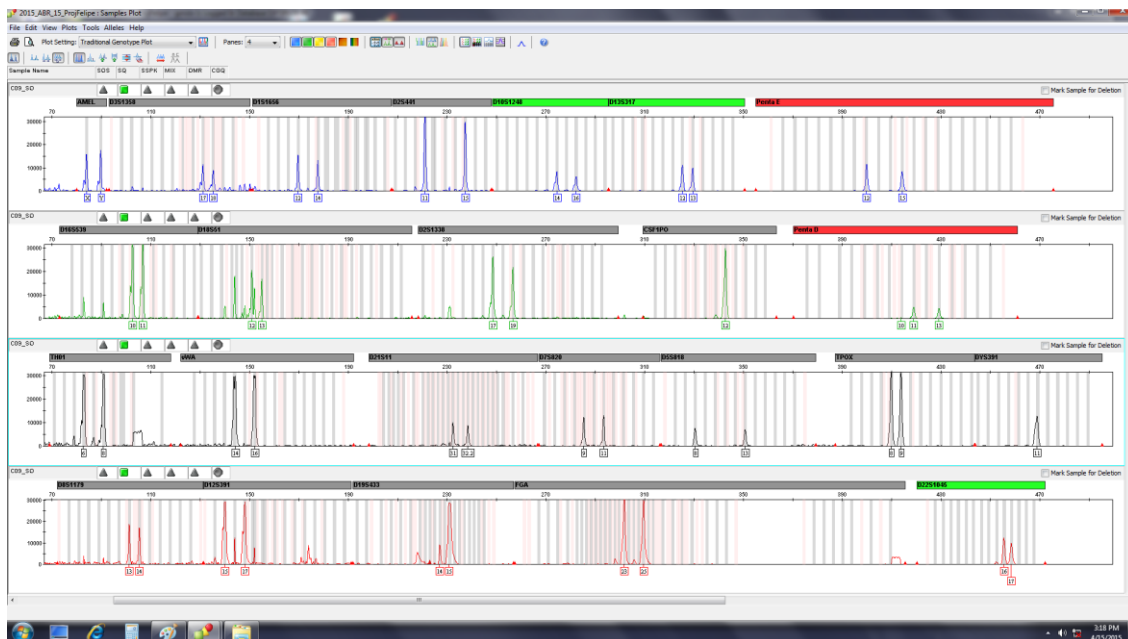


Apêndice 33: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver carbonizado #9, apresentando perfil genético completo com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

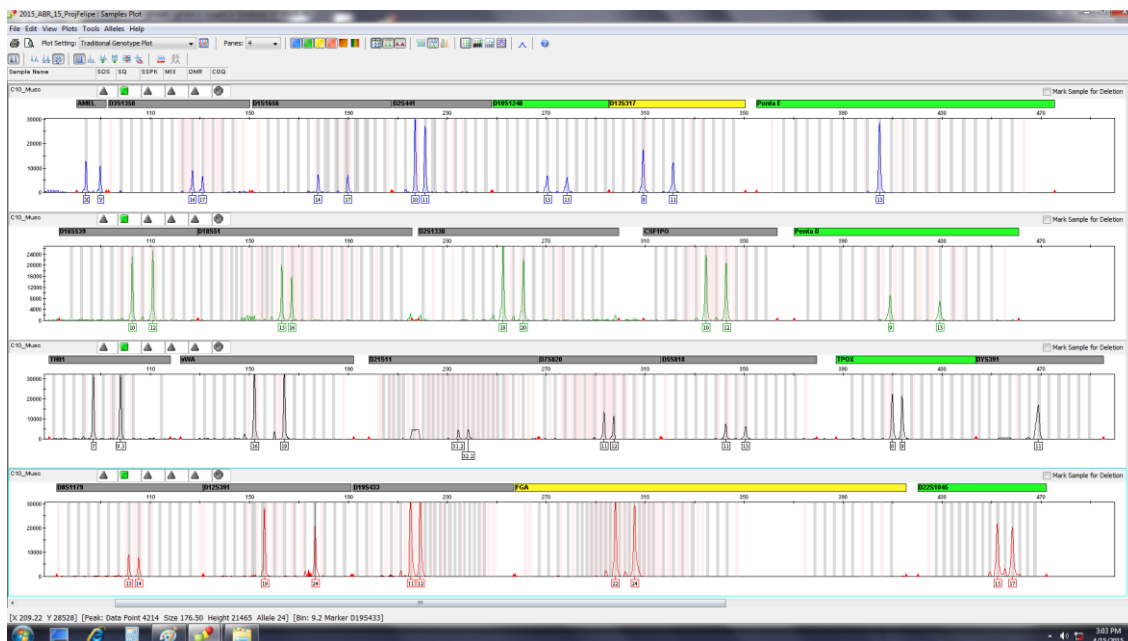


Apêndice 34: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver carbonizado #9, apresentando perfil genético completo com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

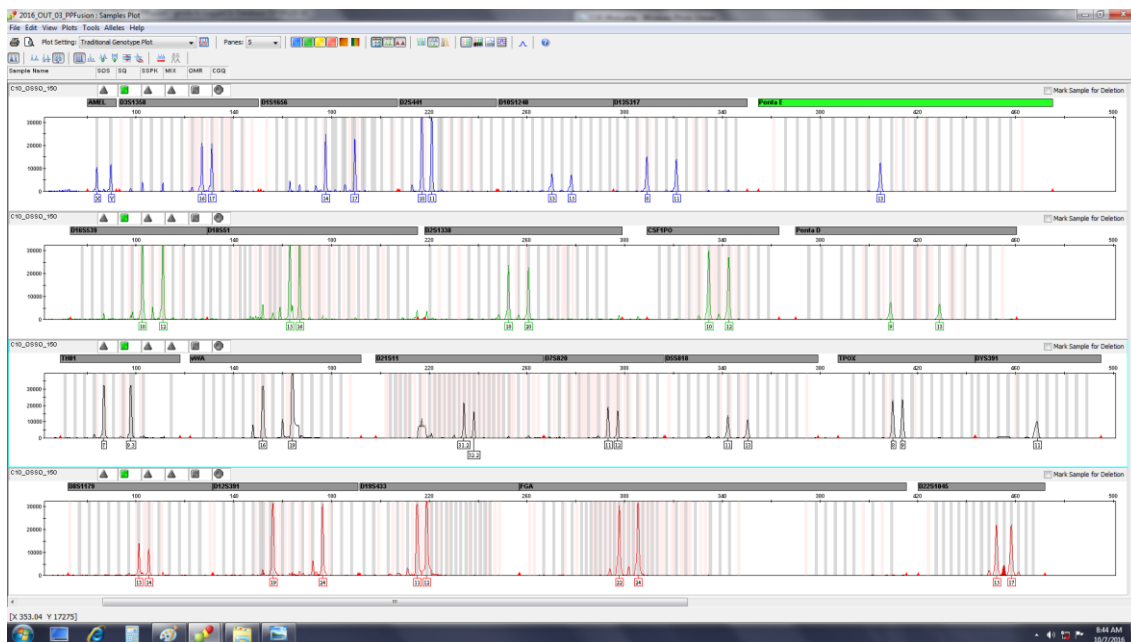




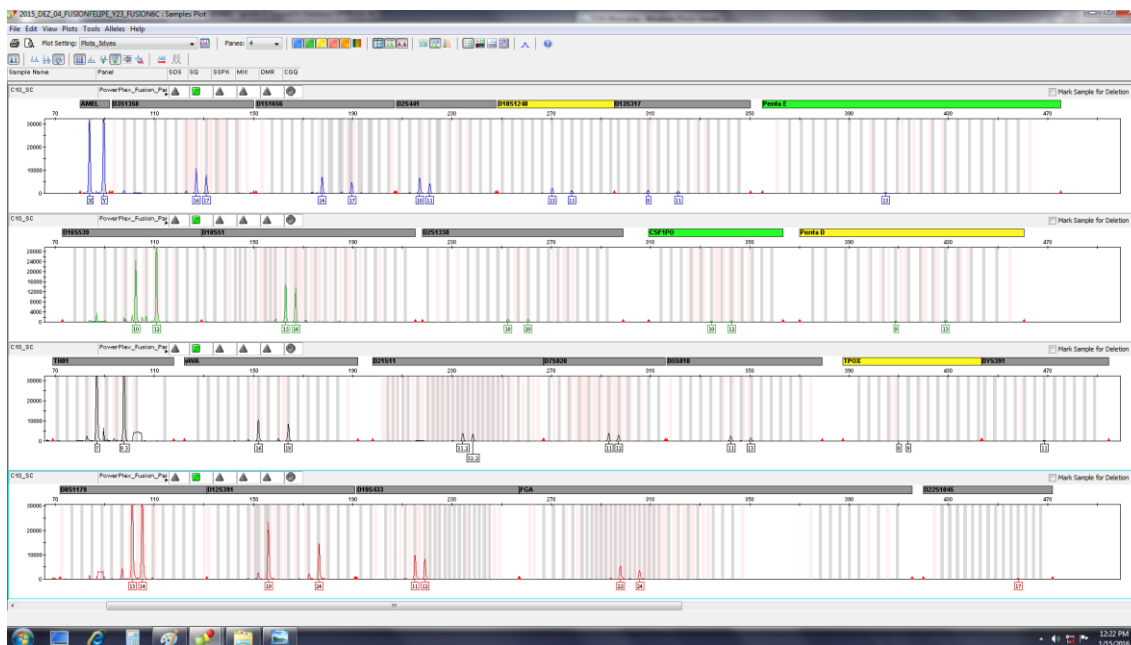
Apêndice 35: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver carbonizado #9, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



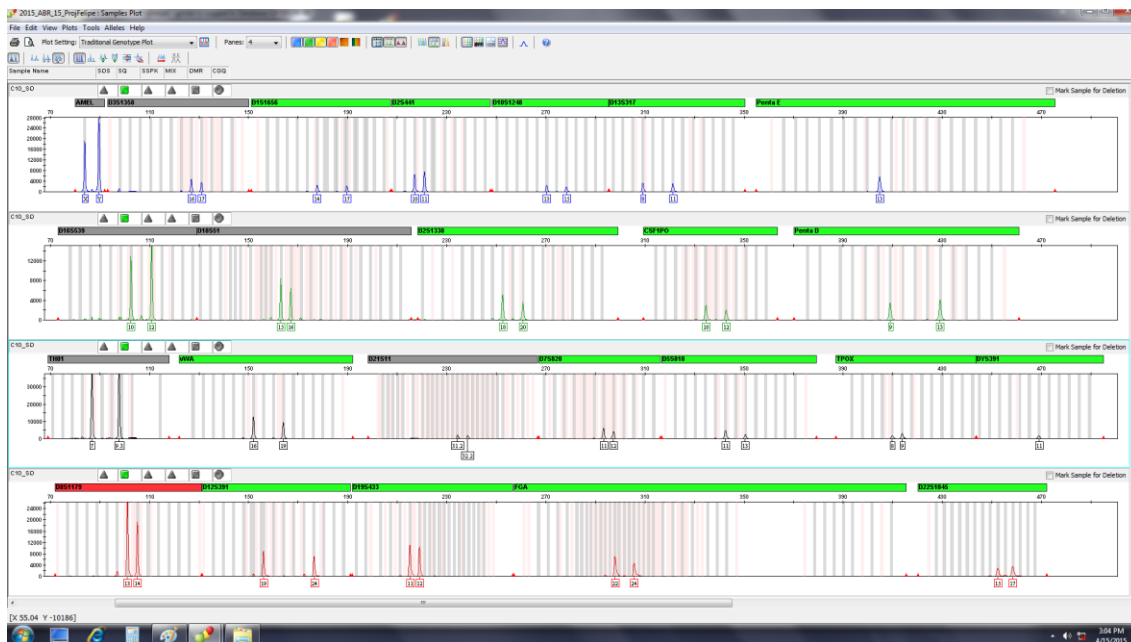
Apêndice 36: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver carbonizado #10, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



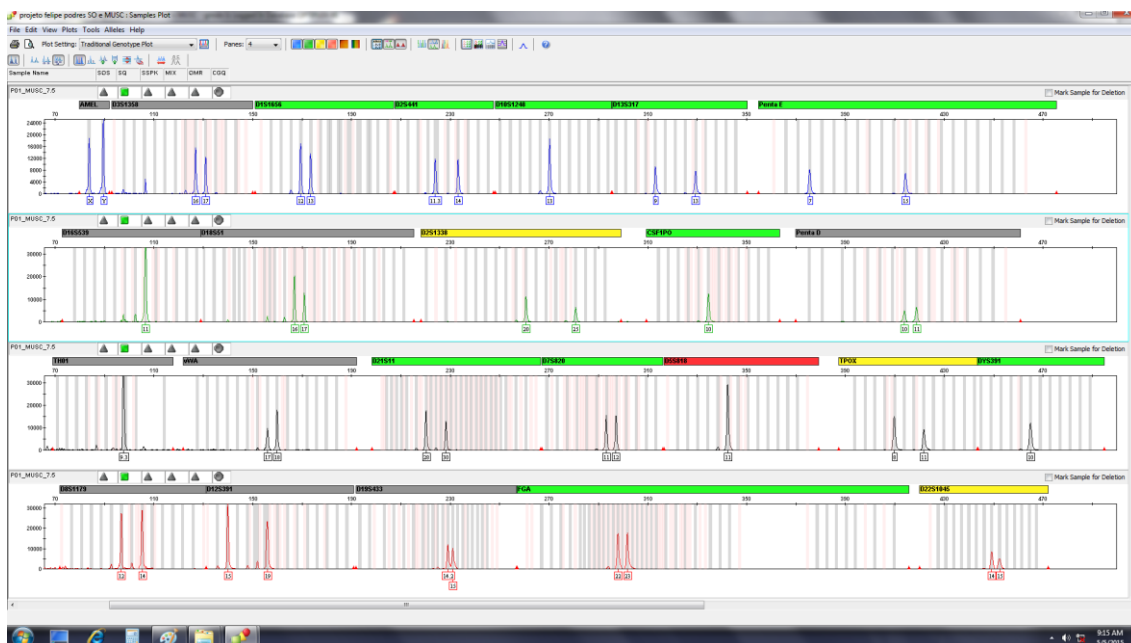
Apêndice 37: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver carbonizado #10, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 38: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver carbonizado #10, apresentando perfil genético parcial com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. *Locus* D22S1045 apresentando *drop-out*. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



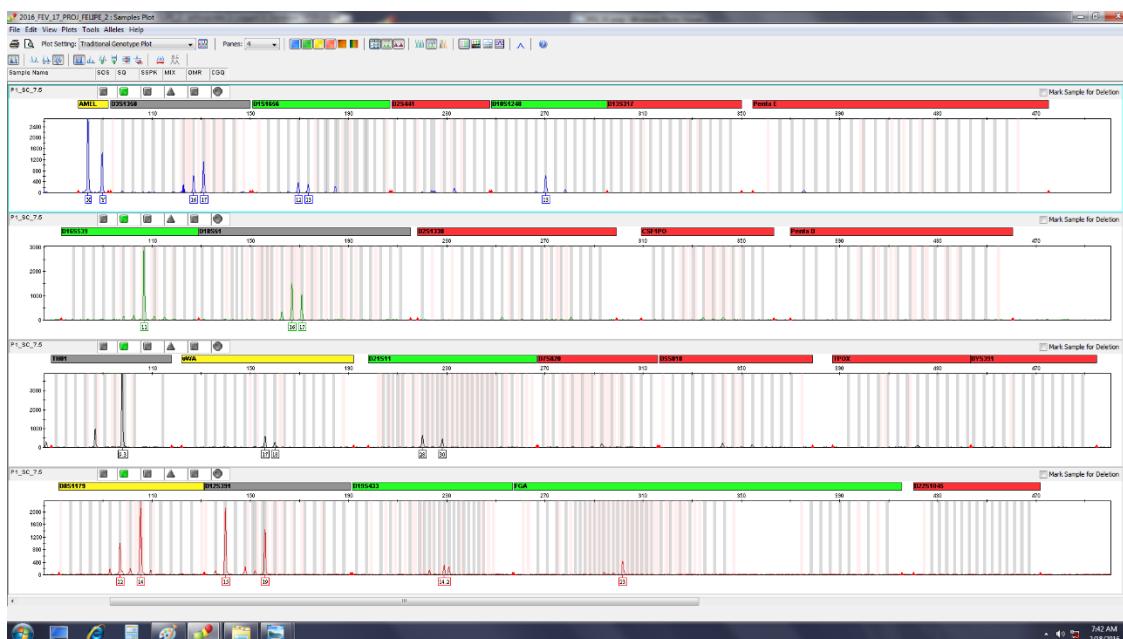
Apêndice 39: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver carbonizado #10, apresentando perfil genético completo com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



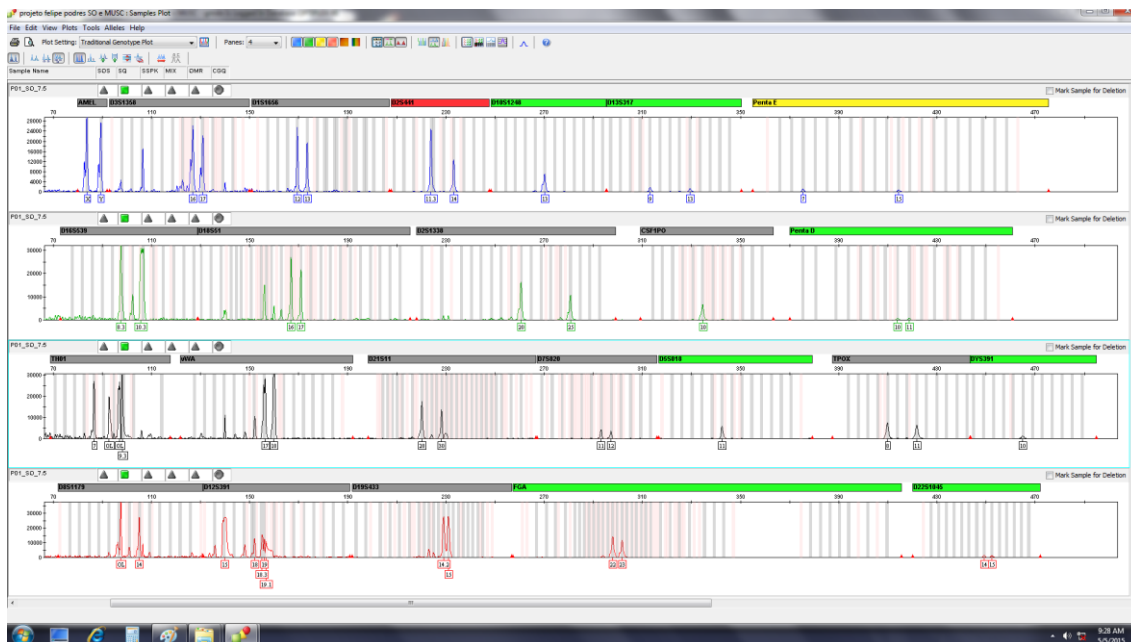
Apêndice 40: Eletroferograma da amostra de *músculo* do cadáver putrefato #1, apresentando perfil genético completo com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



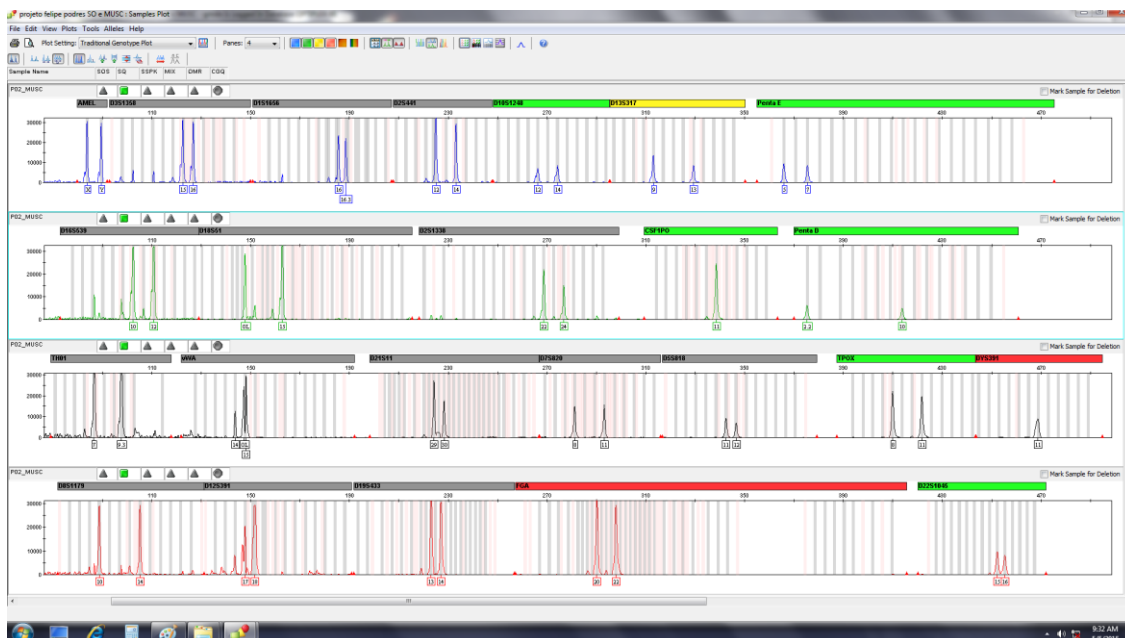
Apêndice 41: Eletroferograma da amostra de *osso* do cadáver putrefato #1, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



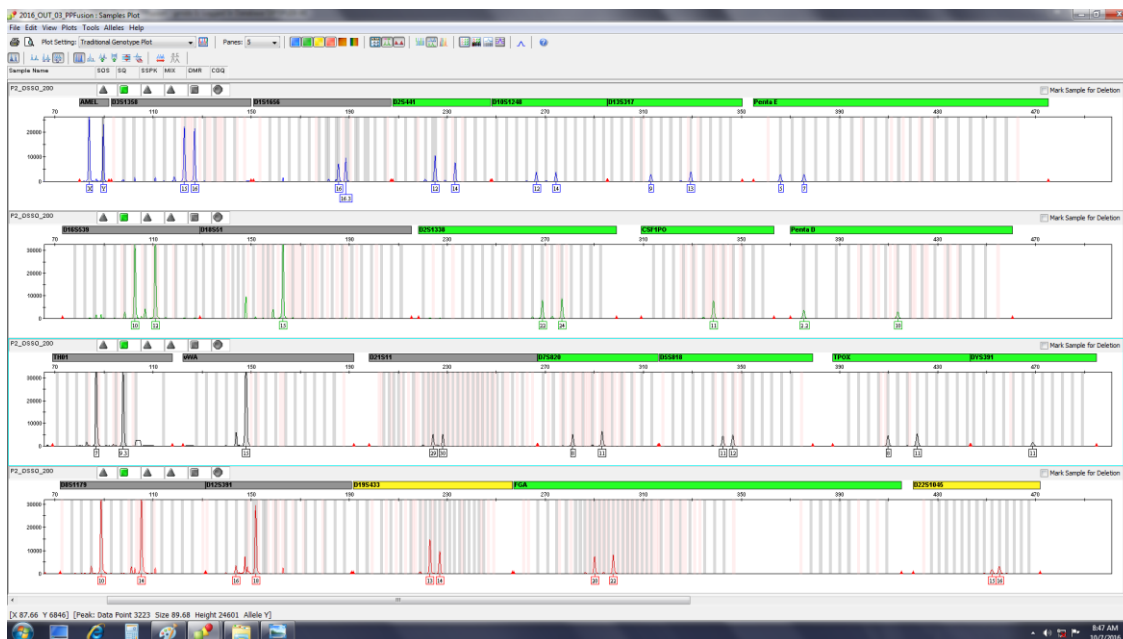
Apêndice 42: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver putrefato #1, apresentando perfil genético parcial com picos em 12 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



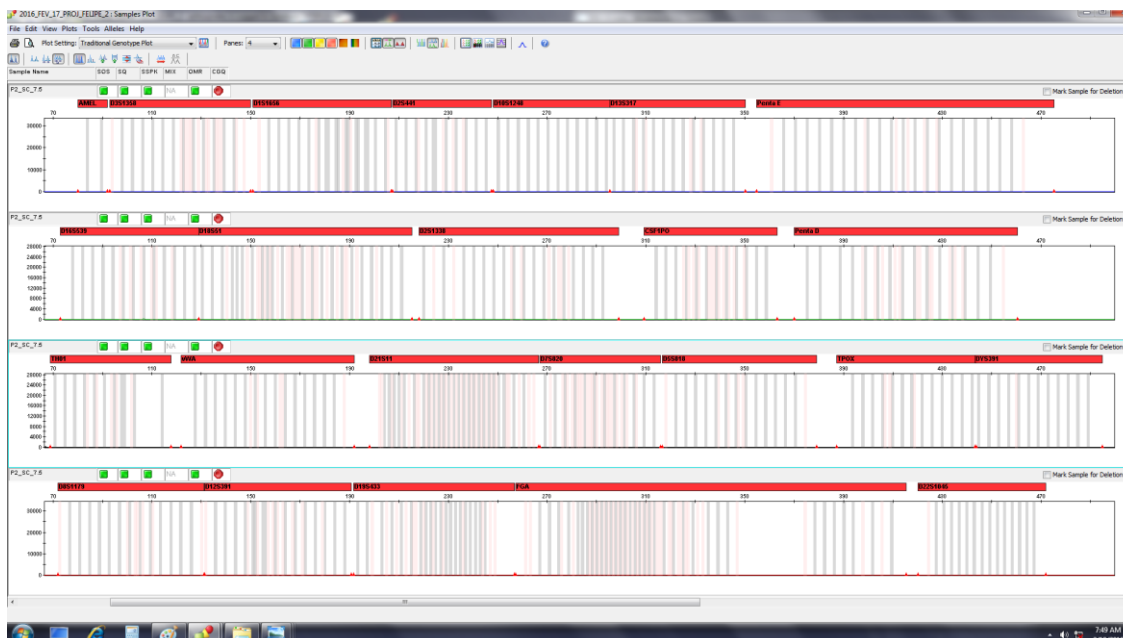
Apêndice 43: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #1, apresentando perfil genético parcial com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. Loci TH01 e D12S391 apresentando *drop-in*. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



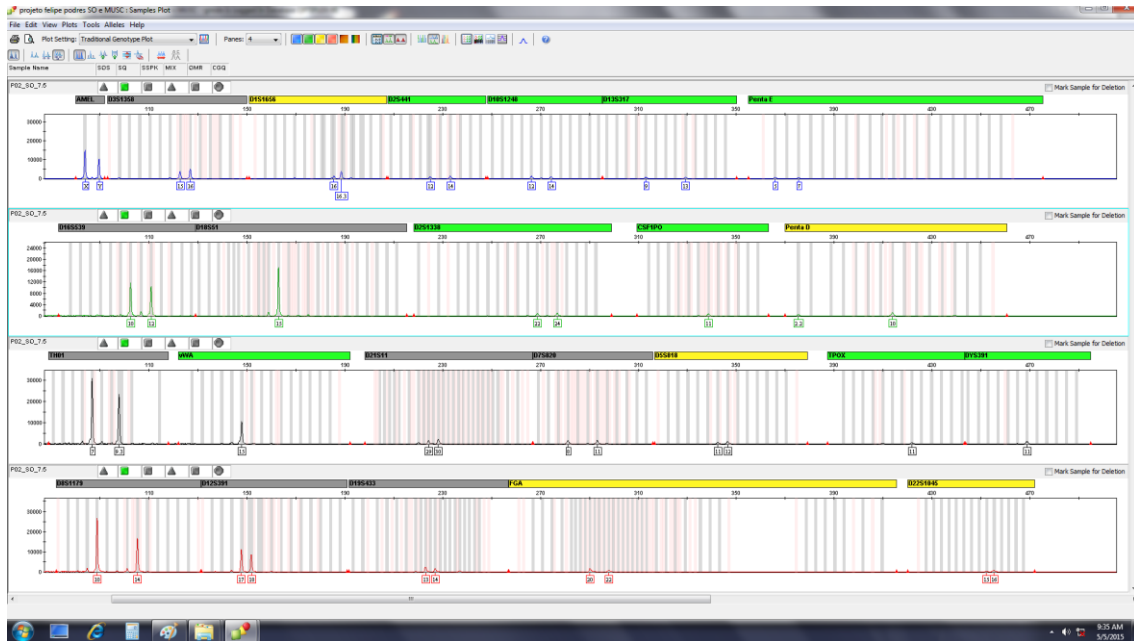
Apêndice 44: Eletroferograma da amostra de *músculo* do cadáver putrefato #2, apresentando perfil genético completo com picos em 23 loci STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 45: Eletroferograma da amostra de *osso* do cadáver putrefato #2, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



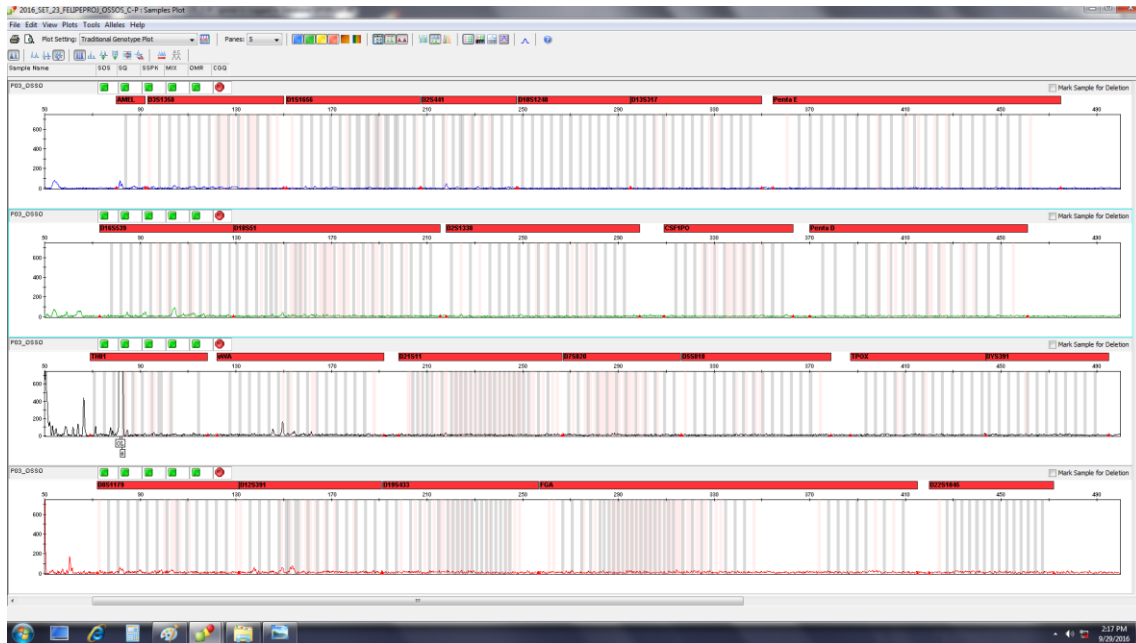
Apêndice 46: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver putrefato #2, apresentando perfil genético insuficiente para análise sem picos STR nem o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



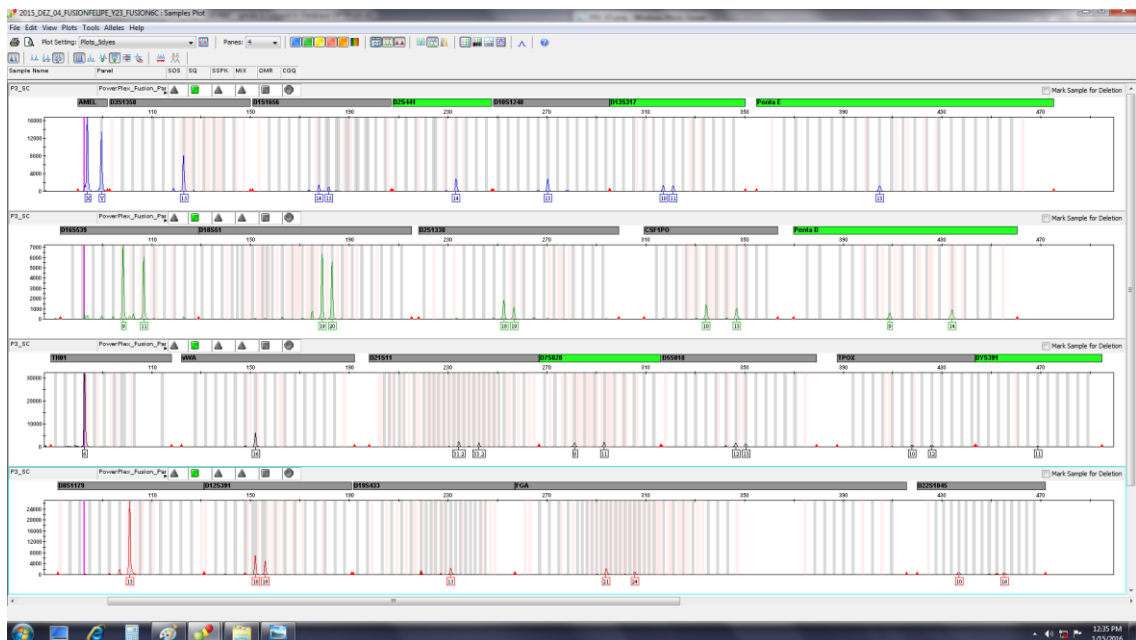
Apêndice 47: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #2, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 48: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver putrefato #3, apresentando perfil genético parcial com picos em 22 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

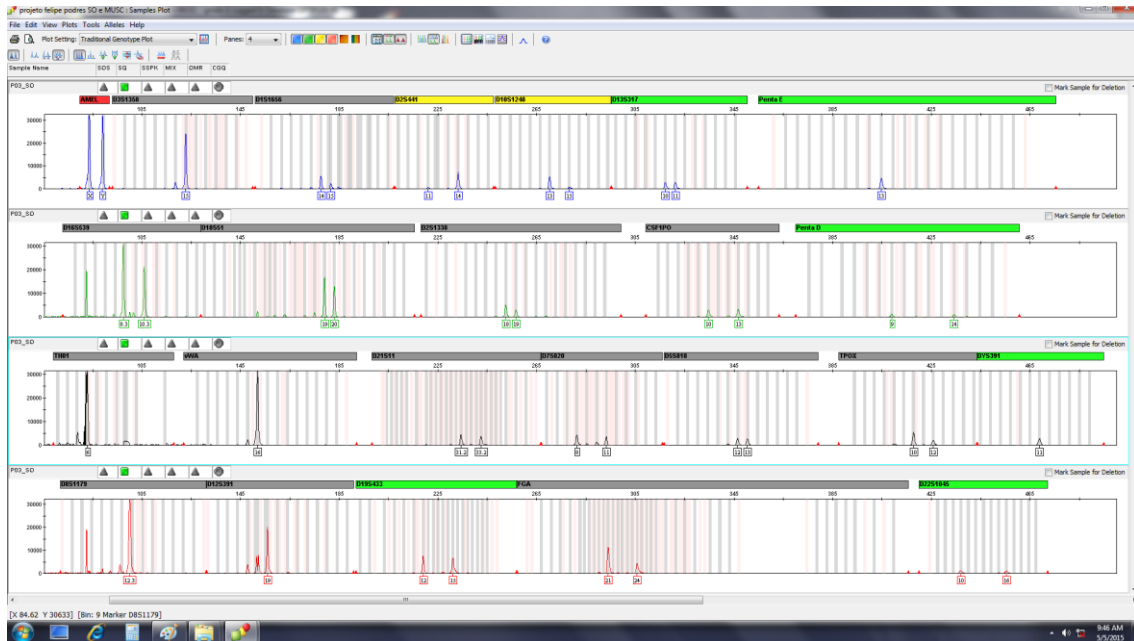


Apêndice 49: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver putrefato #3, apresentando perfil genético insuficiente para análise sem picos STR nem o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

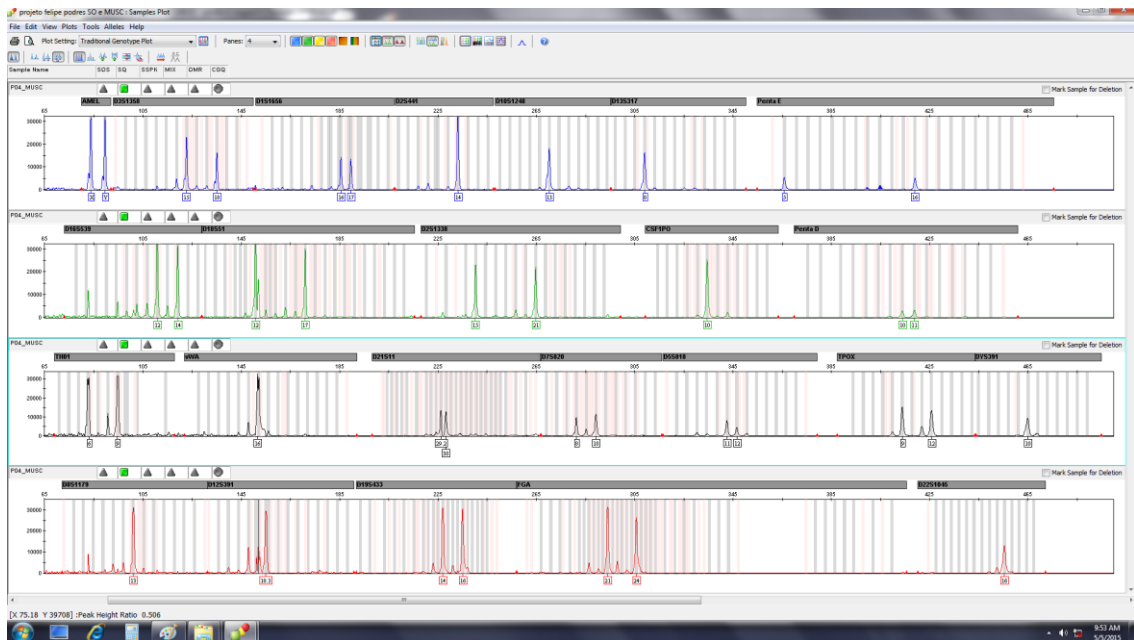


Apêndice 50: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver putrefato #3, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

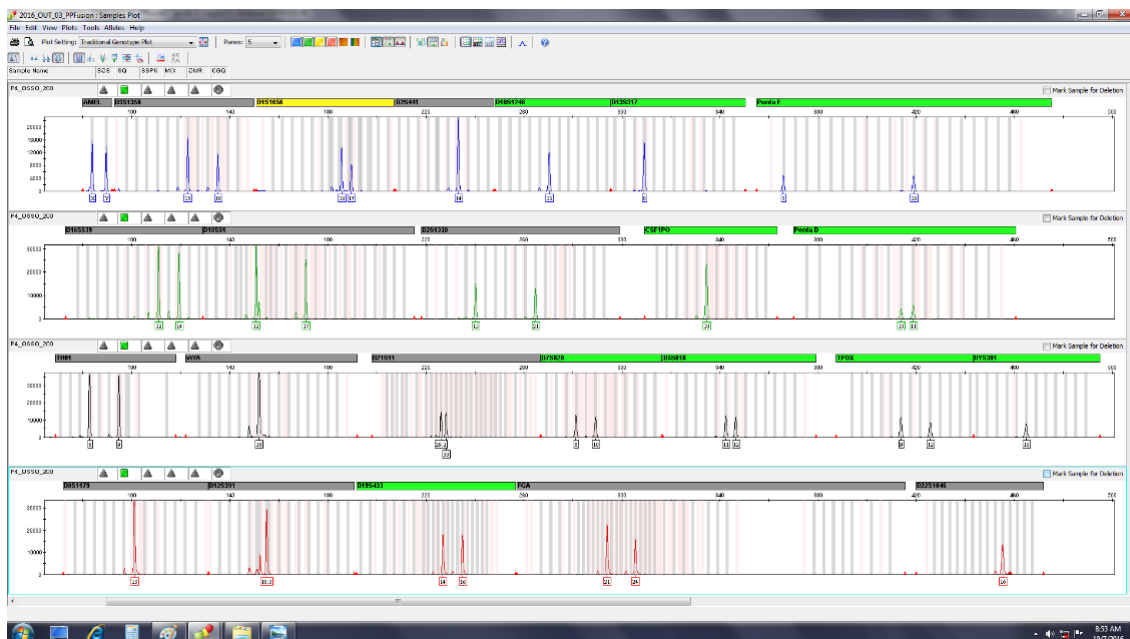




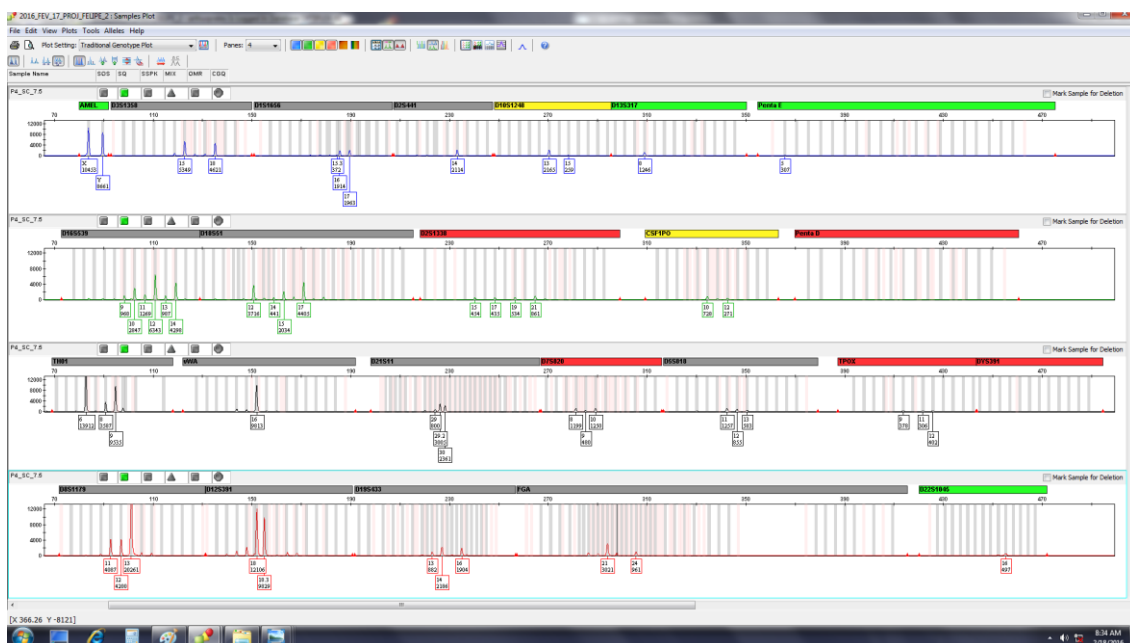
Apêndice 51: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #3, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



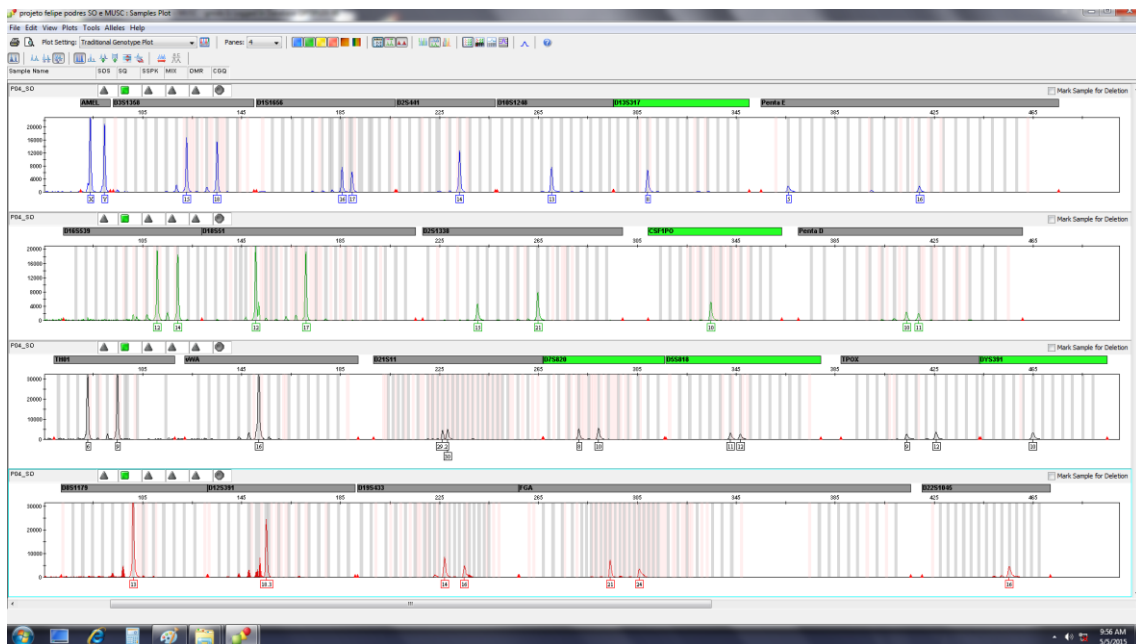
Apêndice 52: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver putrefato #4, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



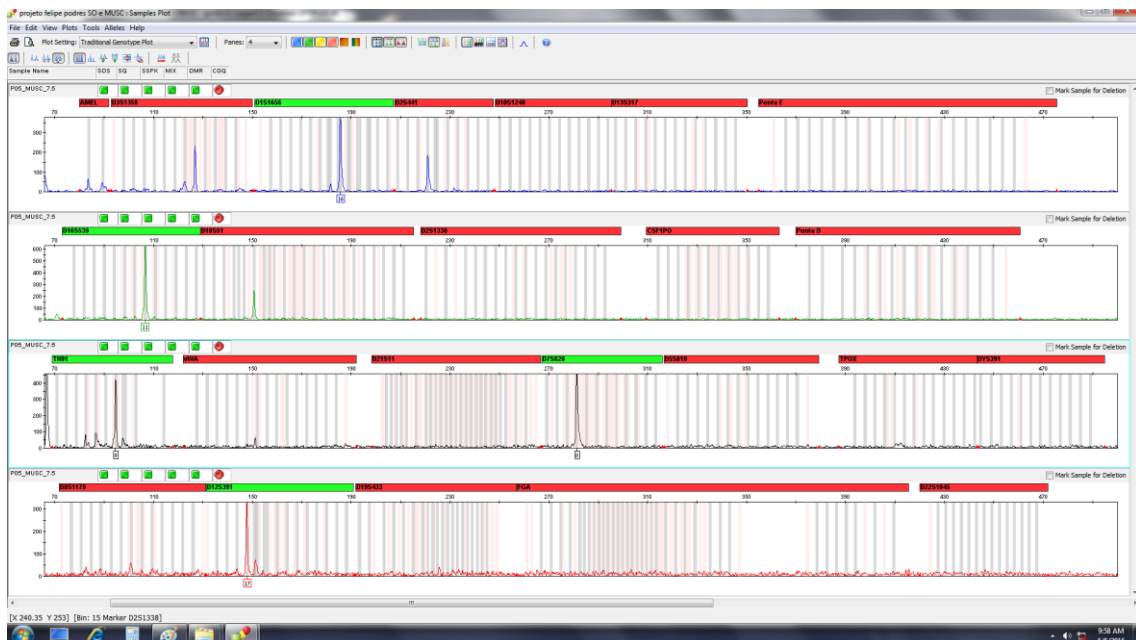
Apêndice 53: Eletroferograma da amostra de *osso* do cadáver putrefato #4, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



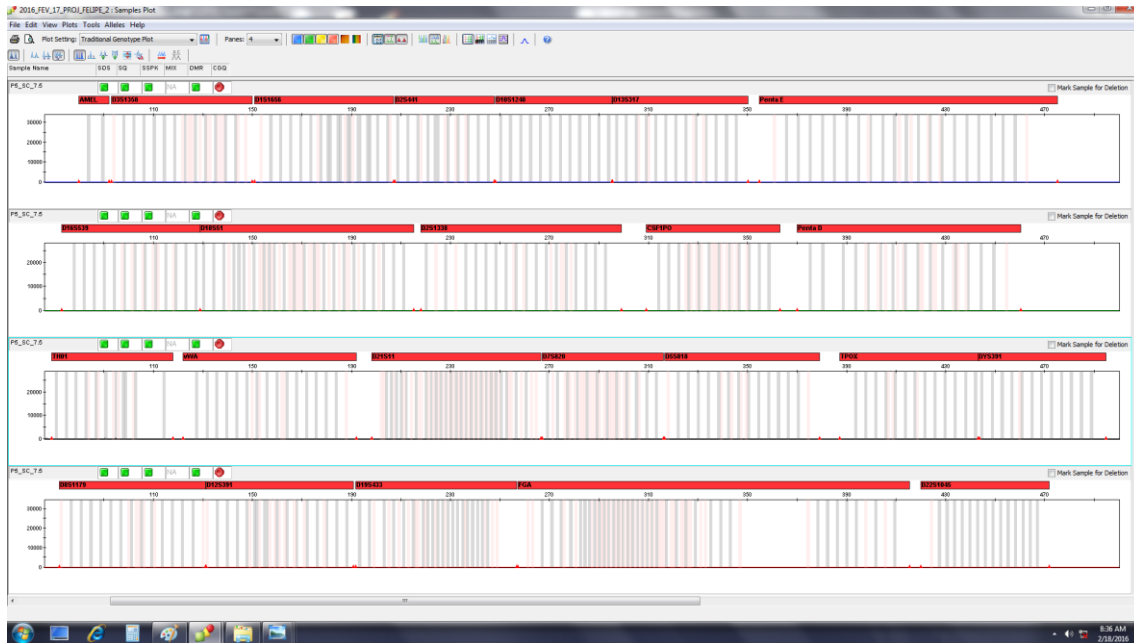
Apêndice 54: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver putrefato #4, apresentando perfil genético parcial com picos em 21 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. Diversos *loci* apresentando *drop-in*. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



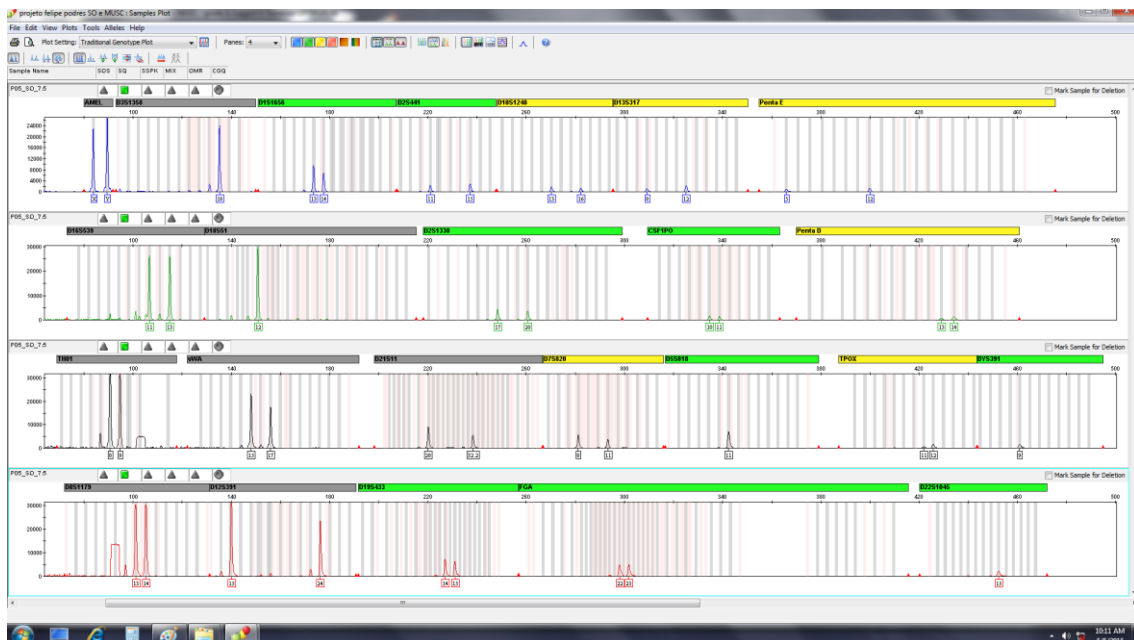
Apêndice 55: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #4, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



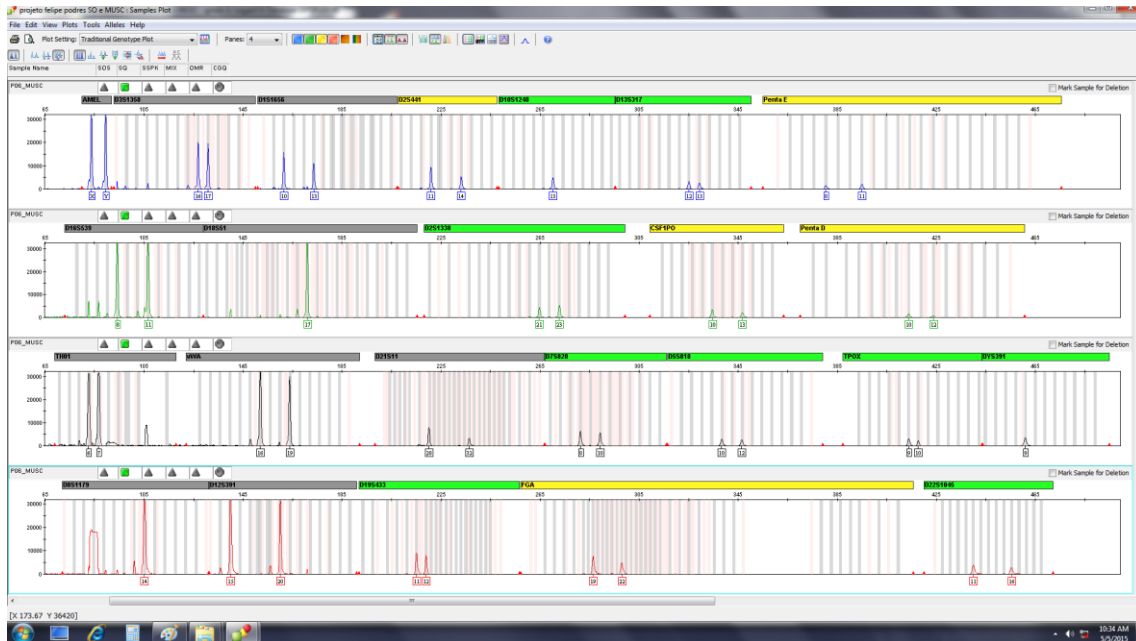
Apêndice 56: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver putrefato #5, apresentando perfil genético insuficiente para análise com picos em 5 *loci* STR e sem o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



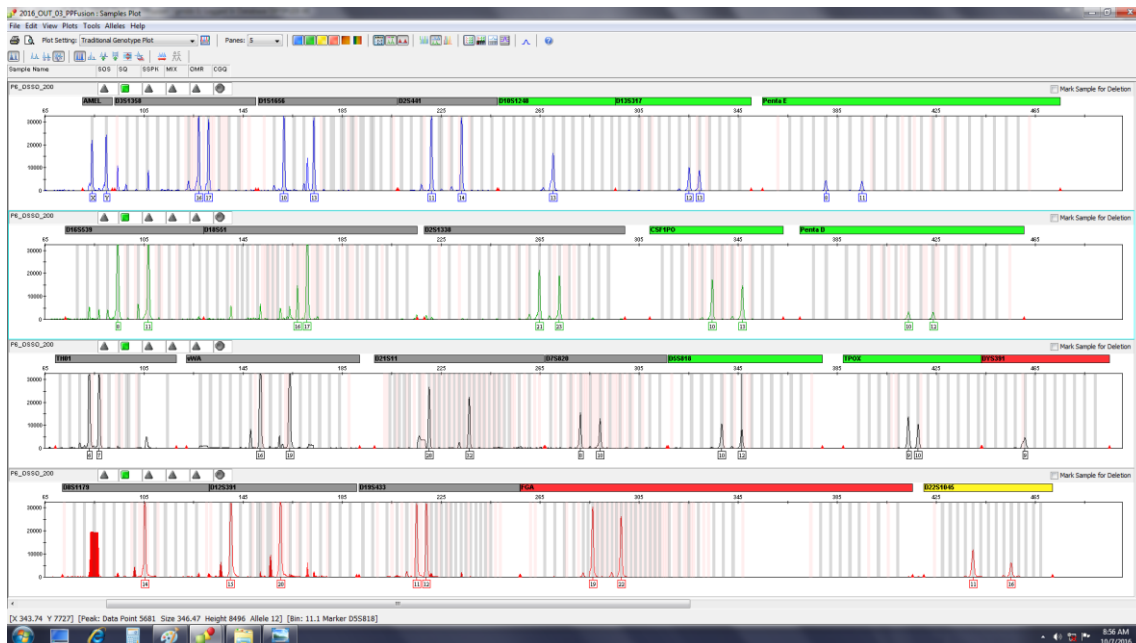
Apêndice 57: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver putrefato #5, apresentando perfil genético insuficiente para análise sem picos STR nem o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



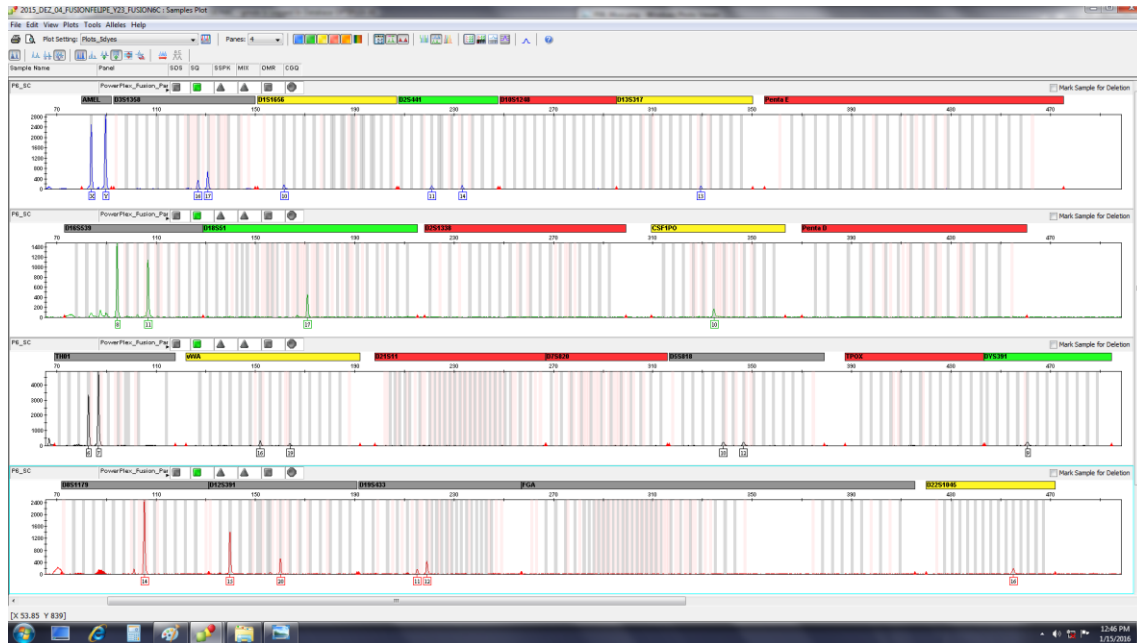
Apêndice 58: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #5, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



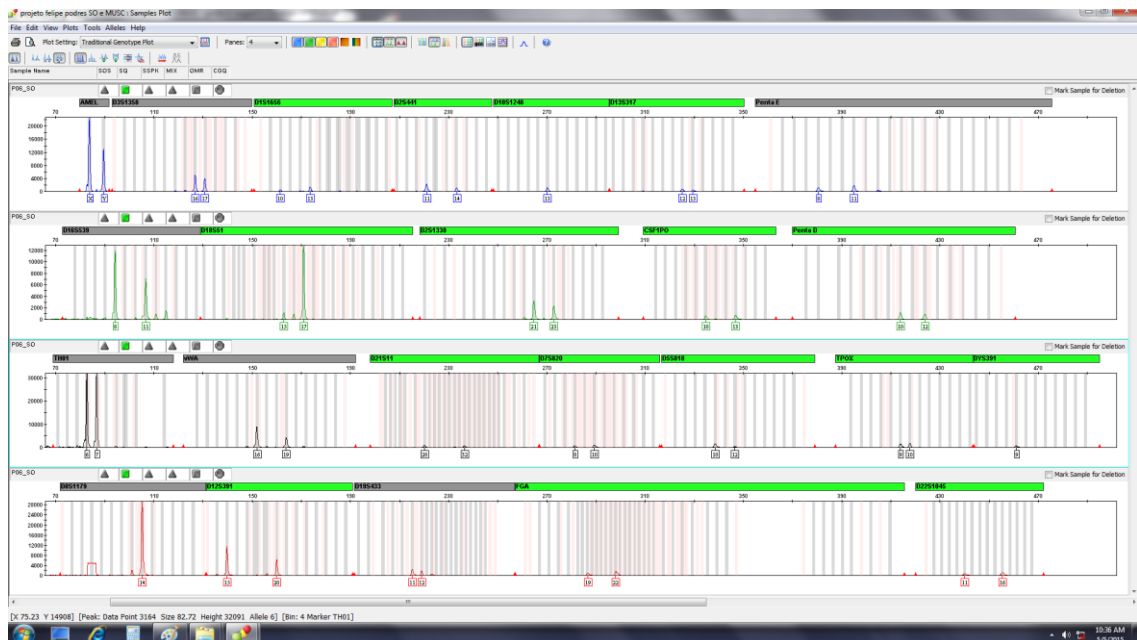
Apêndice 59: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver putrefato #6, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



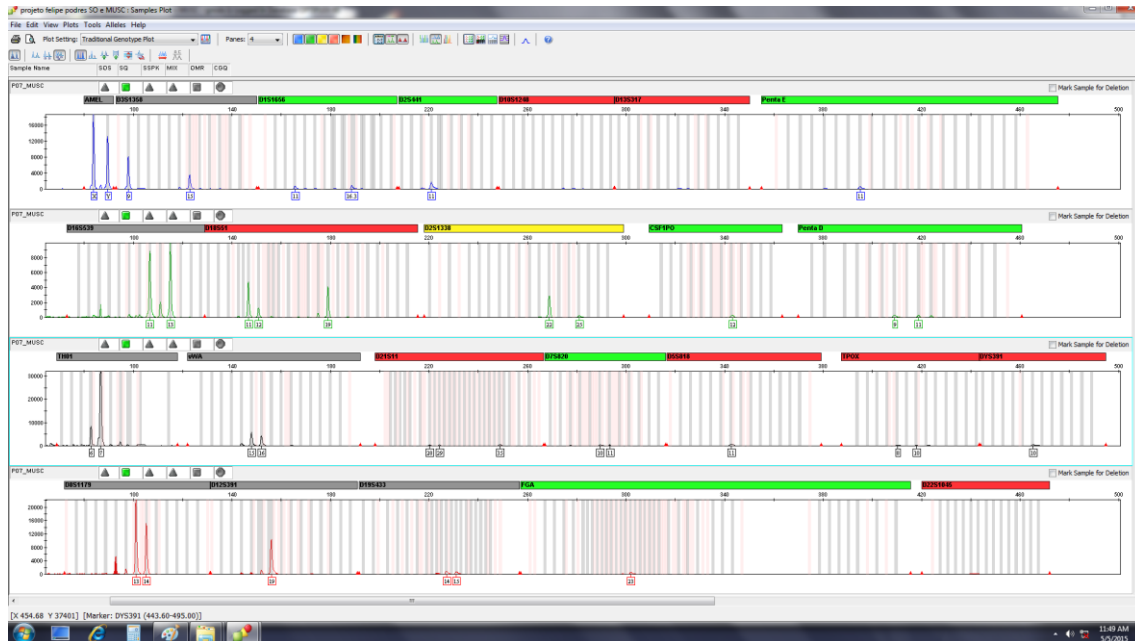
Apêndice 60: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver putrefato #6, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



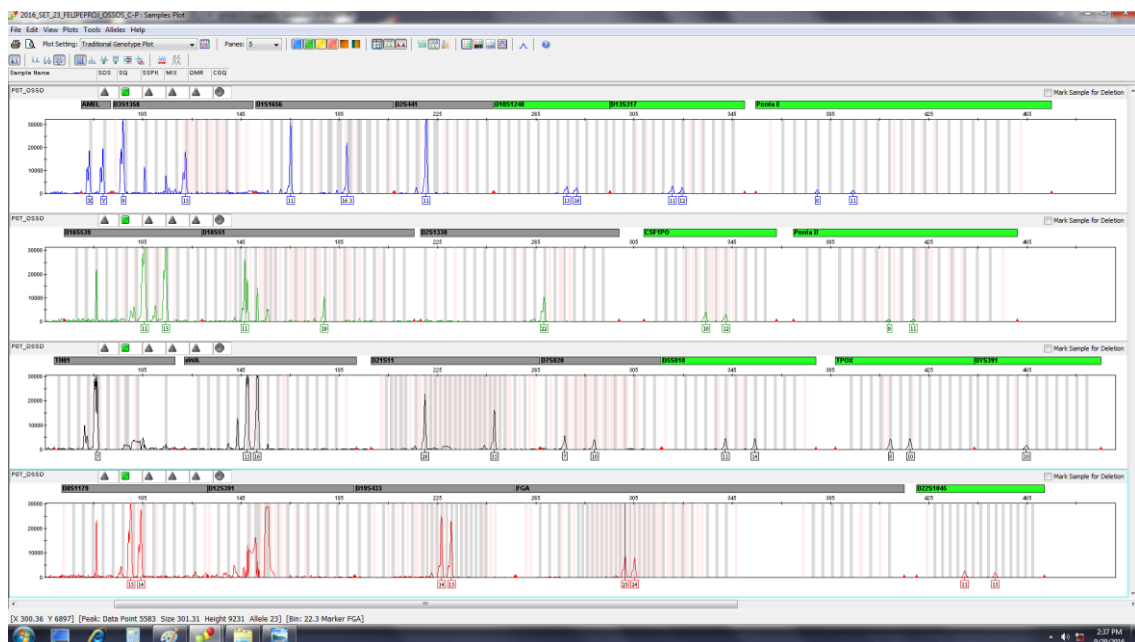
Apêndice 61: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver putrefato #6, apresentando perfil genético parcial com picos em 15 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



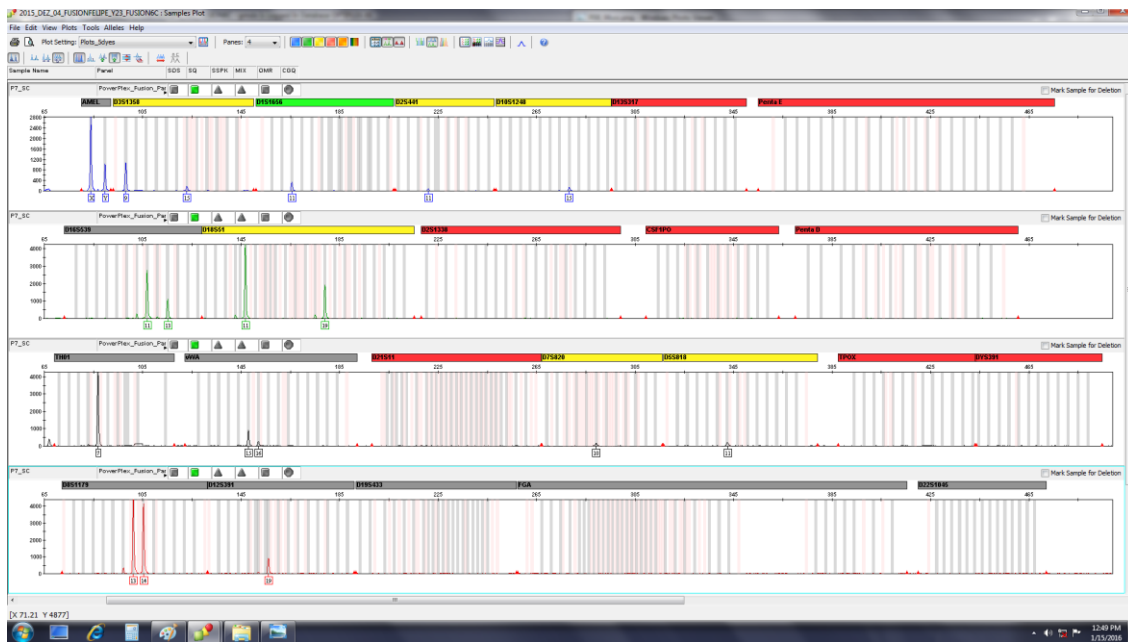
Apêndice 62: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #6, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



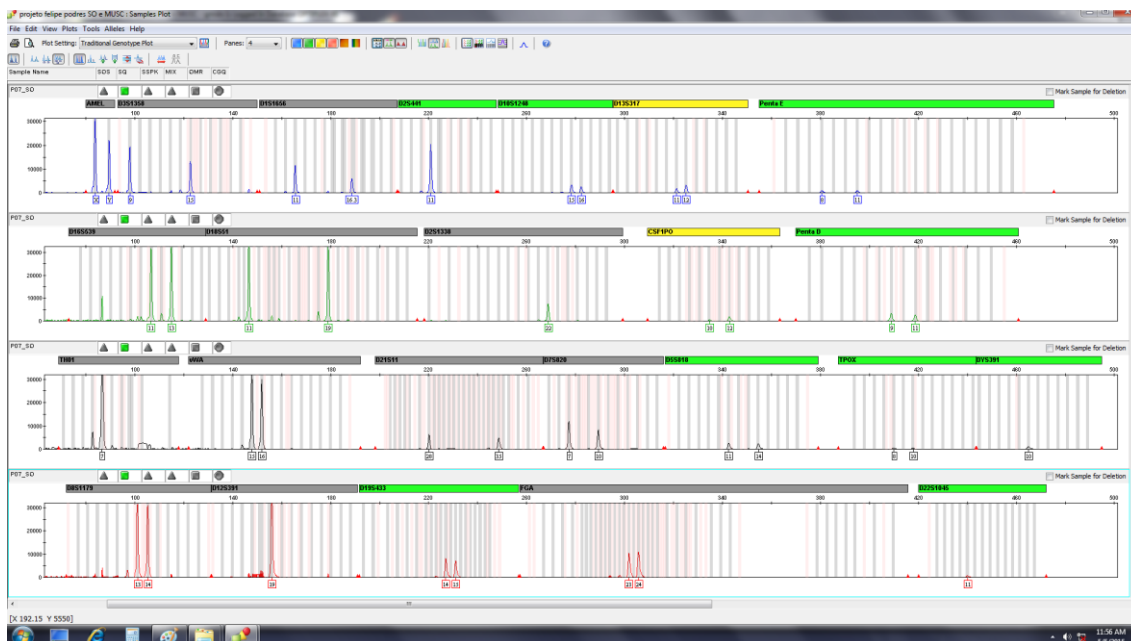
Apêndice 63: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver putrefato #7, apresentando perfil genético parcial com picos em 20 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 64: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver putrefato #7, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

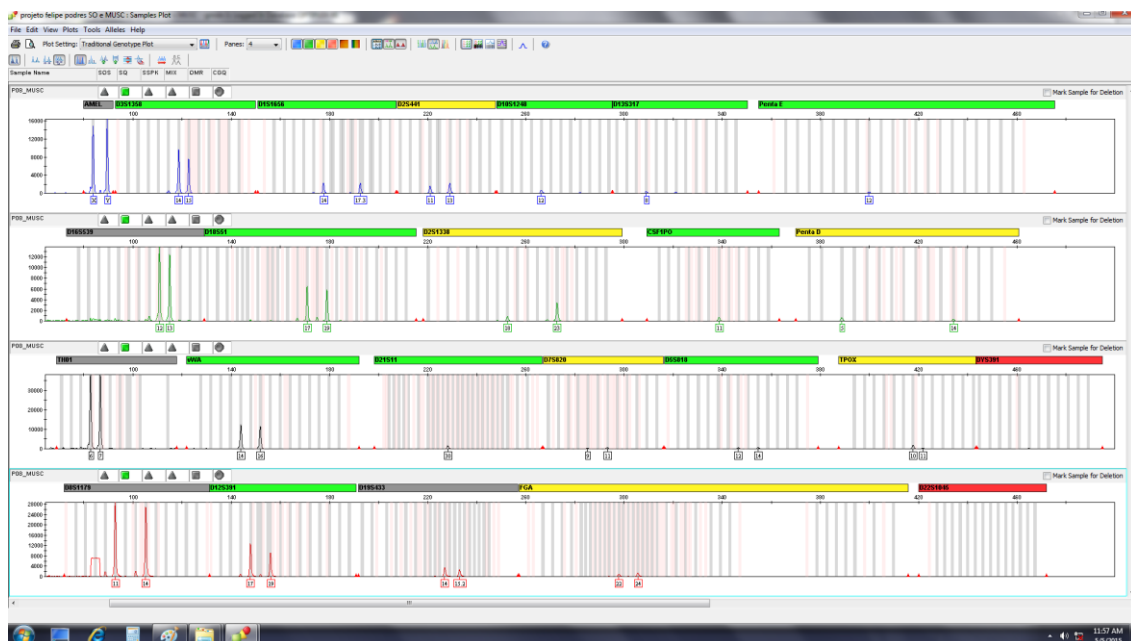


Apêndice 65: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver putrefato #7, apresentando perfil genético parcial com picos em 12 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

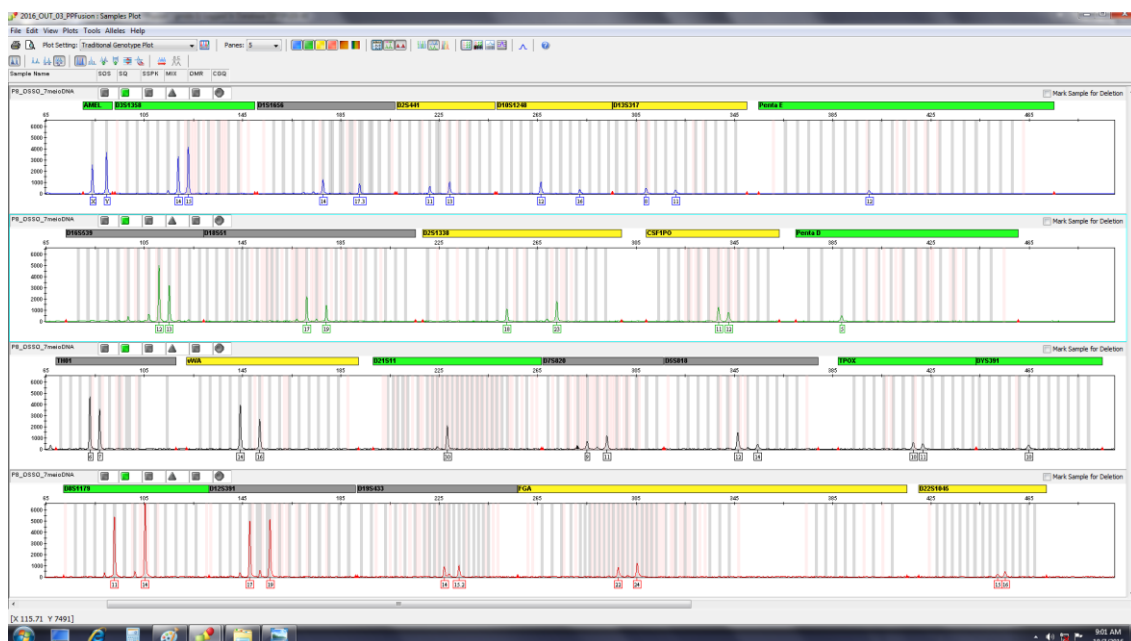


Apêndice 66: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #7, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).

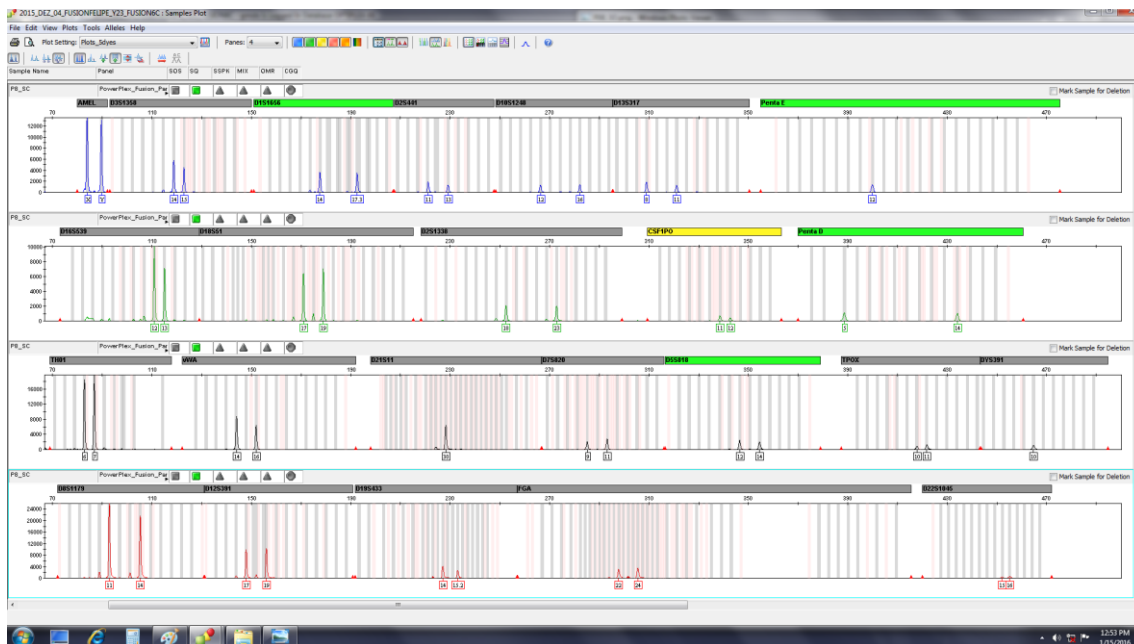




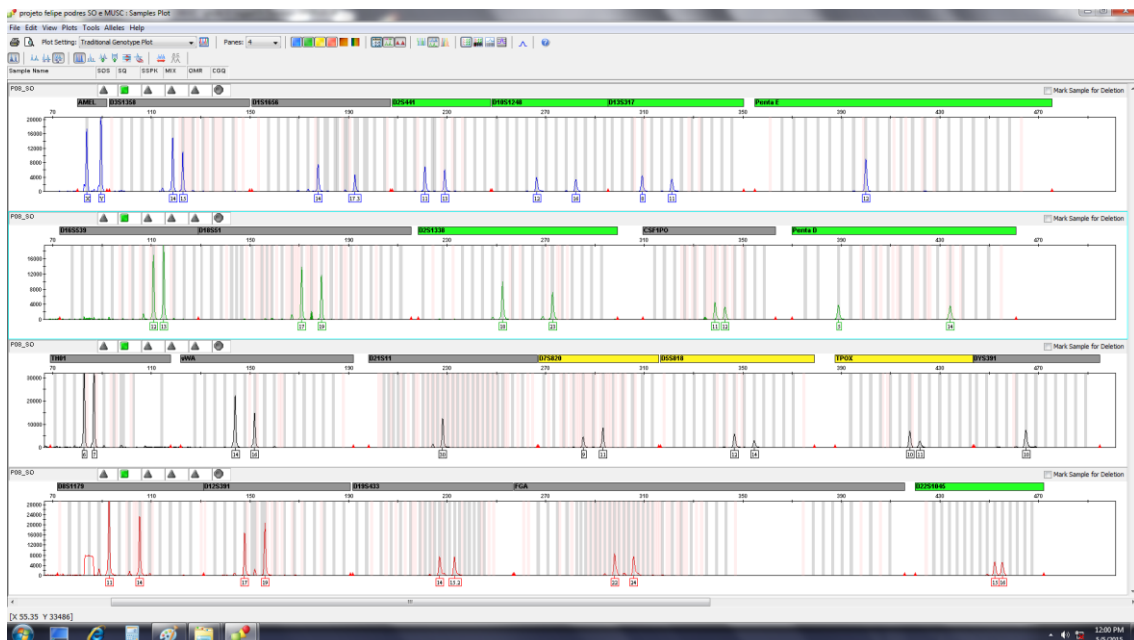
Apêndice 67: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver putrefato #8, apresentando perfil genético parcial com picos em 21 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



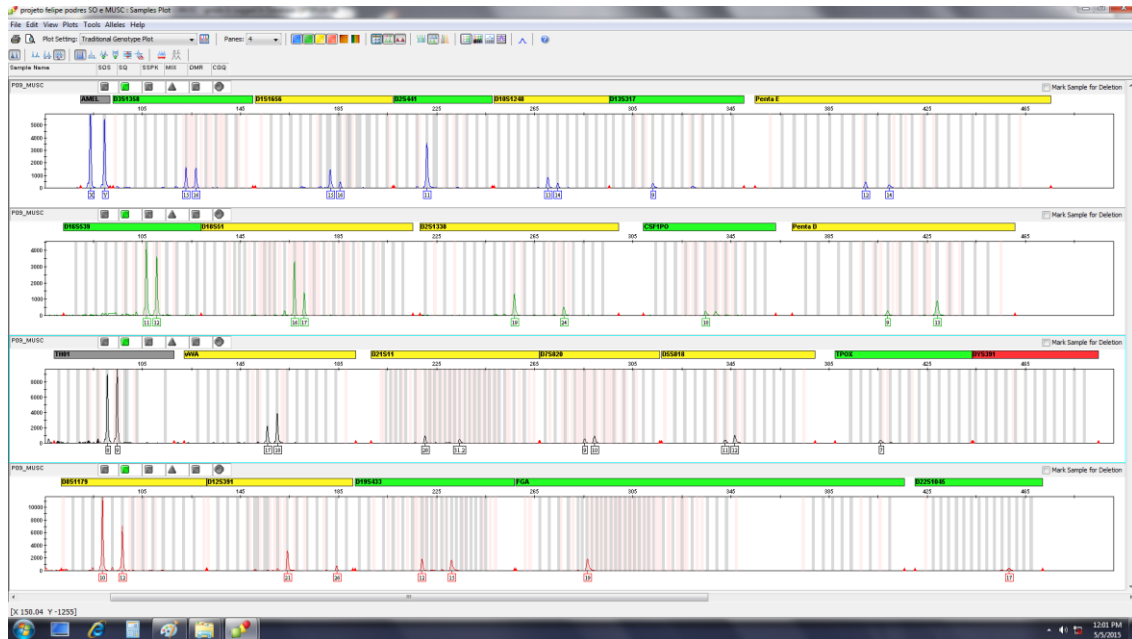
Apêndice 68: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #8, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



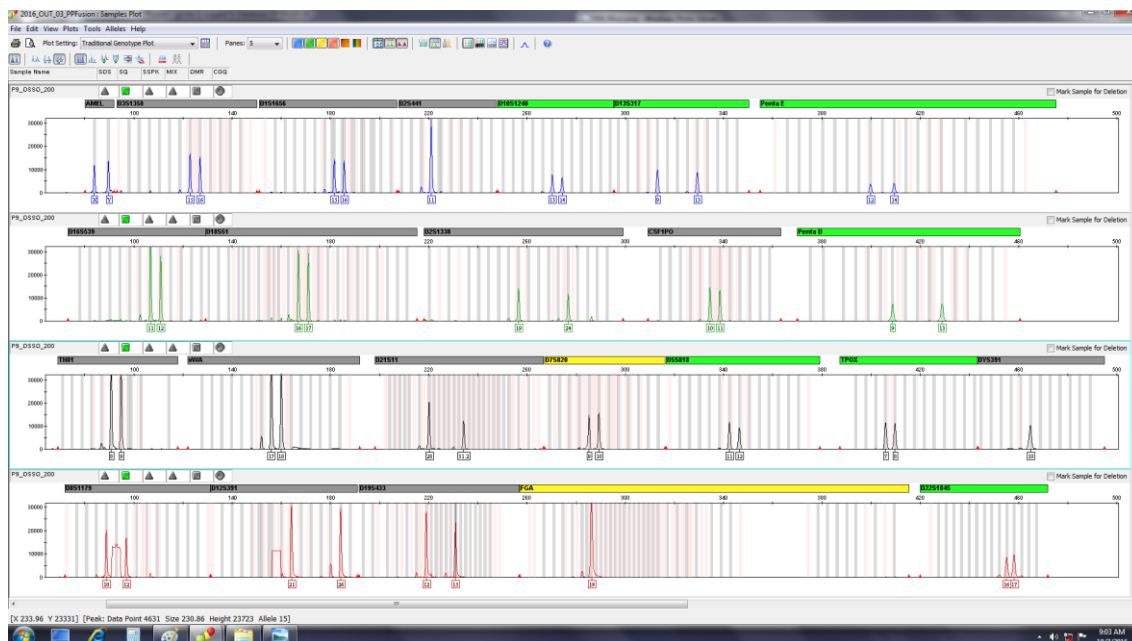
Apêndice 69: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver putrefato #8, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



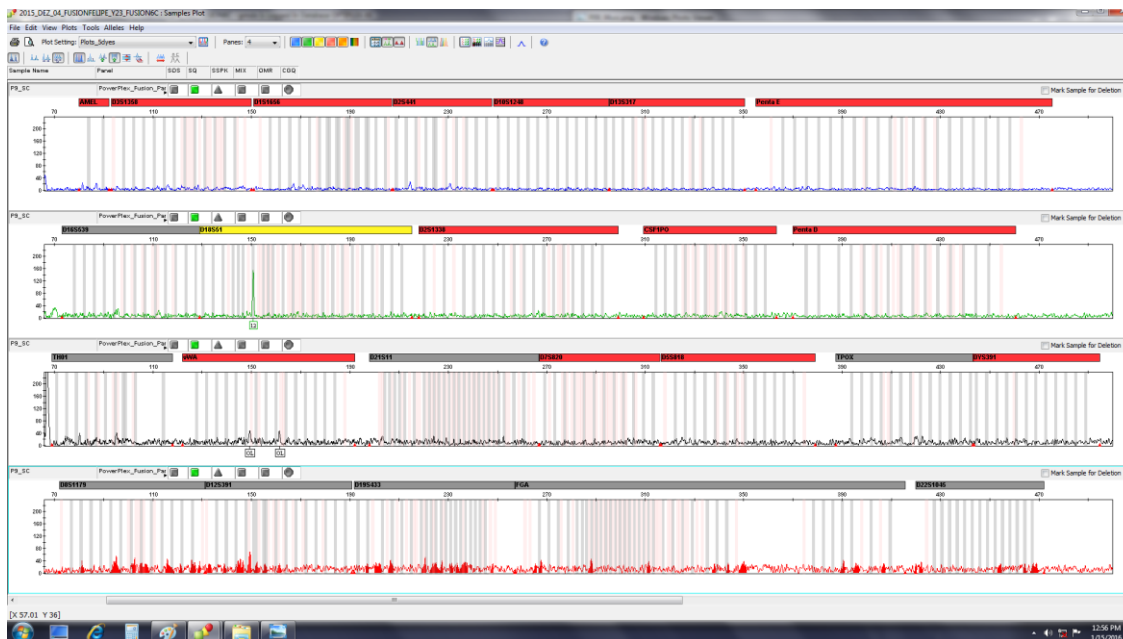
Apêndice 70: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #8, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



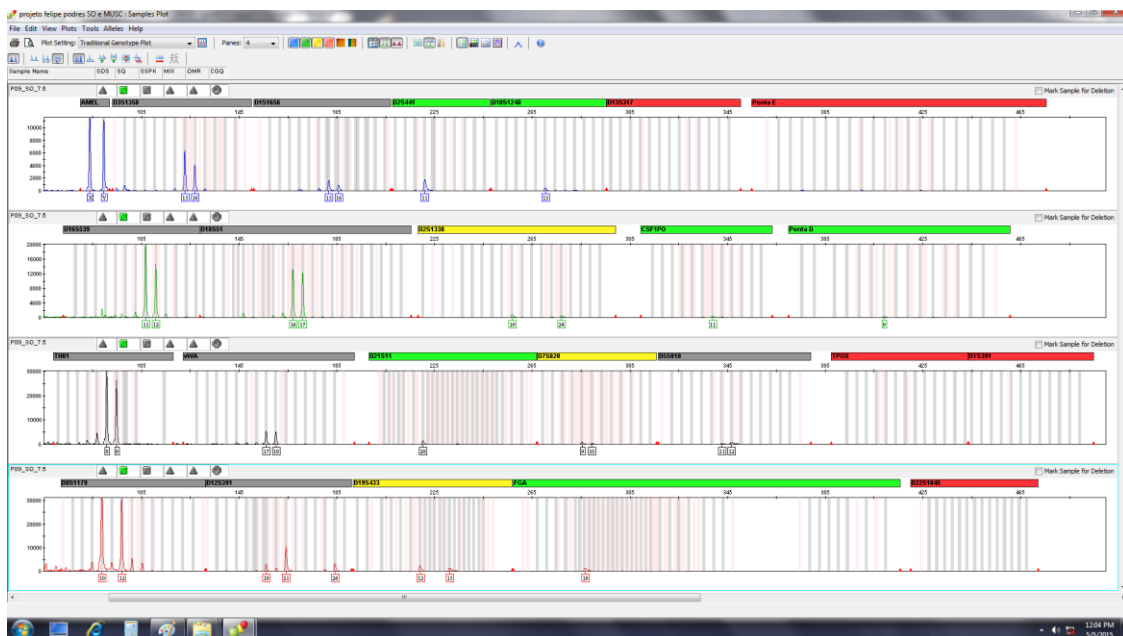
Apêndice 71: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver putrefato #9, apresentando perfil genético parcial com picos em 22 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



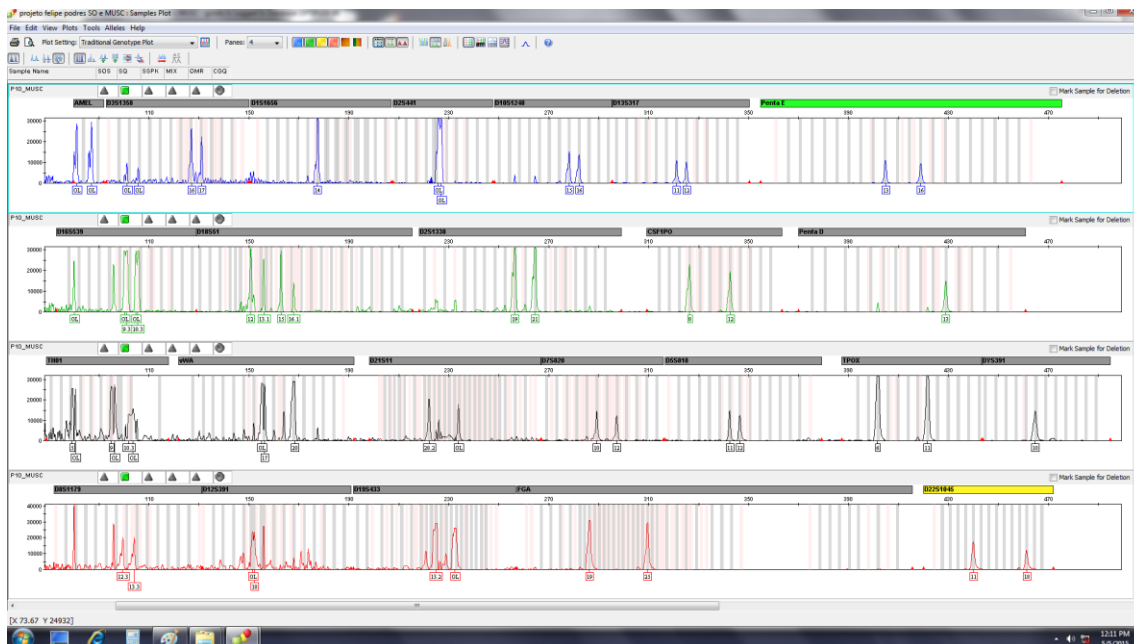
Apêndice 72: Eletroferograma da amostra de osso do cadáver putrefato #9, apresentando perfil genético completo com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 73: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver putrefato #9, apresentando perfil genético insuficiente para análise sem picos STR nem o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



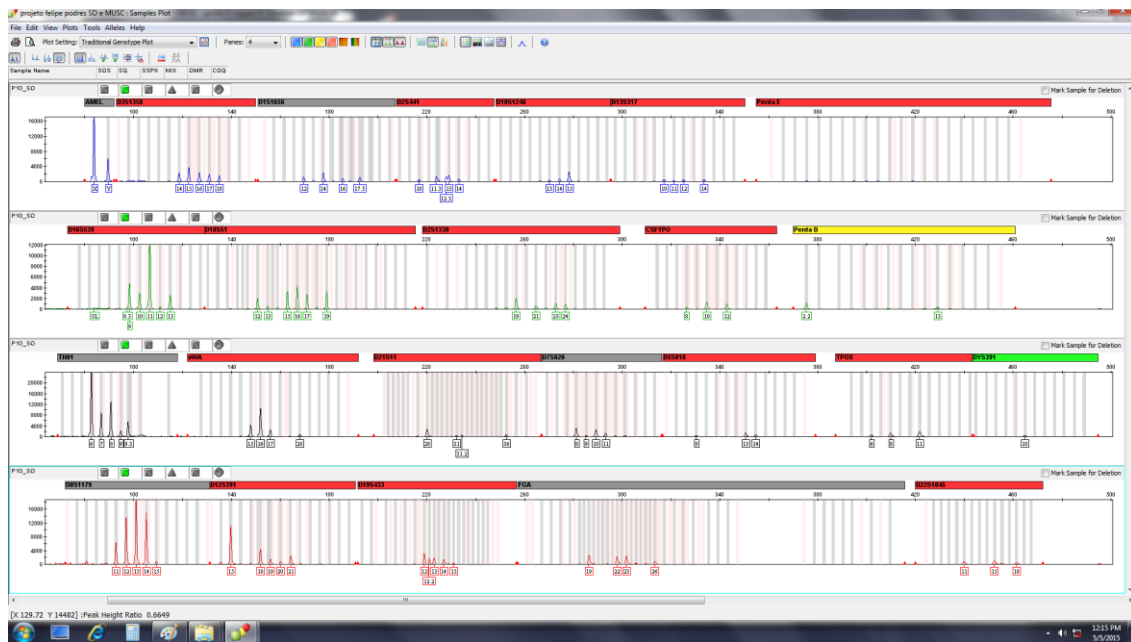
Apêndice 74: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #9, apresentando perfil genético parcial com picos em 18 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 75: Eletroferograma da amostra de músculo do cadáver putrefato #10, apresentando perfil genético parcial com picos em 23 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina, com alguns *loci* apresentando *drop-in*. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 76: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com Chelex® do cadáver putrefato #10, apresentando perfil genético insuficiente para análise com picos em 15 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina, porém 9 *loci* apresentam *drop-in*. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).



Apêndice 77: Eletroferograma da amostra de *swab* extraído com PCI do cadáver putrefato #10, apresentando perfil genético insuficiente para análise com picos em 22 *loci* STR mais o marcador de gênero amelogenina, porém 20 *loci* apresentam *drop-in*. O eixo X representa os alelos do doador da amostra, enquanto o eixo Y representa a altura dos picos em unidades fluorescentes relativas (RFU, do inglês, *Relative Fluorescent Units*).