

MESTRADO
CIÊNCIAS FORENSES

Degradação do DNA de Raízes de Cabelos em Água do Mar – Contributo para a Estimativa do Intervalo *Post* *Mortem* e Identificação Genética do Cadáver

Camila Pontes Rocha

M

2021



SEDE ADMINISTRATIVA

FACULDADE DE MEDICINA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

FACULDADE DE DIREITO

FACULDADE DE FARMÁCIA

FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

FACULDADE DE PSICOLOGIA E DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR



**DEGRADAÇÃO DO DNA DE RAÍZES DE CABELOS EM ÁGUA
DO MAR – CONTRIBUTO PARA A ESTIMATIVA DO
INTERVALO *POST MORTEM* E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA
DO CADÁVER**

CAMILA PONTES ROCHA

Mestrado em Ciências Forenses

Departamento de Ciências da Saúde Pública e Forenses e Educação Médica

Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Setembro 2021

Orientador: Prof. Doutor AGOSTINHO JOSÉ CARVALHO DOS SANTOS

Co-orientadora: Prof. Doutora LAURA SOFIA RAMOS MENDES CAINÉ

Co-orientadora: Mestre GABRIELA MARIA MOURA DE VASCONCELOS LIMA

“São os passos que fazem o caminho.”

– Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Agostinho Santos, por confiar em mim e na minha proposta de investigação, permitindo a realização deste projeto.

À minha co-orientadora Professora Doutora Laura Cainé, por proporcionar ensinamentos valiosos para a realização desta investigação.

À minha co-orientadora Mestre Gabriela Lima, por toda a dedicação, apoio e orientação ao longo de todo o projeto, indispensáveis para a conclusão do mesmo.

À equipe dos Serviços de Patologia Forense e de Genética e Biologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses - Delegação do Norte, pela ajuda e pelo carinho com que me receberam.

Aos meus pais Cristina e Marco, à minha avó Fernanda e ao meu tio Henrique, pelo apoio, incentivo e amor incondicionais, sem os quais eu não seria capaz de ter forças para conquistar os meus objetivos.

Aos meus familiares e amigos, que me apoiaram nos momentos em que mais precisei, alegrando meus dias.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

O meu mais sincero agradecimento.

Dedico esta dissertação à minha avó Fernanda de Almeida.

RESUMO

O tempo que decorre entre o momento da morte do indivíduo e a descoberta do seu cadáver corresponde ao Intervalo *Post Mortem* (PMI). A determinação deste intervalo é de extrema relevância para as Ciências Forenses, principalmente nas áreas da Antropologia e Patologia Forenses. Através da observação e interpretação dos vários fenómenos cadavéricos *post mortem*, é possível estimar o PMI de forma aproximada. No entanto, não existe nenhum método que consiga definir com rigor o momento exato da morte de uma pessoa, o que torna o estudo do PMI um desafio científico a ser resolvido.

No decorrer deste estudo foi perceptível a necessidade de haver cada vez mais alternativas para estimar o PMI, principalmente de metodologias que possam abranger o cálculo de intervalos *post mortem* mais longos, utilizando materiais biológicos menos suscetíveis à rápida deterioração do seu material genético, como é o caso dos pelos/cabelos. A capacidade de degradação lenta deste material biológico é considerada uma vantagem quando comparada à rapidez da putrefação de órgãos e outros tecidos moles, principalmente tratando-se de amostras de cadáveres com intervalos *post mortem* mais prolongados e que estiveram expostos a fatores ambientais por mais tempo. Deste modo, o estudo da quantidade e do nível de degradação do DNA dos cabelos bem como a avaliação da possibilidade de obtenção de perfis genéticos completos, através da análise de marcadores genéticos como os STR, é importante e pode contribuir para a estimativa do PMI.

Uma vez que a quantidade e a degradação do DNA da raiz capilar estão diretamente relacionadas com os fatores ambientais do local em que os cabelos permaneceram expostos e com a duração desta exposição, é importante realizar estudos em que estes fatores possam ser simulados de forma controlada. Desta forma, procedeu-se ao estudo de cabelos expostos à água do mar. Para a realização do estudo, recolheu-se um fragmento de couro cabeludo que foi dividido em 2 fragmentos, um submetido à imersão parcial e outro submetido à imersão total em água do mar durante 17 dias. Diariamente foram recolhidos cabelos destes dois fragmentos. Ao longo do procedimento experimental, foram realizadas análises laboratoriais e estatísticas para averiguar a existência ou ausência de uma correlação significativa entre a quantidade e o índice de degradação do DNA dos cabelos provenientes do cadáver e o tempo decorrido após a morte.

O objetivo principal deste trabalho foi investigar, com base na análise da quantidade e do índice de degradação do DNA dos cabelos submersos em água do mar, a possibilidade da utilização desta metodologia como alternativa capaz de estimar o intervalo *post mortem*, bem como permitir a identificação genética do cadáver.

No final deste projeto foi possível perceber que a análise do DNA dos cabelos de cadáveres submersos em água do mar demonstra ter potencial para ser utilizada como uma ferramenta alternativa na estimativa do intervalo *post mortem* e na identificação de indivíduos, no caso de períodos de tempo após a morte mais longos relativamente aos métodos que utilizam órgãos e outros tecidos moles para análise. Deste modo, este método de análise parece promissor para pesquisas futuras na área das Ciências Forenses, sendo recomendada uma quantidade maior de amostragem a fim de melhorar a precisão do método.

Palavras-chave: Estimativa do Tempo de Morte; Identificação do cadáver; Água do mar; Ciências Forenses.

ABSTRACT

The time that elapses between the moment of the individual's death and the discovery of his corpse corresponds to the *Post Mortem* Interval (PMI). Determining this range is extremely relevant to Forensic Sciences, especially in the areas of Forensic Anthropology and Pathology. Through observation and interpretation of the various *post mortem* cadaveric phenomena, it is possible to estimate the PMI in an approximate way. However, there is no method that can accurately define the exact moment of a person's death, which makes the study of PMI a scientific challenge to be solved.

During this study, the need for more alternatives to estimate the PMI was evident, especially of methodologies that could be applied to the calculation of longer *post mortem* intervals, using biological materials that are less susceptible to fast deterioration, i.e. hairs. The slow degradation capacity of this biological material is considered an advantage when compared to fast decomposition of organs and other soft tissues, especially in cases of cadaveric samples with longer post-mortem intervals that were exposed to environmental factors for a longer period of time. Therefore, the study of the amount and degradation level of hair DNA, as well as the possibility of obtaining a complete genetic profiles through genetic markers analysis, such as STR, are important and can contribute to the estimation of PMI.

Since the amount and degradation of hair root DNA are directly related to the environmental factors of the place where the hairs were exposed and with the time of this exposure, it is important to perform studies in which these factors can be simulated in a controlled manner. Therefore, the study was proceeded in hairs that were exposed to seawater. To perform the study, a scalp fragment was collected and divided into 2 fragments, one submitted to partial immersion and the other submitted to total immersion in seawater during 17 days. Hairs from these two fragments were collected daily. During the experimental procedure, laboratory and statistical analyzes were performed to investigate the existence or absence of a significant correlation between the amount and degradation level of the cadaver hairs' DNA and the time elapsed after death.

The main objective of this work, based on the analysis of the amount and degradation level of hair DNA submerged in seawater, was to investigate the possibility of using this methodology as an alternative method capable of estimating the *post mortem* interval, as well as allowing the cadaver genetic identification.

In the end of this project, it was possible to comprehend the potential of DNA analysis of cadavers' hair submerged in seawater to be used as an alternative tool in the *post mortem* interval estimation and in the identification of individuals, in case of longer periods of time when compared to methods that use organs and other soft tissues for analysis. Therefore, this method of analysis seems promising for future research in the area of Forensic Science. However, it is recommended a larger amount of sampling in order to improve the accuracy of the method.

Keywords: Estimation of time since death; Identification of the corpse; Seawater; Forensic Sciences.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 ESTIMATIVA DO INTERVALO <i>POST MORTEM</i>	2
1.1.1 MÉTODOS CLÁSSICOS.....	2
1.1.2 MÉTODOS ATUAIS	3
➤ ANÁLISE DOS ÁCIDOS NUCLEICOS.....	4
➤ ANÁLISE DOS FATORES AMBIENTAIS.....	5
1.2 ANÁLISE DOS CABELOS	7
1.2.1 ESTRUTURA DOS CABELOS	7
1.2.2 FASES DE CRESCIMENTO DOS CABELOS.....	9
➤ ANAGÉNESE E CATAGÉNESE.....	10
➤ TELOGÉNESE	11
1.2.3 ANÁLISE DA QUANTIDADE E DA DEGRADAÇÃO DO DNA DOS CABELOS E A ESTIMATIVA DO PMI.....	12
➤ UTILIZAÇÃO DO RT-PCR E DE KITS COMERCIAIS.....	13
➤ ANÁLISE DE POLIMORFISMOS <i>SHORT TANDEM REPEATS</i> ..	14
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	17
2.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA DO MAR	20
2.2.1 PH	21

2.2.2	SALINIDADE E DENSIDADE	21
2.2.3	TEMPERATURA	21
2.3	CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DOS CABELOS	21
2.4	ANÁLISE DO DNA DOS CABELOS	22
2.4.1	EXTRAÇÃO.....	22
2.4.2	QUANTIFICAÇÃO	24
2.4.3	AMPLIFICAÇÃO	26
2.4.4	ELETROFORESE CAPILAR.....	27
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	28
III.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1	ANÁLISE DA QUANTIDADE E DEGRADAÇÃO DO DNA DOS CABELOS	31
3.2	ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA DO MAR	39
3.3	ANÁLISE DE PERFIS GENÉTICOS.....	40
IV.	CONCLUSÃO	44
V.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
VI.	ANEXOS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Identificação das estruturas do cabelo no interior da pele	8
Figura 2 Morfologia da haste do cabelo, observado com uma amplificação de 10 vezes ao microscópio ótico	9
Figura 3 Fotografias de seis amostras diferentes de cabelos analisados neste trabalho, representativas das fases de crescimento. A observação foi feita com uma amplificação de 10 vezes ao microscópio ótico. A) Cabelos em fase de anagénesse. B) Cabelos em fase de catagénesse. C) Cabelos em fase de telogénese	10
Figura 4 Fragmento de couro cabeludo recolhido do cadáver	18
Figura 5 Fragmentos 1 e 2 de couro cabeludo fixados, respetivamente, nas porções inferior e lateral do suporte de esferovite	18
Figura 6 Fragmento número 1 de couro cabeludo totalmente submerso e fragmento número 2 de couro cabeludo parcialmente submerso em água do mar	19
Figura 7 Gráfico de dispersão entre o logaritmo da média dos valores relativos à quantidade de DNA de todos os cabelos e os dias decorridos após a morte	34
Figura 8 Gráfico de dispersão entre o logaritmo da média dos valores da degradação do DNA de todos os cabelos e os dias após a morte	35
Figura 9 Gráficos de dispersão entre o logaritmo da média dos valores relativos à quantidade de DNA dos cabelos recolhidos dos fragmentos 1 e 2 e os dias decorridos após a morte	36
Figura 10 Gráficos de dispersão entre o logaritmo da média dos valores da degradação do DNA dos cabelos recolhidos dos fragmentos 1 e 2 e os dias decorridos após a morte	38
Figura 11 Classificação dos perfis genéticos obtidos através da análise dos STR nas amostras de cabelo recolhidas do cadáver	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Informações do cadáver disponibilizado para a experiência.....	17
Tabela 2 Volumes utilizados na preparação da mistura das reações de extração...	23
Tabela 3 Diluições padrão utilizadas, preparadas com o <i>Quantifiler™ THP DNA Standard</i>	25
Tabela 4 Volumes utilizados na preparação da mistura das reações de quantificação	25
Tabela 5 Volumes utilizados na preparação da mistura das reações de amplificação	26
Tabela 6 Volumes utilizados na preparação da mistura para a eletroforese capilar	27
Tabela 7 Teste de normalidade às médias das variáveis em estudo	31
Tabela 8 Teste de correlação de Spearman entre as variáveis referentes ao DNA dos cabelos do cadáver e os dias após a morte.....	32
Tabela 9 Teste de normalidade aos valores dos parâmetros medidos para caracterização da água do mar	39
Tabela 10 Teste de correlação de Spearman entre os dados referentes ao DNA dos cabelos do cadáver e os valores dos parâmetros que caracterizam a água do mar	40

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1.1 ESTIMATIVA DO INTERVALO *POST MORTEM*

A definição de morte equivale à interrupção total e permanente das funções vitais de um ser vivo. O tempo que decorre entre o momento da morte do indivíduo e a descoberta do seu cadáver corresponde ao Intervalo *Post Mortem* (PMI). A sua determinação é importante no âmbito da identificação das causas e circunstâncias de morte, que é realizada pela Antropologia e Patologia Forenses. O estudo do PMI é particularmente importante na investigação criminal em casos de morte violenta como suicídio, homicídio ou acidente e em situações de causa indeterminada com suspeita de interferência externa [1-4].

A morte é um processo contínuo que evolui de forma variável em função do tempo decorrido e das condições ambientais onde o corpo está depositado. Teoricamente, através da observação e interpretação dos vários fenómenos cadavéricos *post mortem*, é possível estimar de forma aproximada (em horas, dias, meses ou anos) há quanto tempo a morte de um indivíduo ocorreu [2]. A análise destas alterações para a estimativa do PMI pode ser feita através de métodos clássicos ou recorrendo a métodos mais atuais.

No entanto, não existe nenhum método que consiga determinar com rigor o momento exato da morte de um indivíduo. Assim, o estudo do PMI é atualmente um desafio científico de elevado interesse para as ciências forenses, sendo relevante a procura de novos métodos que ajudem a estabelecê-lo. Deste modo, graças ao desenvolvimento e à utilização de métodos e de tecnologias mais recentes na área forense, que auxiliam o estudo do PMI, a estimativa do tempo de morte deve ser considerada, cada vez mais, tema de investigação.

1.1.1 MÉTODOS CLÁSSICOS

As alterações que ocorrem após a morte, mais comumente conhecidas por “fenómenos *post mortem*”, podem ser analisadas através de métodos clássicos descritos na literatura. Estas mudanças podem demonstrar sinais de morte precoce

ou tardia, além de evidenciar transformações destrutivas ou conservadoras dos tecidos do corpo [2]. O estudo minucioso destas alterações envolve a aplicação de conhecimentos e metodologias de diversas áreas da ciência, principalmente as ligadas às disciplinas forenses.

Ao recorrer a métodos clássicos, a estimativa do PMI é feita a partir da análise macroscópica e/ou mecânica dos processos de decomposição do cadáver, tais como o aparecimento dos livores cadavéricos, do arrefecimento corporal, da rigidez cadavérica e da flacidez cadavérica. Podem ainda ser feitos estudos da variação das concentrações de eletrólitos no humor vítreo e nos líquidos sinovial e cefalorraquidiano, além da análise de alterações na atividade enzimática e na quantidade dos seus substratos em diversas matrizes corporais. Estudos entomológicos (colonização do cadáver por insetos), microbiológicos (caracterização de microrganismos em função do tempo *post mortem*) ou ainda estudos de botânica forense também são utilizados para contribuir com a estimativa deste intervalo [2,5].

Embora sejam capazes de ajudar na estimativa do tempo de morte, os fenômenos descritos acima são suscetíveis de avaliação subjetiva, o que contribui para a obtenção de eventuais diferenças nos resultados das avaliações destas alterações cadavéricas. Além disso, os fenômenos *post mortem* são instáveis, uma vez que podem ser influenciados por múltiplos fatores internos e externos ao cadáver [5-6]. Estas variações afetam a velocidade, a intensidade e o período de duração dos processos de decomposição do cadáver, tornando a identificação das alterações *post mortem* imprecisas e não uniformes e contribuindo para o aumento de incertezas na determinação do PMI. Desta forma, é necessária a realização de mais estudos que permitam estabelecer o PMI de forma mais precisa e que conduza a menos erros associados ao estudo.

1.1.2 MÉTODOS ATUAIS

As pesquisas atuais para estimativa do PMI analisam as alterações *post mortem* com recurso a tecnologias e metodologias recentes aplicadas à investigação forense. Alguns dos aspetos positivos destes métodos são caracterizados pela estimativa mais rigorosa do PMI, pela existência de uma correlação estatisticamente significativa com o tempo de morte e pela rapidez da análise. Os estudos recentes recorrem à análise de diversos materiais biológicos, tais como humor vítreo, sangue,

saliva, líquido sinovial e tecido cerebral [7-9]. Em oposição aos métodos clássicos, estes estudos são feitos através da análise do material genético presente nas amostras, seja através da análise dos níveis de metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) [10], seja pela análise da degradação de ácidos nucleicos [11-12].

➤ ANÁLISE DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

A análise dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) é uma ferramenta atual de grande utilidade para as Ciências Forenses. Este tipo de análise é amplamente utilizado em investigações de filiação, identificação de indivíduos e de vestígios biológicos, determinação da causa da morte e na estimativa do PMI [13-15].

A degradação *post mortem* do ácido ribonucleico (RNA) ocorre de forma rápida e está relacionada com o tempo decorrido após a morte, o que faz com que esta molécula seja um bom parâmetro de pesquisa para estimar intervalos *post mortem* curtos. Por ser uma molécula de cadeia simples, o RNA é considerado mais instável e vulnerável, sendo afetado mais rapidamente por fatores físicos e químicos, intrínsecos e extrínsecos ao cadáver. No entanto, a sua análise necessita de um elevado número de etapas de processamento, o que a torna mais dispendiosa, demorada e complexa e o risco de ocorrerem contaminações durante o processamento laboratorial é grande. Estas características tornam a utilização da análise do RNA menos favorável para a estimativa do intervalo *post mortem* [5,14].

Por sua vez, a análise do ácido desoxirribonucleico (DNA), quando utilizada para estimar o PMI, é considerada mais robusta do que a do RNA. O DNA degrada-se mais lentamente do que o RNA por ser uma molécula de cadeia dupla, o que lhe confere maior resistência e estabilidade às diversas condições do meio ambiente, tornando-o útil para estimativas de intervalos *post mortem* mais longos. Embora seja mais resistente, o DNA ainda apresenta sensibilidade a fatores intrínsecos e extrínsecos ao cadáver, pelo que será útil na estimativa do PMI através da análise da sua degradação [13,15,17]. Estudos demonstraram que existe uma correlação linear, gradual e significativa entre o aumento da degradação do DNA proveniente de tecidos moles e o tempo decorrido após a morte, revelando o potencial da utilização deste método na estimativa do PMI [16-17,22-25]. Verificou-se também que o material genético dos tecidos cerebrais possui maior potencial na estimativa

deste intervalo do que os outros órgãos, visto que o seu material genético parece estar menos vulnerável à degradação [16,22-23,25].

Apesar dos resultados promissores, a análise do DNA proveniente de órgãos e de outros tecidos moles para estimativa do PMI é limitada. Por serem materiais biológicos mais suscetíveis à degradação, apenas permitem estimar intervalos *post mortem* de curta duração (até 72 horas após a morte). Esta limitação faz com que seja impossível a sua utilização quando se pretende estudar cadáveres com um tempo de morte mais prolongado, visto que no período da análise as amostras já estariam inutilizadas. Apesar da maior resistência do DNA proveniente do tecido cerebral ao processo de putrefação, este órgão não pode ser utilizado como método para estimar o PMI em casos de afogamento, de traumatismo craniano e de ferimentos na cabeça resultantes de disparo por arma de fogo, uma vez que a sua degradação se inicia mais rapidamente nestas situações [16,26].

Ao analisar os estudos sobre a estimativa do PMI, é perceptível a necessidade de haver cada vez mais alternativas para estimar este intervalo, principalmente de metodologias que possam abranger o cálculo de intervalos *post mortem* mais longos, utilizando materiais biológicos menos suscetíveis à rápida deterioração do seu material genético, como é o caso dos pelos/cabelos.

➤ ANÁLISE DOS FATORES AMBIENTAIS

Alguns fatores ambientais, tais como a temperatura, a exposição à luz solar, a humidade e o pH, vão atuar na decomposição do cadáver e na degradação do seu material genético. Uma vez que interferem nos processos que ocorrem após a morte, o seu estudo pode ser importante para a estimativa do PMI [1,15]. Apesar da relevância do seu estudo, atualmente não existe nenhum método *standard* para relacionar a influência destes fatores na degradação do cadáver e do seu material genético com o intervalo *post mortem*.

A temperatura é capaz de interferir na decomposição do cadáver e do seu material genético, uma vez que influencia os diversos processos biológicos, metabólicos e bioquímicos, sendo o seu estudo útil na estimativa do PMI [1,16,27-28]. No entanto, fatores externos como o vento e os raios solares podem interferir com a temperatura do corpo e do ambiente, principalmente em espaços abertos e desprotegidos [28,36]. Sendo assim, na maioria das vezes, não é possível obter a

informação de todas as variações de temperatura que ocorreram no local em que o cadáver esteve exposto [28]. Estes fatores interferem na recolha dos dados a serem analisados e, conseqüentemente, na exatidão dos resultados obtidos para a estimativa do PMI.

A humidade é um fator muito importante porque atua na autólise celular e na fragmentação do DNA. Desta forma, o estudo deste fator pode ser útil para estimar o tempo decorrido após a morte. Estudos demonstraram que, quando comparados com climas quentes e secos, os climas quentes e húmidos são os que mais interferem no processo putrefativo [27-29].

O pH do solo pode interferir na decomposição dos tecidos biológicos e contribuir para a degradação do seu material genético, sendo o seu estudo também útil para a estimativa do PMI [28,36]. No entanto, os valores do pH do solo podem sofrer alterações quando chove, dificultando a sua medição. A ocorrência de chuva favorece o crescimento de microrganismos que podem influenciar os processos de degradação do cadáver, dificultando a estimativa do PMI [26,28].

É perceptível que o meio em que se encontra o cadáver, seja ele aquático ou terrestre, irá influenciar os processos de degradação *post mortem*. A água, salgada ou doce, possui características de pH, temperatura, salinidade e densidade que vão atuar de forma diferente no cadáver. A vantagem é que as características deste meio têm tendência a se manterem mais ou menos constantes, sendo mais fáceis de serem estudadas.

Considerando a influência das condições ambientais na decomposição do cadáver e do seu material genético, são necessárias mais pesquisas acerca deste assunto, que possam contribuir para estimativas mais corretas do PMI. No entanto, para a realização destes estudos, seria necessário simular as diversas condições ambientais de forma mais controlada para que seja possível recolher dados mais rigorosos que possam ser utilizados na estimativa do PMI. A análise controlada da evolução dos processos de degradação do cadáver em água do mar, cujas características de pH, salinidade, densidade e temperatura se mantêm mais ou menos constantes, pode ser um bom começo para este tipo de estudos.

1.2 ANÁLISE DOS CABELOS

Os pelos/cabelos são amostras frequentemente utilizadas em análises forenses. Visto que um elevado número de cabelos cai por dia de um mesmo indivíduo, estas amostras são muitas vezes encontradas em locais de crime, bem como no corpo e no vestuário da vítima e/ou do acusado, o que as torna úteis para a investigação criminal [18,30-31,35].

Devido à sua estrutura queratinizada, os cabelos são capazes de resistir a diferentes condições ambientais por longos períodos de tempo [19-20]. No entanto, os cabelos apresentam sinais de envelhecimento e degradação que podem estar relacionados com o tempo decorrido após a morte [19]. No âmbito das ciências forenses, a capacidade de degradação lenta deste material biológico é considerada uma vantagem quando comparada à rapidez da putrefação dos tecidos moles, principalmente tratando-se de amostras de cadáveres com intervalos *post mortem* mais prolongados e que estiveram expostos às diversas condições ambientais. Esta vantagem é caracterizada por um intervalo de tempo maior em que os cabelos permanecem viáveis possibilitando a análise do DNA, o que torna importante o estudo deste material biológico como forma de contribuir para estimar o PMI [19,21].

1.2.1 ESTRUTURA DOS CABELOS

Os pelos/cabelos são estruturas que se originam de pequenas invaginações da pele, denominadas por folículos pilosos (**Figura 1**) [18]. Os cabelos podem ser divididos em duas estruturas principais, a raiz e a haste. A raiz, porção proximal do cabelo, está localizada no folículo piloso no interior da pele e é composta pelo bolbo capilar e pela papila dérmica [20]. O bolbo capilar é a zona de proliferação do folículo piloso e contém a matriz germinativa, por sua vez a papila dérmica é responsável por nutrir o bolbo, visto que está situada em uma zona ricamente vascularizada [35]. A haste é a porção queratinizada e não viva que emerge da epiderme, estendendo-se do final da raiz até a extremidade distal do cabelo [20,35].

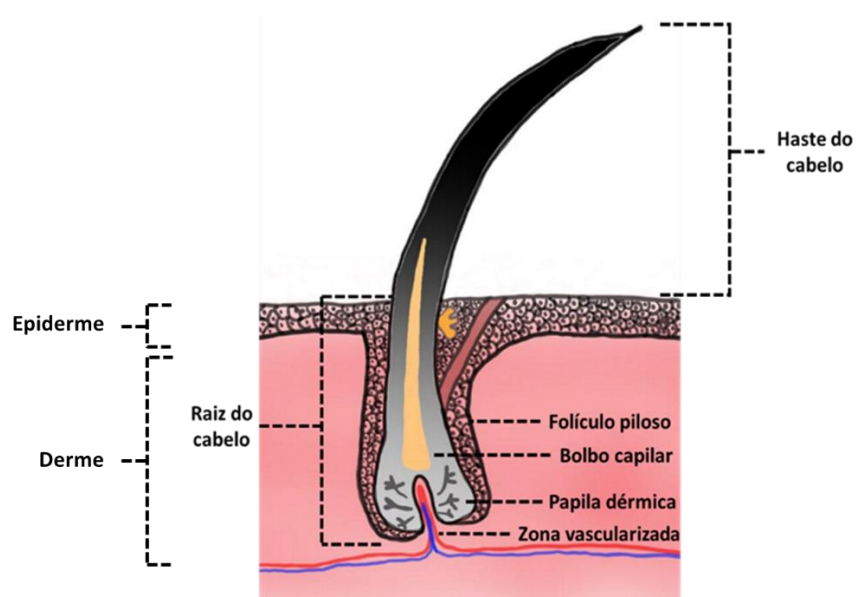


Figura 2 Identificação das estruturas do cabelo no interior da pele.

No que diz respeito à morfologia interna do cabelo, a haste é dividida em 3 camadas, designadas por cutícula, córtex e medula (**Figura 2**). Esta divisão estrutural é importante nos casos em que se deseja realizar a análise microscópica dos danos causados no cabelo e do grau da lesão ocorrida. A cutícula, camada mais externa do cabelo, é constituída por células não nucleadas e posicionadas em escamas que se encontram distribuídas ao longo de toda a haste, sendo a principal linha de defesa dos danos extrínsecos causados pelo meio ambiente [19,21,30]. O córtex, responsável pela resistência capilar, está localizado entre a cutícula e a medula e possui um diâmetro maior relativamente às outras camadas [19,21]. Esta camada é composta por melanina e por células queratinizadas, que se unem à cutícula e proporcionam resistência ao cabelo. Por sua vez, a medula é a porção mais interna do cabelo, permanecendo mais protegida dos danos extrínsecos, uma vez que está resguardada pela cutícula e pelo córtex. Ao final do seu desenvolvimento, as células da medula formam espaços inter e intracelulares contendo ar, responsáveis pelo isolamento do cabelo. Também foi observada a presença de lípidos nesta região, porém a utilidade destas estruturas e da medula ainda é desconhecida [19,51-52].

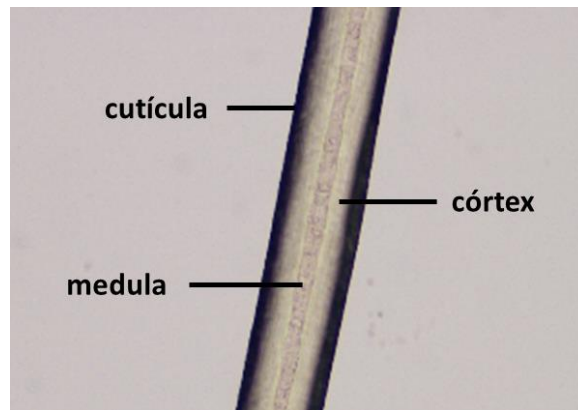


Figura 3 Morfologia da haste do cabelo, observado com uma amplificação de 10 vezes ao microscópio ótico.

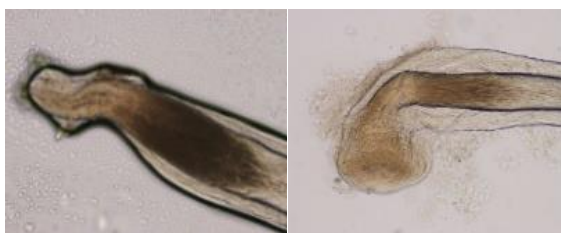
A morfologia dos cabelos e os danos causados na sua estrutura podem ser observados utilizando o microscópio ótico. É possível diferenciar as características de degradação *ante mortem* das características de degradação *post mortem* dos cabelos [19-20]. A análise das características *post mortem*, como o crescimento de fungos e as alterações estruturais devido ao processo de deterioração, podem ser utilizadas para ajudar na estimativa do PMI, pois possuem uma relação estatisticamente significativa com o tempo decorrido após a morte [19-21]. É o caso das alterações observadas na raiz dos cabelos, como a aparência de escova, a faixa escura perpendicular e a ponta queratinizada afiada, que indicam intervalos *post mortem* maiores que 90 dias. Os cabelos com aparência *ante mortem* normal e com faixa amarelada na raiz representam intervalos *post mortem* inferiores a 90 dias [20-21]. Apesar das vantagens descritas, não se consegue determinar o PMI com rigor somente através da observação ao microscópio das alterações capilares *post mortem*. Por este motivo, é necessária a realização de estudos moleculares nas amostras de cabelo, utilizando as informações imagiológicas para complementar o estudo.

1.2.2 FASES DE CRESCIMENTO DOS CABELOS

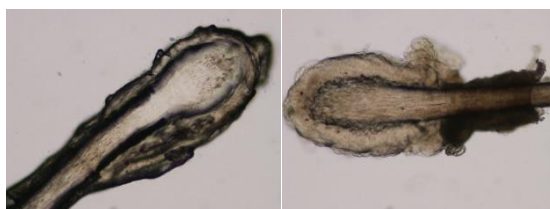
O processo de formação dos cabelos é caracterizado por três etapas distintas de desenvolvimento, denominadas anagénese, catagénese e telogénese (**Figura 3**). Estas fases de crescimento e a estrutura dos cabelos estão profundamente

relacionadas com a quantidade de DNA presente nas amostras. O DNA existente nos cabelos localiza-se no bolbo capilar, apresentando uma maior quantidade endógena de DNA nesta região do cabelo devido à existência de irrigação sanguínea providenciada pelos vasos situados na papila dérmica [18-19].

A)



B)



C)

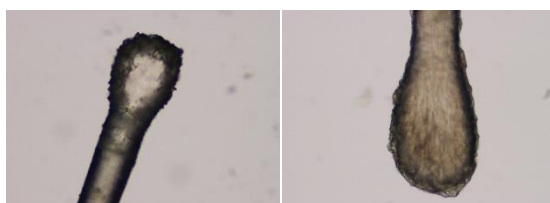


Figura 3 Fotografias de seis amostras diferentes de cabelos analisados neste trabalho, representativas das fases de crescimento. A observação foi feita com uma amplificação de 10 vezes ao microscópio ótico. **A)** Cabelos em fase de anagénese.

B) Cabelos em fase de catagénese. **C)** Cabelos em fase de telogénese.

➤ ANAGÉNESE E CATAGÉNESE

A primeira fase de crescimento é chamada anagénese e inicia-se no bolbo capilar, local onde se encontram as células responsáveis pela formação e pelo desenvolvimento dos novos cabelos (**Figura 3A**). Esta fase inicial representa cerca de 80 a 95% dos cabelos que estão fixados no couro cabeludo. Os cabelos permanecem em anagénese (crescimento ativo) por cerca de 3 a 6 anos e, em

seguida, transitam para as duas últimas fases até o momento em que se desprendem do couro cabeludo, dando início a um novo ciclo com a formação de novos cabelos no folículo. Conforme ocorre o crescimento ativo do cabelo, as células da haste passam por processos de queratinização e de apoptose para a constituição das camadas desta estrutura, ocorrendo uma diminuição drástica da quantidade de DNA nuclear presente, dificultando a análise deste material genético a partir desta estrutura [20,30,34].

Posteriormente, inicia-se a fase de regressão do crescimento capilar, designada por catagénese, com duração de aproximadamente 3 a 4 semanas (**Figura 3B**) [30]. Este período é definido pelo término da recepção de nutrientes do cabelo, pela diminuição do tamanho do folículo piloso e pela redução do crescimento capilar. Nesta fase, a raiz do cabelo começa a desprender-se do folículo piloso, permanecendo parcialmente fixada até que se inicie a próxima etapa [20,30].

Deste modo, os cabelos em fase de anagénese apresentam a sua raiz intacta na fase mitótica, com alta taxa de multiplicação e diferenciação celular, sendo a quantidade de DNA nuclear presente elevada [31-32,35]. Na fase de catagénese, a quantidade de DNA nuclear presente na raiz é também considerada elevada, visto que ainda não foi atingida a última fase de crescimento do cabelo. Uma vez que cerca de 80 a 97% dos cabelos fixados no couro cabeludo estão na etapa de anagénese ou de catagénese, os cabelos que forem arrancados vão ter, à partida, quantidades de DNA nuclear suficientes para a obtenção de perfis genéticos completos [20,32-34]. Para além do DNA presente na raiz, ao serem arrancados os cabelos podem conter fragmentos agregados do tecido epitelial envolvente, que são também fonte de DNA nuclear [33-34].

➤ **TELOGÉNESE**

Por último, num período que dura cerca de 3 a 4 meses, desenvolve-se o estágio de repouso, intitulado telogénese (**Figura 3C**). Esta etapa é assinalada pelo desaparecimento do bolbo capilar e pelo término definitivo do crescimento do cabelo, que se desprende totalmente do folículo piloso e cai ao longo do dia devido ao crescimento de um novo cabelo no mesmo folículo, que “empurra” o antigo. Desta forma, inicia-se um novo ciclo capilar [20,30]. Cerca de 95% dos cabelos que

se desprendem do couro cabeludo estão nesta etapa de crescimento, sendo, portanto, os mais comumente encontrados em cenas de crime [30-31,33].

Visto que os cabelos em telogénese, muitas das vezes, não possuem o bulbo capilar e dispõem de pouca quantidade de DNA nuclear, sendo o DNA presente altamente degradado, a utilização da haste do cabelo para a análise deste tipo de material genético é mais difícil [30,33-34]. Embora a haste capilar não seja considerada uma fonte viável de DNA nuclear, é possível a obtenção do DNA mitocondrial, que pode ser utilizado na análise genética. No entanto, este tipo de DNA possui algumas desvantagens quando comparado com o DNA nuclear, tais como a hereditariedade exclusiva por via materna e a ocorrência de haplótipos comuns numa mesma população, diminuindo o poder discriminativo desta molécula e dificultando o processo de identificação de indivíduos [30-32,37]. Para além disso, a haste do cabelo possui um maior grau de exposição a fatores externos, influenciando a qualidade do DNA disponível para análise [30].

Desta forma, o estudo do DNA nuclear da raiz é mais vantajoso, sendo a análise do DNA mitocondrial feita quando não é possível obter resultados com a análise do DNA nuclear. O DNA nuclear dispõe de um elevado poder discriminativo, sendo utilizado para a distinção entre indivíduos através da análise de marcadores genéticos altamente polimórficos. Esta característica também favorece a preferência para a escolha do DNA como fonte de pesquisa. Atualmente, os *Short Tandem Repeats* (STR) são os marcadores genéticos mais utilizados.

1.2.3 ANÁLISE DA QUANTIDADE E DA DEGRADAÇÃO DO DNA DOS CABELOS E A ESTIMATIVA DO PMI

Conforme referido anteriormente, o cabelo é um material biológico estável e resistente às alterações ambientais, porém não é indestrutível e encontra-se suscetível à degradação. Estudos demonstraram que a degradação do DNA da raiz capilar está diretamente relacionada com os fatores ambientais do local em que os cabelos permaneceram expostos e com a duração desta exposição [19-20,38-40].

Ao analisar a degradação do DNA nuclear das raízes de cabelos submersos em água de nascente, Fripiat et al. [40] demonstrou que a deterioração do DNA nuclear das células capilares tem início após 72 horas de submersão. A partir deste

momento, foi observada uma diminuição significativa na quantidade e um aumento significativo na degradação do DNA nuclear das raízes dos cabelos até que, ao fim de 10 dias de estudo, a destruição celular e a degradação do DNA nuclear eram quase completas.

Pela análise feita por Frippiat et al. [40], foi possível ainda perceber que, apesar de ocorrer a degradação do DNA nuclear dos cabelos ao fim de 3 dias após a imersão, esta deterioração é considerada lenta quando comparada com a rapidez da putrefação dos órgãos e outros tecidos moles e, conseqüentemente, com a rápida degradação do seu material genético. A correlação demonstrada por Frippiat et al. [40] entre a degradação e diminuição da quantidade do DNA dos cabelos ao longo do tempo de imersão em água da nascente, mostra a importância deste tipo de estudos para a estimativa do PMI para períodos mais longos do que os alcançados através da análise dos tecidos moles.

Apesar das vantagens da análise do DNA nuclear presente nas raízes dos cabelos, a maioria dos estudos que utilizam este material biológico como meio para estimar o PMI, têm como principal foco a sua morfologia, avaliando as alterações macro e microscópicas provocadas pelo ambiente ao qual estiveram expostos. Deste modo, é evidente a escassez de trabalhos que relacionem a degradação do DNA presente nas raízes dos cabelos com a estimativa do intervalo *post mortem*, evidenciando a necessidade de realizar mais estudos a respeito deste assunto.

➤ UTILIZAÇÃO DO RT-PCR E DE KITS COMERCIAIS

É possível que as amostras biológicas encontradas em cenas de crime, principalmente quando expostas aos diversos fatores ambientais, apresentem uma baixa quantidade e um alto nível de degradação do seu DNA [45]. Por este motivo, é importante a utilização de metodologias que possam superar estas dificuldades, permitindo análises que forneçam resultados cada vez mais informativos e que tenham a capacidade de utilizar a pouca quantidade de amostra disponível da melhor forma possível. O *Real-Time* PCR é um método com alta sensibilidade e precisão que, quando associado a kits comerciais apropriados, é capaz de amplificar, quantificar e indicar o índice de degradação do DNA proveniente das amostras analisadas [46-47].

Atualmente existem diversos kits comerciais disponíveis para a utilização com a tecnologia de RT-PCR que fornecem informações sobre a quantidade de DNA humano, a quantidade de DNA masculino e o índice de degradação do DNA. Estes kits permitem a amplificação de alelos específicos, cuja localização no genoma humano e a quantidade de pares de base diferem de acordo com o kit utilizado [45]. Em associação com o RT-PCR, estes kits comerciais são muito utilizados para a análise dos STR, uma vez que a quantidade de DNA das amostras é essencial para a obtenção de perfis genéticos completos [46-47]. Desta forma, através da informação da quantidade de DNA disponível, é possível identificar a quantidade de amostra que deverá ser utilizada para a amplificação, a fim de obter perfis genéticos informativos. Além disso, a informação fornecida sobre a degradação do DNA das amostras permite identificar, antes da realização da amplificação, se será possível obter um perfil STR, auxiliando na diminuição de custo e na avaliação da qualidade dos perfis que seriam obtidos [45-46].

➤ **ANÁLISE DE POLIMORFISMOS *SHORT TANDEM REPEATS***

Os *Short Tandem Repeats* (STR) são sequências repetitivas de padrões nucleotídicos que estão localizadas no genoma humano. Os STR apresentam um elevado grau de variabilidade entre indivíduos, sendo atualmente muito utilizados na identificação individual [41-44]. A análise destes marcadores é feita por reação em cadeia de polimerase (PCR), sendo uma técnica simples e de rápida execução. Atualmente, a sensibilidade deste tipo de análise é elevada, existindo vários kits comerciais desenvolvidos para o efeito, permitindo a análise do DNA nuclear em amostras exíguas e com algum grau de degradação [42-44].

A resistência do DNA dos cabelos a possíveis danos causados pelo ambiente é, novamente, uma das vantagens da utilização deste material biológico na análise dos STR. Esta característica aumenta a probabilidade de se obter perfis genéticos mais informativos devido ao menor grau de degradação do DNA a ser analisado [19-21]. A utilização de estruturas como o bulbo capilar e o tecido epitelial aderente às raízes dos cabelos pode permitir a obtenção de perfis genéticos completos e de boa qualidade [31,33-34]. As fases de crescimento em que os cabelos se encontram também vão influenciar a possibilidade de obtenção de perfis genéticos, uma vez que estão diretamente relacionadas com a quantidade e a qualidade do DNA

presente. Desta forma, principalmente quando expostos aos diferentes fatores ambientais, a probabilidade de obtenção de perfis genéticos completos a partir de cabelos que se encontram nas fases ativas de crescimento (anagénesse e catagénesse) é maior do que a partir de cabelos que se encontram na fase de telogénese [31-32,35].

Deste modo, a fim de aumentar a informação sobre a obtenção de perfis genéticos que possam ser utilizados na área forense, é importante efetuar estudos que possam contribuir para a determinação da viabilidade do DNA nuclear proveniente de amostras que foram sujeitas à degradação.

O objetivo principal deste trabalho foi investigar, com base na análise da quantidade e do índice de degradação do DNA dos cabelos submersos em água do mar, a possibilidade da utilização desta metodologia como alternativa capaz de estimar o intervalo *post mortem*, bem como permitir a identificação genética do cadáver.

MATERIAIS E MÉTODOS

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi feito na Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF-DN). Para a realização do procedimento experimental, foi utilizado um cadáver com cabelo e com o tempo de morte estabelecido e curto. A informação do tempo decorrido entre a morte e o início do projeto é importante para a análise dos resultados obtidos no fim da experiência. As informações do cadáver disponibilizado pelo INMLCF-DN estão na **Tabela 1**. A recolha do material biológico a ser utilizado foi realizada na Unidade Funcional de Patologia Forense (UFPF) do Serviço de Clínica e Patologia Forenses (SCPF-N) do INMLCF-DN.

Tabela 3 Informações do cadáver disponibilizado para a experiência.

Género	Masculino
Data de nascimento	08/11/1935
Data da morte	11/02/2021
Horário da morte	19:41h
Data da recolha do couro cabeludo	23/02/2021

Após o posicionamento do cadáver em decúbito ventral, com o auxílio de um bisturi devidamente limpo e descontaminado, foi recolhido um fragmento de couro cabeludo, proveniente da porção parietal do crânio do cadáver, com 4 cm de comprimento, 3 cm de largura e 0,4 cm de espessura (**Figura 4**).



Figura 4 Fragmento de couro cabeludo recolhido do cadáver.

Com o objetivo de simular uma situação de afogamento em água do mar, em que a cabeça do cadáver pode estar total ou parcialmente submersa, o fragmento de couro cabeludo foi cortado ao meio. Em seguida, utilizando um suporte flutuante constituído por dois fragmentos de esferovite, unidos por uma linha, fixaram-se ambos os fragmentos de couro cabeludo, um na porção inferior e o outro na área lateral do suporte (**Figura 5**).



Fragmento 1



Fragmento 2

Figura 5 Fragmentos 1 e 2 de couro cabeludo fixados, respetivamente, nas porções inferior e lateral do suporte de esferovite.

A experiência teve início no dia 23 de fevereiro de 2021 e término no dia 11 de março do mesmo ano, com duração de 17 dias consecutivos. O primeiro dia da experiência, ou seja, o dia em que os fragmentos de couro cabeludo foram

posicionados na água, equivale ao 12º dia após a morte do indivíduo. Por sua vez, o último dia do estudo equivale ao 28º dia após a morte.

Desta forma, no dia 23 de fevereiro, o suporte de esferovite contendo os fragmentos de couro cabeludo foi posicionado num recipiente de plástico com água do mar. A disposição dos fragmentos de couro cabeludo no suporte flutuante permitiu que o fragmento número 1 ficasse totalmente submerso na água, mas sem estar comprimido contra as paredes do recipiente, e que o fragmento número 2 permanecesse parcialmente submerso na água do mar (**Figura 6**). A imobilização do suporte de esferovite, a manutenção do nível de água na zona lateral do fragmento 2 de couro cabeludo e a entrada de ar no interior do reservatório foram possíveis através da utilização de uma tampa plástica com furos em sua superfície.



Figura 6 Fragmento número 1 de couro cabeludo totalmente submerso e fragmento número 2 de couro cabeludo parcialmente submerso em água do mar.

Com o auxílio de uma pinça devidamente limpa e descontaminada, foram recolhidas ao todo, sempre no mesmo horário, noventa e nove amostras de cabelo, identificadas por C1 a C99. Os primeiros três cabelos (C1 a C3) foram colhidos no dia 23 de fevereiro diretamente da cabeça do cadáver com o intuito de identificar as condições do cabelo e do seu material genético antes da submersão dos fragmentos de couro cabeludo em água do mar. Por sua vez, os cabelos C4 a C99 foram recolhidos a partir dos dois fragmentos já submersos, sendo realizada a colheita diária de três cabelos de cada fragmento até o último dia do estudo. Desta forma, a colheita dos seis primeiros cabelos (3 cabelos de cada fragmento) foi efetuada no

dia 24 de fevereiro, ou seja, 24 horas após a submersão em água. E assim sucessivamente até ao final da experiência.

Os noventa e seis cabelos colhidos dos fragmentos submersos foram secos em papel filtro e todos os noventa e nove cabelos foram armazenados em tubos de 2mL, devidamente identificados, num frigorífico a -20°C até o momento da análise, de modo a impedir a degradação do material genético das amostras obtidas.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA DO MAR

A água do mar utilizada no estudo foi recolhida na Praia dos Ingleses, localizada na cidade do Porto, Portugal. As colheitas da água, realizadas sempre no período da tarde e no mesmo local, foram efetuadas nos dias 23 de fevereiro (garrafão 1, utilizado para os 5 primeiros dias da experiência), 28 de fevereiro (garrafão 2, utilizado do 6º dia ao 10º dia de submersão) e 5 de março (garrafão 3, utilizado para os 7 últimos dias do estudo). As amostras de água foram armazenadas em garrações de 6 litros e transportadas para a Unidade Funcional de Patologia Forense do SCPF-N para sua utilização na experiência.

A fim de simular a movimentação constante da água no mar, foi feita uma troca diária de cerca de dois terços da água do mar contida no recipiente de plástico a partir da água nos garrações. Com o intuito de manter a água do mar utilizada na experiência com as suas características originais, foram efetuadas recolhas a cada cinco dias, conforme já referido, substituindo periodicamente os garrações utilizados no processo.

Com o objetivo de caracterizar a água do mar utilizada na realização do procedimento experimental, foram medidos alguns parâmetros físico-químicos, tais como pH, salinidade, densidade e temperatura. Para a medição do pH, salinidade e densidade foram recolhidas diariamente amostras de água do mar contida no recipiente com os fragmentos de couro cabeludo, desde o dia 23 de fevereiro até o término da experiência. Estas amostras de água foram colhidas com o auxílio de uma pipeta plástica previamente esterilizada e armazenadas em tubos de 2mL, os quais foram acondicionados a -20°C até o momento das análises. A medição da temperatura foi feita diariamente na água do recipiente.

2.2.1 PH

A medição do pH da água do mar foi feita utilizando o aparelho pH-metro micropH 2000, da marca *Crison*, de acordo com as instruções do guia de utilização do equipamento. Este parâmetro foi medido no laboratório do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, em Portugal.

2.2.2 SALINIDADE E DENSIDADE

Os valores de salinidade e densidade da água do mar foram determinados utilizando um refratómetro de salinidade portátil, da marca *Mickcara*, seguindo as orientações descritas no manual do aparelho. Os intervalos de medição do refratómetro utilizado são de 1000 g/ml a 1070 g/ml para a densidade da água marinha e de 0 a 100 ‰ (ppt, traduzido do inglês para partes por mil) para a escala de salinidade. Antes da análise das amostras no refratómetro, foi feita a medição da salinidade e da densidade de uma amostra de água destilada, que serviu como controlo negativo, garantindo o bom funcionamento e a calibração do instrumento.

2.2.3 TEMPERATURA

A medição da temperatura da água do mar no interior do recipiente foi registada uma vez por dia, desde o início até o término da experiência, utilizando um termómetro para aquários da marca *Flamingo*. O instrumento permaneceu fixo e completamente submerso ao longo de toda a experiência.

2.3 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DOS CABELOS

Todos os cabelos recolhidos foram caracterizados macroscopicamente registando-se o comprimento e a cor. Em seguida, os cabelos foram observados ao microscópio ótico, da marca *Olympus*, com uma amplificação de 10 vezes. Foi

efetuado o registo fotográfico dos cabelos utilizando a câmara fotográfica digital acoplada ao microscópio.

As características observadas microscopicamente foram a presença ou ausência de bolbo e a fase de crescimento dos cabelos através da observação da extremidade proximal, a presença ou ausência e, caso se encontrasse presente, as características da medula ao longo de toda a extensão da haste dos cabelos, e a condição em que se encontrava a extremidade distal de cada um dos cabelos.

Após a observação dos cabelos ao microscópio, realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do SCPF-N, as amostras foram novamente armazenadas, nos seus respetivos tubos, a uma temperatura de -20°C.

2.4 ANÁLISE DO DNA DOS CABELOS

A lavagem dos cabelos e os processos de extração, quantificação, amplificação e eletroforese capilar do DNA dos cabelos foram realizados no Serviço de Genética e Biologia Forenses do INMLCF-DN.

2.4.1 EXTRAÇÃO

Antes de se proceder à extração do DNA, todos os cabelos foram lavados, a fim de remover possíveis sujidades e contaminantes. Os três cabelos colhidos diretamente da cabeça do cadáver foram lavados com Etanol a 70% e em seguida com água destilada. Os restantes 96 cabelos foram lavados apenas com água destilada. Como estes 96 cabelos se encontraram submersos em água do mar, optou-se por não fazer a lavagem com Etanol para evitar danos ao cabelo e perda de material genético. Todos os cabelos foram colocados em tubos para os processos de lavagem.

Para a lavagem com Etanol a 70%, adicionou-se a cada tubo contendo os cabelos, 2mL de Etanol a 70%. Os tubos foram colocados no aparelho *Eppendorf™ Thermomixer™ R (ThermoFisher Scientific)*, com agitação de 500 rpm, à temperatura de 20°C, durante 30 minutos. Em seguida, os tubos foram

centrifugados à velocidade 12000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, procedeu-se à retirada do Etanol utilizando uma micropipeta de 1000 µL [48].

Para a lavagem com água destilada, adicionou-se a cada tubo contendo os cabelos, 2mL de água destilada. Os tubos foram novamente colocados no aparelho *Eppendorf™ Thermomixer™ R (ThermoFisher Scientific)*, com agitação de 500 rpm, à temperatura de 20°C, durante 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados à velocidade 12000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, procedeu-se à retirada da água destilada utilizando uma micropipeta de 1000 µL [48].

Depois do processo de lavagem das amostras, um corte com cerca de cinco centímetros de comprimento foi feito na extremidade proximal de cada um dos cabelos, de modo que o fragmento a utilizar na extração do DNA seja o que contém o bulbo.

A extração do DNA das amostras de cabelos foi realizada no equipamento *AutoMate Express™ Instrument (Applied Biosystems)*, utilizando o kit *PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems)*, de acordo com as instruções descritas pelo fabricante [48]. Foi feita a montagem das colunas *PrepFiler LySep™ Columns* nos tubos *PrepFiler™ Sample Tubes* e, em seguida, as amostras de cabelo foram colocadas no interior destas colunas. Para a preparação da mistura de reação de extração, foram adicionados 500 µL de *PrepFiler™ Lysis Buffer* e 5 µL de DTT a cada amostra de cabelo (**Tabela 2**). Os cabelos foram incubados a 70°C, com agitação de 750 rpm por 40 minutos, no aparelho *Eppendorf™ Thermomixer™ R (ThermoFisher Scientific)*. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à velocidade 10000 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação, as colunas foram descartadas e os tubos contendo as amostras foram colocados no robot de extração, onde foi selecionado o programa adequado para o kit de extração utilizado.

Tabela 4 Volumes utilizados na preparação da mistura das reações de extração.

Constituintes da reação	Volume por amostra (µL)
<i>PrepFiler™ Lysis Buffer</i>	500
<i>DTT</i>	5
Volume final	505

Para além das amostras de cabelos, foram preparados controlos negativos apenas com os reagentes de extração (sem amostras) em todos os processos de extração realizados, servindo como controlo de qualidade interno. No robot de extração, o volume de eluição do DNA das amostras escolhido foi de 40 µL. Após a extração, as amostras foram acondicionadas a uma temperatura de -20°C.

2.4.2 QUANTIFICAÇÃO

A quantificação do DNA nuclear das amostras de cabelo foi realizada utilizando o kit *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit* (ThermoFisher Scientific – Applied Biosystems), no equipamento *7500 Real-Time PCR* (Applied Biosystems), utilizando o software *HID Real-Time PCR Analysis*. O kit *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit* permite analisar o DNA das amostras de forma quantitativa e qualitativa. Ao longo do processo de quantificação, este kit é capaz de detetar três alvos genómicos. O *Small Autosomal Target* (SA) e o *Large Autosomal Target* (LA), presentes no DNA autossómico, que permitem, respetivamente, determinar a concentração total de DNA genómico humano e estabelecer o Índice de Degradação (ID) das amostras. O terceiro alvo genómico, denominado *Y Chromosome Target*, possibilita a quantificação do DNA humano de origem masculina, assim como o cálculo da proporção de DNA masculino/feminino presente na amostra. Este kit apresenta um controlo interno da amplificação, que permite fazer a distinção entre falha de amplificação e ausência de DNA na amostra [49].

A quantificação do DNA extraído das amostras de cabelos foi feita de acordo com as recomendações do fabricante, apresentadas no manual do utilizador do kit *Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit* [49]. Esta técnica de quantificação baseia-se na comparação da fluorescência gerada pelo DNA das amostras ao longo dos ciclos de amplificação com a curva de calibração originada a partir das amostras padrão com concentrações conhecidas. Para a obtenção da curva de calibração, é necessário preparar as amostras padrão com diferentes concentrações. As amostras padrão foram preparadas utilizando a solução stock de 100ng/µL de *Quantifiler™ THP DNA Standard* e o tampão de diluição *Quantifiler™ THP DNA Dilution Buffer*, conforme descrito na **Tabela 3**. Estes padrões de quantificação

foram processados em duplicado com o objetivo de aumentar a precisão da curva de calibração.

Tabela 3 Diluições padrão utilizadas, preparadas com o *Quantifiler™ THP DNA Standard*.

<i>Standard (Std.)</i>	<i>Concentração (ng/μL)</i>	<i>Volumes (μL)</i>		<i>Factor de Diluição</i>
		<i>DNA</i>	<i>Dilution Buffer</i>	
Std. 1	50	10 <i>DNA Standard</i>	10	2 x
Std. 2	5	5 Std. 1	45	10 x
Std. 3	0,5	5 Std. 2	45	10 x
Std. 4	0,05	5 Std. 3	45	10 x
Std. 5	0,005	5 Std. 4	45	10 x

A mistura de reação para o processo de quantificação foi preparada conforme o indicado no manual do kit [49]. Foram dispensados 18 μL da *reaction mix* e 2 μL de amostra ou de padrão em seus respectivos poços numa placa *MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate* (**Tabela 4**). Em seguida, foram adicionados à placa um controlo negativo e dois controlos positivos. Para os controlos positivos, as concentrações utilizadas foram de 2 ng/μL e 0,1 ng/μL, respetivamente.

Tabela 4 Volumes utilizados na preparação da mistura das reações de quantificação.

Constituintes da reação	Volume por amostra (μL)
<i>Quantifiler™ THP PCR Reaction Mix</i>	10
<i>Quantifiler™ Trio Primer Mix</i>	8
<i>Amostra ou Standard</i>	2
Volume final	20

Por fim, a placa foi selada e introduzida no equipamento *7500 Real-Time PCR* para dar início ao processo. Posteriormente, os resultados foram analisados utilizando o *software HID Real-Time PCR Analysis* e com o auxílio de uma folha de cálculo Excel, obtiveram-se resultados como a concentração do DNA nuclear e o

índice de degradação das amostras. A quantidade de amostra adequada a utilizar na amplificação foi calculada a partir dos resultados da quantidade de DNA presente em cada amostra.

No final do procedimento, as amostras foram novamente armazenadas a -20°C.

2.4.3 AMPLIFICAÇÃO

A amplificação do DNA dos cabelos foi feita utilizando o kit comercial *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* [50]. Este kit é capaz de analisar 21 *loci* autossômicos, um Y-STR, um Y InDel e o marcador da amelogenina, num total de 24 *loci*, o que confere ao kit um elevado poder de discriminação.

A preparação da mistura de amplificação foi feita como o recomendado no manual do kit [50]. A mistura de reação foi dispensada nos *MicroAmp™ Reaction Tubes* com um volume final de 5 µL para cada amostra. Em seguida, as amostras foram adicionadas à reação. A quantidade de amostra a utilizar foi determinada, para cada amostra, tendo em conta os resultados da quantificação, variando de 1 a 7,5 µL de volume dispensado. Nos casos em que a quantidade de amostra adicionada à reação foi inferior a 7,5 µL, o volume restante foi preenchido com o tampão *Low-TE* até obter um volume final de 12,5 µL por tubo (**Tabela 5**). Em cada reação de amplificação foram também utilizados um controlo positivo, contendo *DNA Control 007*, e um controlo negativo.

Tabela 5 Volumes utilizados na preparação da mistura das reações de amplificação.

Constituintes da reação	Volume por amostra (µL)
<i>GlobalFiler™ MasterMix</i>	3,75
<i>GlobalFiler™ PrimerSet</i>	1,25
Amostra	entre 1 e 7,5
<i>Low-TE buffer</i>	até 7,5
Volume final	12,5

Para a reação de amplificação, foi utilizado o termociclador *GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems)* com o programa de 26 ciclos. No final do procedimento, as amostras foram novamente armazenadas a -20°C.

2.4.4 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar foi feita no sequenciador automático *Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer*, utilizando o polímero POP4 (*POP-4™ Performance Optimized Polymer 3500 Series*) e o capilar de 36 cm (3500xl-3500 Capillary Array 16x36cm). O módulo de corrida utilizado para o processamento das amostras foi o pré-definido para o kit *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* [50].

Para a preparação das amostras para a eletroforese, foi feita uma mistura contendo *Hi-Di™ Formamida* e o padrão interno de tamanhos (*GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0*), conforme descrito na **Tabela 6**. Esta mistura foi distribuída na placa de sequenciação (*MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate*) e em seguida adicionaram-se as amostras e o ladder alélico (*GlobalFiler™ Allelic Ladder*) aos respectivos poços da placa. Utilizou-se um ladder alélico a cada duas injeções. A placa foi selada e colocada no termociclador *GeneAmp™ PCR System 9700* para a desnaturação.

Tabela 6 Volumes utilizados na preparação da mistura para a eletroforese capilar.

Constituintes da reação	Volume por amostra (µL)
<i>Hi-Di™ Formamide</i>	12,5
<i>GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0</i>	0,5
Amostra ou <i>GlobalFiler™ Allelic Ladder</i>	1
Volume final	14

Após a desnaturação do DNA, a placa foi colocada no sequenciador automático para dar início à eletroforese capilar. O equipamento utilizado permite a separação dos fragmentos amplificados de DNA de acordo com o seu tamanho. Ao ser criado um campo elétrico, ocorre a migração dos fragmentos de DNA ao longo do capilar. Desta forma, os fragmentos de DNA de menor tamanho e peso molecular deslocam-

se mais rapidamente pelo capilar do que os fragmentos maiores, sendo, portanto, os primeiros a serem detetados pelo aparelho [50].

Terminada a eletroforese capilar, os resultados obtidos foram analisados no programa *GeneMapper™ ID-X Software*, obtendo-se os perfis genéticos de cada amostra. Estes perfis genéticos foram posteriormente analisados e classificados como completos, incompletos ou ausentes, de acordo com a presença ou ausência de marcadores e/ou alelos.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Foi realizada a análise estatística dos resultados obtidos no procedimento experimental a fim de verificar a possível utilização do método de análise usado no presente estudo para a estimativa do intervalo *post mortem*. As variáveis utilizadas para esta análise foram os parâmetros físico-químicos da água do mar (pH, salinidade, densidade e temperatura), o número de dias decorridos após a morte até ao término da experiência, a quantidade de DNA presente nos cabelos e o índice de degradação. Em relação à quantidade e ao índice de degradação do DNA dos cabelos do cadáver, foi utilizada a média aritmética destes parâmetros por dia de experiência, a fim de se obter um valor de tendência central que representasse o conjunto de dados por dia de estudo, facilitando a análise. Além disso, os resultados referentes à quantidade e à degradação do DNA foram analisados estatisticamente de duas formas: 1) utilizando os dados de ambos os fragmentos de couro cabeludo em conjunto; 2) utilizando os dados de cada fragmento de couro cabeludo em separado.

Foram feitos testes à normalidade das variáveis recorrendo ao teste de Kolmogorov-Smirnov, com o intuito de identificar qual o teste de correlação que deveria ser aplicado. Em seguida, foram testadas as correlações entre as variáveis recorrendo ao teste de correlação de Spearman, adequado para amostras que não possuem distribuição normal. O coeficiente de correlação de Spearman Rho (representado pela letra r) foi utilizado para indicar se a correlação existente é positiva ou negativa e qual o grau de associação entre as variáveis, que pode ser considerado forte (quanto mais próximo os valores estiverem de 1 ou -1) ou fraco (quanto mais próximo os valores estiverem de zero). Tanto o teste de Kolmogorov-Smirnov quanto o teste de Spearman foram executados no programa *IBM™ SPSS*

Statistics 27. Por fim, foi feita a análise de regressão linear simples utilizando as variáveis quantidade e degradação do DNA dos cabelos. Para este método, as variáveis a serem analisadas necessitaram de ser transformadas em logaritmo ($\log_{10}$), a fim de se obter uma relação linear com o tempo decorrido após a morte. Na análise de regressão, foi calculado o valor R^2 que representa, em percentagem, quanto uma variável é explicada pela variabilidade da outra variável. Além disso, em alguns casos foi possível obter as equações da regressão linear. Estes modelos podem ser utilizados para realizar previsões do intervalo *post mortem*.

O nível de confiança utilizado em todas as análises efetuadas foi de 95%, sendo assim, os resultados apenas foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade de significância foi $p \leq 0,05$.

Relativamente à análise dos STR dos cabelos do cadáver, foi feito um gráfico de colunas empilhadas a fim de apresentar a variação da qualidade dos perfis genéticos obtidos (completo, incompleto ou ausente) ao longo do tempo decorrido após a morte, visto que a quantidade dos perfis obtidos está diretamente relacionada com a quantidade e com o nível de degradação do DNA presente nas amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas contendo as informações da caracterização da água do mar (**Anexo I**), os dados referentes à análise dos cabelos ao microscópio (**Anexo II**), os valores de quantidade de DNA nuclear e de índice de degradação do DNA dos cabelos do cadáver, a classificação dos perfis genéticos (**Anexo III**) e o cálculo das médias e dos logaritmos destas variáveis (**Anexo IV, V, VI**), estão disponíveis na secção **Anexos**.

3.1 ANÁLISE DA QUANTIDADE E DEGRADAÇÃO DO DNA DOS CABELOS

Foi feito o teste à normalidade das médias aritméticas dos valores referentes à quantidade e ao índice de degradação do DNA dos cabelos do cadáver. Os resultados obtidos, apresentados na **Tabela 7**, mostram que a hipótese de que os dados obtidos possuem uma distribuição normal não se confirma, uma vez que os valores de p calculados foram todos inferiores a 0,05.

Tabela 7 Teste de normalidade às médias das variáveis em estudo.

Análise das médias	Valor p Kolmogorov-Smirnov	Distribuição
Quantidade de DNA	<0,001	Não normal
Degradação do DNA	0,001	Não normal
Quantidade de DNA do fragmento 1	<0,001	Não normal
Quantidade de DNA do fragmento 2	<0,001	Não normal
Degradação do DNA do fragmento 1	<0,001	Não normal
Degradação do DNA do fragmento 2	0,004	Não normal

Visto que nenhuma variável apresenta uma distribuição normal, foi escolhido o teste de correlação de Spearman para verificar a existência ou ausência de associação entre o tempo decorrido após a morte e as restantes variáveis. Na **Tabela 8** é possível observar os dados do teste de associação realizado, além da classificação do tipo de correlação entre as variáveis.

Tabela 8 Teste de correlação de Spearman entre as variáveis referentes ao DNA dos cabelos do cadáver e os dias após a morte.

Análise das médias	Correlação de Spearman		Classificação da Correlação
	Coefficiente de Correlação (r)	Valor p	
Quantidade de DNA	-0,819	<0,001	Significativa, negativa e forte
Degradação do DNA	0,574	0,016	Significativa, positiva e moderada
Quantidade de DNA do fragmento 1	-0,557	0,02	Significativa, negativa e moderada
Quantidade de DNA do fragmento 2	-0,836	<0,001	Significativa, negativa e forte
Degradação do DNA do fragmento 1	0,305	0,288	Não significativa
Degradação do DNA do fragmento 2	0,48	0,051	Não significativa

Ao analisar os dados obtidos através do teste de Spearman, é possível perceber que, à exceção dos resultados referentes à degradação do DNA dos cabelos recolhidos dos fragmentos 1 e 2 de couro cabeludo, analisados separadamente, todas as outras variáveis possuem uma correlação estatisticamente significativa (valor $p < 0,05$) com o tempo decorrido após a morte. As três variáveis relativas à quantidade de DNA dos cabelos apresentam uma relação negativa com os dias decorridos após a morte ($r = -0,819$; $r = -0,557$; $r = -0,836$), ou seja, quanto maior o período de tempo decorrido após a morte, menor é a quantidade de DNA presente nas amostras de cabelo do cadáver. Embora nem todas demonstrem uma correlação significativa com o tempo decorrido após a morte, as variáveis relativas à degradação do DNA dos cabelos apresentam coeficientes de correlação positivos ($r = 0,574$; $r = 0,305$; $r = 0,48$), o que indica que quanto maior o número de dias após a morte, maior será a degradação dos cabelos pertencentes ao cadáver. Estes resultados estão em conformidade com estudos anteriores que analisaram a degradação do DNA proveniente de cabelos que estiveram sujeitos a diferentes condições ambientais, incluindo análises de cabelos submersos em água [39-41].

De acordo com o coeficiente de correlação de Spearman, os valores da quantidade de DNA de todos os cabelos ($r = -0,819$; correlação forte) e dos cabelos parcialmente submersos em água ($r = -0,836$; correlação forte) possuem um maior grau de associação com os dias decorridos após a morte do que as restantes variáveis. Os resultados obtidos demonstram que a análise destas duas variáveis referentes à quantidade de DNA dos cabelos possui elevado potencial para ser utilizada na estimativa do PMI. Por sua vez, os resultados da degradação do DNA de todos os cabelos ($r = 0,574$) e da quantidade de DNA dos cabelos totalmente submersos em água do mar ($r = -0,557$) apresentam um grau de associação

moderado com os dias decorridos após a morte. Mesmo sendo uma associação menor do que as duas primeiras, esta correlação ainda é considerada significativa, contribuindo de igual forma para a estimativa do intervalo *post mortem*.

O teste de Spearman ainda demonstrou que o índice de degradação do DNA dos cabelos recolhidos dos fragmentos 1 e 2 de couro cabeludo, quando analisados em separado, não estão significativamente associados com os dias decorridos após a morte. Uma possível causa para a ausência de correlação entre estas variáveis e os dias após a morte é a elevada variabilidade dos dados, que é influenciada pela menor quantidade de cabelos analisados por dia devido à separação das amostras por fragmento de couro cabeludo. Estes fatores aumentam a dispersão dos dados e dificultam uma correlação significativa com os dias decorridos após a morte.

Foi realizada a regressão linear simples utilizando o logaritmo das médias das variáveis que demonstraram, através do teste de Spearman, uma correlação estatisticamente significativa com o tempo decorrido após a morte (**Figuras 7, 8, 9**). Esta análise demonstrou haver uma correlação entre o aumento da degradação do DNA e a diminuição da quantidade de DNA com o aumento dos dias após a morte.

Na **Figura 7** é apresentado o diagrama de dispersão entre a quantidade de DNA de todos os cabelos e os dias decorridos após a morte. Ao realizar a regressão linear destas variáveis, obteve-se um $R^2 = 0,7184$, o que significa que 71,84% da variação na quantidade de DNA dos cabelos é explicada pelo aumento dos dias decorridos após a morte. A equação linear que representa a interação entre as duas variáveis é $y = -0,1304x + 1,1095$. Este modelo pode ser usado para fazer previsões sobre a quantidade de DNA presente nos cabelos ao longo dos dias decorridos após a morte.

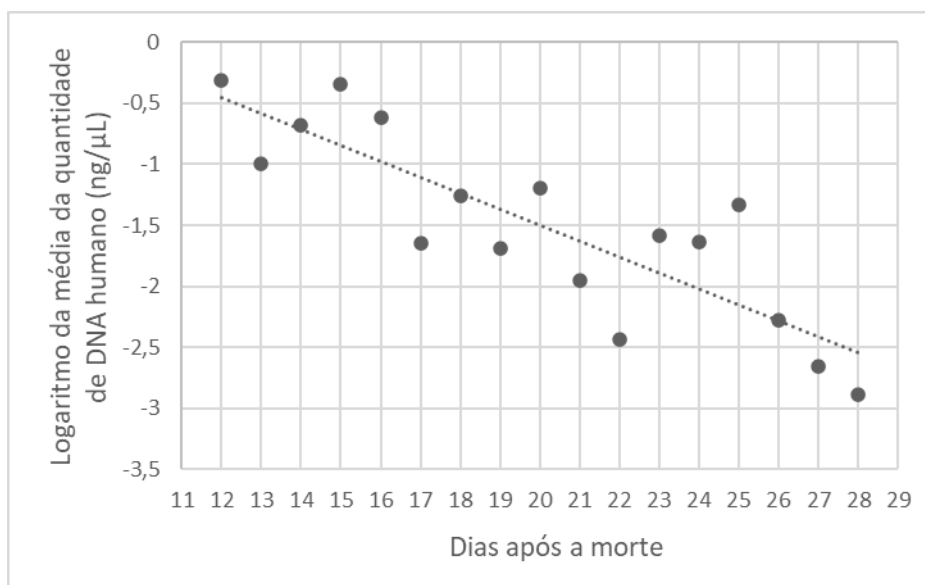


Figura 7 Gráfico de dispersão entre o logaritmo da média dos valores relativos à quantidade de DNA de todos os cabelos e os dias decorridos após a morte.

O diagrama de dispersão acima demonstra claramente a diminuição da quantidade de DNA dos cabelos conforme o aumento dos dias após a morte, estando em conformidade com o resultado obtido anteriormente através do teste de Spearman. Ao observar o gráfico da **Figura 7**, é perceptível a proximidade dos pontos com a reta de regressão, o que pode ser confirmado pelo valor de R^2 calculado ser próximo de um, demonstrando que a previsão está sujeita a uma baixa variabilidade. Sendo assim, este modelo de previsão que utiliza valores referentes à quantidade de DNA presente nos cabelos total e parcialmente submersos em água do mar, demonstra ter potencial para ser utilizado como mais uma ferramenta na estimativa do intervalo *post mortem*. No entanto, é importante a elaboração de mais estudos como o realizado que disponham de uma quantidade maior de amostras a analisar, a fim de aumentar a precisão dos resultados obtidos.

O gráfico de dispersão da **Figura 8** apresenta a relação entre os valores do índice de degradação do DNA de todos os cabelos e os dias decorridos após a morte. Através da análise de regressão linear foi possível obter o valor de $R^2 = 0,2386$, indicando que apenas 23,86% da variação no índice de degradação dos cabelos total e parcialmente submersos em água é explicada pelo aumento do tempo decorrido após a morte. Esta correlação indicada pelo R^2 , apesar de ser estatisticamente significativa, é considerada fraca. A equação obtida através da

regressão linear é $y = 0,026x + 0,0962$. Este modelo pode ser usado para fazer previsões sobre os valores do índice de degradação do DNA presente nos cabelos e o tempo decorrido após a morte.

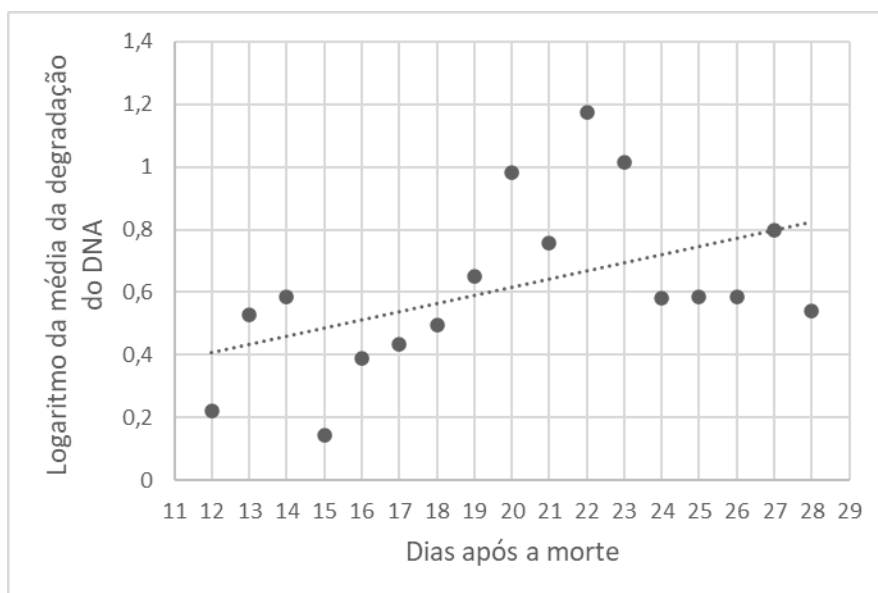


Figura 8 Gráfico de dispersão entre o logaritmo da média dos valores da degradação do DNA de todos os cabelos e os dias após a morte.

Através da análise do gráfico acima, é perceptível o aumento da degradação do DNA até o 23º dia após a morte. No entanto, a partir do 24º dia após a morte, ocorre uma diminuição no índice de degradação do DNA. Esta diminuição pode ser explicada pela forma como o índice de degradação é calculado. O cálculo é realizado através da razão entre o número de fragmentos do *Small Autosomal Target* (SA) amplificados e o número de fragmentos do *Large Autosomal Target* (LA) amplificados. Desta forma, o índice de degradação e o número de fragmentos do LA são inversamente proporcionais. É possível que, devido à baixa quantidade de DNA e ao alto nível de degradação do DNA dos cabelos recolhidos nos últimos 5 dias de experiência, o LA não tenha sido amplificado e seria, portanto, igual a zero, impossibilitando o cálculo do índice para estas amostras. Desta forma, as poucas amostras que permitiram a realização do cálculo do índice de degradação alteraram a tendência e podem não ser representativas do nível real de degradação.

Outro fator que possivelmente afetou o índice de degradação do DNA dos cabelos está relacionado com as fases de crescimento deste material biológico. Três

dos 12 cabelos analisados nos dias 24 e 25 encontravam-se em fase de anagéese ou de catagénese, o que significa que apresentavam maior quantidade de DNA do que os restantes cabelos colhidos nos mesmos dias. Este facto pode explicar também os valores mais baixos do índice de degradação calculados no 24º e 25º dias. Além disso, estes três cabelos foram recolhidos do fragmento de couro cabeludo parcialmente submerso em água do mar, onde se verificou que a degradação do DNA dos cabelos foi menor, o que pode ter contribuído para a alteração da tendência observada.

A **Figura 9** apresenta dois diagramas de dispersão, os quais demonstram a relação entre a quantidade de DNA dos cabelos recolhidos dos fragmentos 1 e 2 de couro cabeludo e os dias decorridos após a morte. O valor obtido através da análise de regressão linear é de $R^2 = 0,445$ para o fragmento totalmente submerso, indicando que 44,5% da variação na quantidade de DNA dos cabelos do fragmento 1 é explicada pelo aumento dos dias após a morte, e $R^2 = 0,6923$ para o fragmento parcialmente submerso, o que significa que 69,23% da variação na quantidade de DNA dos cabelos do fragmento 2 é explicada pelo aumento dos dias após a morte. A equação linear obtida para o fragmento totalmente submerso é $y = -0,1203x + 0,0572$ e a equação da regressão linear do fragmento parcialmente submerso é $y = -0,1263x + 1,2206$.

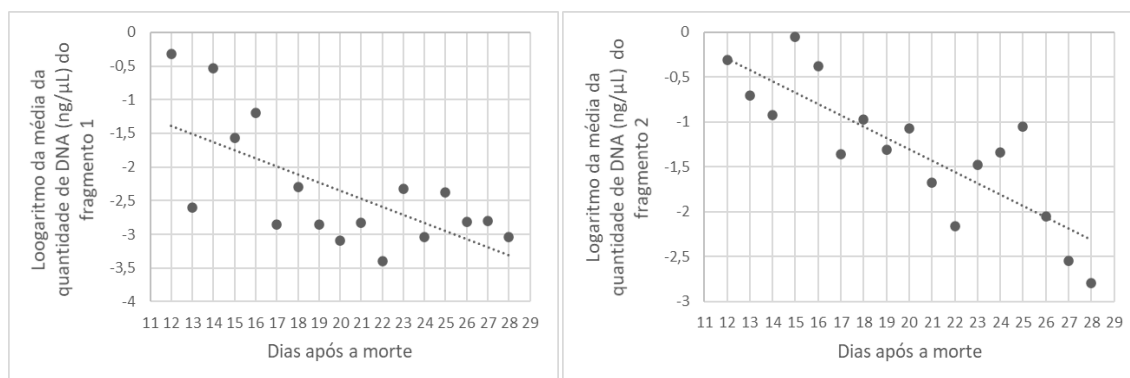


Figura 9 Gráficos de dispersão entre o logaritmo da média dos valores relativos à quantidade de DNA dos cabelos recolhidos dos fragmentos 1 e 2 e os dias decorridos após a morte.

Ao analisar os gráficos da **Figura 9**, é perceptível a diminuição da quantidade de DNA dos cabelos recolhidos dos dois fragmentos de couro cabeludo conforme os

dias foram aumentando. Esta relação está em concordância com os resultados obtidos através do teste de Spearman. Os pontos que representam a quantidade de DNA dos cabelos recolhidos do fragmento 1 estão mais afastados da reta de regressão do que os pontos relativos ao DNA dos cabelos do fragmento 2, o que pode ser comprovado pela análise dos valores de R^2 . Esta variação pode ser explicada pela relação entre a quantidade de DNA e a fase de crescimento dos cabelos, principalmente no 13º dia da experiência. Neste dia, todos os cabelos recolhidos do fragmento totalmente submerso em água do mar estavam em fase de telogénese, o que provavelmente proporcionou a drástica diminuição na quantidade de DNA destas amostras. Além disso, a degradação do DNA dos cabelos nos primeiros dias da experiência é menor, o que explica a maior quantidade de DNA presente nas primeiras amostras analisadas.

Um facto que também pode ser observado é o aumento na dispersão dos pontos em ambos os gráficos devido à diminuição do número de dados analisados na regressão linear, devido à análise em separado dos resultados obtidos por fragmento. Outro aspeto que pode ser identificado é a existência de menor quantidade de DNA nos cabelos recolhidos do fragmento 1 relativamente aos recolhidos no fragmento 2. Este facto leva a crer que o contacto permanente com a água do mar danifica mais rapidamente a estrutura dos cabelos.

Ainda é possível observar, através da análise dos valores de R^2 , que a previsão dos dias decorridos após a morte através da análise da quantidade de DNA presente nos cabelos parcialmente submersos ($R^2 = 0,6923$) está menos sujeita a variabilidade, podendo ser promissora a utilização deste modelo na estimativa do PMI. De qualquer modo, seria importante o aumento da amostragem em análises futuras, melhorando a precisão do método.

Os resultados obtidos para o índice de degradação dos cabelos pertencentes aos fragmentos 1 e 2 de couro cabeludo, quando analisados separadamente, não demonstraram uma correlação estatisticamente significativa com o tempo decorrido após a morte. No entanto, foram feitos gráficos de dispersão entre os valores de degradação de ambos os fragmentos e os dias após a morte, possibilitando uma melhor visualização dos dados obtidos (**Figura 10**).

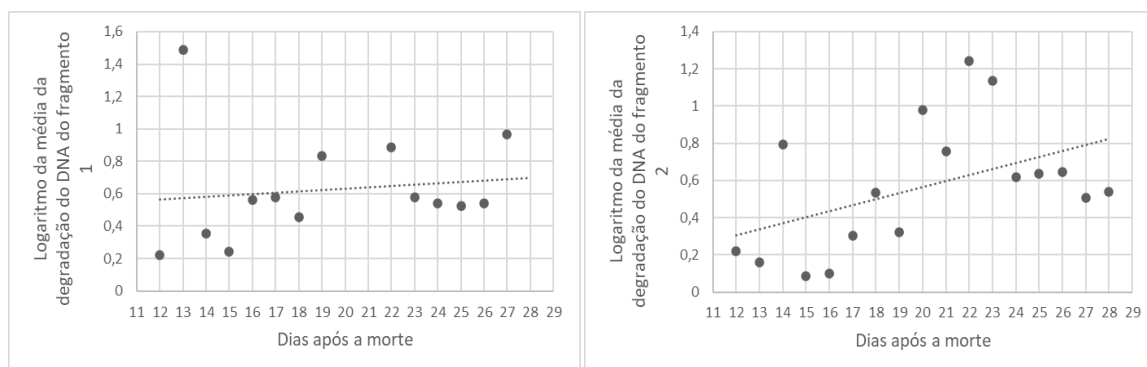


Figura 10 Gráficos de dispersão entre o logaritmo da média dos valores da degradação do DNA dos cabelos recolhidos dos fragmentos 1 e 2 e os dias decorridos após a morte.

Ainda que não se observe uma associação estatisticamente significativa em ambos os diagramas, é possível perceber o aumento da degradação do DNA dos cabelos conforme os dias após a morte aumentam. O facto dos pontos representados nos gráficos estarem maioritariamente afastados das linhas de tendência traçadas demonstra a pouca correlação entre as variáveis. Este facto é comprovado através dos resultados obtidos no teste de Spearman, realizado anteriormente. Por sua vez, a elevada dispersão dos pontos da linha de tendência pode ser explicada pelo menor número de dados utilizados ao fazer a análise dos resultados separadamente por fragmento.

O presente estudo demonstrou haver potencial nos métodos utilizados para a estimativa do PMI. De modo geral, é perceptível que as variáveis com maior grau de correlação com os dias decorridos após a morte são as relativas à quantidade de DNA de todos os cabelos recolhidos dos fragmentos 1 e 2 de couro cabeludo e as relativas à quantidade de DNA dos cabelos parcialmente submersos em água do mar. Desta forma, estes modelos são os mais indicados a serem utilizados na estimativa do intervalo *post mortem*. No entanto, é recomendada a realização de mais estudos, aumentando a amostragem, a fim de melhorar a precisão do método.

3.2 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA DO MAR

Visto que os parâmetros físico-químicos que caracterizam a água do mar podem estar relacionados com os resultados obtidos referentes à quantidade e à degradação do DNA dos cabelos do cadáver, foram realizados testes estatísticos a fim de demonstrar a existência ou ausência de associações entre estas variáveis. Visto que o objetivo principal deste trabalho é investigar a possibilidade de estimar o PMI com base na quantidade e no índice de degradação do DNA dos cabelos submersos em água do mar, apenas foi testada a relação entre as variáveis, uma vez que pode ser relevante a percepção da influência dos fatores ambientais na degradação da estrutura e do DNA dos cabelos, não tendo utilidade direta na estimativa do PMI.

A fim de determinar qual teste seria utilizado para verificar a presença ou ausência de correlação entre os dados referentes ao DNA dos cabelos do cadáver e os valores dos parâmetros físico-químicos que caracterizam a água do mar, foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov às variáveis temperatura, pH, densidade e salinidade. Como é possível visualizar na **Tabela 9**, o teste de Kolmogorov-Smirnov demonstrou que nenhuma das variáveis analisadas apresentava distribuição normal, visto que todos os valores de p foram inferiores a 0,05, rejeitando a hipótese de estas variáveis seguirem uma distribuição normal.

Tabela 9 Teste de normalidade aos valores dos parâmetros medidos para caracterização da água do mar.

Análise	Valor p Kolmogorov-Smirnov	Distribuição
Temperatura	0,009	Não normal
pH	0,016	Não normal
Densidade	<0,001	Não normal
Salinidade	<0,001	Não normal

Uma vez que nenhuma variável apresenta distribuição normal, foi escolhido o teste de correlação de Spearman para verificar a correlação entre os parâmetros físico-químicos da água do mar e a média dos dados referentes ao DNA dos cabelos. Os resultados do teste de associação estão representados na **Tabela 10**.

Tabela 10 Teste de correlação de Spearman entre os dados referentes ao DNA dos cabelos do cadáver e os valores dos parâmetros que caracterizam a água do mar.

Análises	Temperatura		pH		Densidade		Salinidade	
	Coeficiente de Correlação (r)	Valor p	Coeficiente de Correlação (r)	Valor p	Coeficiente de Correlação (r)	Valor p	Coeficiente de Correlação (r)	Valor p
Quantidade de DNA	-0,012	0,964	-0,51	0,036	0,134	0,609	0,134	0,609
Degradação do DNA	0,446	0,073	0,279	0,279	0,003	0,991	0,003	0,991
Quantidade de DNA do fragmento 1	-0,039	0,885	-0,193	0,474	-0,266	0,319	-0,266	0,319
Quantidade de DNA do fragmento 2	-0,077	0,769	-0,552	0,022	0,13	0,619	0,13	0,619
Degradação do DNA do fragmento 1	0,116	0,693	-0,139	0,636	0,112	0,703	0,112	0,703
Degradação do DNA do fragmento 2	0,477	0,053	0,317	0,216	-0,058	0,824	-0,058	0,824

De acordo com os dados do teste de Spearman, as únicas relações que apresentam significância estatística são entre a quantidade de DNA de todos os cabelos recolhidos do cadáver e o pH da água do mar ($p = 0,036 < 0,05$) e entre a quantidade de DNA dos cabelos parcialmente submersos e o pH da água do mar ($p = 0,022 < 0,05$). De acordo com o coeficiente de correlação de Spearman, o grau de associação entre estas duas variáveis e o pH é moderado ($r = -0,51$; $r = -0,552$). Desta forma, ao comparar este resultado com o grau de associação das mesmas variáveis com o tempo decorrido após a morte ($r = -0,819$; $r = -0,836$), é possível perceber que esta última é mais forte do que a relação com o pH. Sendo assim, a relação do pH com a quantidade de DNA dos cabelos não é considerada tão significativa. Em relação aos demais dados analisados, estes não apresentam correlação entre si, demonstrando a ausência de qualquer correlação estatisticamente relevante dos parâmetros físico-químicos da água do mar com a quantidade e degradação do DNA dos cabelos.

3.3 ANÁLISE DE PERFIS GENÉTICOS

A análise dos fragmentos de STR foi realizada para todas as amostras de cabelo recolhidas no procedimento experimental. Os perfis genéticos obtidos foram classificados como completos, incompletos ou ausentes. Pela observação da **Figura 11**, parece haver uma correlação entre o aumento do número de perfis incompletos e/ou ausentes e o número de dias após a morte.

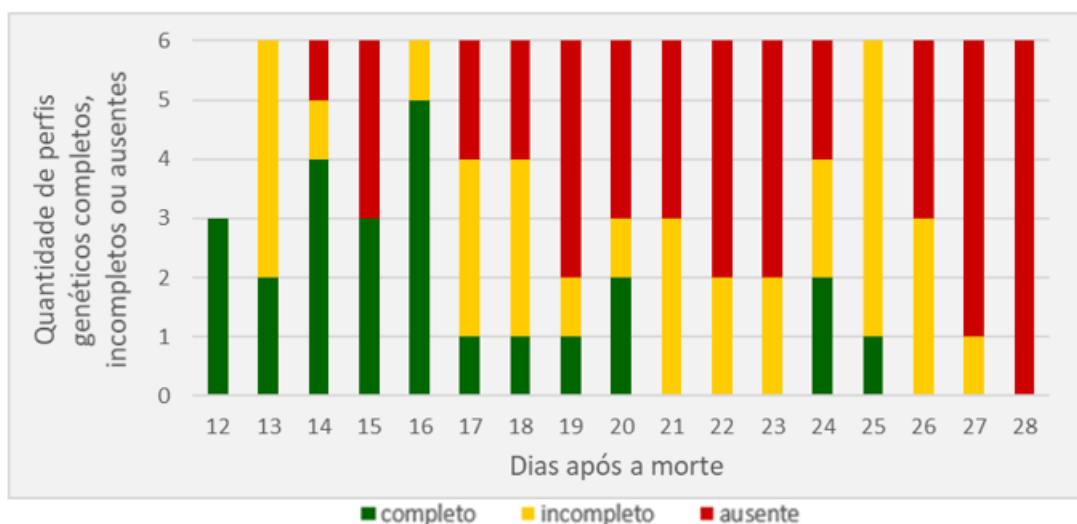


Figura 11 Classificação dos perfis genéticos obtidos através da análise dos STR nas amostras de cabelo recolhidas do cadáver.

Foram observados perfis genéticos completos do dia 12 ao dia 20 e nos dias 24 e 25 após a morte, sendo que a maior quantidade de perfis completos foi obtida nas amostras recolhidas do cadáver nos primeiros 5 dias do estudo. No 12º dia após a morte, ou seja, no primeiro dia da experiência, foram recolhidos 3 cabelos diretamente da cabeça do cadáver. Estes cabelos não estiveram expostos à água do mar, tendo-se obtido perfis completos nas três amostras. Este resultado é importante pois demonstra que não houve degradação significativa do material genético dos cabelos do cadáver nos 12 dias que passaram desde a morte até o começo da experiência, possivelmente pelo facto do cadáver ter sido armazenado no frio nas instalações do INMLCF-DN, estando por isso conservado. Por sua vez, é perceptível o aumento na quantidade de perfis genéticos incompletos e ausentes ao longo dos dias do procedimento experimental, demonstrando que quanto mais tempo os cabelos permaneceram em contacto com a água do mar, maior foi a degradação e a perda do material genético.

De acordo com o gráfico da **Figura 11**, ainda que a quantidade de cabelos com perfil genético completo tenha diminuído com o passar dos dias, provavelmente devido ao aumento da degradação do DNA, este tipo de perfil ainda pode ser observado 14 dias depois dos cabelos permanecerem em contacto com a água do mar. Estes resultados são promissores, visto que, apesar da degradação do material genético, é possível realizar a identificação de cadáveres encontrados neste tipo de ambiente após um período superior a uma semana. Este facto é importante,

principalmente, quando já não for possível obter perfis genéticos completos através da análise de outras estruturas do corpo.

Além dos aspetos citados acima, ao observar as tabelas no **Anexo II** e **Anexo III**, é notória a relação dos perfis genéticos obtidos com a diminuição da quantidade e o aumento da degradação do DNA das amostras e com as fases de crescimento dos cabelos. O número de perfis genéticos completos é maior quanto maior for a quantidade de DNA e menor for a degradação do mesmo. Por sua vez, os cabelos que se encontram nas fases de anagénese ou de catagénese permitem com maior frequência a obtenção de perfis genéticos completos do que os cabelos que estão na última etapa de crescimento, ou seja, na fase de telogénese.

CONCLUSÃO

IV. CONCLUSÃO

A análise do DNA das amostras de cabelo pertencentes ao cadáver, sujeitas à submersão total ou parcial em água do mar, demonstrou haver uma correlação entre o aumento da degradação do DNA e a diminuição da quantidade de DNA com o aumento dos dias decorridos após a morte. Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que estão em conformidade com estudos anteriores que analisaram a degradação do DNA de cabelos submersos em água.

O presente estudo demonstrou que o método de análise da quantidade e do índice de degradação do DNA dos cabelos do cadáver, quando submersos em água do mar, apresenta potencial para a estimativa do intervalo *post mortem*. Apesar do facto da degradação do DNA dos cabelos total e parcialmente submersos, quando analisados em separado, não ter demonstrado uma correlação estatisticamente significativa com os dias decorridos após a morte, todas as outras variáveis analisadas (quantidade de DNA dos cabelos totalmente submersos, quantidade de DNA dos cabelos parcialmente submersos, quantidade e índice de degradação de todos os cabelos) demonstraram correlações fortes e moderadas com o tempo decorrido após a morte, sendo estas últimas as mais indicadas a serem utilizadas em pesquisas futuras para a estimativa do PMI.

Relativamente à análise dos fragmentos de STR, ainda que a quantidade de cabelos com perfil genético completo tenha diminuído com o passar dos dias da experiência, foi possível a observação deste tipo de perfil 14 dias após a submersão dos cabelos em água do mar. Estes resultados são relevantes, principalmente, quando já não for possível obter perfis genéticos completos através da análise de outras estruturas do corpo, o que torna este método promissor na área de genética forense.

Apesar dos resultados positivos obtidos neste projeto, é importante a elaboração de mais estudos como o realizado que disponham de uma quantidade maior de amostragem, a fim de melhorar a precisão do método.

No final deste projeto foi possível perceber que a análise do DNA dos cabelos de cadáveres submersos em água do mar demonstra ter potencial tanto para ser utilizada como mais uma ferramenta na estimativa do intervalo *post mortem* quanto para a identificação de indivíduos por períodos que são considerados mais longos quando comparados com métodos que utilizam órgãos e outros tecidos

moles para análise. Deste modo, este método de análise parece promissor para pesquisas futuras na área das ciências forenses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] H.T. Gelderman, L. Boer, T. Naujocks, A.C.M. Ijzermans, W.L.J.M. Duijst, The development of a post-mortem interval estimation for human remains found on land in the Netherlands, *Int. J. Legal Med.* 132 (2018) 863–873. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1700-9>.
- [2] P. Saukko, B. Knight, *Knight's Forensic Pathology*, 3Ed, Kn. Forensic Pathol. 3Ed. (2004). <https://doi.org/10.1201/b13642>.
- [3] S. Pittner, B. Ehrenfellner, F.C. Monticelli, A. Zissler, A.M. Sängler, W. Stoiber, P. Steinbacher, Postmortem muscle protein degradation in humans as a tool for PMI delimitation, *Int. J. Legal Med.* 130 (2016) 1547–1555. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1349-9>.
- [4] B. Greenberg, J.C. Kunich, *Entomology and the law: flies as forensic indicators*. Cambridge, University Press, New, Cambridge University Press, 2002.
- [5] F. Sampaio-Silva, T. Magalhães, F. Carvalho, R.J. Dinis-Oliveira, R. Silvestre, Profiling of RNA Degradation for Estimation of Post Mortem Interval, *PLoS One*. 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056507>.
- [6] W.C. Li, K.J. Ma, Y.H. Lv, P. Zhang, H. Pan, H. Zhang, H.J. Wang, D. Ma, L. Chen, Postmortem interval determination using 18S-rRNA and microRNA, *Sci. Justice*. 54 (2014) 307–310. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.03.001>.
- [7] L. Li, D.-X. Feng, J. Wu, Research Progress of Carrion-breeding Phorid Flies for Post-mortem Interval Estimation in Forensic Medicine, *J. Forensic Med.* 32 (2016) 363–366.
- [8] R. Swain, A. Kumar, J. Sahoo, R. Lakshmy, S.K. Gupta, D.N. Bhardwaj, R.M. Pandey, Estimation of post-mortem interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry, *J. Forensic Leg. Med.* 36 (2015) 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2015.09.017>.
- [9] B.J. Kim, C. Han, H. Moon, J. Kwon, I.S. Jang, S.K. Lim, K.W. Park, J.S. Choi, H.J. An, Monitoring of post-mortem changes of saliva N-glycosylation by nano LC/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 45–56. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0702-2>.

- [10] L.K. Sjöholm, Y. Ransome, T.J. Ekström, O. Karlsson, Evaluation of Post-Mortem Effects on Global Brain DNA Methylation and Hydroxymethylation, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 122 (2018) 208–213.
<https://doi.org/10.1111/bcpt.12875>.
- [11] D. Peng, M. Lv, Z. Li, H. Tian, S.Q. Qu, B. Jin, B. Long, W. Liang, L. Zhang, Postmortem interval determination using mRNA markers and DNA normalization, *Int. J. Legal Med.* 134 (2020) 149–157.
<https://doi.org/10.1007/s00414-019-02199-7>.
- [12] P.A. Carrasco, C.I. Brizuela, I.A. Rodriguez, S. Muñoz, M.E. Godoy, C. Inostroza, Histological transformations of the dental pulp as possible indicator of post mortem interval: a pilot study, *Forensic Sci. Int.* 279 (2017) 251–257.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.09.001>.
- [13] C. Mattana, M.M. Fernandes, R. Tinoco, R.N. Oliveira, R. Mattana, B. Rodrigues, Importância Pericial do DNA e a Participação do Odontologista, *Brazilian J. Forensic Sci. Med. Law Bioeth.* 2 (2012) 65–82.
<https://doi.org/10.17063/bjfs2-1-y201265>.
- [14] M. Tsokos, R.W. Byard, *Postmortem Changes: Overview*, Elsevier Ltd., 2015.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800034-2.00312-8>.
- [15] C. Li, Q. Wang, Y. Zhang, H. Lin, J. Zhang, P. Huang, Z. Wang, Research progress in the estimation of the postmortem interval by Chinese forensic scholars, *Forensic Sci. Res.* 1 (2016) 3–13.
<https://doi.org/10.1080/20961790.2016.1229377>.
- [16] T. Williams, S. Soni, J. White, G. Can, G.T. Javan, Evaluation of DNA degradation using flow cytometry, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 36 (2015) 104–110. <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000146>.
- [17] S. Attalla, N. Hasan, S.H. El-nabi, Degradation In Different Tissues Of Drowned Rats, 4 (2008) 1–7.
- [18] J.M. Sousa, P.R.M. Queiroz, Coleta E Preservação De Vestígios, *Ensino e Ciências.* 16 (2012) 99–115.
- [19] S.R. Tridico, S. Koch, A. Michaud, G. Thomson, K. Paul Kirkbride, M. Bunce, Interpreting biological degradative processes acting on mammalian hair in the living and the dead: Which ones are taphonomic?, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281 (2014). <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1755>.

- [20] S.L. Koch, A.L. Michaud, C.E. Mikell, Taphonomy of Hair-A Study of Postmortem Root Banding, *J. Forensic Sci.* 58 (2013) 1–8.
<https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02271.x>.
- [21] J.H. Collier, Estimating the Postmortem Interval in Forensic Cases through the Analysis of Postmortem Deterioration of Human Head Hair, Unpublished. (2005) 1–30. <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-01242005-145140/>.
- [22] Shu, X.; Liu, Y.; Ren, L.; He, F.; Zhou, H.; Liu, L.; Liu, L. Correlative analysis on the relationship between PMI and DNA degradation of cell nucleus in human different tissues. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2005, 25, 423–426, doi:10.1007/bf02828213.
- [23] Zheng, J.L.; Li, X.N.; Zhang, X.D.; Niu, Q.S. DNA degradation in nucleolus of skeletal muscle, heart, liver, kidney and brain in mice after death. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2010, 26, 161–164.
- [24] Xiong, P.; Guo, P.; Zhang, J. Raman micro spectroscopic analysis of relationship between DNA degradation in tissue cells and postmortem interval. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 2010, 30, 1511–1515.
- [25] Ebuehi, O.A.T.; Amode, M.; Balogun, A.; Fowora, A. Postmortem Time Affects Brain, Liver, Kidney and Heart DNA in Male Rat. *Am. J. Biochem.* 2015, 5, 1–5, doi:10.5923/j.ajb.20150501.01.
- [26] P. Tozzo, S. Scrivano, M. Sanavio, L. Caenazzo, The role of DNA degradation in the estimation of post-mortem interval: A systematic review of the current literature, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21103540>.
- [27] J.K. Suckling, M.K. Spradley, K. Godde, A Longitudinal Study on Human Outdoor Decomposition in Central Texas, *J. Forensic Sci.* 61 (2016) 19–25.
<https://doi.org/10.1111/1556-4029.12892>.
- [28] B. Larkin, S. Iaschi, I. Dadour, G.K. Tay, Using accumulated degree-days to estimate postmortem interval from the DNA yield of porcine skeletal muscle, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 6 (2010) 83–92. <https://doi.org/10.1007/s12024-009-9109-5>.
- [29] S. Barnes, Barcoding Fish: Prospects for a Standardized DNA-Based Method of Species-level Identification for Archaeological Fish Remains, *Hawaiian Archaeol. J.* 11 (2007) 54–60.

- [30] K. Müller, R. Klein, E. Miltner, P. Wiegand, Improved STR typing of telogen hair root and hair shaft DNA, *Electrophoresis*. 28 (2007) 2835–2842.
<https://doi.org/10.1002/elps.200600669>.
- [31] T. Lepez, M. Vandewoestyne, D. Van Hoofstat, D. Deforce, Fast nuclear staining of head hair roots as a screening method for successful STR analysis in forensics, *Forensic Sci. Int. Genet.* 13 (2014) 191–194.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.08.003>.
- [32] R. Ottens, D. Taylor, D. Abarno, A. Linacre, Successful direct amplification of nuclear markers from a single hair follicle, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 9 (2013) 238–243. <https://doi.org/10.1007/s12024-012-9402-6>.
- [33] A.M. Haines, A. Linacre, A rapid screening method using DNA binding dyes to determine whether hair follicles have sufficient DNA for successful profiling, *Forensic Sci. Int.* 262 (2016) 190–195.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.03.026>.
- [34] S. Szabo, K. Jaeger, H. Fischer, E. Tschachler, W. Parson, L. Eckhart, In situ labeling of DNA reveals interindividual variation in nuclear DNA breakdown in hair and may be useful to predict success of forensic genotyping of hair, *Int. J. Legal Med.* 126 (2012) 63–70. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0566-5>.
- [35] M.R. Harkey, Anatomy and physiology of hair, *Forensic Sci. Int.* 63 (1993) 9–18.
[https://doi.org/10.1016/0379-0738\(93\)90255-9](https://doi.org/10.1016/0379-0738(93)90255-9).
- [36] C. Hauteo, S. Pawita, A. Hamzah, K. Osman, A. Ayunni, A. Ghani, Post mortem changes in relation to different types of clothing - 541870c10cf2218008bf3d18.pdf, 35 (2013) 77–85.
http://www.researchgate.net/profile/Noor_Hazfalinda_Hamzah/publication/244481156_Post_mortem_changes_in_relation_to_different_types_of_clothing/links/541870c10cf2218008bf3d18.pdf.
- [37] K.S. Grisedale, G.M. Murphy, H. Brown, M.R. Wilson, S.K. Sinha, Successful nuclear DNA profiling of rootless hair shafts: a novel approach, *Int. J. Legal Med.* 132 (2018) 107–115. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1698-z>.
- [38] C.F. Bengtsson, M.E. Olsen, L.O. Brandt, M.F. Bertelsen, E. Willerslev, D.J. Tobin, A.S. Wilson, M.T. Gilbert, DNA from keratinous tissue. Part I: hair and nail. *Ann. Anat.* 194 (20012) 17–25. (doi:10.1016/j.aanat.2011. 03.013)
- [39] S. Ghatak, R.B. Muthukumaran, S.K. Nachimuthu, A simple method of genomic

- DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis, *J. Biomol. Tech.* 24 (2013) 224–231. <https://doi.org/10.7171/jbt.13-2404-001>.
- [40] C. Fripiat, A. Gastaldi, S. Van Grunderbeeck, Persistence of immersed blood and hair DNA: A preliminary study based on casework, *J. Forensic Leg. Med.* 51 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.07.009>.
- [41] W. Fan, L. Xu, H. Cheng, M. Li, H. Liu, Y. Jiang, Y. Guo, Z. Zhou, S. Hou, Characterization of Duck (*Anas platyrhynchos*) Short Tandem Repeat Variation by Population-Scale Genome Resequencing, *Front. Genet.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00520>.
- [42] J.M. Butler, Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing., *Biotechniques.* 43 (2007). <https://doi.org/10.2144/000112582>.
- [43] J.E. Lygo, P.E. Johnson, D.J. Holdaway, S. Woodroffe, C.P. Kimpton, P. Gill, J.P. Whitaker, T.M. Clayton, The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework, *Int. J. Legal Med.* 107 (1994) 77–89. <https://doi.org/10.1007/BF01225493>.
- [44] S. Vieira, Universidade Federal Do Paraná Genética Forense Silvana Vieira, (2011). <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/38895/R - E - SILVANA VIEIRA.pdf?sequence=2&isAllowed=y>.
- [45] A.S. Holmes, R. Houston, K. Elwick, D. Gangitano, S. Hughes-Stamm, Evaluation of four commercial quantitative real-time PCR kits with inhibited and degraded samples, *Int. J. Legal Med.* 132 (2018) 691–701. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1745-9>.
- [46] S. Ginart, M. Caputo, D. Corach, A. Sala, Human DNA degradation assessment and male DNA detection by quantitative-PCR followed by high-resolution melting analysis, *Forensic Sci. Int.* 295 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.11.013>.
- [47] H. Simoes Dutra Correa, G. Brescia, V. Cortellini, N. Cerri, A. Verzeletti, DNA quantitation and degradation assessment: a quantitative PCR protocol designed for small forensic genetics laboratories, *Electrophoresis.* 41 (2020) 714–719. <https://doi.org/10.1002/elps.201900360>.
- [48] A. Biosystems, PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits, User Guide, Appl. Biosyst. by Life Technologies. (2010).

- [49] A. Biosystems, Quantifiler TM HP and Trio DNA Quantification Kits, 4485354. (2017) 116. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf>.
- [50] T.F. Scientific, GlobalFiler [®] PCR Amplification Kit User Guide, Appl. Biosyst. Life Technol. 4476135 (2014). <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/4477604.pdf>.
- [51] L. Langbein, H. Yoshida, S. Praetzel-Wunder, D.A. Parry, J. Schweizer, The keratins of the human beard hair medulla: The riddle in the middle, J. Invest. Dermatol. 130 (2010) 55–73. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.192>.
- [52] M.A. Oliver, M. Marti, L. Coderch, V. Carrer, M. Kreuzer, C. Barba, Lipid losses and barrier function modifications of the brown-to-white hair transition, Ski. Res. Technol. 25 (2019) 517–525. <https://doi.org/10.1111/srt.12681>.

ANEXOS

VI. ANEXOS

- **ANEXO I**

Resultados obtidos na medição dos parâmetros físico-químicos da água do mar utilizada na experiência. A água destilada, utilizada como controle negativo, apresentou densidade igual a 1 g/ml e salinidade igual a 0 ‰, demonstrando a correta calibração do aparelho.

Dias após a morte	Temperatura (°C)	pH	Densidade (g/ml)	Salinidade (‰)
12	17	7,99	1,022	30
13	17	7,24	1,04	54
14	18	7,36	1,009	13
15	18	7,32	1,011	16
16	19	7,33	1,007	11
17	18	7,37	1,012	17
18	18	7,42	1,012	17
19	18	7,45	1,018	25
20	19	7,43	1,015	21
21	18	7,45	1,011	16
22	19	7,46	1,011	16
23	19	7,47	1,013	18
24	19	7,52	1,012	17
25	19	7,5	1,01	14
26	18	7,56	1,013	18
27	18	7,52	1,009	13
28	17	7,76	1,011	16

• **ANEXO II**

Características dos cabelos recolhidos ao cadáver, observadas ao microscópio ótico.

Dias após a morte	Estado de submersão	Cabelo	Comprimento (cm)	Cor	Extremidade Proximal		Medula		Extremidade Distal
					Bolbo	Fase de crescimento	Estado	Descrição	
12	Não submersos	C1	10.5	preto	presente	catagénese	presente	contínua	danificada
		C2	8	branco	presente	catagénese	presente	contínua	danificada
		C3	10	preto	presente	catagénese	presente	descontínua	danificada
13	Totalmente submersos	C4	2	branco	presente	telogénese	presente	descontínua	danificada
		C5	4.5	branco	presente	telogénese	ausente	não aplicável	cortada
		C6	5	branco	presente	telogénese	presente	fragmentada	danificada
	Parcialmente submersos	C49	7	branco	presente	telogénese	presente	contínua	cortada
		C50	4,5	branco	presente	anagénese	presente	fragmentada	danificada
		C51	8	branco	presente	catagénese	presente	descontínua	cortada
14	Totalmente submersos	C7	5	branco	presente	catagénese	presente	descontínua	quebrada
		C8	6	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada
		C9	3.5	branco	presente	catagénese	presente	descontínua	cortada
	Parcialmente submersos	C52	7	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada
		C53	7	branco	presente	telogénese	presente	descontínua	cortada
		C54	4,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	cortada
15	Totalmente submersos	C10	2	branco	presente	catagénese	ausente	não aplicável	quebrada
		C11	2.5	branco	presente	telogénese	presente	descontínua	danificada
		C12	7	preto	presente	telogénese	presente	contínua	cortada
	Parcialmente submersos	C55	5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada
		C56	5,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
		C57	7,5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada
		C58	6	preto	presente	catagénese	presente	descontínua	cortada
16	Totalmente submersos	C13	5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
		C14	6	branco	presente	telogénese	presente	contínua	cortada
		C15	7	branco	presente	catagénese	presente	descontínua	cortada
	Parcialmente submersos	C58	6	preto	presente	catagénese	presente	descontínua	cortada
		C59	4	branco	presente	catagénese	presente	descontínua	quebrada
		C60	5	branco	presente	anagénese	presente	fragmentada	danificada
17	Totalmente submersos	C16	3.5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	cortada
		C17	4.5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	danificada
		C18	4	branco	presente	telogénese	presente	fragmentada	quebrada
	Parcialmente submersos	C61	6,5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
		C62	8,5	branco	presente	catagénese	presente	descontínua	cortada
		C63	7,5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
18	Totalmente submersos	C19	5.5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
		C20	5	branco	presente	telogénese	presente	descontínua	cortada
		C21	6	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
	Parcialmente submersos	C64	8	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
		C65	6	branco	presente	catagénese	presente	fragmentada	quebrada
		C66	1,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	danificada
19	Totalmente submersos	C22	5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	cortada
		C23	5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
		C24	5.5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	danificada
	Parcialmente submersos	C67	2	preto	presente	telogénese	presente	fragmentada	danificada
		C68	3	branco	presente	anagénese	presente	contínua	danificada
		C69	7	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada
		C69	7	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada

20	Totalmente submersos	C25	5,5	branco	presente	catagénese	presente	descontínua	cortada
		C26	1	branco	presente	anagénese	presente	contínua	cortada
		C27	2,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	danificada
	Parcialmente submersos	C70	4,5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
		C71	2	branco	presente	anagénese	presente	descontínua	danificada
		C72	6,5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
21	Totalmente submersos	C28	1,5	branco	presente	anagénese	presente	fragmentada	danificada
		C29	4	branco	presente	catagénese	ausente	não aplicável	cortada
		C30	5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
	Parcialmente submersos	C73	7	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada
		C74	6	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
		C75	6,5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
22	Totalmente submersos	C31	3,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
		C32	3,5	branco	presente	telogénese	presente	descontínua	cortada
		C33	4	branco	presente	telogénese	presente	contínua	danificada
	Parcialmente submersos	C76	3,5	preto	presente	catagénese	presente	fragmentada	danificada
		C77	2,5	branco	presente	anagénese	presente	contínua	danificada
		C78	7	branco	presente	catagénese	presente	descontínua	cortada
23	Totalmente submersos	C34	7	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
		C35	7,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
		C36	2	branco	presente	anagénese	presente	contínua	danificada
	Parcialmente submersos	C79	8	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada
		C80	7,5	preto	presente	anagénese	presente	descontínua	danificada
		C81	8	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada
24	Totalmente submersos	C37	6	branco	presente	anagénese	presente	contínua	quebrada
		C38	7	branco	presente	anagénese	presente	contínua	cortada
		C39	7,5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
	Parcialmente submersos	C82	5	branco	presente	catagénese	ausente	não aplicável	cortada
		C83	6	branco	presente	catagénese	presente	descontínua	quebrada
		C84	6	branco	presente	catagénese	ausente	não aplicável	cortada
25	Totalmente submersos	C40	3,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
		C41	8,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
		C42	7,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
	Parcialmente submersos	C85	7	branco	presente	catagénese	ausente	não aplicável	cortada
		C86	1	branco	presente	anagénese	presente	descontínua	danificada
		C87	5	branco	presente	anagénese	ausente	não aplicável	quebrada
26	Totalmente submersos	C43	5	branco	presente	telogénese	presente	fragmentada	cortada
		C44	5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	cortada
		C45	5,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
	Parcialmente submersos	C88	6	branco	presente	catagénese	ausente	não aplicável	danificada
		C89	6	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada
		C90	5	branco	presente	catagénese	presente	fragmentada	cortada
27	Totalmente submersos	C46	4	branco	presente	telogénese	presente	descontínua	quebrada
		C47	7	branco	presente	telogénese	presente	contínua	quebrada
		C48	4,5	branco	presente	telogénese	presente	contínua	cortada
	Parcialmente submersos	C91	8,5	branco	presente	telogénese	presente	fragmentada	cortada
		C92	1	branco	presente	telogénese	presente	descontínua	danificada
		C93	6,5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
28	Totalmente submersos	C94	7	branco	presente	anagénese	presente	contínua	danificada
		C95	6	branco	presente	telogénese	presente	contínua	cortada
		C96	7	branco	presente	telogénese	presente	fragmentada	cortada
	Parcialmente submersos	C97	5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
		C98	5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	quebrada
		C99	5	branco	presente	catagénese	presente	contínua	cortada

- **ANEXO III**

Resultados obtidos relativos à quantidade de DNA nuclear e ao índice de degradação do DNA dos cabelos recolhidos ao cadáver e respetiva classificação dos perfis genéticos obtidos nessas amostras.

Dias após a morte	Estado de submersão	Cabelo	Quantidade de DNA humano (ng/μL)	Índice de degradação do DNA	Perfil genético
12	Não submersos	C1	0,2175	2,6728	completo
		C2	0,6362	0,9535	completo
		C3	0,6052	1,3881	completo
13	Totalmente submersos	C4	0,0015	10,496	incompleto
		C5	0,0021	79,623	incompleto
		C6	0,0038	1,9954	incompleto
	Parcialmente submersos	C49	0,007	1,4165	incompleto
		C50	0,0785	1,8427	completo
		C51	0,5117	1,088	completo
14	Totalmente submersos	C7	0,1034	2,5243	completo
		C8	0,5525	2,7507	completo
		C9	0,2372	1,475	completo
	Parcialmente submersos	C52	0,3415	1,6467	completo
		C53	0,0152	10,7675	incompleto
		C54	0,0001		ausente
15	Totalmente submersos	C10	0,0813	1,7433	completo
		C11	0,0001		ausente
		C12	0,0004		ausente
	Parcialmente submersos	C55	1,1507	1,1633	completo
		C56	0,0009		ausente
		C57	1,5062	1,2747	completo
16	Totalmente submersos	C13	0,1406	2,5869	completo
		C14	0,0036	5,5739	incompleto
		C15	0,0472	2,7529	completo
	Parcialmente submersos	C58	0,1578	1,2116	completo
		C59	0,4751	1,2597	completo
		C60	0,6167	1,2902	completo
17	Totalmente submersos	C16	0,0005	3,3745	ausente
		C17	0,0001		ausente
		C18	0,0037	4,1969	incompleto
	Parcialmente submersos	C61	0,004	2,7234	incompleto
		C62	0,0975	1,4366	completo
		C63	0,0295	1,8799	incompleto

18	Totalmente submersos	C19	0,0006	2,1969	ausente
		C20	0,0122	3,3442	incompleto
		C21	0,0022	2,9803	incompleto
	Parcialmente submersos	C64	0,0076	5,7006	incompleto
		C65	0,3086	2,4408	completo
		C66	0,0001	2,1634	ausente
19	Totalmente submersos	C22	0,0005		ausente
		C23	0,0029	4,813	incompleto
		C24	0,0009	8,8673	ausente
	Parcialmente submersos	C67			ausente
		C68	0,0002	1,7187	ausente
		C69	0,097	2,4702	completo
20	Totalmente submersos	C25	0,0008		ausente
		C26			ausente
		C27			ausente
	Parcialmente submersos	C70	0,0832	1,7617	completo
		C71	0,0175	22,6673	incompleto
		C72	0,1557	4,2829	completo
21	Totalmente submersos	C28	0,0005		ausente
		C29	0,0009		ausente
		C30	0,0031		ausente
	Parcialmente submersos	C73	0,0092	9,4555	incompleto
		C74	0,0142	4,9148	incompleto
		C75	0,0392	2,8469	incompleto
22	Totalmente submersos	C31	0,0003		ausente
		C32	0,0001		ausente
		C33	0,0009	7,6593	ausente
	Parcialmente submersos	C76	0,0019	27,7213	ausente
		C77	0,0131	4,9944	incompleto
		C78	0,0059	19,5504	incompleto
23	Totalmente submersos	C34			ausente
		C35	0,0048	3,7852	incompleto
		C36			ausente
	Parcialmente submersos	C79	0,006	14,7665	ausente
		C80	0,0038		ausente
		C81	0,0909	12,4728	incompleto
24	Totalmente submersos	C37	0,0003	2,2774	ausente
		C38	0,0009	3,7823	incompleto
		C39	0,0015	4,3366	incompleto
	Parcialmente submersos	C82	0,003	6,3606	ausente
		C83	0,0367	3,3927	completo
		C84	0,0972	2,7453	completo
25	Totalmente submersos	C40	0,0019	5,1125	incompleto
		C41	0,0046	2,9265	incompleto
		C42	0,006	1,972	incompleto
	Parcialmente submersos	C85	0,0101	4,1619	incompleto
		C86	0,0403	6,6101	incompleto
		C87	0,2179	2,2262	completo

26	Totalmente submersos	C43	0,0008	2,3089	ausente
		C44	0,0009	3,9982	ausente
		C45	0,0029	4,0854	incompleto
	Parcialmente submersos	C88	0,0051	5,0876	incompleto
		C89	0,0204	3,7598	incompleto
		C90	0,0013		ausente
27	Totalmente submersos	C46	0,0001	2,9107	ausente
		C47	0,0034	4,289	incompleto
		C48	0,0014	20,6559	ausente
	Parcialmente submersos	C91	0,0056	5,2424	ausente
		C92	0,0005	2,4349	ausente
		C93	0,0023	1,9999	ausente
28	Totalmente submersos	C94	0,0001		ausente
		C95	0,0018		ausente
		C96	0,0008		ausente
	Parcialmente submersos	C97	0,0014	2,4284	ausente
		C98	0,0015	2,3994	ausente
		C99	0,002	5,5454	ausente

- **ANEXO IV**

Cálculo das médias e dos logaritmos referentes à quantidade de DNA nuclear e ao índice de degradação do DNA de todos os cabelos analisados na experiência.

Dias após a morte	Média da quantidade de DNA humano (ng/ μ L)	Logaritmo da média da quantidade de DNA humano (ng/ μ L)	Média do índice de degradação do DNA	Logaritmo da média do índice de degradação do DNA
12	0,486	-0,31	1,67	0,22
13	0,101	-1,00	3,37	0,53
14	0,208	-0,68	3,83	0,58
15	0,457	-0,34	1,39	0,14
16	0,24	-0,62	2,45	0,39
17	0,023	-1,65	2,72	0,43
18	0,055	-1,26	3,14	0,50
19	0,02	-1,69	4,47	0,65
20	0,064	-1,19	9,57	0,98
21	0,011	-1,95	5,74	0,76
22	0,004	-2,43	14,98	1,18
23	0,026	-1,58	10,34	1,01
24	0,023	-1,63	3,82	0,58
25	0,047	-1,33	3,83	0,58
26	0,005	-2,28	3,85	0,59
27	0,002	-2,65	6,26	0,80
28	0,001	-2,89	3,46	0,54

- **ANEXO V**

Cálculo das médias referentes à quantidade de DNA nuclear e ao índice de degradação do DNA dos cabelos analisados na experiência de acordo com os fragmentos a que pertencem.

Dias após a morte	Quantidade de DNA humano (ng/μL) do fragmento 1	Quantidade de DNA humano (ng/μL) do fragmento 2	Índice de degradação do DNA do fragmento 1	Índice de degradação do DNA do fragmento 2
12	0,486	0,486	1,67	1,67
13	0,002	0,199	30,70	1,45
14	0,298	0,119	2,25	6,21
15	0,027	0,886	1,74	1,22
16	0,064	0,417	3,64	1,25
17	0,001	0,044	3,79	2,01
18	0,005	0,105	2,84	3,43
19	0,001	0,049	6,84	2,09
20	0,001	0,085		9,57
21	0,002	0,021		5,74
22		0,007	7,66	17,42
23	0,005	0,034	3,79	13,62
24	0,001	0,046	3,47	4,17
25	0,004	0,089	3,34	4,33
26	0,002	0,009	3,46	4,42
27	0,002	0,003	9,29	3,23
28	0,001	0,002		3,46

- **ANEXO VI**

Cálculo dos logaritmos referentes à quantidade de DNA nuclear e ao índice de degradação do DNA dos cabelos analisados na experiência de acordo com os fragmentos a que pertencem.

Dias após a morte	Quantidade de DNA humano (ng/μL) do fragmento 1	Quantidade de DNA humano (ng/μL) do fragmento 2	Índice de degradação do DNA do fragmento 1	Índice de degradação do DNA do fragmento 2
12	-0,31	-0,31	0,22	0,22
13	-2,60	-0,70	1,49	0,16
14	-0,53	-0,92	0,35	0,79
15	-1,56	-0,05	0,24	0,09
16	-1,20	-0,38	0,56	0,10
17	-2,85	-1,36	0,58	0,30
18	-2,30	-0,98	0,45	0,54
19	-2,85	-1,31	0,84	0,32
20	-3,10	-1,07		0,98
21	-2,82	-1,68		0,76
22	-3,40	-2,16	0,88	1,24
23	-2,32	-1,47	0,58	1,13
24	-3,05	-1,34	0,54	0,62
25	-2,38	-1,05	0,52	0,64
26	-2,82	-2,05	0,54	0,65
27	-2,80	-2,55	0,97	0,51
28	-3,05	-2,80		0,54

- ANEXO VII

Autorização pela comissão de ética do INMLCF-DN para a realização do projeto.



Parecer do Diretor/Coordenador de Serviço:

Considero este projeto de investigação com interesse para a Medicina Legal. No entanto, a atual situação de pandemia COVID-19 que se vive nos laboratórios condiciona muito a realização de projetos de investigação nos laboratórios do SGBF. As instalações do SGBF-N são adequadas, o que pode não permitir o correto cumprimento das regras de higiene e segurança, na falta de medidas de isolamento. 21.10.2020 L. Sadamir.

Parecer do RAI (Responsável pelo Acesso à Informação):

N/A.

Parecer da CE (Comissão de Ética):

CE - 33/2020

Concordando com o parecer da Direção do SGBF, a Comissão de Ética não manifesta a oposição. Realiza, no entanto, a pertinência da indicação do número de amostras a analisar. Enc. 17.12.2020

Despacho do Diretor da Delegação/Presidente do CD:

☒ Autorizado ☐ Não Autorizado, cumprindo-se as regras de higiene e segurança referidas pela 5ª Direção SGBF.

Data: 28.11.2020

Assinatura:

F. Corte Real

Francisco Corte Real