



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*Estudos genéticos de uma coleção osteológica da época
Medieval*

Joana Rita Vicente Lopes

2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudos genéticos de uma coleção osteológica da época Medieval

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Evolução e Biologia Humanas, realizada sob a orientação científica do Professor António Amorim (Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses – Delegação Sul) e da Professora Doutora Eugénia Cunha (Universidade de Coimbra)

Joana Rita Vicente Lopes

2015

"I have not failed.
I've just found 10,000 ways that won't work."
Thomas Alva Edison

Agradecimentos

Um simples agradecimento parece pouco para aqueles que, de qualquer forma contribuíram para que este trabalho tenha sido possível.

Em primeiro lugar quero agradecer à Professora Doutora Eugénia Cunha por ter aceite a orientação desta dissertação e me indicar as pessoas certas que tornaram realidade este que, à partida, parecia ser um desafio impossível.

Ao meu orientador Dr. António Amorim por me orientar neste projeto complexo, alimentado pela curiosidade, persistência e vontade da descoberta. Obrigada pela paciência, pela partilha de conhecimentos e confiança que depositou em mim.

À Professora Doutora Cláudia Umbelino por ter aceite e tornado possível este estudo com esqueletos da coleção osteológica do Campo Arqueológico de Mértola, a qual está ao seu cuidado. Obrigada pela simpatia e disponibilidade.

Ao Sr. Professor Doutor Jorge Costa Santos e ao Doutor Mário Dias, nas condições de anterior e atual diretor do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses da delegação sul ao permitirem que este trabalho tenha sido realizado nas instalações do INMLCF, I.P.

À Dr^a Teresa Ribeiro por me receber no Serviço de Genética e Biologia Forenses do INMLCF, I.P e à restante equipa do SGBF pelo acolhimento.

Um especial agradecimento, à Dr^a Heloísa Afonso Costa e à Dr^a Cláudia Vieira da Silva pela ajuda incansável, pela paciência, disponibilidade, por tudo o que me ensinaram e por não sendo minhas orientadoras oficiais, nunca deixaram de o ser.

Às colegas estagiárias que se tornaram amigas. À Filipa Simão pela partilha, cumplicidade e diversão quando trabalhámos lado a lado. À Conceição Salvador, à Rita Reis, à Sara Gaudêncio, à Ana Rita Inácio, à Marisa Cruz e à Ana Filipa Resende pelo incentivo, momentos de descontração e gargalhadas que me proporcionaram durante esta viagem.

À Vânia Loureiro, à Carina Costa Nogueira, à Paula Ribeiro e ao José Seco pela entreajuda nos momentos de pânico, pela galhofa e simplesmente pela amizade que me faz acreditar em todas as histórias que criámos juntos.

A toda a família e amigos que de uma forma ou de outra demonstraram interesse e me encorajaram a continuar. À Ana Raquel Dias e Ieva Mikucionyte, por serem as irmãs que não tive. Pela cumplicidade inata, partilha e ajuda constantes.

E aos mais importantes, os meus pais Maria Júlia Vicente e Vasco Lopes, por me ajudarem a construir o que sou, pela confiança, compreensão, incentivo e conselhos nos momentos certos.

Índice

Agradecimentos.....	i
Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas.....	x
Resumo.....	xiii
Abstract	xiv
Lista de siglas e abreviaturas.....	xv

1. Introdução	1
1.1 ADN antigo	2
1.2 ADN autossômico	4
1.3 ADN sexual - Cromossoma Y.....	5
1.4 ADN mitocondrial.....	6
1.4.1 Sequenciação de ADN mitocondrial	8
1.5 O ADN no tecido ósseo.....	10
1.6 O estudo de amostras ósseas	13
1.7 Degradação física e química	14
1.8 Contaminações	15
1.9 Extração de ADN	16
1.10 Amplificação e Quantificação de ADN (PCR e RT-PCR).....	18
1.11 Marcadores Genéticos	20
1.11.1 Short Tandem Repeat - (STR).....	20
1.11.1.1 Short Tandem Repeat do cromossoma Y - (Y-STR).....	22
1.11.2 Mini-STR	23
1.11.3 InDel.....	24
1.11.4 Single Nucleotide Polymorphisms - (SNP).....	25
1.11.4.1 Single Nucleotide Polymorphisms no cromossoma Y - (Y-SNP).....	26
1.12 Caracterização da Amostra.....	28
1.13 Objetivos	30
2. Material e Métodos	31
2.1 Amostras	32
2.2 Preparação das amostras antes da extração de ADN.....	34

2.3 Métodos de Extração de ADN	35
2.3.1 Método orgânico de Fenol Clorofórmio.....	36
2.3.2 Método PrepFiler Express BTA.....	37
2.4 Quantificação de ADN.....	38
2.5 Amplificação de STRs e InDels.....	39
2.5.1 <i>PowerPlex® ESI 17 System</i>	40
2.5.2 <i>PowerPlex® ESI 17 Pro System</i>	41
2.5.3 <i>PowerPlex® ESX 17 System</i>	41
2.5.4 <i>AmpFI STR® MiniFiler™</i>	42
2.5.5 <i>AmpFI STR® Yfiler®</i>	43
2.5.6 Critérios de aceitação de alelos nos marcadores do tipo STR.....	44
2.5.7 <i>Investigator® DIPlex</i>	44
2.6 Sequenciação de ADN mitocondrial	45
2.7 Sequenciação de fragmentos do gene da Amelogenina	51
2.8 SNPs do cromossoma Y.....	55
3. Resultados.....	59
3.1 Quantificação de ADN.....	61
3.2 Amplificação de STRs autossômicos e InDels.....	64
3.2.1 STR e Mini-STR autossômicos.....	64
3.2.2 InDel.....	69
3.3 Amelogenina	73
3.4 Y-STR	77
3.5 Y-SNPs.....	79
3.6 ADN mitocondrial.....	84
3.6.1 Heteroplasmias de posição	89
3.6.2 Heteroplasmias de comprimento	93
3.7 Ancestralidade.....	96
3.8 Amplificação total.....	99
4. Conclusão e Discussão.....	103
5. Bibliografia.....	111
6. Apêndices	129
7. Anexos.....	134

Índice de Figuras

Capítulo 1. Introdução

Figura 1. 1 - O Genoma humano no interior do núcleo de cada célula é composto por 23 pares de cromossomas (22 autosómicos e 1 sexual) e no citoplasma de cada célula encontra-se o ADN mitocondrial (adaptado de Butler, 2005).....	4
Figura 1. 2 - Imagem representativa da molécula circular de ADN mitocondrial, indicando a região controlo HV1 e HV2 (adaptado de Butler, 2011).....	7
Figura 1. 3 - Árvore filogenética com os diferentes haplogrupos com base em ADN mitocondrial, mt-MRCA - Most Recent Common matrilineal Ancestor (www.phylotree.org).10	
Figura 1. 4 - Representação do modelo teórico do complexo entre ADN e colagénio, onde é possível ver as ligações por pontes de hidrogénio dos grupos fosfato do ADN e os grupos CH do colagénio (Mrevlishvili e Svintradze, 2005).....	12
Figura 1. 5 - Representação do modelo esquemático das ligações dos grupos fosfato do ADN com os iões de cálcio da hidroxiapatite (Okazaki <i>et al.</i> , 2001).....	12
Figura 1. 6 - Imagem representativa da ligação dos primers numa amplificação de STR e Mini-STR (adaptado de Butler, 2011).....	23
Figura 1. 7 - Imagem representativa de um marcador heterozigótico (In/Del), um marcador homozigótico para a deleção (Del) e um homozigótico para inserção (In) (adaptado de Fondevila <i>et al.</i> , 2011).....	24
Figura 1. 8 - Single nucleotide polymorphism (SNP). Dois alelos possíveis (Guanina ou Adenina), que diferem em apenas um nucleótido, traduzindo-se em três possíveis genótipos (G/G; G/A ou A/A).....	25
Figura 1. 9 - Mapa da distribuição global dos haplogrupos do cromossoma Y consoante o Y Chromosome Consortium. Adaptado de (Jobling e Tyler-Smith, 2003).....	27
Figura 1. 10 - Fotografia da alcáçova do castelo de Mértola (http://www.terraspulodolobo.com/regiao/alcacova-do-castelo-mertola_t77).....	29

Capítulo 2. Material e Métodos

Figura 2. 1 - A - Remoção da área superficial com a serra elétrica paralela ao osso. B e C - Corte de uma janela na diáfise proximal. D - Fragmentação do pedaço cortado em pedaços mais pequenos.....	35
---	----

Figura 2. 2 - Tubo de purificação <i>Vivacon</i> ®2. A - Tubo de coleção A, capacidade até 2ml. B - Tubo de coleção B, capacidade de cerca de 100µl. (http://www.directindustry.com/prod/sartorius-ag/centrifugal-concentrators-4963-520717.html)	36
Figura 2. 3 - Aparelho automático de extração de ADN onde se efetua o kit <i>PrepFiler Express BTA</i> (https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4467754)	37
Figura 2. 4 - Processo de sequenciação com ddNTP marcados com fluorocromos de cores diferentes (Adaptado de Butler, 2005).	48
Figura 2. 5 - Gel de poliacrilamida com amostras controlo. 1 - Controlo negativo; 2 - Controlo positivo masculino; 3 - Controlo positivo feminino; 4 - marcador de peso molecular seta - marcador para os 100 pb.	53

Capítulo 3. Resultados

Figura 3. 1 - Fotografias de ossos com terra e raízes no seu interior. A - Amostra AGEN-035 com raízes atravessadas no interior do osso (seta). B - Amostra AGEN-078 com raízes no interior (seta). C - Amostra AGEN-068 com terra no interior.	60
Figura 3. 2 - Valores obtidos na quantificação de ADN a partir dos cromossomas 14 e Y após ambas a extrações de cada uma das 50 amostras da população Medieval (Fenol - método orgânico de Fenol Clorofórmio e BTA - <i>Kit PrepFiler Express BTA</i>)	62
Figura 3. 3 - Valores obtidos na quantificação de ADN a partir dos cromossomas 14 e Y após ambas a extrações de cada uma das 10 amostras da rotina pericial - Grupo controlo A (Fenol - método de Fenol Clorofórmio e BTA - <i>Kit PrepFiler Express BTA</i>)	63
Figura 3. 4 - Valores obtidos na quantificação de ADN a partir dos cromossomas 14 e Y após ambas a extrações de cada uma das 10 amostras da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B (Fenol - método orgânico de Fenol Clorofórmio e BTA - <i>Kit PrepFiler Express BTA</i>)	63
Figura 3. 5 - Valores obtidos na quantificação de ADN a partir dos cromossomas 14 e Y após ambas a extrações da amostra da Capela particular - Grupo controlo C (Fenol - método orgânico de Fenol Clorofórmio e BTA - <i>Kit PrepFiler Express BTA</i>)	63
Figura 3. 6 - Resultados obtidos na amplificação de 20 marcadores STR, utilizando diferentes Kits comerciais para cada uma das 50 amostras da população Medieval	65
Figura 3. 7 - Resultados obtidos da amplificação de 20 marcadores STR, utilizando diferentes Kits comerciais para cada uma das 10 amostras da rotina pericial - Grupo controlo A	66
Figura 3. 8 - Resultados obtidos da amplificação de 20 marcadores STR, utilizando diferentes Kits comerciais para cada uma das 10 amostras da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B	66

Figura 3. 9 - Resultados obtidos da amplificação de 20 marcadores STR, utilizando diferentes Kits comerciais para a amostra da capela particular - Grupo controlo C.....	66
Figura 3. 10 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores STR no grupo de esqueletos da rotina pericial - Grupo controlo A.....	68
Figura 3. 11 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores STR no grupo de esqueletos da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.....	68
Figura 3. 12 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores STR no esqueleto da Capela particular - Grupo controlo C.....	68
Figura 3. 13 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores STR no grupo de esqueleto da população Medieval em estudo.....	68
Figura 3. 14 - Representação gráfica dos resultados da amplificação de marcadores tendo em conta o tamanho dos produtos de amplificação dos diferentes kits comerciais utilizados no estudo de marcadores do tipo STR e Mini-STR para os esqueletos da população Medieval em estudo e grupos controlo A, B e C.....	68
Figura 3. 15 - Resultados obtidos da amplificação de 31 marcadores InDel para cada uma das 50 amostras da população Medieval.....	70
Figura 3. 16 - Resultados obtidos da amplificação de 31 marcadores InDel, para cada uma das 10 amostras da rotina pericial - Grupo controlo A.....	71
Figura 3. 17 - Resultados obtidos da amplificação de 31 marcadores InDel, para cada uma das 10 amostras da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.....	71
Figura 3. 18 - Resultados obtidos da amplificação de 31 marcadores InDel, para a amostra da Capela particular - Grupo controlo C.....	71
Figura 3. 19 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores InDel no grupo de esqueletos da rotina pericial - Grupo controlo A.....	72
Figura 3. 20 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores InDel no grupo de esqueletos da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.....	72
Figura 3. 21 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores InDel no esqueleto da Capela particular - Grupo controlo C.....	72
Figura 3. 22 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores InDel no grupo de esqueleto da população Medieval em estudo.....	72
Figura 3. 23 - Eletroferogramas de kit comerciais com a amplificação da amelogenina. A - Indivíduo masculino (amostra AGEN-054 amplificada com o kit AmpFlSTR® <i>MiniFiler</i>). B - Indivíduo feminino (amostra AGEN-061 amplificada com o kit PowerPlex® ESX 17 System).	74
Figura 3. 24 - Gel de poliacrilamida após a segunda amplificação da Amelogenina para amostras da população medieval. Poços 1, 2, 6 e 8 não foi possível obter resultado (AGEN-077; 078; 082 e 084 respetivamente); poços 3 - Amostra feminina (AGEN - 079) 4 - Amostra	

Masculina (AGEN - 080); 5 - Amostra feminina (AGEN-081); 7 - Amostra Masculina (AGEN - 083); 9 - controlo positivo masculino; 10 - controlo positivo feminino, 11 - Controlo negativo; 12 - marcador de pesos moleculares; seta - marcador para os 100 pb.	74
Figura 3. 25 - Sequenciação da Amelogenina de amostras da população medieval (apenas estão representadas as posições 64 até 111). A - Indivíduo masculino (AGEN - 058) - não reconhece qualquer alteração uma vez que é igual à sequência de referência (cromossoma Y); B - Indivíduo feminino (AGEN - 068) - reconhece alterações na posição 68, 69 (evidenciadas a preto) e 88 (evidenciado aa vermelho) em comparação com a sequência de referência.	74
Figura 3. 26 - Resultados da atribuição do sexo aos 50 indivíduos da população medieval por métodos Antropológicos e Genéticos.....	76
Figura 3. 27 - Resultados obtidos na amplificação de 16 marcadores Y-STR com o kit AmpFlSTR® <i>Yfiler</i> ®.....	77
Figura 3. 28 - Resultados obtidos na amplificação de 16 marcadores Y-STR, para cada uma das 10 amostras da rotina pericial - Grupo controlo A.....	78
Figura 3. 29 - Resultados obtidos na amplificação de 16 marcadores Y-STR, para cada uma das 10 amostras da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.....	78
Figura 3. 30 - Resultados obtidos na amplificação de 16 marcadores Y-STR, para cada uma das 10 amostras da Capela particular - Grupo controlo C.....	78
Figura 3. 31 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-STR no grupo de esqueletos da rotina pericial - Grupo controlo A.....	79
Figura 3. 32 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-STR no grupo de esqueletos da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.....	79
Figura 3. 33 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-STR no esqueleto da Capela particular - Grupo controlo C.....	79
Figura 3. 34 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-STR no grupo de esqueleto da população Medieval em estudo.....	79
Figura 3. 35 - Resultado obtido para a análise de Y-SNPs numa amostra da população medieval (AGEN - 083).....	80
Figura 3. 36 - Resultados obtidos da amplificação de 9 marcadores Y-SNP em 15 amostras da população medieval.....	80
Figura 3. 37 - Resultados obtidos da amplificação de 9 marcadores Y-SNP, para cada uma das 10 amostras da rotina pericial - Grupo controlo A.....	81
Figura 3. 38 - Resultados obtidos da amplificação de 9 marcadores Y-SNP, para cada uma das 10 amostras da Guerra Ultramar - Grupo controlo B.....	81
Figura 3. 39 - Resultados obtidos da amplificação de 9 marcadores Y-SNP, para a amostra da Capela particular - Grupo controlo C.....	81

Figura 3. 40 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-SNP no grupo de esqueletos da rotina pericial - Grupo controlo A.....	82
Figura 3. 41 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-SNP no grupo de esqueletos da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.....	82
Figura 3. 42 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-SNP no esqueleto da Capela particular - Grupo controlo C.....	82
Figura 3. 43 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-SNP no grupo de esqueletos da população Medieval em estudo.....	82
Figura 3. 44 - Resultados obtidos para o cálculo da ancestralidade a partir de marcadores STR com o programa <i>PopAffiliator</i> para uma amostra da população medieval (AGEN-054).....	97
Figura 3. 45 - Resultados obtidos para o cálculo da ancestralidade a partir de marcadores STR com o programa <i>PopAffiliator</i> para os esqueletos da rotina pericial - Grupo controlo A.....	98
Figura 3. 46 - Resultados obtidos para o cálculo da ancestralidade a partir de marcadores STR com o programa <i>PopAffiliator</i> para o esqueleto da Capela particular - Grupo controlo C.....	98
Figura 3. 47 - Representação gráfica da amplificação total dos 126 alelos em estudo usando diferentes técnicas - Grupo controlo A.....	101
Figura 3. 48 - Representação gráfica da amplificação total dos 126 alelos em estudo usando diferentes técnicas - Grupo controlo B.....	101
Figura 3. 49 - Representação gráfica da amplificação total dos 126 alelos em estudo usando diferentes técnicas - Grupo controlo C.....	101
Figura 3. 50 - Representação gráfica da amplificação total dos 126 alelos em estudo usando diferentes técnicas - Esqueletos da população medieval.....	101

Capítulo 6. Apêndices

Apêndice 1: Representação de um fémur direito e as diferentes secções de A a E correspondendo de um corte mais anterior para o mais posterior. A zona de interesse para o corte de uma pequena janela nos ossos em estudo é a região B (região mais densa da diáfise). (adaptado de White <i>et al.</i> , 2012).....	129
Apêndice 2: Composição do Tampão de extração de tecidos ósseos.....	129
Apêndice 3: Exemplo de um resultado obtido a partir de eletroforese capilar após a amplificação de uma amostra para 5 dos marcadores STR usados no <i>Kit PowerPlex® ESX 17 System</i> (amostra AGEN - 054).....	130
Apêndice 4: Exemplo de um resultado obtido a partir de eletroforese capilar após a amplificação de uma amostra para 8 dos marcadores InDel usados no <i>Kit Investigator® DIPplex</i> (amostra AGEN - 069).....	130

Apêndice 5: Representação gráfica dos resultados da amplificação de marcadores tendo em conta o tamanho dos produtos de amplificação de marcadores InDel com o *Kit Investigator®* *DIPplex* para os esqueletos da população Medieval em estudo e grupos controlo A, B e C....131

Índice de Tabelas

Capítulo 2. Material e Métodos

Tabela 2. 1 - Concentrações da reta de calibração com ADN standard para Quantifiler Duo. ..	38
Tabela 2. 2 - Volumes utilizados em cada amplificação consoante a concentração obtida na quantificação	39
Tabela 2. 3 - Volumes da reação de PCR do <i>Kit PowerPlex® ESI 17 System</i>	40
Tabela 2. 4 - Programa de temperaturas para o PCR usando o <i>Kit PowerPlex® ESI 17 System</i> .	40
Tabela 2. 5 - Volumes da reação de PCR do <i>Kit PowerPlex® ESI 17 Pro System</i>	41
Tabela 2. 6 - Volumes da reação de PCR do <i>Kit PowerPlex® ESX 17 System</i>	42
Tabela 2. 7 - Volumes da reação de PCR do <i>Kit AmpFlSTR® MiniFiler™</i>	42
Tabela 2. 8 - Programa de temperaturas para o PCR usando o <i>Kit AmpFSTR® MiniFiler™</i> ..	42
Tabela 2. 9 - Volumes da reação de PCR do <i>Kit AmpFlSTR® Yfiler®</i>	43
Tabela 2. 10 - Programa de temperaturas para o PCR usando o <i>Kit AmpFlSTR® Yfiler®</i>	43
Tabela 2. 11 - Volumes da reação de PCR do <i>Kit Investigator® DIPplex</i>	45
Tabela 2. 12 - Programa de temperaturas para o PCR usando o <i>Kit Investigator® DIPplex</i>	45
Tabela 2. 13 - Volumes das reações de PCR para a amplificação da região controlo total.	46
Tabela 2. 14 - Programa de temperaturas para a amplificação da região controlo total.....	46
Tabela 2. 15 - Volumes das reações de PCR para a amplificação Nested de HV1 e HV2.	47
Tabela 2. 16 - Programa de temperaturas para a amplificação Nested de HV1 e HV2.....	47
Tabela 2. 17 - Volumes da reação de sequenciação para HV1 e HV2.	48
Tabela 2. 18 - Programa de temperaturas para a sequenciação de HV1 e HV2.	49
Tabela 2. 19 - Regras de nomenclatura segundo a IUPAC.	50
Tabela 2. 20 - Volumes da reação de PCR para a 1ª amplificação do gene da Amelogenina....	52
Tabela 2. 21 - Programa de temperaturas para a 1ª amplificação do gene da Amelogenina.....	52
Tabela 2. 22 - Volumes da reação de PCR para a 2ª amplificação do gene da Amelogenina....	52
Tabela 2. 23 - Volumes da reação de sequenciação do gene da Amelogenina.	54
Tabela 2. 24 - Programa de temperaturas para a sequenciação do gene da Amelogenina.	54
Tabela 2. 25 - Resultados esperados para a sequenciação dos cromossoma X e Y:	55
Tabela 2. 26 - Volumes da reação de PCR de Y-SNP.....	56
Tabela 2. 27 - Programa de temperaturas para a amplificação de Y-SNP.	56
Tabela 2. 28 - Volumes da reação de <i>SNaPshot</i> de Y-SNP.	57
Tabela 2. 29 - Programa de temperaturas para a reação de <i>SNaPshot</i> de Y-SNP.	57

Capítulo 3. Resultados

Tabela 3. 1 - Resultados obtidos para a atribuição de haplogrupos das amostras em estudo e para as amostras dos grupos controlo.....	83
Tabela 3. 2 - Haplótipos e haplogrupos das amostras da população medieval.	85
Tabela 3. 3 - Haplótipos e haplogrupos das amostras do grupo controlo A - Esqueletos da rotina pericial.....	85
Tabela 3. 4 - Haplótipos e haplogrupos das amostras do grupo controlo B - Esqueletos da Guerra do Ultramar.	85
Tabela 3. 5 - Haplótipo e haplogrupo do grupo controlo C - Esqueleto da Capela particular ...	86
Tabela 3. 6 - Haplótipo e haplogrupo do grupo controlo D - operador.....	86
Tabela 3. 7 - Extensão da análise para HV1 e HV2 de ADN mitocondrial para as amostras em estudo e grupos controlo e registo da presença de heteroplasmias de comprimento (H.C) na região de poli-C para as amostras em estudo da população medieval e grupos controlo (G.C.A; G.C.B.; G.C.C. e G.C.D.).....	87
Tabela 3. 8 - Frequência estimada para cada amostra na população europeia (africana para o caso de AGEN - 031) e o número de haplótipos idênticos presentes na base de dados EMPOP.	88
Tabela 3. 9 - Todos os haplótipos e haplogrupos possíveis construídos a partir da heteoplasmia na posição 16304 da amostra AGEN - 043.	91
Tabela 3. 10 - Todos os haplótipos e haplogrupos possíveis construídos a partir das heteoplasmias na posição 16228 e 16341 da amostra AGEN - 041.....	92
Tabela 3. 11 - Todos os haplótipos e haplogrupos possíveis construídos a partir das heteoplasmias na posição 16111, 16129; 16278 e 16294 da amostra AGEN - 057.....	92

Capítulo 6. Apêndices

Tabela 6. 1 - Tabela de dados antropológicos recolhidos a partir dos estudos realizados previamente às sepulturas selecionadas para este trabalho. Indicados estão os nomes de código de cada uma das 50 amostra no laboratório, correspondente a cada sepultura; a região onde se efetuou o corte; o ano de escavação; o ano em que a sepultura foi estudada e o responsável pelo estudo; a idade estimada à morte, o sexo do indivíduo atribuído por técnicas antropológicas; o fémur esquerdo/direito selecionado para este trabalho e a condição de cada fémur (presença/ausência ou fratura de cada região do osso).....	131
--	-----

Capítulo 7. Anexos

Tabela 7. 1 - Marcadores estudados para diferentes Kits de STR (<i>PowerPlex ESI 17</i> , <i>PowerPlex ESI 17 Pro</i> e <i>PowerPlex ESX17</i> da Promega e <i>AmpFlSTR® MiniFiler™</i> da Applied Biosystems), bem como a sequência de repetição e a localização no cromossoma de cada marcador.....	134
Tabela 7. 2 - Marcadores STRs estudados no cromossoma Y com o kit <i>AmpFlSTR® Yfiler®</i> da Applied Biosystems.	135
Tabela 7. 3 - Marcadores InDel estudados para o kit <i>Investigator® DIPplex</i> da Quiagen.	135
Tabela 7. 4 - Primers utilizados na amplificação de ADNmt, para a região controlo total (HVI e HV2 e 3):.....	136
Tabela 7. 5 - Primers utilizados no nested de ADNmt, para a região HV1 e HV2:	136
Tabela 7. 6 - Par de primers usados na amplificação da amelogenina:	137
Tabela 7. 7 - Pares de primers dos marcadores usados na amplificação multiplex para Y-SNPs e o tamanho dos produtos amplificados em pares de bases (pb):.....	137
Tabela 7. 8 - Volumes de cada primer <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) para amplificação de Y-SNPs, aplicados em cada reação.	138
Tabela 7. 9 - Primers usados na minisequenciação por <i>SNaPshot</i> em Y-SNPs:	138
Tabela 7. 10 - Volumes do primer <i>forward</i> (F) ou <i>reverse</i> (R) para a reação de <i>SNaPshot</i> aplicados em cada reação.	138

Resumo

A extração de ADN e a obtenção de um perfil genético a partir de amostras de tecido ósseo torna-se bem mais desafiante e complexo do que em amostras de referência de sangue e saliva. Fatores como a temperatura, humidade, microrganismos, o pH do solo e o armazenamento, antes e após a exumação dos esqueletos, estão correlacionados com a preservação do ADN em material ósseo e podem condicionar a obtenção de bons resultados.

O ADN antigo é caracterizado frequentemente por se encontrar muito fragmentado (cadeias curtas de ADN em média entre 100 a 500 pares de bases) e em pouca quantidade, devido aos processos de degradação que sofreu ao longo do tempo. Os principais problemas que a análise de ADN antigo enfrenta são a baixa concentração de moléculas ADN das amostras, a alta degradação e fragmentação das moléculas e a contaminação com ADN exógeno, seja ele externo ou associado aos métodos de laboratório. As técnicas para o estudo de ADN degradado têm vindo a ser cada vez mais desenvolvidas devido à sua utilidade em casos forenses, bem como em estudos populacionais e evolutivos. Neste trabalho pretende-se aplicar técnicas já comprovadas como sendo eficazes em amostras de tecido ósseo em 50 amostras de uma coleção osteológica da época Medieval, já previamente estudadas por métodos antropológicos. Métodos de STR, Mini-STR, InDel, Y-STR, Y-SNP e ADN mitocondrial são aplicados tanto nas amostras em estudo como em ossos de grupos controlo com o intuito de obter o perfil genético mais completo possível para cada uma das amostras.

Os resultados demonstraram maior percentagem de amplificação em marcadores bialélicos bem como quanto menor forem os produtos de amplificação de cada marcador. Foi possível atribuir um género a alguns indivíduos da população medieval através de diversos métodos genéticos. Através dos haplótipos de ADN mitocondrial e Y-SNP's foi ainda possível determinar a origem geográfica da linhagem materna e paterna respetivamente para algumas das amostras estudadas. A partir do conjunto de técnicas aplicadas concluiu-se que as amostras em estudo se encontram num elevado estado de degradação, não permitindo a reprodutibilidade desejada dos resultados, devido ao efeito estocástico característico de amostras antigas de tecido ósseo.

Palavras chave: ADN degradado; tecido ósseo; marcadores genéticos; época Medieval.

Abstract

DNA extraction and genetic profiling in bone tissue samples are considered much more challenging and complex when compared with reference blood and buccal swabs samples study. Temperature, humidity, microorganisms, pH and the storage conditions before and after exhumation are related to DNA preservation of the bone material and can limit good results achievement.

Ancient DNA is characterized by being frequently fragmented (short DNA chains with an average of 100 and 500 base pairs) and in small quantities, due to degradation processes over time. The main problems that ancient DNA faces are the low concentration of DNA molecules in the samples, the high degradation and fragmentation of molecules, and the contamination with exogenous DNA, both external and related to laboratory methods.

The techniques applied for the study of the degraded DNA have been improving as a result of its utility in forensic, population and evolutionary cases. In this study, techniques already proven effective in fresh bone tissue were applied in 50 samples of an osteological collection from the medieval times, previously studied by anthropologic methods. STR, Mini-STR, InDel, Y-STR, Y-SNP and mitochondrial DNA are implemented both in the study's samples and in control group bones, with the objective of obtaining the most complete genetic profile possible from each of the samples.

The results demonstrated a greater percentage of amplification in biallelic markers, and in amplification products with smaller dimensions, for each marker. It was possible to attribute a gender to some of the individuals from the medieval population through diverse genetic methods. From the mitochondrial DNA haplotypes and Y-SNP's, it was also possible to determine the geographical origin of, not only the maternal, but also the paternal lineage, respectively, for some of the studied samples. From the set of the applied techniques, we conclude that the samples in study are in a high degradation state and do not allow desirable reproducibility of the results, due to the stochastic DNA pattern characteristic of ancient bone samples.

Key words: degraded DNA; bone tissue; genetic markers; Medieval period.

Lista de siglas e abreviaturas

A - Adenina

ADN - ácido desoxirribonucleico

C - Citosina

DCV - Departamento de Ciências da Vida

DMSO - dimetilsulfóxido

dNTP's - desoxinucleótidos trifosfatados

ddNTP's - didesoxinucleótidos trifosfatados

DTT - Dithiothreitol

EDNAP - *European DNA Profiling*

EDTA - do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EMPOP - *EDNAP forensic mtDNA population database*

ExoSAP - do inglês *Exonuclease - Shrimp Alkaline Phosphatase*

G - Guanina

InDel - Inserção e/ou Deleção

INMLCF - Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses.

IPCs - do inglês *Internal Positive Controls*

MgCl₂ - Cloreto de magnésio.

mtDNA - ADN mitocondrial

NaCl - Cloreto de sódio

pb - pares de bases

PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction*

rCRS - do inglês *Revised Cambridge Reference Sequence*

SAP - do inglês *Shrip Alkaline Phosphatase*

SDS - do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate solution*

SGBF-S - Serviço de Genética e Biologia Forenses - Delegação do Sul

SNP - do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

STR - do inglês *Short Tandem Repeats*

T - Timina

TriHCL - do inglês *Tris hydroxymethy aminomethane hydrochloride*

Y - SNP - do inglês *Single Nucleotide Polymorfism*, do cromossoma Y

Y - STR - do inglês *Short Tandem Repeats*, do cromossoma Y

1. Introdução

1. Introdução

1.1 ADN antigo

O ADN (ácido desoxirribonucleico) é uma macromolécula constituída por duas cadeias polinucleotídicas, ligadas por pontes de hidrogénio, orientadas em direções opostas, apresentando uma estrutura de dupla hélice (Grilo, 2001; Nussbaum *et al.*, 2007; Alaeddini *et al.*, 2010). As cadeias são compostas por unidades básicas - nucleótidos -, que por sua vez são compostos por três tipos de moléculas - um açúcar (desoxirribose), um grupo fosfato e uma base azotada (Grilo, 2001; Nussbaum *et al.*, 2007; Alaeddini *et al.*, 2010). Estas bases azotadas podem ser purinas (A-Adenina e G-Guanina) ou pirimidinas (C-Citosina e T-Timina). Entre as duas cadeias, a Adenina estabelece ligação com a Timina e a Guanina com a Citosina (Grilo, 2001; Nussbaum *et al.*, 2007; Alaeddini *et al.*, 2010).

Utiliza-se a designação de "ADN antigo" para fazer referência a ADN fragmentado (cadeias curtas de ADN, em média entre 100 a 500 pares de bases) e em quantidade reduzida, devido aos processos de degradação que sofreu ao longo do tempo, por contraposição a ADN com cadeias longas e intactas (Brown, 2000; Pääbo *et al.*, 2004). Desta forma, são considerados ADN antigo, os vestígios de ADN encontrados tanto em ossos e dentes, como em pele seca (ex: múmias), coprólitos ou sementes, pertencentes a humanos, animais ou plantas (Herrmann e Hummel, 1994; Chelomina, 2006). Por este motivo, o ADN antigo é estudado por várias especialidades tais como a sistemática, a genética de populações, a paleoantropologia, a paleoecologia, a arqueologia, a biologia da conservação e a genética forense, de entre outras (Chelomina, 2006).

O ADN antigo humano é recuperado essencialmente a partir de coleções osteológicas de contextos arqueológicos depositadas em Museus e outras instituições públicas e em restos fósseis e sub-fósseis (restos biológicos que não completaram o processo de fossilização) (Herrmann e Hummel, 1994; Pääbo *et al.*, 2004). Até à atualidade, já foram analisadas amostras de populações antigas com milhares de anos (Gómez-Sánchez *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2014). O estudo genético de amostras antigas pode ser utilizado para obter o perfil genético a nível individual; estudar a história das populações humanas a nível intrapopulacional e interpopulacional (comparações entre

indivíduos da mesma população e comparações entre grupos de indivíduos de populações distintas, respetivamente); ajudar a compreender a história evolutiva humana, estudar alterações genéticas ao longo do tempo, ou até estudar características fenotípicas dos indivíduos do passado (Herrmann e Hummel, 1994; Raff *et al.*, 2011; Bolnick *et al.*, 2012). Cada vez mais, as análises a ADN antigo têm vindo a contribuir para estudos de evolução humana bem como, para estudos de outras espécies que coabitaram com o *Homo sapiens* há 80.000 anos (como é o exemplo do *Homo neanderthalensis* e o mais recentemente estudado, homem de Denisova) (Green *et al.*, 2010). A espécie do género *Homo* mais antiga em que foi possível realizar com sucesso parte da sequenciação do seu genoma nuclear é precisamente o *Homo neanderthalensis* (a partir de amostras com cerca de 45.000 anos, espécie que terá surgido há 400.000 anos e se extinguiu há cerca de 25.000 anos atrás) através do qual é sugerido que os Neandertais tinham pele clara e cabelo arruivado (Green *et al.*, 2010; Draus-barini *et al.*, 2013).

"O estudo do ADN antigo começou em meados dos anos 80 do séc. XX simultaneamente em dois laboratórios: o Sueco (Svante Pääbo) e o Americano (Allan C. Wilson)" (Chelomina, 2006). Estes investigadores verificaram que poderiam aplicar, em ADN antigo, técnicas que já utilizavam na análise do ADN recente, considerando este tipo de análise, uma experiência única, já que trazia a hipótese de estudar o ADN de espécies já extintas, como é o exemplo de um gorgulho extinto (um coleóptero da família Nemonychidae), a espécie mais antiga alguma vez estudada por ADN antigo, com cerca de 130 milhões de anos (Chelomina, 2006). Inicialmente, a amplificação era realizada com primers que emparelhavam em regiões ao acaso e clonagem em bactérias (Pääbo, 1989; Pääbo, Higuchii e Wilson, 1989; Brown, 2000). Posteriormente, com os desenvolvimentos tecnológicos dos últimos tempos, foram surgindo métodos de amplificação de fragmentos vestigiais cada vez mais sensíveis (Chelomina, 2006).

Desde então, o estudo de ADN antigo tem sido uma área em crescente expansão (Rohland e Hofreiter, 2007b; Rohland *et al.*, 2010), uma vez que a obtenção e a análise de ADN a partir de amostras osteológicas se tem tornado numa ferramenta essencial em diversos campos nos quais seja necessária a identificação humana como é o exemplo da medicina legal e ciências forenses, estudos de evolução humana ou genética de populações (Adler *et al.*, 2011; Bolnick *et al.*, 2012; Kirsanow e Burger, 2012).

Os ossos e os dentes representam, assim, uma fonte de informação genética única, pois, graças à sua estrutura, são resistentes à degradação ao longo do tempo e, dependendo do ambiente de conservação, podem ser capazes de preservar quantidades de ADN necessário para proceder a análises genéticas em amostras com milhares de anos (Jakubowska *et al.*, 2012; Kirsanow e Burger, 2012; Draus-barini *et al.*, 2013).

1.2 ADN autossómico

O ADN presente no interior do núcleo das células, encontra-se organizado e compactado em cromossomas (as moléculas de ADN associam-se a histonas, permitindo a proteção e condensação do material genético) (Goodwin *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 2007; Nussbaum *et al.*, 2007; Pinheiro, 2010). Uma cópia de cada cromossoma é herdado por parte da mãe e outra por parte do pai sendo que o total dos cromossomas é designado por cariótipo (Goodwin *et al.*, 2007; Nussbaum *et al.*, 2007). Cada célula possui 23 pares de cromossomas, 22 são autossómicos (numerados do maior para o menor) e um par são cromossomas sexuais (cromossomas X e Y no homem e dois cromossomas X na mulher) - ver figura 1.1 (Levy *et al.*, 2007; Nussbaum *et al.*, 2007; Pinheiro, 2010).

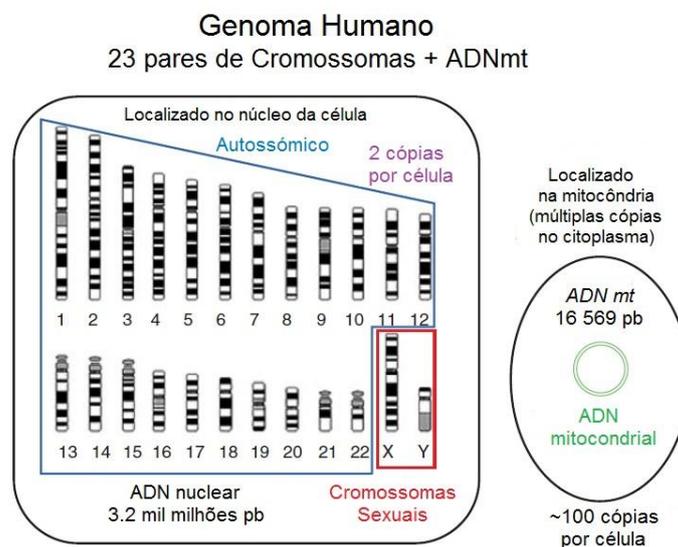


Figura 1. 1 - O Genoma humano no interior do núcleo de cada célula é composto por 23 pares de cromossomas (22 autossómicos e 1 sexual) e no citoplasma de cada célula encontra-se o ADN mitocondrial (adaptado de Butler, 2005).

O genoma humano contém aproximadamente 3 200 000 000 pares de bases (pb), onde estão envolvidos entre 20 000 a 25 000 genes (regiões que codificam e regulam a síntetização de proteínas) (Goodwin *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 2007). Sabe-se ainda que,

apenas 5% do genoma humano é composto por genes, sendo que o restante material genético é composto por ADN não codificante, por vezes designado "ADN lixo", por não estar relacionado diretamente com a codificação de proteínas (Butler, 2005).

Estima-se que cerca de 99,7% do genoma humano é partilhado entre todos os indivíduos, restando 0,3% que permitem a diferenciação de um indivíduo (Butler, 2011). Contudo, o poder de discriminação a nível genético está dependente do facto de que os indivíduos serem diferentes geneticamente uns dos outros (exceto os gémeos verdadeiros) (Goodwin *et al.*, 2007). Felizmente, em genética forense, os marcadores genéticos utilizados na identificação humana encontram-se nas regiões não codificantes, em zonas particularmente polimórficas (Butler, 2011; Goodwin *et al.*, 2007). Consequentemente, quanto mais marcadores forem estudados, menor é a probabilidade de encontrar um indivíduo em toda a população mundial com o mesmo perfil genético (Butler, 2005; Goodwin *et al.*, 2007).

1.3 ADN sexual - Cromossoma Y

O cromossoma Y é o terceiro cromossoma mais pequeno, representa cerca de 2% de todo o genoma humano, tem aproximadamente 60Mb (milhões de pares de bases) de comprimento e contém apenas 78 genes (Buckleton *et al.*, 2005; Butler, 2005; Goodwin *et al.*, 2007; Pinheiro, 2010).

Este cromossoma é haplóide ou seja, está representado por apenas uma cópia nos indivíduos do sexo masculino e não sofre recombinação meiótica em cerca de 95% da sua extensão (Butler, 2005; Pinheiro, 2010). Apenas as extremidades, designadas por regiões pseudoautossómicas (PAR1 e PAR2, no braço curto e longo, respetivamente) recombinam nas zonas homólogas com o cromossoma X (Butler, 2005; Pinheiro, 2010).

A região não-recombinante (NRY - Non Recombining region of the Y chromosome) é específica dos indivíduos masculinos e é transmitida intacta através da linhagem paterna (exceto quando ocorre mutações), contendo diversos tipos de polimorfismos (Jobling, 2001; Jobling e Tyler-Smith, 2003; Goodwin *et al.*, 2007; Pinheiro, 2010).

O estudo do cromossoma Y em casos forenses tem três objetivos principais: (1) identificação do sexo masculino; (2) identificação da linhagem paterna e (3)

identificação da origem geográfica da linhagem paterna (Goodwin *et al.*, 2007; Pinheiro, 2010; Butler, 2011). Na determinação do sexo do indivíduo, amplifica-se uma região do gene da Amelogenina, resultando em fragmentos de 106 pb e 112 pb aquando da amplificação do cromossoma X e Y respetivamente no caso de se tratar de um indivíduo do sexo masculino (e amplificação de dois fragmentos de 106 pb no caso de se tratar de um indivíduo do sexo feminino) (Steinlechner *et al.*, 2002; Afonso, 2010; Pinheiro, 2010; Morikawa, *et al.* 2011; Tozzo *et al.*, 2013).

Na identificação da linhagem paterna, são estudados os polimorfismos específicos do cromossoma Y, estes podem ser bialélicos (onde estão incluídos os SNP - Single Nucleotide Polymorphisms - ver capítulo 1.11.4) ou multi-alélicos (marcadores do tipo STR - Short Tandem Repeat - ver capítulo 1.11.1) (Butler, 2005; Rapley e Whitehouse, 2007). Os marcadores do tipo STR no cromossoma Y, ou Y-STRs, são os mais utilizados em genética forense porque demonstram maior diversidade intrapopulacional, que os marcadores bialélicos (Pinheiro, 2010). Por esse motivo, associado a baixas taxas de mutação e ao facto do cromossoma Y ser herdado apenas por via paterna, os marcadores bialélicos do cromossoma Y, ou Y-SNPs (SNPs do cromossoma Y - ver capítulo 1.11.4.1) são úteis para a identificação da eventual origem das linhagens paternas (Rapley e Whitehouse, 2007; Pinheiro, 2010).

1.4 ADN mitocondrial

Uma alternativa ao estudo do ADN nuclear é o estudo do ADN mitocondrial (ADNmt, ou do inglês *mtDNA*) que se localiza no interior das mitocôndrias e é transmitido apenas pela via materna, e por isso não sofre recombinação (Alaeddini *et al.*, 2010; Pinheiro, 2010; Butler, 2011; Parson *et al.*, 2014). O estudo de *mtDNA* é bastante útil particularmente em amostras degradadas, uma vez que as mitocôndrias são organelos presentes na célula em grande número, isto é, podem existir entre cerca de 50 a 700 mitocôndrias por célula e cada mitocôndria, tem 2 a 3 moléculas de *mtDNA*, o que equivale a ter entre 100 a 2000 cópias de *mtDNA* por célula (Alaeddini *et al.*, 2010; Butler, 2011).

Por não sofrer recombinação é útil na identificação de linhagens maternas, estudos populacionais e de evolução (Pereira *et al.*, 2000; Pinheiro, 2010; Butler, 2011; Parson

et al., 2014). O estudo de ADN mitocondrial não permite, no entanto a identificação humana positiva, uma vez que o ADN mitocondrial é partilhado por toda a linhagem materna, ou seja, um indivíduo possui ADN mitocondrial idêntico ao da sua mãe, mas também ao das suas irmãs e irmãos, da sua avó materna, tias, tios, primos e primas da linhagem materna (filhos de irmãs da mãe) (Kaestle e Horsburgh, 2002; Afonso, 2010). O mesmo acontece com o cromossoma Y, que é transmitido exclusivamente via paterna, pelo que, um indivíduo tem o cromossoma Y idêntico ao do pai, irmãos, avô paterno, tios e primos masculinos da linhagem paterna (Kaestle e Horsburgh, 2002).

O ADN mitocondrial é uma molécula circular, haplóide, com 16 569 pb, constituído por duas cadeias, uma cadeia leve (L – light), rica em Citosinas e Timinas e uma pesada (H – heavy) rica em Guaninas e Adeninas (designa-se por cadeia pesada por conter um elevado número de guaninas, o nucleótido com maior peso molecular) (Pinheiro, 2010; Butler, 2011). A numeração das posições nucleotídicas no mtDNA (da 1ª a 16 569ª pb) inicia-se perto da origem de replicação da cadeia pesada (O_H) (Butler, 2011).

É composto por uma região codificante e uma não codificante ou região controlo (com cerca de 1100 pb), onde se incluem três segmentos hipervariáveis (HVR -*Hipervariable Region*), HV1, HV2 e HV3, sendo que HV1 e HV2 são os mais estudados (ver representação na Figura 1.2) (Pereira *et al.*, 2000; Pinheiro, 2010; Butler, 2011).

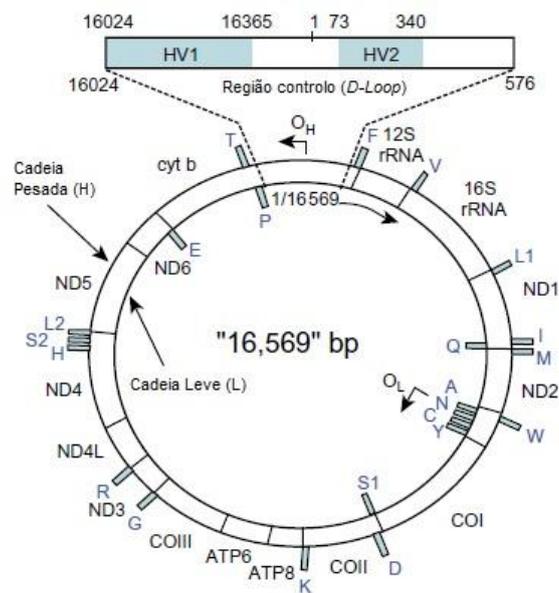


Figura 1.2 - Imagem representativa da molécula circular de ADN mitocondrial, indicando a região controlo HV1 e HV2 (adaptado de Butler, 2011).

Por se tratar de uma molécula com dupla cadeia circular fechada, torna-se menos suscetível à degradação por exonucleases (Butler, 2011; Allentoft *et al.*, 2012). No entanto, por estar próxima da cadeia respiratória (que é a principal fonte intracelular de radicais livres oxidativos) e pelos seus sistemas de reparação de replicação serem limitados, o *mtDNA* tem uma taxa de mutações entre 5 a 10 vezes superior ao ADN nuclear (Butler, 2011; Payne *et al.*, 2013).

1.4.1 Sequenciação de ADN mitocondrial

No estudo do ADN mitocondrial, após a amplificação da região de controlo, segue-se a sequenciação. Geralmente, a sequenciação pelo método de *Sanger*, descrito em 1977, é o mais utilizado (Butler, 2011). A sequenciação de *Sanger*, é um método simples que replica a habilidade natural da enzima polimerase durante a sua extensão aquando da produção de novas das cadeias de ADN (Rapley e Whitehouse, 2007).

O método de *Sanger*, inicia-se com cadeias simples de ADN e baseia-se na utilização de desoxinucleótidos (dNTP's) no processo de extensão, na reação de amplificação e na incorporação didesoxinucleótidos (ddNTP's) como terminadores das cadeias em extensão ligados a diferentes fluorocromos, permitindo a sua identificação (Butler, 2011). Os ddNTP's são dNTP's modificados, sem o grupo hidroxilo da extremidade 3', impossibilitando a extensão da cadeia de ADN após a enzima polimerase ter adicionado um ddNTP à cadeia que está ser sintetizada (Butler, 2011).

No final da sequenciação são obtidas sequências com diversos tamanhos, cada uma divergindo em apenas um nucleótido (Butler, 2011). Segue-se a separação por eletroforese capilar e leitura de cada um dos nucleótidos das sequências por excitação dos fluorocromos ligados a cada ddNTP (o ddATP - Adenina - emite a cor verde, o ddTTP - Timina - emite cor vermelha, o ddCTP - Citosina - emite cor azul e a o ddGTP - Guanina - emite cor amarela, em que tipicamente é exibido a preta de forma a facilitar a visualização (Butler, 2011). A sequenciação é feita separadamente para cada um dos *primers* envolvidos, por isso, realiza-se uma reação de sequenciação com o *primer forward* e outra com o *primer reverse* (para cada região a amplificar), com o objetivo de comparar e confirmar as cadeias complementares sequenciadas (Butler, 2005).

Durante o processo de sequenciação, pode ocorrer **heteroplasmias de posição**, isto é, quando dois nucleótidos diferentes se encontram na mesma posição em diferentes moléculas da mesma mitocôndria, ou **heteroplasmias de comprimento**, associadas frequentemente a inserções ou deleções (na sua maioria na região de poli C - região com variado número de citosinas), alterando o tamanho da sequência de *mtDNA* (Pinheiro, 2010; Butler, 2011; Parson *et al.*, 2014). Inicialmente considerava-se as heteroplasmias como sendo eventos raros, mas estudos mais recentes têm vindo a revelar que podem ser mais comuns do que se pensava (Pinheiro, 2010; Butler, 2011). Contudo, foram reportados, no máximo duas heteroplasmias num só indivíduo, ou seja, no caso de ocorrerem mais casos de heteroplasmias, deve considerar-se a possibilidade de contaminações (Butler, 2011; Parson *et al.*, 2014).

As regiões HV1 e HV2, após serem amplificadas e sequenciadas são comparadas com uma sequência de referência (cadeia L da Sequência de Referência de Cambridge - CRS) descrita por Anderson e colaboradores em 1981 e revista por Andrews e colaboradores em 1999 (Sequência de Referência de Cambridge revista - rCRS), na qual foram detetados e corrigidos 11 erros (Anderson *et al.*, 1981; Andrews *et al.*, 1999; Pinheiro, 2010; Butler, 2011).

As alterações observadas na amostra em estudo, por comparação com a sequência de referência, correspondem ao haplótipo do indivíduo (Pinheiro, 2010; Butler, 2011). Os haplótipos agrupam-se em haplogrupos (haplótipos de linhagens próximas) que vão permitir determinar a ancestralidade do indivíduo, com recurso à árvore filogenética *PhyloTree*, criada por Van Oven e Kayser em 2009 (ver Figura 1.3) (Van Oven e Kayser, 2009). Os Haplogrupos são classificados de A a Z, seguidos de números e letras que definem os subhaplogrupos. (Pinheiro, 2010). Os haplogrupos L0, L1, L2, L3, L4, L5 e L6 são característico das populações Africanas (Salas *et al.*, 2007; Van Oven e Kayser, 2008; Pinheiro, 2010). O haplogrupo L3 subdivide-se nos dois grandes grupos M e N que terão saído de África há cerca de 60.000 - 80.000 anos (Salas *et al.*, 2007; Van Oven and Kayser, 2008; Pinheiro, 2010). Os haplogrupos mais comuns na Europa são o H, I, J, K, T, U, V, W e X; os haplogrupos associados às populações Asiáticas são o A, B, C, D, E, F, G e M; os haplogrupos Americanos são o A, B, C e D do haplogrupo asiático (isto é, estes haplogrupos Asiáticos juntaram-se na população americana antes da colonização europeia) (Pinheiro, 2010).

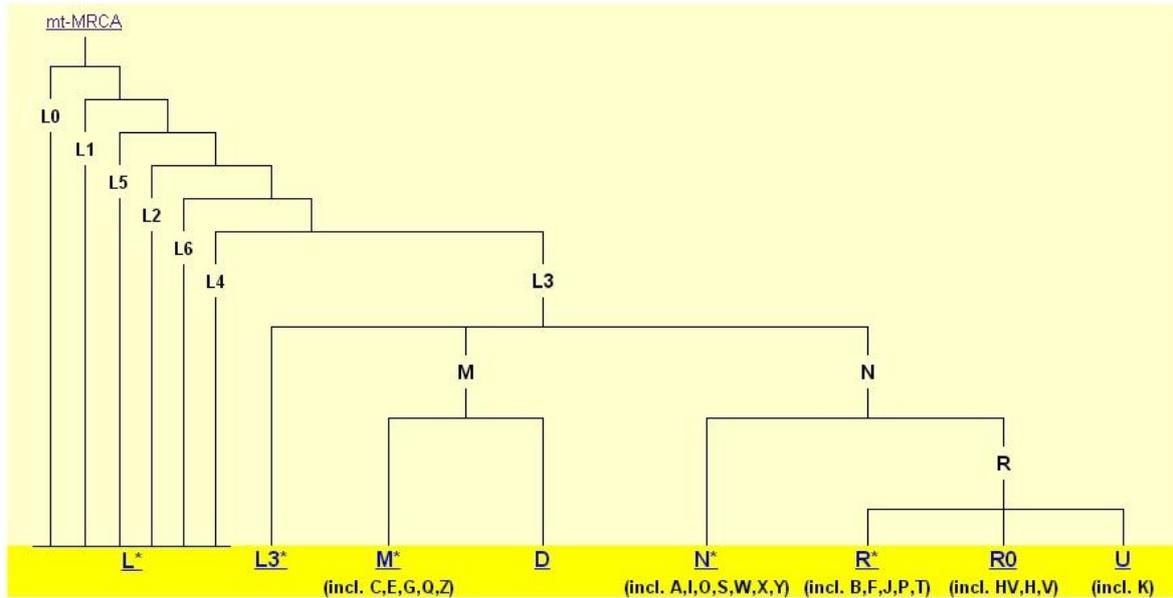


Figura 1. 3 - Árvore filogenética com os diferentes haplogrupos com base em ADN mitocondrial, **mt-MRCA** - Most Recent Common matrilineal Ancestor (www.phylotree.org).

A base de dados EMPOP (EDNAP mitochondrial DNA population database) disponível online (www.empop.org) é mundialmente utilizada com o intuito de recolher e controlar a qualidade das sequências publicadas (Parson e Dür, 2007). Nesta base de dados estão incluídas um total de cerca de 35 000 sequências englobando as mais variadas regiões do globo, desde a África sub-sariana, Oeste da Eurásia, Este da Ásia e sudeste da Ásia (Parson e Dür, 2007). De todas as populações, a que está melhor representada é a Europeia com cerca de 10 000 sequências (Parson e Dür, 2007; www.empop.org). Entre as diversas funções da EMPOP, esta permite determinar a frequência dos haplótipos introduzidos, nas diferentes populações, indicando quantas sequências iguais estão incluídas na base de dados (Parson e Dür, 2007). Esta função torna-se bastante útil para verificar se o haplótipo é comum numa determinada população em estudo.

1.5 O ADN no tecido ósseo

Macroscopicamente, os ossos de um indivíduo adulto apresentam duas componentes estruturais; o osso compacto ou cortical (mais denso), que se encontra por exemplo nas diáfises (zona mediana dos ossos longos, compreendida entre as extremidades) ou ossos chatos (ex: crânio e escápula) e osso esponjoso ou trabecular (mais poroso)

encontrando-se nas epífises (extremidades dos ossos longos) ou corpos vertebrais (Campos *et al.*, 2012; White *et al.*, 2012).

Os dentes são compostos maioritariamente por tecido compacto, apresentando diversas estruturas desde a raiz à coroa. No interior do dente, encontra-se a polpa delimitada pela dentina que por sua vez é revestida pelo esmalte (tecido mais duro do corpo humano), enquanto que a zona da raiz é protegida pelo cimento (tecido calcificado com grande densidade celular) (Adler *et al.*, 2011; White *et al.*, 2012). Os dentes são os únicos elementos do esqueleto humano que interagem com o ambiente e por isso, são os mais resistentes a abrasões químicas e físicas, tornando-se ideais para análises genéticas, uma vez que o risco de contaminação é muito mais reduzido dada à compactação do tecido ósseo envolvente (Adler *et al.*, 2011; White *et al.*, 2012).

Microscopicamente, o tecido ósseo é composto por células responsáveis pela síntese e deposição da matriz óssea (osteoblastos), manutenção (osteócitos) e reabsorção do tecido ósseo (osteoclastos) e por material extracelular calcificado (matriz óssea) (Campos *et al.*, 2012; White *et al.*, 2012). A matriz óssea é a componente maioritária sendo constituída por uma fração inorgânica (hidroxiapatite e fosfato de cálcio) que atribui a resistência e dureza aos ossos e por uma fração orgânica, constituída por cerca de 90% de colagénio do tipo I (mais comum presente nas cartilagens, tendões, ossos e pele) e outras proteínas não colagénicas (Loreille *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2012; White *et al.*, 2012).

A preservação do ADN no tecido ósseo está relacionada com a sua ligação à matriz proteica do colagénio, no entanto há estudos que demonstram que o ADN pode ser também encontrado na fração mineral, ligando-se aos cristais de hidroxiapatite (Campos *et al.*, 2012).

O colagénio é o principal componente dos tecidos conjuntivos. É uma proteína fibrosa com uma estrutura em tripla hélice presente na pele, ossos, tendões, cartilagens e dentes (Campos, 2005). Esta ligação do ADN ao colagénio ocorre por pontes de hidrogénio entre os grupos fosfato do ADN e os grupos CH constituintes do colagénio, estas ligações vão criar estabilidade e proteção à molécula de ADN contra nucleases (Mrevlishvili e Svintradze, 2005). Mrevlishvili e Svintradze produziram um modelo molecular teórico do complexo entre o colagénio e o ADN (Mrevlishvili e Svintradze, 2005). De acordo com este estudo, tendo em conta o tamanho da proteína de colagénio,

calculou-se que o ADN se encontra rodeado por 5 proteínas de colagénio ligadas por pontes de hidrogénio, tal como ilustrado na Figura 1.4 (Mrevlishvili e Svintradze, 2005).

Uma explicação possível para a presença de ADN na fração mineral é o encapsulamento dos osteóides (células da matriz óssea não mineralizada, produzidas pelos osteoblastos) por parte da hidroxiapatite durante a mineralização progressiva da matriz óssea, protegendo assim o ADN da degradação (Campos *et al.*, 2012). Os estudos que demonstraram que o ADN é capaz de se ligar a cristais de hidroxiapatite, basearam-se em modelos teóricos e síntese laboratorial de hidroxiapatite na presença de ADN (proveniente de sémén de salmão) (Okazaki *et al.*, 2001). A hidroxiapatite (HAp - $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$) é um mineral capaz de se ligar facilmente a moléculas e macromoléculas orgânicas, por isso, pensa-se que os grupos fosfato do ADN carregados negativamente se ligam por grande afinidade aos iões de cálcio (carregados positivamente) dos cristais de HAp como está representado na Figura 1.5 (Okazaki *et al.*, 2001).

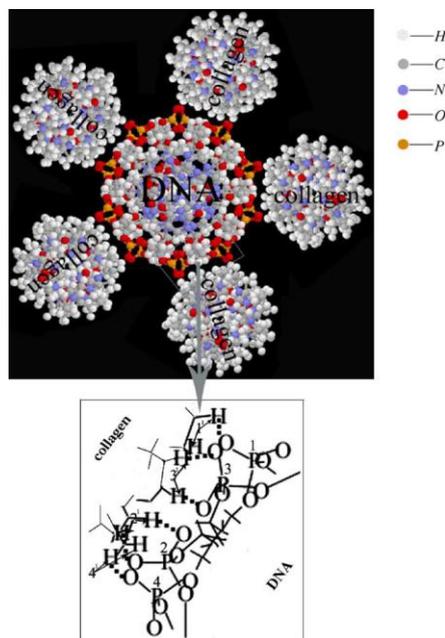


Figura 1. 4 - Representação do modelo teórico do complexo entre ADN e colagénio, onde é possível ver as ligações por pontes de hidrogénio dos grupos fosfato do ADN e os grupos CH do colagénio (Mrevlishvili e Svintradze, 2005).

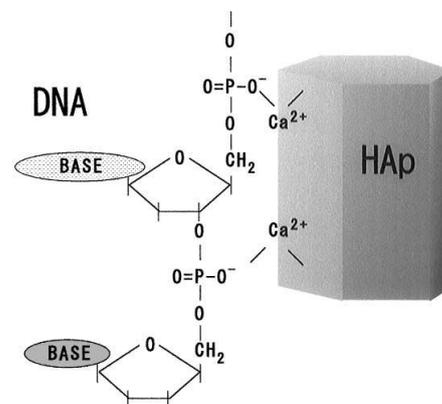


Figura 1. 5 - Representação do modelo esquemático das ligações dos grupos fosfato do ADN com os iões de cálcio da hidroxiapatite (Okazaki *et al.*, 2001).

A forma como ADN se encontra preservado no tecido ósseo ainda está longe de ser bem compreendida e estes modelos de ligação entre o ADN e a fração orgânica e inorgânica do osso constituem apenas modelos teóricos, uma vez que foram estudados *in vitro*. No entanto, Paula Campos e colaboradores sugerem, com base no estudo de ossos de animais, que tanto a componente orgânica como a inorgânica contribuem para a estabilização e preservação do ADN presente nos ossos (Campos *et al.*, 2012).

1.6 O estudo de amostras ósseas

O estudo genético de amostras ósseas contemporâneas (ossos e dentes) é um forte contributo para a antropologia forense (seja para os casos de investigação de parentesco, como para os casos de identificação pessoal - identificação de desconhecidos, crime e ocultação de cadáver ou desastres em massa), quando a vítima já se encontra esqueletizada ou seja, quando a identificação não é possível com recurso às características fenotípicas visíveis, como a cor da pele, dos olhos, cabelo ou outras (Schmitt *et al.*, 2006; Pereira, 2009; Draus-barini *et al.*, 2013). A identificação genética recorre ao estudo dos microssatélites autossómicos, ou STR (*Short Tandem Repeats*) numa comparação direta de amostras problema com amostras de referência (amostra da qual conhecemos a sua origem) como é o exemplo de objetos pessoais da vítima (ex: escova de dentes, escova do cabelo etc.) ou através de comparação com os perfis genéticos de familiares, (Pinheiro, 2008; Draus-barini *et al.*, 2013).

Em amostras arqueológicas, como já foi referido, o ADN antigo é maioritariamente recolhido de coleções osteológicas presentes em museus, e o seu estudo implica danos irreparáveis em amostras insubstituíveis, uma vez que é uma análise destrutiva, e por isso, muitas das vezes, os museus não autorizam a sua recolha (Kaestle e Horsburgh, 2002; Rohland *et al.*, 2004; Bolnick *et al.*, 2012). Para minimizar os estragos na morfologia do osso, é possível retirar somente um fragmento na zona da diáfise, em ossos longos, não sendo necessário destruir o osso por completo, ou no caso dos dentes, apenas perfurar o dente para retirar a dentina ou o cimento (Kaestle e Horsburgh, 2002; Adler *et al.*, 2011).

Têm sido desenvolvidos métodos não destrutivos, usando técnicas de extração química a nível da superfície dos ossos ou dentes (Rohland *et al.*, 2004; Bolnick *et al.*, 2012), no

entanto, apesar de manter a integridade física das amostras, estas técnicas apenas demonstram maior eficácia em dentes (93% em dentes e 67% em ossos), além de produzirem alterações químicas na amostra (Bolnick *et al.*, 2012).

Para aumentar as probabilidades de obter bons resultados nos métodos de extração, as amostras devem ser recolhidas o mais brevemente possível após a escavação, de forma a evitar a degradação do ADN provocada pela alteração das condições ambientais, uma vez que as condições de armazenamento das amostras (incluindo temperatura, humidade e acondicionamento) podem ser fundamentais para a preservação do ADN, minimizando também a contaminação com ADN dos "operadores" (Herrmann e Hummel, 1994; Brown, 2000; Pruvost *et al.*, 2007). Contudo, como por vezes é difícil a recolha imediata, dado que, para proceder à análise genética é aconselhável que o estudo antropológico já tenha sido realizado, muitas das vezes a amostra é estudada pela genética após ter sido manuseada por diversos observadores (desde os Arqueólogos, Antropólogos ou curadores dos museus) (Herrmann e Hummel, 1994). Por este facto, antes da extração de ADN, as amostras ósseas devem ser descontaminadas por meios químicos ou físicos (Herrmann e Hummel, 1994).

1.7 Degradação física e química

O estado de conservação dos ossos e consequentemente do ADN, vai depender de uma série de variáveis físicas, químicas e biológicas e de fatores intrínsecos e extrínsecos (Buikstra e Ubelaker, 1994; Schmitt *et al.*, 2006; Tibbett, 2008) Como fatores extrínsecos, o processo de conservação vai depender se o corpo foi inumado com roupa ou não; do período de tempo decorrido antes do corpo ser enterrado; da geografia da inumação (zonas permanentemente congeladas permitem uma melhor preservação que as zonas amenas e em especial que as zonas tropicais ou desérticas); do tipo de sepultura (se o corpo foi sepultado no solo, pedra ou caixão, variando ainda se foi construído em madeira, zinco etc.); do tipo de solo (variando o pH, e a densidade do solo: solos argilosos, arenosos, etc.); e ainda a profundidade a que o corpo foi sepultado (Schmitt *et al.*, 2006; Pruvost *et al.*, 2007; White *et al.*, 2012).

O ambiente em que o corpo é sepultado vai determinar as condições a que os ossos vão estar sujeitos como a temperatura, o oxigénio, a humidade, o pH, a exposição a raios

UV e a presença de microrganismos (bactérias e fungos) (Schmitt *et al.*, 2006; White *et al.*, 2012). As condições de inumação ideais à conservação do material ósseo seriam zonas bem drenadas, com pouca humidade, solos neutros ou ligeiramente alcalinos, temperaturas baixas ou temperadas em grande profundidade (White *et al.*, 2012). De acordo com estudos anteriores o ADN tem maiores probabilidades de se preservar em material ósseo, quando este é inumado em condições de pH de cerca de 7.5 e a temperaturas de -5°C (Allentoft *et al.*, 2012).

Os fatores de preservação intrínsecos passam essencialmente pelo nível de compactação e calcificação dos ossos e por isso, quanto mais compactos, mais resistentes à degradação (White *et al.*, 2012). Variando assim, a quantidade e qualidade de ADN obtido com a idade à morte, o sexo, o tamanho do osso ou a sua forma (ossos longos são mais compactos que ossos curtos ou chatos) (White *et al.*, 2012).

É necessário ainda ter em conta que a mudança abrupta de ambiente a que os ossos são sujeitos durante a escavação, ou seja a transferência do ambiente em que se encontravam sepultados para o ambiente dos museus ou coleções naturais, pode afetar gravemente a preservação do ADN (Pruvost *et al.*, 2007; Allentoft *et al.*, 2012).

A degradação pós-morte do ADN no meio intracelular pode ocorrer por nucleases, reações hidrolíticas e reações oxidativas (Krings *et al.*, 1997; Pääbo *et al.*, 2004; Alaeddini *et al.*, 2010; Cox *et al.*, 2012). Estes danos são responsáveis pela destruição das cadeias de ADN (locais de destruição indicados na Figura 1.3) provocando a sua fragmentação em tamanhos muito reduzidos (em média entre 100 a 500 pares de bases) podendo impedir a aplicação de técnicas de análise molecular (Pääbo *et al.*, 2004; Alaeddini *et al.*, 2010; Cox *et al.*, 2012;).

1.8 Contaminações

Além da degradação do ADN, um dos problemas mais relatados e mais difíceis de contornar é a distinção entre ADN em estudo e as contaminações com ADN estranho à amostra, pois, como já foi referido, antes das amostras osteológicas serem analisadas num laboratório, já terão passado pela mão de muitos outros investigadores, aumentando o risco de contaminações (Yang e Watt, 2005; Brown e Brown, 2013; Kirsanow e Burger, 2012). Inclusive, em alguns dos primeiros estudos com ADN

antigo, a partir de amostras com milhões de anos, percebeu-se mais tarde, que o ADN amplificado era resultado de contaminações com ADN estranho à amostra, anulando a interpretação dos dados inicialmente propostos (Kaestle e Horsburgh, 2002; Noonan *et al.*, 2006).

Uma forma de eliminar as possíveis contaminações por ADN exógeno (seja ele humano ou bacteriano) é evitar a contaminação no interior do laboratório (Pääbo *et al.*, 2004; Knapp *et al.*, 2012). É aconselhável que haja separação física entre o local onde se procede à extração do ADN, do local de amplificação e do local de deteção dos produtos amplificados (Knapp *et al.*, 2012; Pääbo *et al.*, 2004). O trajeto das amostras deve ser unidirecional, desde a extração à deteção dos produtos amplificados (Knapp *et al.*, 2012). Os procedimentos de extração e amplificação devem realizar-se no interior de uma câmara de fluxo laminar, deve usar-se sempre proteção adequada como luvas, batas, e outros equipamentos, limpar regularmente os espaços de trabalho, bem como os materiais que estejam em contacto com as amostras que devem ser, não só limpos, mas também descontaminados (Pääbo *et al.*, 2004; Knapp *et al.*, 2012).

O conjunto destas limitações impostas às técnicas de ADN antigo refletem a dificuldade de trabalhar com este tipo de amostras, e talvez por isso, esta área de estudo seja das poucas em que os resultados negativos podem ser encarados como uma forma de avaliar a qualidade do próprio estudo (Brown, 2000).

1.9 Extração de ADN

De acordo com vários estudos, a fração esponjosa do osso é a mais rica em ADN, no entanto é a que menos se preserva dado à sua estrutura frágil, estando também mais sujeita a contaminações, por isso é escolhido preferencialmente o osso compacto por ser mais resistente à degradação e estar menos sujeito a contaminações exógenas (Herrmann e Hummel, 1994; Kitayama *et al.*, 2010; Pereira, 2009). Os ossos mais utilizados para extração de ADN são os ossos longos dos membros inferiores, ou caso existam, os dentes (Herrmann e Hummel, 1994; Pereira, 2009; Kitayama *et al.*, 2010).

A extração de ADN a partir de amostras ósseas é bem mais desafiante que a partir de sangue, saliva ou tecidos moles, uma vez que é necessário recorrer a tratamentos

prévios das amostras antes da extração, para evitar contaminações bem como para proceder à desmineralização do tecido ósseo, que pode levar a perdas de ADN durante o processo (Bolnick *et al.*, 2012; Caputo, Irisarri, Alechine, e Corach, 2013).

O processo de preparação das amostras inclui o corte das extremidades dos ossos que estiveram mais expostas a agentes externos (Herrmann e Hummel, 1994); a remoção da superfície externa dos ossos com uma lâmina elétrica, lixa ou outro tipo de abrasão mecânica, para eliminar possíveis contaminações e inibidores de PCR (Kitayama *et al.*, 2010; Caputo *et al.*, 2013;). O osso é ainda descontaminado com detergentes, hipoclorito, etanol ou UV (Kitayama *et al.*, 2010; Caputo *et al.*, 2013; Draus-barini *et al.*, 2013) . Os ossos e dentes são então cortados em pedaços e triturados com um criotriturador, sendo reduzidos a pó (Rohland e Hofreiter, 2007a; Jakubowska *et al.*, 2012; Draus-barini *et al.*, 2013).

A partir das amostras em pó, podem ser utilizados variados métodos de extração (em média a partir de cerca de 500mg de osso pulverizado), mas todos eles seguem os passos gerais de desmineralização, eliminação de restos celulares e biomoléculas que não o ADN, concentração do ADN com um álcool e lavagem e purificação do material extraído (Rohland e Hofreiter, 2007a; Kitayama *et al.*, 2010; Butler, 2011; Jakubowska *et al.*, 2012; Caputo *et al.*, 2013; Draus-barini *et al.*, 2013;).

Entre os vários métodos de extração apropriados para material ósseo, o mais comum e um dos mais eficientes é o método de extração orgânica com fenol-clorofórmio (Adler *et al.*, 2011; Butler, 2011; Caputo *et al.*, 2013; Jakubowska *et al.*, 2012; Kitayama *et al.*, 2010; Loreille *et al.*, 2007; Pinheiro, 2008) seguido por métodos com kits comerciais como o NucleoSpin® DNA Trace Bones, o QIAamp DNA Investigator Kit ou o Kit PrepFiler Express BTA, sendo este último, um método automático (*Genomic DNA from forensic samples, User manual*, 2012; *PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits, User Guide*, 2010).

Mesmo utilizando os métodos de extração mais apropriados, a quantidade de ADN extraído em amostras com ADN antigo pode ser muito baixo, normalmente muito inferior a 1µg/µL (Benoit *et al.*, 2013). Mas, apesar da maioria dos métodos de extração ser capaz de extrair quantidades suficientes para análise genética, as técnicas de extração de ADN antigo têm algumas limitações pois, devido ao conjunto de agressões a que está sujeito, a partir de um certo período de tempo, cerca de 130.000 anos é quase

impossível obter qualquer informação genética, mesmo sob boas condições de conservação (Kaestle e Horsburgh, 2002).

1.10 Amplificação e Quantificação de ADN (PCR e RT-PCR)

A **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*) surgiu em meados dos anos 80 e veio trazer uma revolução na forma como o ADN pode ser estudado (Herrmann e Hummel, 1994; Brown, 2000). Esta técnica baseia-se na amplificação enzimática de fragmentos específicos de ADN, ladeados por dois primers (pequenas sequências que emparelham com o ADN molde) que hibridam com a zona a amplificar e vão sendo alongadas, dando origem a uma cópia do ADN molde (Herrmann e Hummel, 1994; Pinheiro, 2008). A mistura de reação é sujeita a um número de ciclos repetidos de desnaturação do ADN, hibridação dos primers e sua extensão, resultando num aumento exponencial do número de cópias da zona amplificada (Rapley e Whitehouse, 2007; Pinheiro, 2008). A PCR multiplex, foi desenvolvida mais recentemente e permite a amplificação de mais do que uma região ao mesmo tempo (pois são adicionados vários pares de primers). Esta técnica reduz a quantidade de amostra necessária para amplificar o mesmo número de regiões e minimiza o tempo e o dinheiro despendidos na análise (Alaeddini, Walsh e Abbas, 2010).

A PCR multiplex pode amplificar 20 ou mais fragmentos com comprimentos diferentes, relativos a diferentes alelos que podem ser separados uns dos outros por eletroforese capilar (Butler, 2005 e 2011). A deteção dos fragmentos é realizada por um sequenciador automático que, pela ação de um laser, é capaz de excitar os diferentes fluorocromos ligados a cada primer, (uma vez que podem existir fragmentos amplificados com o mesmo tamanho, mas de marcadores genéticos diferentes, estes são diferenciados pelos fluorocromos diferentes) (Butler, 2005). O tamanho de cada fragmento bem como a cor emitida permite a atribuição da designação ao alelo, por comparação com um *alelic ladder* (marcador molecular). Finalmente, é emitido um eletroferograma em que os diferentes alelos são representados por diferentes picos (Butler, 2005).

Devido às características do ADN antigo, têm sido desenvolvidas técnicas cada vez mais sensíveis com o intuito de detetar fragmentos muito pequenos de ADN, no entanto

um dos principais problemas que se coloca é a reduzida quantidade de ADN inicial, ou seja, a existência de poucas moléculas de ADN base para amplificação (Butler, 2005; Pinheiro, 2008; Alaeddini *et al.*, 2010;). LCN, do inglês *Low Copy Number* refere-se a concentrações de ADN genómico inferiores a 100 pg (uma célula diploide humana contem cerca de 6,6 pg) (Alaeddini *et al.*, 2010; Butler, 2005). Um dos métodos sugeridos para aumentar o número de cópias é o **Nested PCR** (envolve 2 reações de PCR separadas, em que a segunda recorre a primers desenhados para amplificar regiões mais pequenas e internas ao ADN já amplificado na primeira PCR (Pinheiro, 2008; Alaeddini *et al.*, 2010; Butler, 2011). Contudo, é necessário transferir os produtos de PCR do primeiro para o segundo ensaio, aumentando a hipótese de contaminações (Pinheiro, 2008; Butler, 2011). Outros métodos compreendem a utilização de primers que amplifiquem regiões mais pequenas, redução do volume da PCR, aumento do volume de ADN aplicado, aumento do número de ciclos da PCR, aumento do volume de ADN para sequenciação e aumento do tempo de injeção no capilar aquando a análise (Pinheiro, 2008; Alaeddini *et al.*, 2010; Butler, 2011).

Outro problema que a amplificação de ADN antigo tem de contornar é a presença de inibidores de PCR (como é o exemplo dos ácidos húmicos, compostos orgânicos presentes no solo, encontrando-se frequentemente em ossos e dentes sepultados diretamente na terra) que podem ser extraídos em simultâneo com o ADN antigo (Kaestle e Horsburgh, 2002; Woide *et al.*, 2010).

Uma ferramenta bastante útil é a PCR em tempo real (**RT-PCR**) que pode ser utilizada para determinar a concentração de ADN presente na amostra antes de se proceder à amplificação das regiões alvo (Butler, 2011). Na RT-PCR para quantificação de ADN podem estar envolvidas sondas (às quais estão ligados fluorocromos) que hibridam numa zona específica do ADN a amplificar e durante a extensão, a Taq polimerase ao aproximar-se da sonda, secciona os fluorocromos a que está ligada, emitindo fluorescência (Barbisin *et al.*, 2009; *Quantification Kit User's Manual*, 2012). Esta fluorescência vai aumentar exponencialmente ao longo dos ciclos de PCR sendo registada em gráfico (*Quantification Kit User's Manual*, 2012). Isto significa que pode ser possível determinar a concentração de ADN numa determinada amostra em estudo comparando-a com as amostras standard em que a concentração é conhecida. Sabendo a quantidade de ADN presente em cada amostra é possível ajustar o volume de ADN molde a utilizar na reação de PCR (Hofreiter *et al.*, 2001; Rapley e Whitehouse, 2007;

Adler *et al.*, 2011; Butler, 2011). Geralmente, os kits comerciais de quantificação possuem controlos positivos que vão ser amplificados ao mesmo tempo que o ADN molde e que permite a deteção de inibidores de PCR nos produtos extraídos (Loreille *et al.*, 2007).

1.11 Marcadores Genéticos

Em genética forense tem-se vindo a desenvolver métodos de identificação humana cada vez mais rápidos, precisos e com maior poder de discriminação, a partir de amostras biológicas de diferentes naturezas (sangue, saliva, sémen, ossos, entre outras) (Rapley e Whitehouse, 2007; Pinheiro, 2010). O principal objetivo destes métodos, é a determinação do perfil genético de uma determinada amostra biológica (Goodwin *et al.*, 2007; Pinheiro, 2010). O perfil genético de um indivíduo é o conjunto de características hereditárias individuais para um determinado conjunto de marcadores genéticos (Pinheiro, 2010). Os marcadores genéticos, ou moleculares, são então, regiões do ADN caracterizadas por conterem polimorfismos suscetíveis de apresentar variação na população (Pinheiro, 2010).

Uma grande porção do genoma humano é constituída por ADN não codificante, sendo que, algumas destas regiões são altamente polimórficas, com sequências de ADN repetidas em *tandem* e por isso com elevado interesse para a genética forense (Pinheiro, 2010; Butler, 2011). Desde a descoberta destas regiões e da sua importância para a identificação humana, os marcadores genéticos das regiões não codificantes têm vindo a sofrer uma aumento na variabilidade de tipos de marcadores e uma diminuição do tamanho dos produtos amplificados com o objetivo de obter resultados em amostras degradadas (desde os VNTR - variable number of tandem repeats- ou RFLPs - restriction fragment length polymorphism - , aos STRs, InDels, ou SNPs) (Rapley e Whitehouse, 2007; Pinheiro, 2010; Butler, 2011).

1.11.1 Short Tandem Repeat - (STR)

Os STR (*Short Tandem Repeat*) ou regiões de ADN micro-satélite consistem em unidades de repetição com 1 a 5 nucleótidos, repetidos entre 2 a 40 vezes (Rapley e

Whitehouse, 2007). Estes marcadores genéticos são muito abundantes em zonas não codificantes do ADN nuclear, e são facilmente amplificadas por PCR, uma vez que as áreas de repetição têm até 400 pb (Butler, 2011; Pinheiro, 2010; Rapley e Whitehouse, 2007). Os STR podem ser interpretados como polimorfismos de tamanho uma vez que possuem muita variação no número de repetições, o que os torna ideais em identificação humana, pois exibem grande poder de discriminação (Rapley e Whitehouse, 2007; Butler, 2011). Os STR mais utilizados em genética forense são os tri, tetra e pentanucleotídicos (Pinheiro, 2010). Um perfil genético de um indivíduo, no âmbito de identificação genética humana, trata-se então da informação sobre o número de repetições relativa a todos os STR estudados (Pinheiro, 2010). Na determinação de um perfil genético, são utilizados kits comerciais de PCR multiplex, que estudam cerca de 15 STR em simultâneo e o gene homólogo de amelogenina (Amorim e Pereira, 2005; Pinheiro, 2010). A amelogenina está presente nos cromossomas X e Y mas com formas ligeiramente diferentes, é um gene que codifica para uma proteína que está envolvida na deposição do esmalte dentário durante o desenvolvimento dos dentes, contudo no cromossoma X tem uma região com tamanho diferente da região homóloga do cromossoma Y, tornando-se ideal para a identificação do género sexual dos indivíduos em estudo (Nakahori *et al.*, 1991; Morikawa *et al.* 2011; Brown e Brown, 2013; Tozzo *et al.*, 2013).

Geralmente, os kits de STRs recomendam a aplicação com cerca de 0,5 a 1 ng de ADN inicial na reação de PCR para obtenção de bons resultados, o que por vezes é difícil de obter em ADN antigo (Alaeddini *et al.*, 2010; Pinheiro, 2010).

Por apresentarem um grande poder de discriminação, além de serem úteis em identificação humana, os marcadores do tipo STR são também amplamente utilizados em testes de parentesco (Butler, 2005, 2011; Keyser *et al.*, 2003, 2009). Esta aplicação tem uma elevada importância em estudos de populações do passado, no sentido de identificar relações de parentesco (relacionando os dados de marcadores de STR com o estudo de linhagens maternas através da análise do ADN mitocondrial e linhagens paternas através do estudo de marcadores no cromossoma Y), bem como no estudo de eventos migratórios na história das populações humanas (Keyser *et al.*, 2003, 2009).

Um dos desafios no estudo de STRs é presença de fenómenos *drop in* e *drop out*, muito frequentes em amostras degradadas (Pinheiro, 2008). *Drop out* caracteriza-se pelo

desaparecimento de um alelo, eventualmente devido a uma alteração da sequência na área de ligação dos primers, o que resulta na não amplificação dessa região e consequentemente em dificuldades na análise dos resultados, uma vez que o indivíduo é interpretado como homozigótico quando na verdade pode ser heterozigótico (Pinheiro, 2008 e 2010; Butler, 2005 e 2011). Este fenómeno pode também ocorrer em ambos os alelos, normalmente em amostras degradadas, nos STRs pentanucleotídicos e fragmentos de amplificação longos (Pinheiro, 2008).

Um *drop in* ocorre devido a contaminações esporádicas detetadas pelos kits por serem muito sensíveis, induzindo a uma interpretação de um locus heterozigótico quando na realidade pode ser homozigótico (Pinheiro, 2010). Mas por este fenómeno não ser geralmente reprodutível, deve analisar-se a mesma amostra várias vezes até se encontrar um perfil consenso (aquele que apresenta os mesmos alelos em pelo menos duas amplificações da mesma amostra) (Pinheiro, 2010).

1.11.1.1 Short Tandem Repeat no cromossoma Y - (Y-STR)

Tal como foi descrito no capítulo 1.3, o cromossoma Y é haplóide, implicando que grande parte do cromossoma não é sujeito a recombinação e por isso, é transmitido em bloco de pais para os filhos (Jobling, 2001; Jobling e Tyler-Smith, 2003). Por ser transmitido em bloco, o cromossoma Y apenas sofre alterações através de mutações (Jobling e Tyler-Smith, 2003). Estas mutações geram diversidade genética e podem ser detetadas através de polimorfismos de comprimento (STRs do cromossoma Y - (Y-STR)) e polimorfismos de posição (Y-SNP - Single Nucleotide Polymorphisms no cromossoma Y- ver capítulo 1.11.4.1) (Jobling e Tyler-Smith, 2003; Hammer *et al.*, 2006; Wei *et al.* 2013).

O estudo de marcadores do tipo STR no cromossoma Y são mais utilizados que os marcadores bialélicos (Y-SNPs), devido à sua grande diversidade dentro de uma determinada população (oferecendo maior poder de discriminação entre várias linhagens paternas) bem como à sua simplicidade metodológica para obtenção de perfis genéticos (Pinheiro, 2010).

Apesar do estudo de marcadores genéticos no ADN autossômico ser mais informativo para a genética forense, seja para identificação individual, seja para testes de parentesco, o estudo do cromossoma Y traz vantagens em casos de mistura de material biológico feminino e masculino, ou mesmo em casos de mistura de dois indivíduos do sexo masculino (uma vez que para cada *locus* apenas é amplificado 1 alelo, por cada cromossoma Y) (Pinheiro, 2010). Com o estudo de marcadores específicos no cromossoma Y é possível diferenciar o perfil do indivíduo masculino, por exemplo, em casos de violações, contudo não é específico, uma vez que não identifica o indivíduo masculino, mas sim toda a sua linhagem paterna (Butler, 2005; Pinheiro, 2010).

1.11.2 Mini-STR

Em amostras degradadas é mais provável obter sucesso na amplificação de regiões mais pequenas do que regiões mais extensas, por isso, se os primers forem reposicionados para o mais perto possível do local das repetições (STRs), reduzindo o tamanho da sequência de ADN a amplificar, aumentamos a probabilidade de amplificação (ver Figura 1.6) (Alaeddini *et al.*, 2010; Butler, 2011). Os Mini-STR produzem produtos de amplificação consideravelmente mais pequenos que os STR para a mesma região e constituem, portanto, uma alternativa ou um complemento para um perfil genético parcial obtido anteriormente com STRs. Como desvantagem, os Mini-STR apenas amplificam um número limitado de regiões pois, uma vez que os produtos de amplificação têm tamanhos muito semelhantes, torna-se difícil a interpretação dos resultados mesmo quando são marcados com fluorocromos diferentes (Pinheiro, 2010).



Figura 1.6 - Imagem representativa da ligação dos primers numa amplificação de STR e Mini-STR (adaptado de Butler, 2011).

1.11.3 InDel

Um dos polimorfismos mais recentemente estudados em genética forense são os InDel (*Insertion/Deletion*) ou DIP (*Deletion Insertion Polymorphism*). Tratam-se de polimorfismos bialélicos ou seja, inserção e/ou deleção de 1 ou mais nucleótidos (os mais estudados são de quatro nucleótidos) (ver Figura 1.7) (Butler, 2011; Costa Francez *et al.*, 2012; Fondevila *et al.*, 2012).

Os InDel resultam de um evento único de mutação que ocorre com baixa frequência, sendo bastante estáveis (Pereira *et al.*, 2009a; Fondevila *et al.*, 2012; Zaumsegel *et al.*, 2013). Esta técnica combina várias vantagens das técnicas de STR e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* - polimorfismos com variação em apenas um nucleótido) isto é, permite a amplificação de fragmentos muito pequenos de ADN (menos de 160 pb e é capaz de obter perfis com apenas 300 pg de ADN inicial), o que a torna bastante útil em amostras degradadas (Pereira *et al.*, 2009a, 2009b; Amorim, 2011; Costa Francez, da *et al.*, 2012; Fondevila *et al.*, 2012; Romanini *et al.*, 2012). Os procedimentos e a análise são semelhantes aos utilizados com STRs (Pereira *et al.*, 2009a; Amorim, 2011; Butler, 2011; Costa Francez *et al.*, 2012; Fondevila *et al.*, 2012;).

Estudos populacionais, têm vindo a demonstrar diferenças significativas nas frequências alélicas dos InDel entre populações separadas geograficamente, e por isso, estes têm potencial para se associarem à ancestralidade de um indivíduo (Pereira *et al.*, 2009a; Costa Francez, da *et al.*, 2012; Fondevila *et al.*, 2012; Zaumsegel *et al.*, 2013).

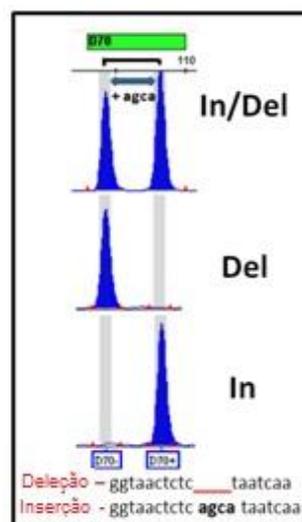


Figura 1. 7 - Imagem representativa de um marcador heterozigótico (In/Del), um marcador homozigótico para a deleção (Del) e um homozigótico para inserção (In) (adaptado de Fondevila *et al.*, 2011).

1.11.4 Single Nucleotide Polymorphisms - (SNP)

Os marcadores do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), são constituídos por polimorfismos bialélicos com variação em apenas 1 nucleótido (ver figura 1.8) (Rapley e Whitehouse, 2007; Pinheiro, 2010; Butler, 2011). Esta variação surge após uma mutação pontual num único par de bases e esta se encontrar numa frequência superior a 1% numa determinada população (Pinheiro, 2010; Amorim, 2011). A grande maioria dos SNPs poderão apresentar apenas 2 alelos possíveis (raramente poderão existir marcadores com 3 alelos) ou seja, podem apresentar o alelo original ou o mutado (seja em homozigotia, ou em heterozigotia) (Butler, 2011; Pinheiro, 2010). Contudo, torna-se bastante complicada a análise de amostras com mistura pois, a diferenciação entre um genótipo heterozigótico e dois homozigóticos, ou mesmo um genótipo heterozigótico e um homozigótico é quase impossível (Butler, 2005 e 2011; Pinheiro, 2010).

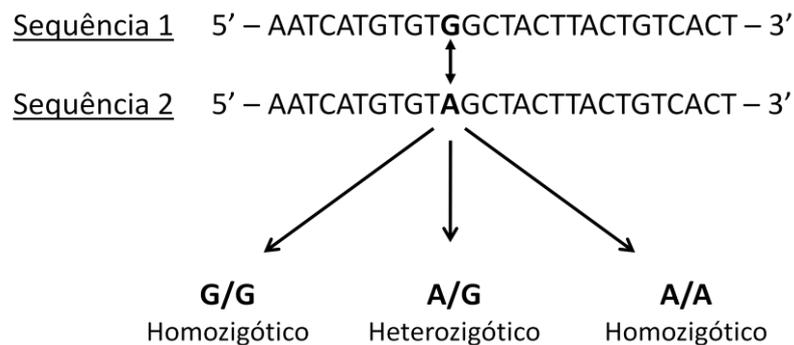


Figura 1. 8 - Single nucleotide polymorphism (SNP). Dois alelos possíveis (Guanina ou Adenina), que diferem em apenas um nucleótido, traduzindo-se em três possíveis genótipos (G/G; G/A ou A/A) .

O tamanho dos produtos amplificados pode ser inferior a 100 pb, o que demonstra grande utilidade no estudo de amostras do ADN degradado (Butler, 2005 e 2011; Pinheiro, 2010). Os SNPs são os polimorfismos mais abundantes no genoma humano, atualmente existem cerca de 10 milhões de SNPs estudados no genoma nuclear, e apresentam taxas de mutação muito baixas (Amorim e Pereira, 2005; Goodwin *et al.*, 2007; Pinheiro, 2010). Por serem muito frequentes, teoricamente, a combinação de vários SNPs aumentaria bastante o poder de discriminação entre indivíduos, contudo, é necessário estudar entre 50 a 80 SNPs para alcançar o mesmo poder de discriminação que 10 marcadores do tipo STRs (Amorim e Pereira, 2005; Goodwin *et al.*, 2007; Pinheiro, 2010; Butler, 2011).

Os principais objetivos do estudo de marcadores do tipo SNPs, é a identificação individual (embora menos eficaz que os marcadores STR); identificação de linhagens de SNPs (conjuntos de SNPs intimamente ligados podem funcionar como marcadores multialélicos pois, têm maiores probabilidades de identificar indivíduos relacionados do que simples SNPs bialélicos); identificar a origem geográfica de indivíduos e informar sobre características fenotípicas (tais como a cor da pele, cabelo, olhos, ou até a suscetibilidade para determinadas doenças) (Butler, 2011).

1.11.4.1 Single Nucleotide Polymorphisms no Cromossoma Y - (Y-SNP)

Os marcadores genéticos Y-SNPs são então marcadores bialélicos com alteração de apenas um só nucleótido que ocorrem no cromossoma Y (Jobling e Tyler-Smith, 2003; Sanchez *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 2013;). Em genética forense o estudo de marcadores SNP no cromossoma Y tem o objetivo de identificar linhagens paternas e indagar sobre a possível origem geográfica de um indivíduo em estudo, bem como toda a sua linhagem paterna (Pinheiro, 2010) Tanto os Y-STR como os Y-SNP têm as suas vantagens no entanto, a combinação da tipagem de amostradas com ambas as técnicas irá proporcionar uma identificação mais completa (Jobling, 2001; Pinheiro, 2010).

O facto de os Y-SNP possuírem uma taxa de mutação muito reduzida, quando comparada com os Y-STR (Y-SNP - 10^{-8} ; Y-STR - 10^{-3}); serem considerados como eventos raros na evolução humana; serem herdados unicamente por via paterna; não sofrerem recombinação com o cromossoma X; serem bialélicos e por isso possuem muito menos variabilidade, torna-os adequados na atribuição de haplogrupos estáveis de linhagens paternas (Jobling, 2001; Y Chromosome Consortium, 2002; Butler, 2003; Jobling e Tyler-Smith, 2003). São as combinações destas alterações polimórficas (Y-SNPs) que permitem a atribuição da amostra em estudo a um determinado haplogrupo, que por sua vez, cada haplogrupo está associado a uma população de uma determinada região geográfica (Jobling, 2001; Jobling e Tyler-Smith, 2003; Pinheiro, 2010). A determinação da origem geográfica dos haplogrupo é feita com base em estudos das suas frequências e distribuições geográficas em todas as população humanas (Pinheiro, 2010).

Recentemente, esta área de estudo tem demonstrado grandes desenvolvimentos no sentido de descrever cada vez mais SNPs com o objetivo de construir uma árvore de haplogrupos o mais completa possível (Jobling e Tyler-Smith, 2003; Pinheiro, 2010).

Existem pelo menos 6 sistemas de nomenclatura diferentes para os haplogrupos no entanto, o mais robusto e universalmente aceite é o *Y chromosome consortium*, (composto por 153 NRY (do inglês *Nonrecombining portion of the Y Chromosome*) haplogrupos designados de A - R) por ser capaz de se adaptar e aceitar a criação de novos haplogrupos à medida de que se descrevem mais Y-SNPs (Jobling, 2001; Y Chromosome Consortium, 2002; Jobling e Tyler-Smith, 2003; Pinheiro, 2010) A referência na atribuição de haplótipos para Y-SNP, é por isso, o *Y Chromosome Consortium* publicado em 2002 (Y Chromosome Consortium, 2002).

De entre os haplogrupos, nem sempre é fácil identificar uma região geográfica específica, no entanto sabe-se que os haplogrupos A e B são exclusivos de África ou seja, não são encontrados em mais parte nenhuma do mundo; os haplogrupos C, O, D e M encontram-se no sudeste Asiático e Austrália; os haplogrupos I, J, N e R estão presentes maioritariamente no centro e noroeste asiático e Europa e por fim, o haplogrupo Q é encontrado na sua maioria na América (ver Figura 1.9) (Jobling, 2001; Y Chromosome Consortium, 2002; Jobling e Tyler-Smith, 2003; Pinheiro, 2010). Mais especificamente para a Europa, podemos encontrar maioritariamente os haplogrupos R1a1, R1, N3, M46, I, J2 e E3b (Lessig *et al.*, 2005; Pericić *et al.*, 2005).

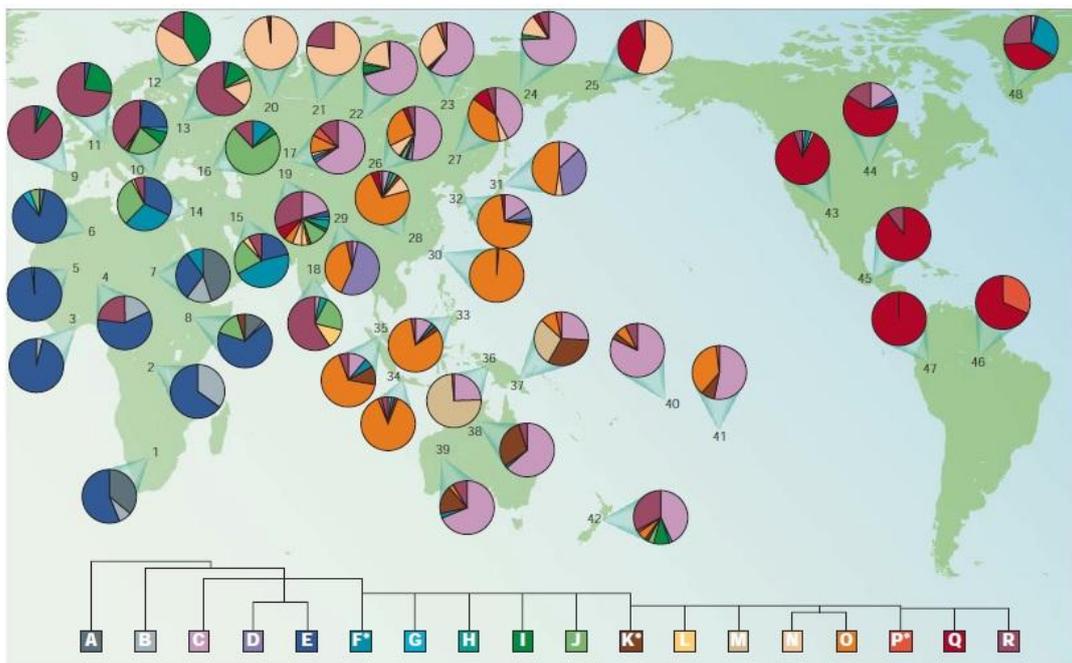


Figura 1. 9 - Mapa da distribuição global dos haplogrupos do cromossoma Y consoante o Y Chromosome Consortium. Adaptado de (Jobling e Tvler-Smith. 2003).

1.12 Caracterização da Amostra

Mértola é uma vila pertencente ao distrito de Beja, na região do Baixo Alentejo, em Portugal, banhada pelo rio Guadiana. Foi ocupada por Fenícios e Cartagineses e mais tarde por Romanos e Árabes, representando um importante entreposto comercial devido ao fácil acesso, tendo-se tornado num porto fluvial do tráfego mediterrânico e um local de destaque nas rotas comerciais (Currais, 2008; Cunha, 2011).

O Castelo de Mértola foi construído já no final do século IX, durante as ocupações árabes e expandido durante os séculos seguintes (Silvério, 2008). No reinado de D. Sancho II, em 1239, Mértola foi reconquistada aos Mouros e doada à Ordem de Santiago (Currais, 2008). D. Afonso III concedeu a carta de foral a Mértola em 1250, e esta foi renovada em 1287 por D. Dinis e em 1512 por D. Manuel I (Currais, 2008). Entre os séculos XIV e XVI, o antigo bairro islâmico no interior das muralhas do castelo tornou-se numa área onde era sepultada a maioria da população cristã, já que só os indivíduos com maiores posses poderiam ser enterrados no interior da igreja (Monteiro, 2010; Santos, 2012). A região de Mértola, ao contrário das planícies alentejanas, apresenta algum relevo com solo composto essencialmente por xisto, fraco na retenção de água das chuvas limitando fortemente a agricultura (Silvério, 2008; Santos, 2012).

As escavações no Campo Arqueológico de Mértola (CAM) tiveram início no verão de 1978 com intuito de estudar as populações do passado (Currais, 2008; Cunha, 2011). Após sucessivas campanhas de escavação na alcáçova do castelo de Mértola (área principal mais elevada e fortificada de um castelo representada na Figura 1.10) foram exumados cerca de 700 indivíduos até o ano de 2008 (Currais, 2008; Cunha, 2011). A necrópole é da época medieval cristã, datada entre os séculos XIV e XVI (Cunha, 2011), e o facto de não ter havido qualquer construção posterior na zona da alcáçova contribuiu para que as sepulturas permanecessem em bom estado de conservação (Cunha, 2011). O material osteológico no entanto, apresenta-se muito danificado e desmineralizado, devido à elevada acidez do solo e à ação destrutiva de raízes e pequenos roedores (Morgado, 2008; Silvério, 2008 ; Cunha, 2011).



Figura 1. 10 - Fotografia da alcáçova do castelo de Mértola (http://www.terraspulodolobo.com/regiao/alcacova-do-castelo-mertola_t77).

A maioria das inumações são em sepulturas individuais, em fossa e em alguns casos delimitadas por lajes de xisto (Morgado, 2008; Cunha, 2011). A decomposição dos corpos deverá ter ocorrido num espaço sem ar, uma vez que as sepulturas se encontravam completamente cobertas por terra e raízes de plantas, mantendo a correta posição anatómica do material esquelético (Morgado, 2008). Os esqueletos encontravam-se depositados em decúbito dorsal, com os membros superiores sobre o peito ou abdómen, e por vezes com as mãos posicionadas segundo a forma cristã de rezar (Morgado, 2008; Cunha, 2011).

Dos mais de 700 indivíduos exumados no campo arqueológico de Mértola cerca de 250 foram cedidas ao então Departamento de Antropologia, agora Departamento de Ciências da Vida (D.C.V.), da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra com o objetivo de caracterizar a população da necrópole medieval cristã inumada na alcáçova do castelo de Mértola (Currais, 2008; Monteiro, 2010; Cunha, 2011). Os esqueletos foram acondicionados em caixas de plástico correspondendo uma caixa a cada sepultura e os ossos organizados por áreas anatómicas, distribuídos em sacos de plástico (Cunha, 2011). Cada osso encontra-se identificado com as siglas CAM X A/E Sep Y (CAM - Campo Arqueológico de Mértola, X - ano de escavação, A/E - Alcáçova ou Encosta, Sep Y - número da sepultura) (Cunha, 2011). Desde 2007 que esta coleção tem vindo a ser estudada por alunos da Universidade de Coimbra (Couto,

2008; Currais, 2008; Morgado, 2008; Silvério, 2008; Monteiro, 2010; Carmo, 2011; Cunha, 2011; Leandro, 2011; Santos, 2012; Ferreira, 2013). O estudo da coleção osteológica inclui a análise demográfica, ou seja, diagnóstico sexual e a estimativa da idade à morte de cada indivíduo, análise morfológica, onde é calculada a estatura e os índices de robustez e achatamento, estudo de patologias, referindo as doenças que afetam o tecido ósseo e tecidos moles preservados, onde está incluída a análise odontológica (desgaste dentário e patologias relacionadas com a dentição) (Cunha, 2011) e ainda o estudo de caracteres discretos (caracteres não métricos, sendo que, alguns dos quais são herdados geneticamente, permitindo o cálculo de distâncias biológicas entre populações) (Carolineberry e Berry, 1967; MacMillan, 1997; Kaur *et al.*, 2012;).

1.13 Objetivos

Com este trabalho, pretendemos contribuir para um conhecimento mais alargado da população medieval que tem sido estudada a nível antropológico no Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Este trabalho, foca-se no estudo genético sendo assim, temos como objetivo principal a obtenção de ADN de amostras ósseas de 50 indivíduos pertencentes à coleção osteológica do Campo Arqueológico de Mértola datada da época medieval. Outros objetivos incluem o estudo comparativo de diferentes métodos de extração de ADN em amostras ósseas, o estudo da eficácia de tipagem do ADN obtido com diferentes marcadores genéticos e diferentes kits comerciais, bem como a caracterização genética das amostras ósseas da coleção osteológica com marcadores genéticos específicos de identificação humana. Por fim, pretende-se determinar o sexo de cada indivíduo em estudo bem como a sua ancestralidade por via materna e paterna.

2. Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1 Amostras

A amostra em estudo é constituída por 50 fémures de indivíduos distintos, já estudados antropológicamente, pertencentes à coleção osteológica de uma Necrópole datada do Baixo-Medieval (Couto, 2008; Currais, 2008; Morgado, 2008; Silvério, 2008; Cunha, 2011; Leandro, 2011; Santos, 2012;). A amostra foi exumada na alcáçova do castelo de Mértola e datada através do estudo dos estratos geológicos e do estudo da cultura material que indicaram uma datação entre o séc. XIV-XVI (Cunha, 2011). Foram escolhidos preferencialmente fémures, uma vez que se trata do osso mais denso do corpo humano e por se encontrar mais disponível para estudo genético que os dentes nesta coleção osteológica. Com base nos estudos previamente realizados com esta coleção, procurou-se selecionar as sepulturas que apresentavam pelo menos um fémur com cerca de dois terços ($2/3$) do osso intacto a partir dos esqueletos de 250 indivíduos cedidos ao Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra ao cuidado da Professora Cláudia Umbelino, dos cerca de 700 indivíduos exumados no total (Currais, 2008; Monteiro, 2010; Cunha, 2011). Selecionou-se as 50 amostras da coleção que se encontravam em melhores condições dentro das que se apresentavam disponíveis para estudo, de forma a potenciar a probabilidade de obter resultados na análise genética e representar significativamente a população medieval da coleção osteológica. Após a exumação (entre 1990 e 2010), os ossos estiveram sujeitos à temperatura ambiente (em condições de temperatura e humidade não controladas), acondicionados em sacos de plástico, dentro de caixotes separados por número de sepultura, num armazém enquanto permaneceram em Mértola e no sótão do D.C.V. após a sua transferência para Coimbra.

Aquando da entrada no Serviço de Genética e Biologia Forenses (SGBF) do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses - Delegação do Sul (INMLCF,I.P.), as amostras mantiveram-se numa arca de refrigeração à temperatura de -20°C , quer antes quer depois dos procedimentos. De forma a minimizar os danos na morfologia dos ossos, selecionou-se uma pequena janela de corte na zona da diáfise proximal por ser a área mais densa do fémur, e por isso, com maior probabilidade de obter ADN preservado, bem como por se tratar da zona com menos interesse na determinação de características

físicas do indivíduo. A diáfise proximal do fémur é usada na determinação do índice de achatamento, contudo, as amostras que estudámos geneticamente, já tinham sido estudadas antropologicamente, e por isso, esses dados foram previamente obtidos.

Além do grupo das amostras em estudo, introduzimos grupos de amostras controlo de forma a facilitar a interpretação dos resultados obtidos. Os grupos controlo destacam-se por serem constituídos pelo mesmo material biológico que o grupo em estudo (fémures) no entanto, sujeito a diferentes condições e tempo de enterramento. Todas as amostras dos grupos de controlo deram entrada no Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses da Delegação Sul (INMLCF, I.P.) com o objetivo comum de identificação pessoal e desde então foram acondicionados a -60°C . Os grupos controlo são:

Grupo Controlo A - Constituído por 10 fémures de indivíduos adultos não relacionados, inumados em cemitérios da zona de Lisboa, há menos de 40 anos. Todos os indivíduos deste grupo foram enterrados em caixões comuns e após a exumação foram imediatamente acondicionados com refrigeração a -60°C e encontram-se ao cuidado do INMLCF, I.P.- Delegação do Sul, com o intuito da realização de exames periciais no âmbito da genética forense.

Grupo Controlo B - Constituído por 10 fémures de soldados portugueses mortos durante a Guerra Colonial (entre 1961 - 1974). Foram inumados na Guiné-Bissau há cerca de 40 anos, em contacto direto com a terra em clima tropical (temperaturas altas e bastante humidade). Foram exumados em 2009, mantidos à temperatura ambiente até chegarem ao INMLCF, I.P. - Delegação do Sul, onde foram acondicionados com refrigeração a -60°C e se encontram em estudo no âmbito de um projeto de doutoramento.

Grupo Controlo C - Constituído por apenas 1 fémur de um indivíduo falecido no séc. XV, inumado no interior de um túmulo lacrado e depositado no interior de uma capela privada em Coimbra. Após a exumação, há cerca de 5 anos (em 2010), o esqueleto foi acondicionado em sacos de plástico exposto à temperatura ambiente e desde 2013 encontram-se ao cuidado do INMLCF, I.P. - Delegação do Sul, no âmbito de projetos de investigação científica.

Grupo Controlo D - Constituído pelas amostras de referência (sangue e saliva) dos operadores que tiveram contacto com o material ósseo e executaram todos os estudos genéticos, para detetar possíveis contaminações.

O grupo controlo A tem a função de um grupo controlo positivo dos métodos de extração, amplificação e sequenciação, uma vez que se trata das amostras mais recentes e se encontrarem em bom estado de conservação e por isso, são esperados resultados positivos. Os grupos controlo B e C, servirão como comparação no que respeita ao tipo de solo e condições de inumação. No caso do grupo controlo B, as amostras são tão recentes como o grupo controlo A, sendo por isso esperado a obtenção de perfis genéticos completos, no entanto, foram sujeitos a condições abrasivas para o material ósseo. No caso do grupo controlo C, detém uma datação muito semelhante à das amostras em estudo e por isso são esperados resultados idênticos (perfis genéticos representativos de ADN antigo), no entanto foi inumado em condições mais favoráveis à preservação do ADN.

2.2 Preparação das amostras antes da extração de ADN

Antes de aplicar os métodos de extração de ADN às amostras ósseas é necessário uma preparação prévia que consiste na descontaminação e pulverização de fragmentos ósseos.

Todas as amostras foram preparadas e processadas numa câmara de fluxo laminar (câmara de segurança biológica). A limpeza das amostras foi feita através de remoção da área superficial do osso no sentido horizontal com uma serra elétrica como é apresentado na Figura 2.1 A. Foi recortada uma pequena porção na zona da diáfise proximal de cada fémur (sempre que possível), uma vez que é a região mais densa do osso (ver Apêndice 1) (representação na Figura 2.1 B e C). A área retirada, foi depois cortada em pedaços com cerca de 0,5 x 0,5 cm com recurso a uma tesoura (uma vez que as amostras ósseas em estudo são mais frágeis) (representação na Figura 2.1 D). Após a fragmentação, as amostras foram pulverizadas num criotriturador (Freezer Mill 6750), com azoto líquido. Depois da trituração, as amostras foram guardadas a -20°C até a sua extração.

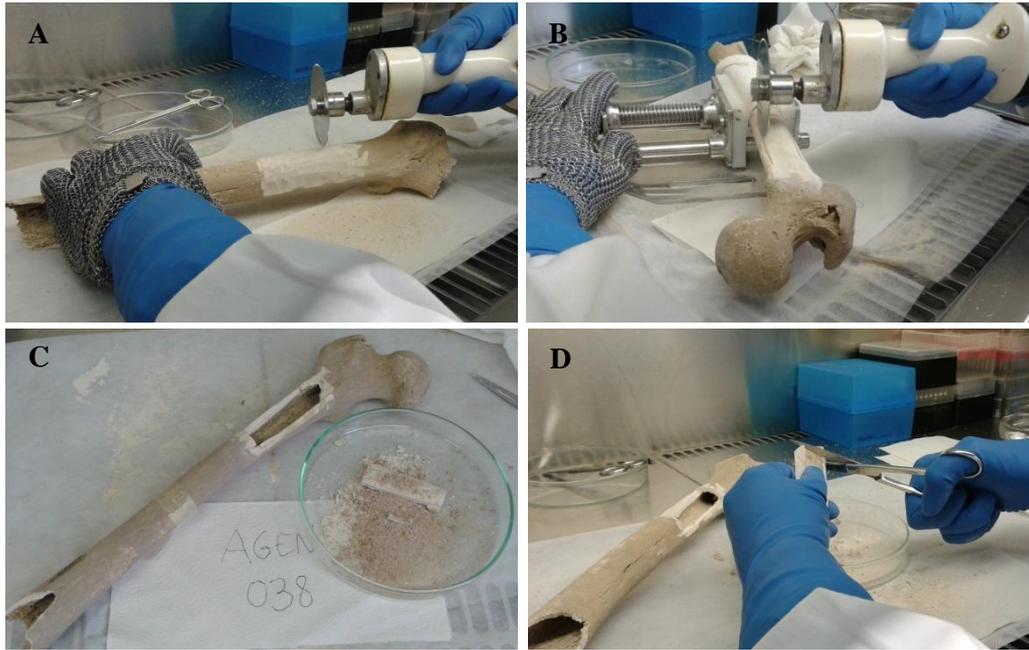


Figura 2. 1 - A - Remoção da área superficial com a serra eléctrica paralela ao osso. B e C - Corte de uma janela na diáfise proximal. D - Fragmentação do pedaço cortado em pedaços mais pequenos.

2.3 Métodos de Extração de ADN

Um protocolo de extração ideal deverá conseguir isolar quantidades de ADN suficientes para obter perfis genéticos de qualidade a partir da menor quantidade de osso inicial possível, ser rápido e ter baixos custos. No entanto, não existe um método standard que apresente todas estas características (Caputo *et al.*, 2013) e por isso, neste estudo, foram utilizados dois métodos diferentes de extração de ADN com o intuito de obter o máximo ADN possível, recorrendo às características vantajosas de cada um. Para todas as amostras, extraiu-se ADN com recurso a ambos os métodos, exceto no grupo controlo B e D. No grupo controlo B apenas utilizámos o método *Kit PrepFiler Express BTA*, uma vez que a quantidade de osso pulverizado não seria suficiente para ambas as extrações. No grupo controlo D a extração foi realizada juntamente com outras amostras de sangue e saliva de casos de rotina pericial (método Chelex[®] 100 da BioRad (Walsh *et al.*, 1991).

2.3.1 Método orgânico de Fenol Clorofórmio

A extração foi realizada a partir de 1 g de osso previamente pulverizado, à qual adicionamos 3mL de EDTA (0,5M) e incubamos durante 48h à temperatura ambiente (num tubo de 50ml). Centrifugamos 4 minutos a 9.700 rotações por minuto (rpm) e descartamos todo o sobrenadante. Procedemos a lavagens do pellet adicionando água mili-Q agitando e centrifugando 4min a 9.700 rpm até a solução apresentar um aspeto límpido. Adicionamos 3mL de tampão de extração de tecidos ósseos (ver Apêndice 2) e 450 μ L de Proteinase K (10mg/ml) e incubamos a 56°C durante 2 horas. Após as incubações, centrifugamos 4min a 9.700 rpm, e decantamos o sobrenadante para um novo tubo, descartando o pellet. Adicionamos *Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico* (na proporção 25:24:1) em igual volume ao sobrenadante. Agitamos suavemente e centrifugamos 4min a 9.700 rpm. Transfererimos a fase inorgânica para um novo tubo e repete-se o processo uma vez com *Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico* e uma outra com *Clorofórmio: Álcool isoamílico* (na proporção 24:1). Transfererimos a última fase inorgânica para um tubo de purificação *Vivacon*®2 (purificação por membrana de celulose *Hydrosart*® - Tubo de coleção A - Figura 2.2) e centrifugamos 30min a 4.500 rpm. O sobrenadante foi dispensado e procedemos a lavagens adicionando 1mL de água mili-Q e centrifugando 3min a 4.500 rpm; repetimos este processo duas vezes. Invertemos o tubo de coleção e adicionamos 80 μ L de Tampão de Eluição (TE) pré-aquecido a 70°C no centro do malha do filtro, a partir da zona do tubo de coleção B. Após uma incubação de 2min, à temperatura ambiente, centrifugamos 3min a 4.500 rpm e conservamos o produto extraído a -20°C.



Figura 2. 2 - Tubo de purificação *Vivacon*®2. **A** - Tubo de coleção A, capacidade até 2ml. **B** - Tubo de coleção B, capacidade de cerca de 100 μ l. (<http://www.directindustry.com/prod/sartorius-ag/centrifugal-concentrators-4963-520717.html>)

Este método de extração é o mais utilizado em estudos de casos com ADN antigo. É um método pouco dispendioso que, geralmente permite obter uma boa quantidade de ADN, mas requer grande quantidade de osso pulverizado inicial. É muito demorado, com vários passos, tempos de incubação e mudanças de tubos, aumentando a probabilidade

de contaminação e inclui tampões utilizados no processo que são preparados manualmente, aumentando a probabilidade de erros e contaminações.

2.3.2 Método PrepFiler Express BTA

A extração foi realizada com 500mg de osso, num tubo de 2mL, ao qual adicionamos 660 μ L de *PrepFiler BTA Lysis Buffer*, 21 μ L de Proteinase K e 9 μ L de DTT (1M) durante 2h a 56°C com agitação de 1100 rpm. Centrifugamos os tubos 2min a 9.000 rpm e transferimos o sobrenadante para novos tubos (*PrepFiler Sample Tube*). Preparamos todos os componentes do kit para cada amostra (cartucho de reagentes, tubo contendo o sobrenadante, tubo de eluição, e pontas para cada amostra) e programamos o aparelho para o kit *PrepFiler BTA*. O processo de extração decorreu durante 30min e o produto de extração foi conservado a -20°C.



Figura 2. 3 - Aparelho automático de extração de ADN onde se efectua o kit PrepFiler Express BTA (<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4467754>)

Este é um método automatizado, que recorre a reduzida quantidade de osso pulverizado, envolve a utilização de partículas eletromagnéticas, capazes de reter o ADN, separando-o dos restantes componentes da solução. É um método rápido, permite geralmente obter bons resultados, não necessita do operador durante o processo de extração, não necessita de mudança de tubos e a extração ocorre no interior do aparelho (*AutoMate Express™ Instrument* com o *PrepFiler Express BTA™ Protocol Card* da Applied Biosystem), diminuindo as probabilidades de contaminação. No entanto, é muito dispendioso comparativamente ao método anterior.

2.4 Quantificação de ADN

Antes de proceder à amplificação do ADN com marcadores genéticos específicos de identificação humana, é necessário quantificarmos o produto extraído. Para isso, utilizamos o *Quantifiler Duo Quantification Kit (Applied Biosystems)* que, além de amplificar um fragmento do cromossoma 14, também amplifica um fragmento do cromossoma Y. Este método torna-se útil pois, uma vez que se trata de ADN antigo, uma das regiões pode estar degradada e não amplificar, mesmo que existam fragmentos de outros cromossomas, por isso, ao amplificar duas regiões distintas e em cromossomas diferentes, aumenta a probabilidade de ser detetada alguma quantidade de ADN (esta vantagem só se aplica para indivíduos do sexo masculino). Este kit permite ainda detetar a presença de inibidores de PCR, pois inclui IPCs (*Internal Positive Controls*) que, caso sejam amplificados, indica que não existiam inibidores de PCR e por isso, se o resultado da amplificação for nulo, não se deve à presença de inibidores mas à inexistência ou degradação do ADN em estudo.

Para cada amostra, adicionamos 10,5µL de Mix de Primers, 12,5µL de *Quantifiler PCR Mix* e 2µL de ADN extraído em micro-tubos óticos (Optical 8 - tube strip). É necessário ainda preparar duas séries de 8 tubos com ADN standard, pois, uma vez que a concentração deste ADN é conhecida (ver Tabela 2.1) é fornecida a informação necessária ao software para criar uma reta de calibração e atribuir uma certa concentração à amostra em estudo.

Tabela 2. 1 - Concentrações da reta de calibração com ADN standard para Quantifiler Duo.

Standart	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD6	STD7
Conc.(ng/µl)	50	16.70	5.560	1.850	0.620	0.210	0.068	0.023
Volume por tubo	10µl							
	DNA	10µl						
	STD	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7
	30µl	20µl						
	Buffer							

A técnica é realizada com recurso ao *7500 Real-Time PCR System* (aparelho de RT-PCR), acoplada a um computador com o software *HID Real-Time PCR Analysis software v1.1*.

Em todas as quantificações realizadas foram ainda adicionados controlos positivos, negativos (água em vez de ADN) e brancos (apenas os reagentes) de forma a confirmar a eficácia do kit e detetar possíveis contaminações na água e reagentes utilizados no kit.

2.5 Amplificação de STRs e InDels

A amplificação do ADN extraído foi realizada por PCR multiplex usando diferentes kits comerciais de STRs e um kit para InDels, todos com marcadores específicos para identificação genética humana. Foram utilizados termocicladores *GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler* com bloco de prata com 96 poços. Para ambas as extrações de cada amostra, amplificamos marcadores genéticos com todos os kits que apresentamos a seguir de forma a maximizar a probabilidade de obter resultados e para determinação de um perfil consenso. Junto com as amostras em estudo, em todas as amplificações adicionamos ainda um controlo positivo e controlo negativo. A maior parte dos kits aconselham uma concentração inicial de ADN molde entre os 0,5ng/μL e 1ng/μL, no entanto a maioria das amostras não cumpre este requisito e por isso, consoante a concentração obtida na quantificação, ajustamos tanto o volume de amostra como o de água a utilizar em cada amplificação mantendo o volume final, como é possível visualizar na tabela 2.2.

Tabela 2. 2 - Volumes utilizados em cada amplificação consoante a concentração obtida na quantificação

Concentração obtida na quantificação (ng/μL)	Volume de ADN molde a aplicar (μL)
[0 - 0.01]	5μL
[0.02 - 0.09]	4μL
[0.1 - 0.6]	2μL
[0.7 - ∞]	Diluir (1:10) e usar 1μL

A análise dos resultados foi feita por eletroforese capilar, num sequenciador de 16 capilares *3130xl Genetic Analyzer* com o *3130 Series Data Collection Software v 4.0*, utilizando um polímero adequado a eletroforese (POP 4) (*Applied Biosystems*) com recurso ao *GeneMapper® ID-X Software version 1.4*.

Utilizando o *software PopAffiliator 2*, disponível gratuitamente online através do site <http://cracs.fc.up.pt/~nf/popaffiliator2/index.php#f>, foi possível estimar a origem geográfica dos indivíduos a partir de 17 marcadores de STR's autossómicos (Pereira *et al.*, 2011).

2.5.1 PowerPlex® ESI 17 System - Kit de amplificação de STRs autossómicos (*Promega*) que amplifica os marcadores indicados no Anexo 1: Tabela 7.1. O tamanho dos produtos amplificados, ou amplicões varia entre os 80 e os 460 pb.

Para cada amostra, adicionamos os seguintes reagentes num volume final de 12,45µL (Tabela 2.3).

Tabela 2. 3 - Volumes da reação de PCR do *Kit PowerPlex® ESI 17 System*.

Master Mix:	2,5µL
Primer Pair Mix:	1,25µL
Água mili-Q:	7,70µL
ADN molde:	1µL (concentração inicial: 0.5ng/µL)

A PCR ocorreu com as seguintes temperaturas (Tabela 2.4):

Tabela 2. 4 - Programa de temperaturas para a PCR usando o *Kit PowerPlex® ESI 17 System*.

Desnaturação inicial:	96°C - 2min	
Desnaturação:	94°C - 30seg	} x 30 ciclos
Annealing:	59°C - 2min	
Extensão:	72°C - 1:30min	
Extensão final:	60°C - 45seg	
Conservação:	4°C - ∞	

Seguiu-se aplicação das amostras no sequenciador em que, numa placa de 96 poços, adicionamos por cada amostra, 0,5µL de *Size Standard* (CC5 ILS 500); 10µL de *Hi-Di Formamida* e 2µL de ADN amplificado (1µL de ADN amplificado nos controlos

positivo, negativo e nos casos de amostras com ADN com concentrações iguais ou superiores a 0,5ng/μL). Reservamos um dos poços por corrida (cada 16 capilares) com a mesma proporção de size standard e formamida, e adicionamos 1μL de *ESI 17 Allelic Ladder* (possui todos os alelos para todos os marcadores genéticos e permite atribuir a designação do alelo na amostra em estudo). Desnaturamos as amostras a 95°C durante 3min e aplicamos a placa no sequenciador para ser analisada.

2.5.2 PowerPlex® ESI 17 Pro System - Kit de amplificação de STRs autossómicos (*Promega*), que amplifica os mesmos marcadores que o *ESI 17 System* (Anexo 1: Tabela 7.1) no entanto, tem demonstrado ser mais sensível que este último. O tamanho dos produtos amplificados variam entre 80 e 460 pb. Para cada amostra, adicionamos os seguintes reagentes num volume final de 12,50μL (Tabela 2.5):

Tabela 2. 5 - Volumes da reação de PCR do *Kit PowerPlex® ESI 17 Pro System*.

Master Mix:	2,5μL
Primer Pair Mix:	1,25μL
Água mili-Q:	7,75μL
ADN molde:	1μL (concentração inicial: 0.5ng/μL)

A amplificação de PCR ocorreu com o mesmo padrão de temperaturas que no *kit ESI 17 System*. Na placa de 96 poços adicionamos, por cada amostra, 0,5μL de *Size Standard (CC5 ILS 500 Pro)*; 10μL de *Hi-Di Formamida* e 2μL de ADN amplificado (1μL de ADN amplificado nos controlos positivo, negativo e nos casos de amostras com ADN com concentrações iguais ou superiores a 0,5ng/μL). Reservamos um dos poços para o *Ladder* (1μL de *ESI 17 Pro Allelic Ladder*). Desnaturamos as amostra a 95°C durante 3min e aplicamos a placa no sequenciador para ser analisada.

2.5.3 PowerPlex® ESX 17 System - Kit de amplificação de STR autossómicos (*Promega*), possui os mesmos marcadores que o *ESI 17 System* e *ESI 17 Pro System* (Anexo 1: Tabela 7.1), no entanto, amplifica as regiões com tamanhos diferentes dos kit anteriores. Os produtos amplificados variam entre 80 e 420 pb. Para cada amostra, adicionamos os seguintes reagentes num volume final de 12,50μL (Tabela 2.6).

Tabela 2. 6 - Volumes da reação de PCR do *Kit PowerPlex® ESX 17 System*.

Master Mix:	2,5µL
Primer Pair Mix:	1,25µL
Água mili-Q:	7,75µL
ADN molde:	1µL (concentração inicial: 0.5ng/µL)

A PCR ocorreu com o mesmo padrão de temperaturas que nos *kits ESI 17 System* e *ESI 17 Pro System*. Na placa de 96 poços, adicionamos por cada amostra 0,5µL de *Size Standard (CC5 ILS 500)*; 10µL de *Hi-Di Formamida* e 2µL de ADN amplificado (1µL de ADN amplificado nos controlos positivo, negativo e nos casos de amostras com ADN com concentrações iguais ou superiores a 0,5ng/µL). Reservamos um dos poços para o Ladder (1µL de *ESX 17 Allelic Ladder*). Desnaturamos as amostra a 95°C durante 3min e aplicamos a placa no sequenciador para ser analisada.

2.5.4 *AmpFlSTR® MiniFiler™* - Kit de amplificação de mini-STRs autossómicos (*Applied Biosystems*) que amplifica os marcadores indicados na Anexo 1: Tabela7.1. Os produtos amplificados variam entre 70 e 280 pb. Para cada amostra, adicionamos os seguintes reagentes num volume final de 13,50µL (Tabela 2.7):

Tabela 2. 7 - Volumes da reação de PCR do *Kit AmpFlSTR® MiniFiler™*.

Master Mix:	5µL
Primer Set:	2,5µL
Água mili-Q:	5µL
ADN molde:	1µL (concentração inicial: 1ng/µL)

A PCR ocorreu com as seguintes temperaturas (Tabela 2.8):

Tabela 2. 8 - Programa de temperaturas para a PCR usando o *Kit AmpFlSTR® MiniFiler™*.

Desnaturação inicial:	95°C - 11min	} x 30 ciclos
Desnaturação:	94°C - 20seg	
Annealing:	59°C - 2min	
Extensão:	72°C - 1min	
Extensão final:	60°C - 45min	
Conservação:	4°C - ∞	

Na placa de 96 poços, adicionamos por cada amostra 0,5µL de *Size Standard (GS 500 Liz)*; 10µL de *Hi-Di Formamida* e 2µL de ADN amplificado (1µL de ADN amplificado nos controlos positivo, negativo e nos casos de amostras com ADN com concentrações iguais ou superiores a 1ng/µL). Reservamos um dos poços para o Ladder (1µL de *AmpFlSTR MiniFiler*). Desnaturamos as amostra a 95°C durante 3min e aplicamos a placa no sequenciador para ser analisada.

2.5.5 *AmpFlSTR® Yfiler®* - Kit de amplificação de STRs presentes no cromossoma Y (*Applied Biosystems*) que amplifica os marcadores indicados na Anexo 1: Tabela 7.2. Os produtos amplificados variam entre 100 e 320 pb.

Para cada amostra, adicionamos os seguintes reagentes num volume final de 12,50µL (Tabela 2.9).

Tabela 2. 9 - Volumes da reação de PCR do *Kit AmpFlSTR® Yfiler®*.

Reaction Mix:	4,6µL
Primer Set:	2,5µL
Taq Polimerase	0,4µL
Água mili-Q:	3,75µL
ADN molde:	1,25µL (concentração inicial: 1ng/µL)

A PCR ocorreu com as seguintes temperaturas (Tabela 2.10):

Tabela 2. 10 - Programa de temperaturas para o PCR usando o *Kit AmpFlSTR® Yfiler®*.

Desnaturação inicial:	95°C - 11min	
Desnaturação:	94°C - 1min	} x 30 ciclos
Annealing:	61°C - 1min	
Extensão:	72°C - 1min	
Extensão final:	60°C - 80min	
Conservação:	4°C - ∞	

Na placa de 96 poços, adicionamos por cada amostra 0,5µL de *Size Standard (GS 500 Liz)*; 10µL de *Hi-Di Formamida* e 2µL de ADN amplificado (1µL de ADN amplificado nos controlos positivo, negativo e nos casos de amostras com ADN com concentrações iguais ou superiores a 1ng/µL). Reservamos um dos poços para o Ladder (1µL de

AmpFlSTR YFiler Kit). Desnaturamos as amostra a 95°C durante 3min e aplicamos a placa no sequenciador para ser analisada.

2.5.6 Critérios de aceitação de alelos nos marcadores do tipo STR

Estabelecemos um conjunto de critérios para aceitar os alelos de cada amplificação e criar um perfil genético de consenso para STRs. Os perfis genéticos de consenso foram criados segundo os critérios sugeridos por Peter Gill e colaboradores em 2000 (Gill *et al.*, 2000):

- Aceitamos picos com dimensão ≥ 20 RFUs, desde que os controlos negativos de todo o procedimento desde a extração até à eletroforese não apresentem quaisquer picos;
- Não consideramos alelos coincidentes com alelos obtidos nos controlos negativos;
- Só consideramos os picos bem definidos, permitindo a correta identificação do alelo.
- Em marcadores com mais de dois alelos consideramos a ocorrência de contaminação. Só consideramos algum desses alelos se estiver isolado noutra ensaio;
- Apenas se consideraram os alelos quando estes se encontram em duplicado noutra ensaio;
- Foram considerados alelos Flutuantes (assinalados com " F'") aqueles que surgiram em *Drop in* ou *Drop out*, não sendo contabilizados como alelos amplificados.

2.5.7 Investigator® DIPplex - Kit de amplificação de InDels autossómicos (*Qiagen*), que amplifica os marcadores indicados na Anexo 1: Tabela 7.3. Os produtos amplificados variam entre 75 e 155 pb.

Para cada amostra, adicionamos os seguintes reagentes num volume final de 12,50µL (Tabela 2.11):

Tabela 2. 11 - Volumes da reação de PCR do *Kit Investigator® DIPplex*.

Reaction Mix A:	2,5μL
Primer Mix:	2,5μL
Taq Polimerase	0,3μL
Água mili-Q:	5,2μL
ADN molde:	2μL (concentração inicial: 0,35ng/μL)

A PCR ocorreu com as seguintes temperaturas (Tabela 2.12):

Tabela 2. 12 - Programa de temperaturas para o PCR usando o *Kit Investigator® DIPplex*.

Desnaturação inicial:	94°C - 4min	
Desnaturação:	94°C - 30seg	} x 32 ciclos
Annealing:	61°C - 2min	
Extensão:	72°C - 1:15min	
Extensão final:	68°C - 60min	
Conservação:	10°C - ∞	

Na placa de 96 poços, adicionamos por cada amostra 0,3μL de *Size Standard (BTO)*; 8,9μL de *Hi-Di Formamida* ou 0,5μL de *Size Standard (GS600 Liz)*; 12μL de *Hi-Di Formamida* onde se adiciona 2μL de ADN amplificado (1μL de ADN amplificado nos controlos positivo, negativo e nos casos de amostras com ADN com concentrações iguais ou superiores a 0,35ng/μL). Reservamos um dos poços para o Ladder (1μL de *DIP Ladder*). Desnaturamos as amostra a 95°C durante 3min, e aplicamos a placa no sequenciador para ser analisada.

2.6 Sequenciação de ADN mitocondrial

O procedimento para amplificar ADN mitocondrial passa por uma primeira amplificação com PCR multiplex da região controlo total com os primers L15997 e H016 para a região HV1 (Região *Hipervariable* 1; cadeias L-light e H-heavy respetivamente) e L16555 e H639 para a região HV2 e 3 (a sequência dos primers encontra-se na Anexo 2: Tabela 7.4), com os seguintes volumes para cada amostra (25μL de volume final) (Tabela 2.13):

Tabela 2. 13 - Volumes das reações de PCR para a amplificação da região controlo total.

HV1		HV2 e 3	
Master Mix HST*:	12,5µL	Master Mix HST*:	12,5µL
Primer Mix (4mM)**:	5µL	Primer Mix (4mM)**:	5µL
DMSO**** (50%):	2,5µL	DMSO*** (50%):	2,5µL
ADN molde:	5µL	ADN molde:	5µL

* Reagente mistura com *HotStarTaq Plus DNA polymerase*, tampão com MgCl₂ (3mM) e dNTP's (400µM cada um) (*Qiagen*)

** O Primer Mix a 4mM é composto por: 2µL de primer L15997 (100mM), 2µL de primer H016 (100mM) e 46µL água mili-Q.

*** O Primer Mix a 4mM é composto por: 2µL de primer L16555 (100mM), 2µL de primer H639 (100mM) e 46µL água mili-Q.

**** O DMSO (dimetilsulfóxido) é descrito como sendo um aditivo potenciador da amplificação (Rapley e Whitehouse, 2007; *QIAGEN Multiplex PCR Handbook For fast and efficient multiplex PCR without optimization*, 2010).

Os produtos amplificados nesta reação, têm 588 pb para HV1 e 653 pb para HV2 e 3. A primeira amplificação de PCR ocorreu com as seguintes temperaturas (Tabela 2.14):

Tabela 2. 14 - Programa de temperaturas para a amplificação da região controlo total.

Desnaturação inicial:	95°C - 5min	
Desnaturação:	94°C - 30seg	} x 35 ciclos
Annealing:	60°C - 1:30min	
Extensão:	72°C - 1min	
Extensão final:	72°C - 10min	
Conservação:	4°C - ∞	

Após a amplificação da região controlo total, utilizamos um gel de poliacrilamida de forma a verificar a presença de produtos amplificados. Para as amostras que apresentaram produtos amplificados no gel, realizamos um **Nested PCR** (exceto para o controlo positivo e negativo) ou seja, amplificamos uma região mais pequena tendo como ADN molde o produto já amplificado anteriormente, aumentando a probabilidade de obter resultados em amostras degradadas. No nested PCR amplificamos regiões mais curtas que a região controlo total com os Primers L15997 e H16401 para HV1 e L048 e H408 para HV2 (a sequência dos primers encontra-se na Anexo 2: Tabela 7.5). Os produtos amplificados nesta reação, foram de 404 pb para HV1 e 360 pb para HV2. Para cada amostra, adicionamos os seguintes reagentes para um volume final de 25µL (Tabela 2.15):

Tabela 2. 15 - Volumes das reações de PCR para a amplificação Nested de HV1 e HV2.

HV1		HV2	
PCR Gold Buffer (10x)	2,5µL	PCR Gold Buffer (10x)	2,5µL
MgCl ₂	2µL	MgCl ₂	2µL
dNTPs	0,2µL	dNTPs	0,2µL
L15997 (100mM)	0,05µL	L048 (100mM)	0,05µL
H16401 (100mM)	0,05µL	H408 (100mM)	0,05µL
Taq Polimerase	1µL	Taq Polimerase	1µL
Água mili-Q	17,2µL	Água mili-Q	17,2µL
ADN molde	2µL	ADN molde	2µL

A Nested PCR ocorreu às seguintes temperaturas (Tabela 2.16):

Tabela 2. 16 - Programa de temperaturas para a amplificação Nested de HV1 e HV2.

Desnaturação inicial:	96°C - 10min	
	94°C - 30seg	
Desnaturação:	94°C - 20seg	} x 16 ciclos
Annealing:	56°C - 10seg	
Extensão:	72°C - 30seg	
Conservação:	4°C - ∞	

Após a segunda amplificação, as amostras foram purificadas com 2 enzimas presentes na *Exo SAP-IT* (*Exonuclease I* e *ShrimpAlkaline Phosphatase*) (*Affymetrix*) com a proporção de 4µL *ExoSAP-IT* para 10µL de ADN de cada amostra. As enzimas têm a função de eliminar primers e dNTP's residuais da reação, respetivamente, e são ativadas num programa de 15min a 37°C e 15min a 80°C.

Seguiu-se a **sequenciação** pelo método de *Sanger*, descrito em 1977 (Butler, 2011), onde foram adicionados dNTPs (desoxinucleótidos) e ddNTPs (didesoxinucleótidos). Sendo que os dNTPs são nucleótidos utilizados na extensão da reação de amplificação e os ddNTPs são dNTPs modificados para impedir a ligação de futuros dNTPs na cadeia em extensão. Estes ddNTPs estão ligados a fluorocromos que vão permitir a identificação da sequência do ADN mitocondrial (Figura 2.4). Cada ddNTP emite cores diferentes; a Adenina emite cor verde, a Timina emite cor vermelha, a Citosina emite cor azul e a Guanina emite cor amarela sendo que, esta última para facilitar a visualização durante a análise o software mostra a cor preta (Butler, 2005).

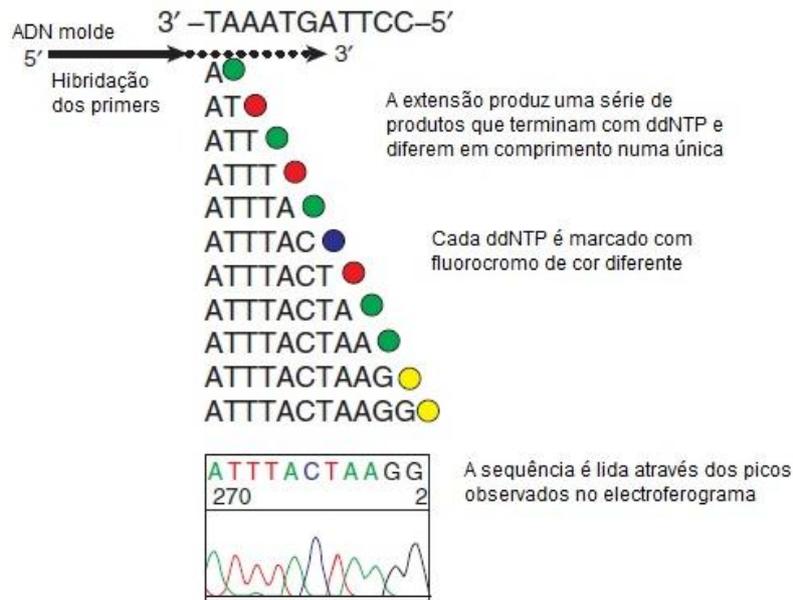


Figura 2. 4 - Processo de sequenciação com ddNTP marcados com fluorocromos de cores diferentes (Adaptado de Butler, 2005).

Na sequenciação, cada amostra subdividiu-se em 4 reações, uma para cada primer das regiões HV1 e HV2 numa placa de 96 poços, adicionando um controlo negativo da sequenciação (apenas os reagentes), além dos controlos positivos e negativos da amplificação. Para cada amostra, adicionamos os seguintes volumes (Tabela 2.17):

Tabela 2. 17 - Volumes da reação de sequenciação para HV1 e HV2.

<u>X 4 Primers*</u>	
Big Dye® Terminator**	1µL
Better Buffer***	2µL
1 Primer (2,5mM)****	1µL
ADN purificado	1µL

* Cada amostra é subdividida em 4 reações, uma para cada primer: L15997, H16401, L048 e H408.

** Contém dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); ddNTPs corados com fluorocromos (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP) e ADN polimerase. *** Tampão responsável pela otimização do Big Dye® Terminator.

**** Cada Primer a 2,5mM é composto por: 2,5µL de primer (100mM) e 97,5µL água mili-Q.

A sequenciação ocorreu com as seguintes temperaturas (Tabela 2.18):

Tabela 2. 18 - Programa de temperaturas para a sequenciação de HV1 e HV2.

Desnaturação inicial:	96°C - 3min	
Desnaturação:	96°C - 15seg	} x 25 ciclos
Annealing:	50°C - 10seg	
Extensão:	60°C - 3min	
Conservação:	4°C - ∞	

Foi necessário ainda purificar os produtos sequenciados de forma a remover dNTP's e ddNTP's que não foram incorporados e que possam influenciar na análise das sequências. Recorremos então ao *BigDye XTerminator Purification kit* (Applied Biosystems) que contém 2 reagentes. Aplicamos 3,7µL de *X-TerminatorTM solution* (remove dNTP's, ddNTP's e primers não emparelhados), 16,4µL de *SAMTM solution* (promove a ação do primeiro reagente e estabiliza a amostra) e 30µL de água mili-Q em cada poço. Agitamos a placa durante 30min num agitador de placas a temperatura ambiente, para que os reagentes se liguem a todos os excessos produzidos na sequenciação. Centrifugamos a placa durante 2min a 2800 rpm para que os resíduos se concentrem no fundo de cada poço libertando os produtos da sequenciação.

A sequência de nucleótidos de cada amostra foi detetada por excitação dos fluorocromos ligados aos diferentes ddNTPs através eletroforese capilar, num sequenciador de 4 capilares *3130 Genetic Analyzer* com o *3130 Series Data Collection Software v 4.0*, usando o polímero POP 6. Os produtos sequenciados migram consoante o seu peso molecular, ou seja, os fragmentos de menor peso molecular percorrem os capilares a uma maior velocidade e são detetados primeiro que os fragmentos de maior peso molecular. Cada fragmento está associado a um ddNTP corado com um fluorocromo e este, quando é excitado pelo laser do aparelho emite fluorescência. Esta fluorescência é registada no eletroferograma e representada sob forma de um pico com a cor correspondente ao fluorocromo excitado.

A análise dos resultados foi feita com recurso ao *Sequencing Analysis software v 5.2*, avaliando primeiro a qualidade de cada sequência e o *Seq Scape Software v 3.0* que permitiu a comparação da sequência em estudo com a Sequência de Referência de Cambridge (rCRS). Através desta comparação com a rCRS foi possível identificar os polimorfismos de cada amostra. O conjunto dos polimorfismos constitui o haplótipo do indivíduo e este foi incluído num haplogrupo que indicou uma provável origem geográfica da linhagem materna obtida.

Na análise das sequências de ADN mitocondrial cumprimos as regras de nomenclatura da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) apresentadas na Tabela 2.19. Diferentes nucleótidos na mesma posição estão normalmente associados a heteroplasmias de posição ou a possíveis contaminações. Diversos autores já reportaram amostras com, no máximo, duas heteroplasmias numa só sequência de ADN mitocondrial (Butler, 2011; Parson *et al.*, 2014). Consideramos, por isso, que a amostra poderá estar contaminada quando apresenta três ou mais posições com mais do que um nucleótido identificado.

O haplótipo (conjunto de alterações polimórficas da amostra em estudo relativas à sequência de referência) é composto por todos os polimorfismos. Cada polimorfismo foi identificado com a posição em que surgiu a alteração, seguido do nucleótido para o qual, a posição foi alterada.

Tabela 2. 19 - Regras de nomenclatura segundo a IUPAC.

Código IUPAC	Bases nucleotídicas
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
B	C, G ou T
D	A, G ou T
H	A, C ou T
R	A ou G (pu R ine)
Y	C ou T (p Y rimidine)
K	G ou T (K eto)
M	A ou C (a M ino)
S	G ou C (S trong bonds)
W	A ou T (W eak bonds)
N	a N y base
V	A, C ou G

A título de exemplo, o polimorfismo **263G** corresponde a uma alteração na posição 263 do segmento HV2, e o G corresponde à alteração ocorrida (na rCRS está presente uma Adenina, no entanto ocorre frequentemente uma alteração para uma Guanina - G) (Parson *et al.*, 2014). No caso de surgir uma inserção, identificamos a posição nucleotídica imediatamente anterior à alteração, seguida de **.1** (para a primeira inserção, no caso de ocorrer mais do que uma colocamos **.2** na segunda inserção e assim

sucessivamente). Por exemplo a inserção **315.1C** corresponde a uma inserção de uma citosina entre as posições 315 e 316 (Parson *et al.*, 2014). Por fim, se ocorrer uma deleção, o polimorfismo é identificado com a posição que foi deletada seguido do sufixo "del". Por exemplo a deleção **523del** corresponde à deleção do nucleótido da posição 523 (Parson *et al.*, 2014).

Neste estudo, para a determinação do haplótipo, foram apenas analisados os resultados que se encontravam no intervalo entre as posições 16024 e 16365 na análise de HV1 e entre a posição 73 e 340 na análise de HV2. O haplogrupo de cada amostra foi atribuído através do haplótipo com recurso à árvore filogenética *PhyloTree* criada por Van Oven e Kayser em 2009. Os haplótipos foram ainda introduzidos na bases de dados EMPOP de forma a verificar a sua frequência em diferentes populações a nível mundial.

2.7 Sequenciação de fragmentos do gene da Amelogenina

Todos os kits comerciais para a amplificação de marcadores STR de identificação humana incluem a amplificação do gene homólogo da amelogenina, contudo, em ADN degradado nem sempre se obtêm resultados para este marcador. Por isso, concebemos uma reação de PCR para amplificar um fragmento do gene da amelogenina utilizando um par de primers. Recorremos à *Master mix* da *Qiagen Multiplex PCR Mix*, pois contém todos os reagentes necessários à reação de PCR, sendo apenas necessário adicionar os primers específicos e o ADN molde. Adicionamos ainda, DMSO para potenciar a amplificação. Foram selecionados os primers *Amel F* e *Amel R* (Anexo 3: Tabela 7.6) por demonstrarem bons resultados em estudos prévios (Morikawa *et al.*, 2011; Tozzo *et al.*, 2013). Os primers utilizados amplificam uma região de 106 pb no cromossoma X e de 112 pb no cromossoma Y (Afonso, 2010; Morikawa *et al.* 2011; Tozzo *et al.*, 2013). A região amplificada torna-se bastante útil na diferenciação do sexo dos indivíduos em estudo uma vez que, entre o cromossoma X e o Y varia o tamanho do produto amplificado bem como os nucleótidos em 13 posições, permitindo a determinação do género através de sequenciação.

Para cada amostra, utilizamos os seguintes reagentes para um volume final de 25µL (Tabela 2.20):

Tabela 2. 20 - Volumes da reação de PCR para a 1ª amplificação do gene da Amelogenina.

Master Mix:	12,5µL
Primer <i>Amel F</i> (2µM)*:	2,5µL
Primer <i>Amel R</i> (2µM)**:	2,5µL
DMSO (50%)***:	3,5µL
ADN molde:	4µL

* Primer *Amel F* (2µM = 0,002mM) é composto por 1µL de Primer *Amel F* em stock (100µM) e 49µL de água mili-Q.

** Primer *Amel R* (2µM = 0,002mM) é composto por 1µL de Primer *Amel R* em stock (100µM) e 49µL de água mili-Q.

*** DMSO (dimetilsulfóxido) é descrito como sendo um aditivo potenciador da amplificação (Rapley e Whitehouse, 2007; *QIAGEN Multiplex PCR Handbook For fast and efficient multiplex PCR without optimization*, 2010)

A amplificação do gene homólogo da Amelogenina ocorreu com as seguintes temperaturas (Tabela 2.21):

Tabela 2. 21 - Programa de temperaturas para a 1ª amplificação do gene da Amelogenina.

Desnaturação inicial:	95°C - 10min	
Desnaturação:	94°C - 1min	} x 35 ciclos
Annealing:	63,5°C - 45seg	
Extensão:	72°C - 1min	
Extensão final:	70°C - 10min	
Conservação:	4°C - ∞	

Após uma primeira amplificação, realizamos a segunda amplificação (exceto para o controlo positivo e negativo) utilizando os mesmos primers que anteriormente. Tendo por base o produto já amplificado como ADN molde para a segunda amplificação, pretende-se aumentar a probabilidade de obter resultados nas amostras degradadas. Para cada amostra, na segunda amplificação necessitamos dos seguintes reagentes para um volume final de 25µL (Tabela 2.22):

Tabela 2. 22 - Volumes da reação de PCR para a 2ª amplificação do gene da Amelogenina.

Master Mix:	12,5µL
Primer <i>Amel F</i> (2µM):	2,5µL
Primer <i>Amel R</i> (2µM):	2,5µL
Água mili-Q:	3,5µL
ADN molde:	4µL

Após a segunda amplificação, as amostras foram purificadas com duas enzimas presentes na *Exo SAP-IT* (*Exonuclease I* e *ShrimpAlkaline Phosphatase*) (*Affymetrix*), responsáveis pela eliminação de primers não utilizados na reação e remoção de restos de dNTP's respetivamente, na proporção de 4 μ L *ExoSAP-IT* para 10 μ L de ADN de cada amostra. As enzimas são ativadas num programa de 15min a 37°C e 15min a 80°C.

Após a purificação das amostras, realizamos eletroforese em gel de poliacrilamida para verificar a presença de ADN, bem como identificar o género a partir do padrão de bandas apresentadas, comparando-as com os controlos positivos masculino e feminino e com um marcador de peso molecular. No caso de aparecer apenas uma banda na região dos 100 pb consideramos que a amostra corresponde a um indivíduo do sexo feminino, caso aparecerem duas bandas, uma na zona dos 100 pb e outra na zona dos 112 pb, consideramos que a amostra corresponde a um indivíduo do sexo masculino (o fragmento do gene da Amelogenina do cromossoma Y, por ter 112 pb distancia-se do cromossoma X que tem 106 pb).

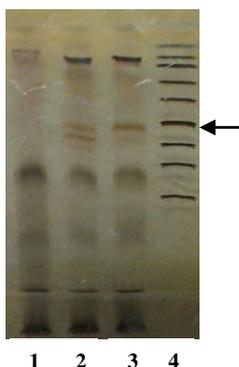


Figura 2. 5 - Gel de poliacrilamida com amostras de controlo. **1** - Controlo negativo; **2** - Controlo positivo masculino; **3** - Controlo positivo feminino; **4** - marcador de peso molecular *seta* - marcador para os 100 pb.

Seguiu-se a **sequenciação**, tal como se procedeu para o ADN mitocondrial, mas neste caso, subdividimos cada amostra em duas reações, uma para cada primer, utilizando como suporte uma placa de 96 poços, adicionando um controlo negativo da sequenciação (apenas os reagentes) além dos controlos positivos e negativos da amplificação. Para cada amostra, adicionamos os seguintes volumes (Tabela 2.23):

Tabela 2. 23 - Volumes da reação de sequenciação do gene da Amelogenina.

<u>X 2 Primers*</u>	
Big Dye® Terminator	1µL
Better Buffer	2µl
1 Primer (2µM)	1µl
ADN purificado	1µl

* Cada amostra é subdividida em 2 reações, uma para cada primer: *Amel F* e *Amel R*.

A sequenciação ocorreu com as seguintes temperaturas (Tabela 2.24):

Tabela 2. 24 - Programa de temperaturas para a sequenciação do gene da Amelogenina.

Desnaturação inicial:	96°C - 3min	
Desnaturação:	96°C - 15seg	} x 25 ciclos
Annealing:	50°C - 10seg	
Extensão:	60°C - 3min	
Conservação:	4°C - ∞	

Para purificar os produtos sequenciados, aplicamos em cada poço (correspondente de cada amostra) 3,7µL de *X-TerminatorTM solution*, 16,4µL de *SAMTM solution*, (*Applied Biosystems*) e 30µL de água mili-Q. Agitamos a placa durante 30min num agitador de placas à temperatura ambiente para que os reagentes se ligassem aos resíduos produzidos na sequenciação e libertassem o ADN purificado. Centrifugamos a placa durante 2min a 2800 rpm e aplicamos a placa num sequenciador de quatro capilares *3130 Genetic Analyzer* com o *3130 Series Data Collection Software v 4.0*, utilizando o POP 6 para realizar a eletroforese capilar tal como descrito para o estudo do ADN mitocondrial.

A análise dos resultados foi feita com recurso ao *Sequencing Analysis software v 5.2*, avaliando primeiro a qualidade de cada sequência e o *Seq Scape Software v 3.0* que permitiu a comparação da sequência em estudo com a sequência de referência do cromossoma Y retirada do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

No caso de uma amostra correspondente a um indivíduo sexo feminino, apenas foi possível identificar o cromossoma X por isso, através da sequenciação o resultado obtido foi o indicado na Tabela 2.25 para o cromossoma X. Caso a amostra correspondesse a um indivíduo do sexo masculino, como amplificamos a mesma região nos cromossomas X e Y, obtivemos os resultados indicados na Tabela 2.25 para a

sequenciação dos cromossomas X e Y. Obtivemos, portanto, dois fragmentos, com duas sequências diferentes, para a mesma amostra.

Tabela 2. 25 - Resultados esperados para a sequenciação dos cromossoma X e Y:

Cromossoma X:
5' - <u>CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG*</u> TGT TGA TTC TTT ATC CCA GAT XXX XXX GTT TCT CAA GTG GTC CTG ATT TTA CAG TTC CTA CCA CCA GCT TCC CAG TTT AAG CTC TGA T** - 3'
Cromossoma Y:
5' - <u>CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG*</u> XGT GGA TTC TTC ATC CCA AAT AAA GTG GTT TCT CAA GTG GTC CCA ATT TTA CAG TTC CTA CCA TCA GCT TCC CAG TTT AAG CTC TGA T** - 3'

* Sequenciação do primer *Amel F*; ** Sequenciação do primer *Amel R*; X - nucleótidos não presentes na referida sequência, mas presentes na sequencia do cromossoma complementar; Nucleótidos evidenciados a negrito - posições nucleotídicas que diferem com o cromossoma complementar.

2.8 SNPs do cromossoma Y

A análise de SNPs do cromossoma Y (Y-SNP's) é bastante mais sensível que a análise de Y-STR, o que a torna bastante útil em amostras com pouca concentração de ADN uma vez que é possível produzir resultados em amostra com menos de 125 pg de ADN (Lessig *et al.*, 2005).

No estudo de Y-SNP's, foi concebida uma reação de PCR multiplex com recurso à *Master Mix* da *Qiagen Multiplex PCR Mix*, uma vez que contem todos os reagentes necessários à reação de PCR, à qual juntamos os Primers específicos dos marcadores a amplificar e o ADN molde. O multiplex escolhido é composto por 9 pares de primers, - M22, P25, 92R7, SRY1532, M70, M173, Tat, M213 e M9 - (Sequência de cada primer encontra-se na Anexo 4: Tabela 7.7). Segundo Brion e colaboradores, este multiplex é um dos mais comumente utilizado na determinação dos haplogrupos mais frequentes na Europa (Brion *et al.*, 2004). Uma vez que, em principio, eram esperados haplogrupos Europeus nas amostras em estudo, recorremos a este grupo de marcadores no sentido de evitar a utilização de SNPs pouco adequados, bem como para diminuir os custos da técnica, já que apenas 9 marcadores de SNPs são indispensáveis para a definição do haplogrupo (Brion *et al.*, 2004). Os produtos amplificados variam entre 55 pb e 340pb (ver Anexo 4 Tabela 7.7).

Para cada amostra, foram necessários os seguintes reagentes para um volume final de 10 μ L (Tabela 2.26):

Tabela 2. 26 - Volumes da reação de PCR de Y-SNP.

Multiplex Master Mix	5 μ L
Primer Mix*	1 μ L
Água mili-Q	3,5 μ L
ADN molde	0,5 μ L

* O Primer Mix é composto por 9 pares de primers descritos na Anexo 4: Tabela 7.8 .

A PCR ocorreu com as seguintes temperaturas (Tabela 2.27):

Tabela 2. 27 - Programa de temperaturas para a amplificação de Y-SNP.

Desnaturação inicial:	95°C - 15min	
Desnaturação:	94°C - 30seg	} x 35 ciclos
Annealing:	60°C - 1:30min	
Extensão:	72°C - 1min	
Extensão final:	72°C - 10min	
Conservação:	4°C - ∞	

Purificamos os produtos amplificados na proporção de 1 μ L de *ExoSAP-IT* (*Affymetrix*) para cada 1 μ L de ADN amplificado, com o objetivo de remover os dNTPs excedentes da reação. As enzimas foram ativadas num programa de 45min a 37°C e 15min a 85°C. Seguiu-se uma reação de *SNaPshot* (kit comercial *SNaPshot® Multiplex kit - Applied Biosystems*), que não é mais que uma minisequenciação. A sequência de cada primer encontra-se na Anexo 4: Tabela 7.9. Os fluorocromos ligados a cada um dos quatro ddNTP emitem comprimentos de onda distintos, traduzindo-se numa cor específica para cada base, detetada por eletroforese (uma Adenina é representado pela cor verde, uma Citosina por amarelo - que para facilitar a visualização apresenta-se em preto, uma Guanina por azul e uma Timina por vermelho). Nas amostras purificadas, adicionamos em cada tubo (respetivo a cada amostra), os seguintes reagentes (volume final de 5,5 μ L) (Tabela 2.28):

Tabela 2. 28 - Volumes da reação de *SNaPshot* de Y-SNP.

<i>SNaPshot</i> Multiplex	1µL
Primer Mix*	1,27µL
Água mili-Q	1,23µL

* O Primer Mix é composto por 9 primers descritos na Anexo 4: Tabela 7.10.

A reação de *SNaPshot* ocorreu com as seguintes temperaturas (Tabela 2.29):

Tabela 2. 29 - Programa de temperaturas para a reação de *SNaPshot* de Y-SNP.

Desnaturação: 96°C - 10seg	} x 25 ciclos
Annealing: 50°C - 5seg	
Extensão: 60°C - 30seg	
Conservação: 4°C - ∞	

Seguiu-se uma purificação de forma a eliminar os ddNTPs não incorporados no *SNaPshot*, adicionando 2µL de *SAP* (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (*Affymetrix*) a cada tubo, sendo a enzima ativada a 37°C durante 60min e desativada posteriormente a 85°C durante 15min. Para aplicar as amostras no sequenciador, recorremos a placas de 96 poços e adicionamos a cada poço 0,5µL de *Size standard* (*120 Liz*) e 9µL de *Hi-Di Formamida* para cada 0,5µL de ADN purificado. Desnaturamos a placa com as amostras a 95°C durante 5min.

A deteção por fluorescência dos Y-SNPs ocorre por eletroforese capilar num sequenciador de 4 capilares *3130 Genetic Analyzer* com o *3130 Series Data Collection Software v 4.0*, utilizando o POP 6, e a análise foi realizada com recurso ao *GeneMapper®ID software v 3.2.1* da *Applied Biosystems*.

Após a eletroforese, foram registados os polimorfismos de cada região amplificada para cada amostra em estudo. Este conjunto de polimorfismos constitui o haplótipo das amostras, referentes aos marcadores estudados. Sendo os marcadores Y-SNPs, marcadores bialélicos, é esperado obter resultados de apenas um nucleótido por cada região amplificada. No entanto, foram registados marcadores com mais do que um nucleótido sem representarem contaminação esporádica (Brion *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2004; Vallone e Butler, 2004). Dentro do painel de marcadores estudados, no P25 e

92R7 já foram identificados mais do que um nucleótido, o que se deve a uma duplicação do fragmento amplificado, produzindo uma sequência variante (ou PSVs - *Paralogous Sequence Variants*) em que, pelo menos um deles é polimórfico (Brion *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2004).

Para atribuir haplogrupos às amostras e inferir sobre a sua ancestralidade referente à linhagem paterna, recorreremos à árvore filogenética para Y-SNPs criada pelo Y Chromosome Consortium divulgada em 2002 (Y Chromosome Consortium, 2002).

3. Resultados

3. Resultados

A seleção dos fêmures para este estudo realizou-se com base nos estudos previamente realizados sobre esta coleção osteológica. Pretendeu-se escolher fêmures de indivíduos adultos, com cerca de dois terços do osso intacto. No entanto, enquanto a representação esquemática dos estudos realizados anteriormente indicava que o osso se encontrava inteiro, por vezes, na realidade encontrava-se fraturado mas fixo com fita adesiva ou com cola, podendo, então, ter sofrido contaminação no interior do osso.

Os dados antropológicos das 50 amostras em estudo foram registados numa tabela que se encontra no Apêndice 6, Tabela 6.1. Nem sempre foi possível cortar um pedaço de osso na diáfise proximal, por estar fragmentado, ausente, ou unido com cola. Nestes casos a amostra foi retirada da diáfise distal.

Os ossos, no seu conjunto, encontravam-se com alterações tafonómicas, designadamente bastante desmineralizados, quebradiços e degradados com marcas de raízes e roedores. Foi encontrada terra e raízes de plantas no interior de alguns ossos como é apresentado na Figura 3.1. Como já foi referido, os ácidos húmicos presentes no solo podem constituir inibidores da PCR e afetar a amplificação de ADN presente no osso.

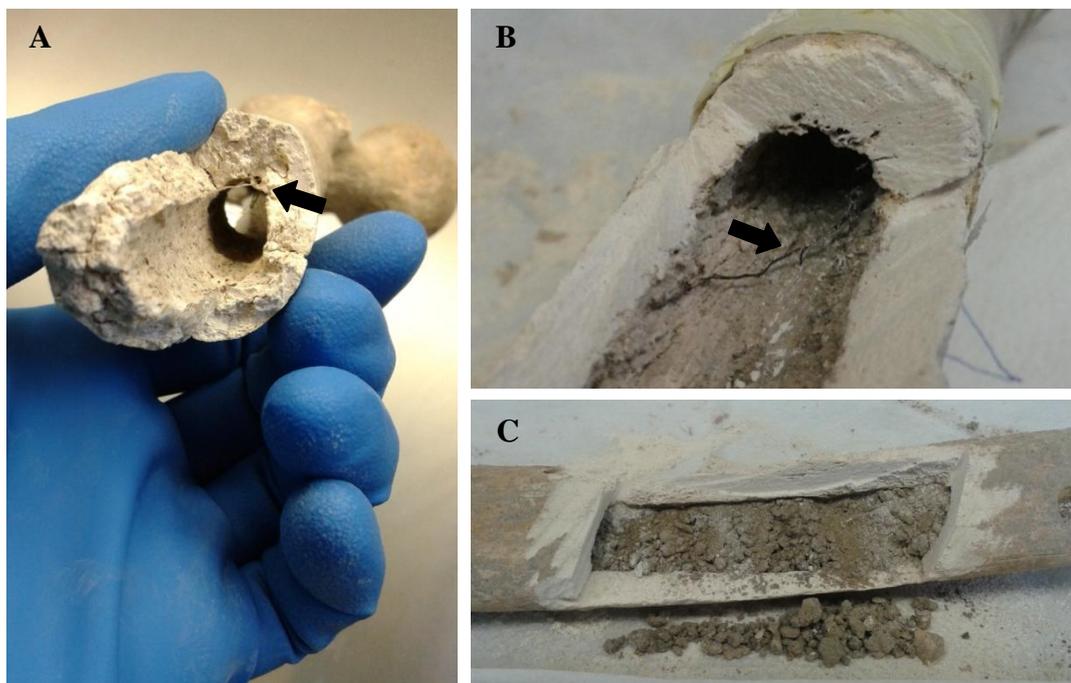


Figura 3. 1 - Fotografias de ossos com terra e raízes no seu interior. **A** - Amostra AGEN-035 com raízes atravessadas no interior do osso (seta). **B** - Amostra AGEN-078 com raízes no interior (seta). **C** - Amostra AGEN-068 com terra no interior.

3.1 Quantificação de ADN

Os valores determinados na quantificação de ADN com o *kit Quantifiler Duo* foram, tal como esperado inferior a 100 pg (100 pg = 0,1 ng); uma vez que se trata de ADN antigo (Figura 3.2). A maioria dos casos apresenta resultados na ordem dos 1 a 10 pg/ μ L de ADN. Verificou-se ainda que em 8 das 50 amostras obtivemos resultados na quantificação quando extraídas pelo método de Fenol clorofórmio e apenas em 4 quando extraídas com o método PrepFiler Express BTA (BTA) (no total, em 9 das 50 obtivemos algum resultado de quantificação). No entanto, as amostras extraídas com BTA apresentaram concentrações superiores às extraídas com Fenol.

Para a maioria das amostras não obtivemos resultados detetáveis na quantificação, contudo isso não invalida a tentativa posterior de obtenção de resultados de tipagem com marcadores genéticos de identificação humana. Uma vez que a quantificação apenas se baseia na amplificação de duas regiões do ADN total, em alguns casos estas regiões podem encontrar-se fragmentadas, e ser possível a amplificação com marcadores em outras regiões.

As concentrações determinadas no grupo controlo A, esqueletos da rotina pericial (Figura 3.3), foram, tal como esperado, bastante superiores. A maioria apresenta resultados na ordem dos 10 a 500 pg/ μ L. Excepcionalmente duas das amostras apresentaram concentrações acima dos 10 000 pg/ μ L. Isto pode dever-se ao facto de estas amostras se encontrarem melhor preservadas que as outras. É de salientar que as amostras extraídas com o método de Fenol apresentam maioritariamente valores de concentração de ADN superiores aos obtidos com o método BTA.

Já o grupo controlo B, esqueletos de soldados da guerra do ultramar (Figura 3.4), revelaram valores de concentração de ADN muito baixos (na ordem dos 0,5 a 1pg/ μ L). Apenas 2 das 10 amostras apresentaram resultados de quantificação detetáveis, sendo estes resultados obtidos na extração com o método BTA.

Por fim, no grupo controlo C, o esqueleto da capela particular (Figura 3.5), apresentou valores de concentração de ADN superiores aos esqueletos da guerra do ultramar e que a maioria dos esqueletos da população medieval. Apresentou valores na ordem dos 2 a 11 pg/ μ L. No entanto apenas se obtiveram resultados detetáveis no cromossoma Y, tanto no método de Fenol como no BTA.

Esqueletos população Medieval

Concentrações de ADN obtido por métodos de extração

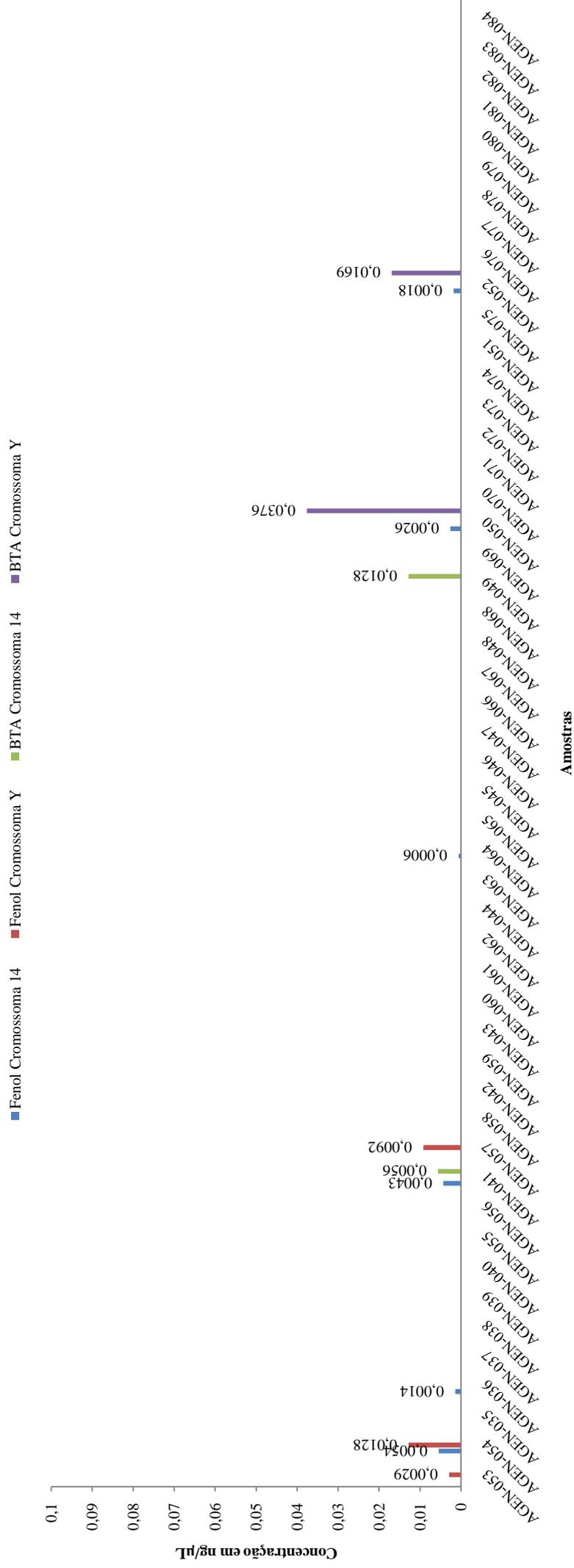


Figura 3. 2 - Valores obtidos na quantificação de ADN a partir dos cromossomas 14 e Y após ambas a extrações de cada uma das 50 amostras da população Medieval (Fenol - método de Fenol Cloroformio e BTA - Kit PrepFiler Express BTA).

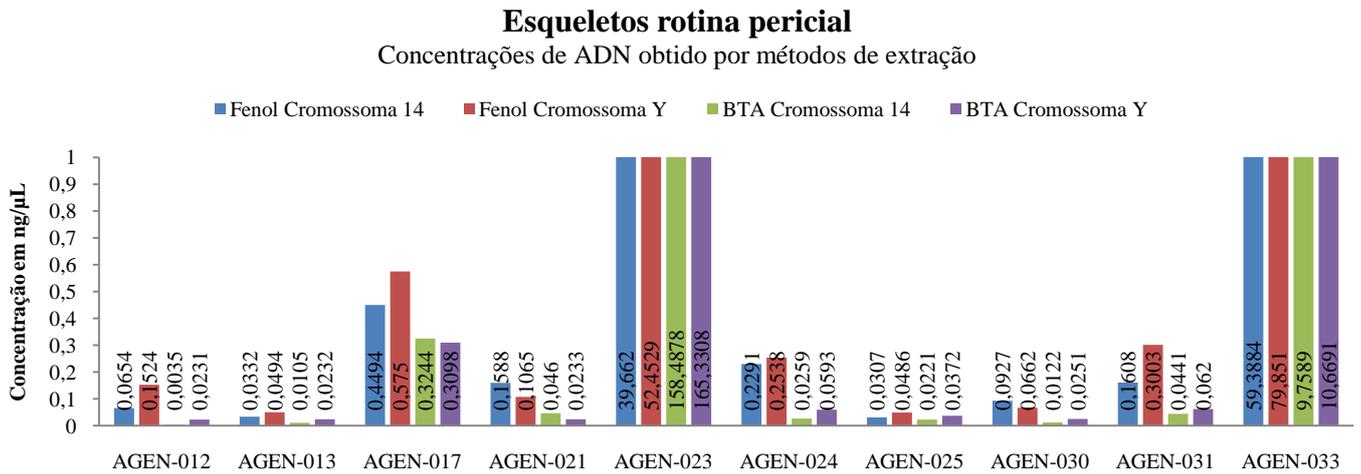


Figura 3. 3 - Valores obtidos na quantificação de ADN a partir dos cromossomas 14 e Y após ambas a extrações de cada uma das 10 amostras da rotina pericial - Grupo controlo A (Fenol - método orgânico de Fenol Clorofórmio e BTA - *Kit PrepFiler Express BTA*).

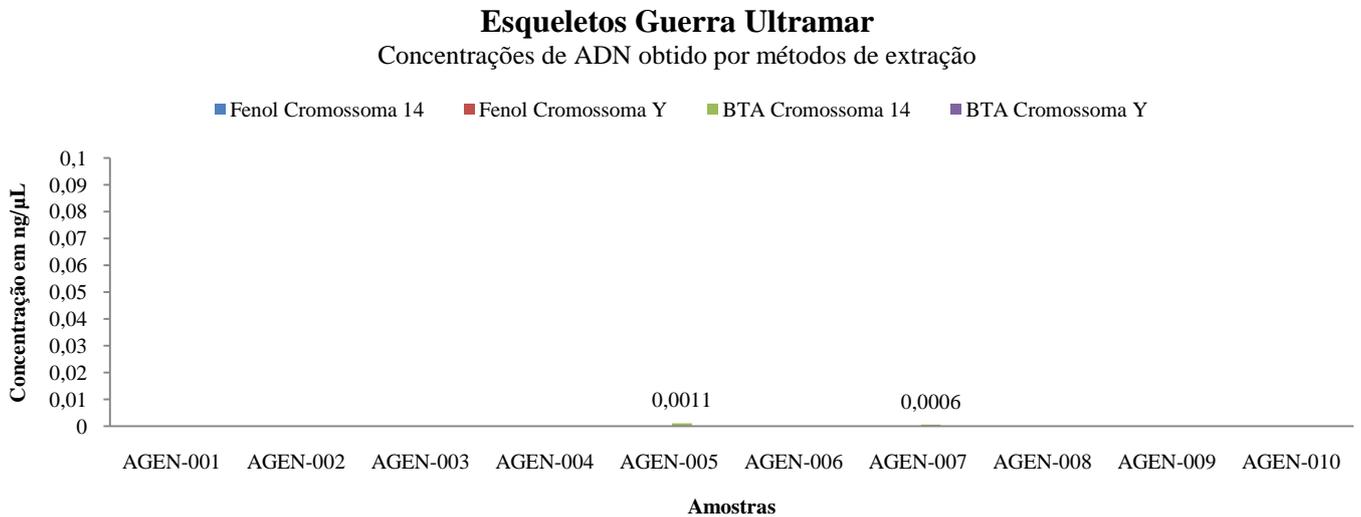


Figura 3. 4 - Valores obtidos na quantificação de ADN a partir dos cromossomas 14 e Y após ambas a extrações de cada uma das 10 amostras da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B (Fenol - método orgânico de Fenol Clorofórmio e BTA - *Kit PrepFiler Express BTA*).

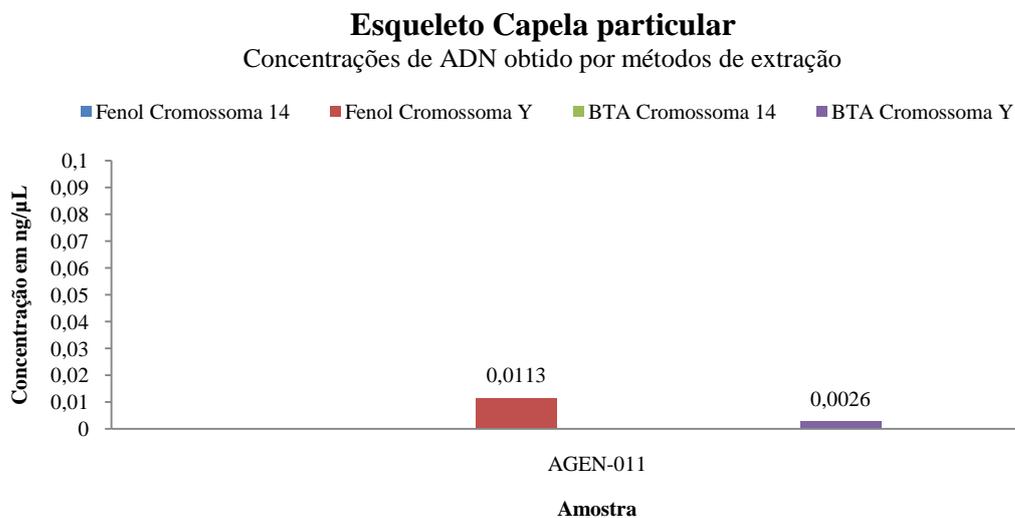


Figura 3. 5 - Valores obtidos na quantificação de ADN a partir dos cromossomas 14 e Y após ambas a extrações da amostra da Capela particular - Grupo controlo C (Fenol - método orgânico de Fenol Clorofórmio e BTA - *Kit PrepFiler Express BTA*).

3.2 Amplificação de STRs autossômicos e InDels

Os resultados obtidos das amplificações dos marcadores do tipo STR e InDel para as amostras da população medieval, revelaram-se bastante incompletos. Calculamos frequências de amplificação e frequências dos alelos flutuantes, e realizamos a comparação com os grupos controlo, bem como entre os resultados para marcadores do tipo STR e InDel.

3.2.1 STR e Mini-STR autossômicos

No estudo de marcadores STR, foram utilizados diferentes kits comerciais para amplificação dos mesmos 17 marcadores. O Kit PowerPlex®ESI 17 System amplifica os mesmos 17 marcadores e com o mesmo tamanho que o Kit PowerPlex®ESI 17 Pro System, mas este último está descrito como sendo mais sensível que o primeiro. Enquanto o Kit PowerPlex® ESX 17 System (ver Apêndice 3), amplifica os mesmos marcadores, mas estes com tamanhos diferentes que os dois anteriores. A utilização destes kits, além de representarem repetições da mesma amostra, trazem a vantagem de, para o mesmo marcador, caso não obtenha resultados usando um kit, talvez seja possível obter resultados usando outro kit em que o produto de amplificação seja mais pequeno. Para além destes kits, utilizou-se também, um kit comercial que amplifica Mini-STRs, em que a maioria dos marcadores são coincidentes com os outros kits, e adiciona, ainda, 3 outros marcadores ao estudo, por isso, para cada amostra teremos a possibilidade de estudar 20 marcadores do tipo STR.

Uma vez que, para cada amostra extraímos ADN com 2 métodos diferentes, e cada método de extração foi utilizado para amplificar marcadores STR com 4 kits diferentes (num total de 8 amplificações para cada amostra), foi necessário criar um perfil consenso que compilasse toda a informação obtida. Na Figura 3.6 é possível ver os resultados do perfil consenso de cada uma das 50 amostras da população Medieval em termos de número de alelos amplificados e de alelos flutuantes. Confirmou-se, ainda, não ter ocorrido qualquer contaminação por parte dos intervenientes do processo - Grupo controlo D.

Esqueletos população Medieval Amplificação de STR's

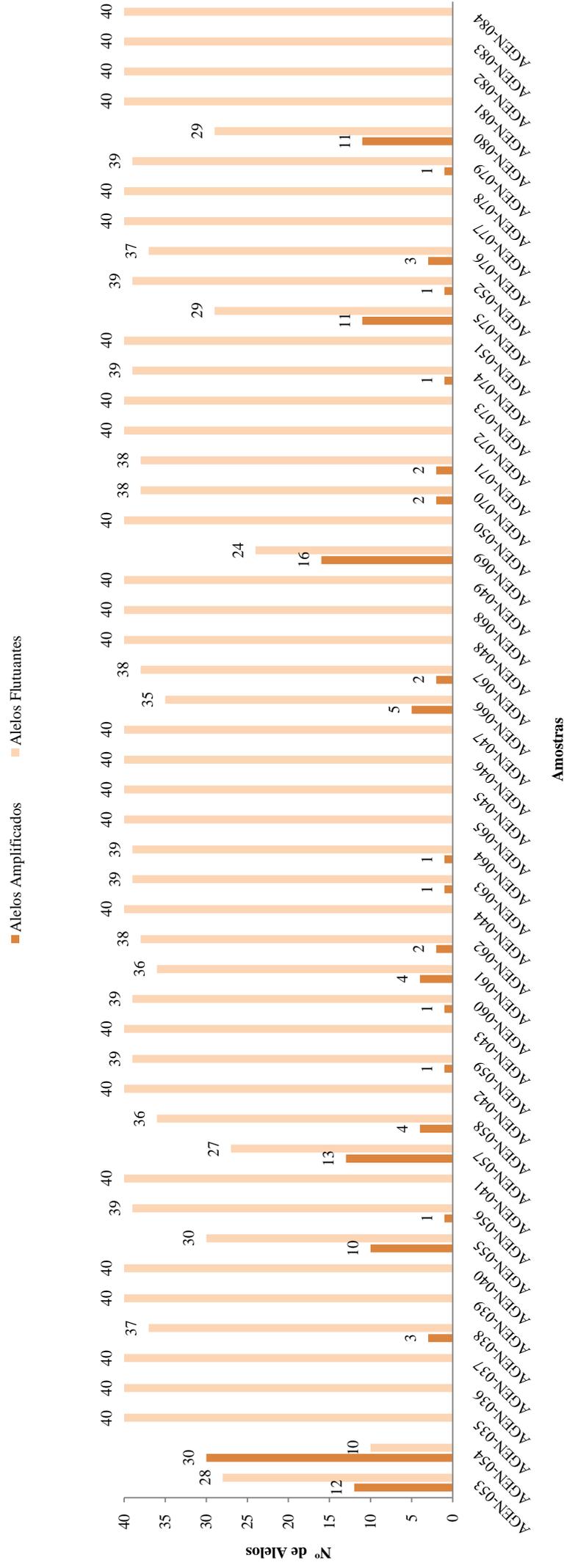


Figura 3. 6 - Resultados obtidos na amplificação de 20 marcadores STR, utilizando diferentes Kits comerciais para cada uma das 50 amostras da população Medieval.

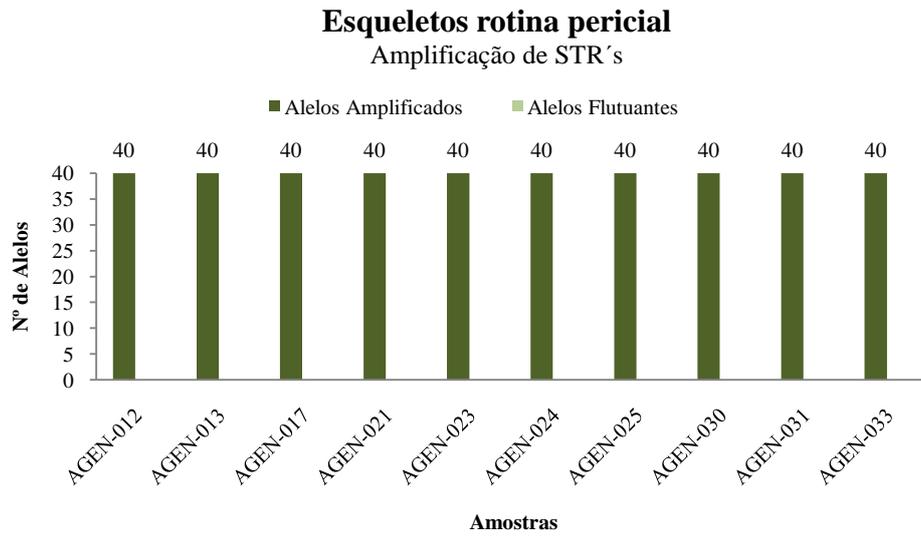


Figura 3. 7 - Resultados obtidos na amplificação de 20 marcadores STR, utilizando diferentes Kits comerciais para cada uma das 10 amostras da rotina pericial - Grupo controlo A.

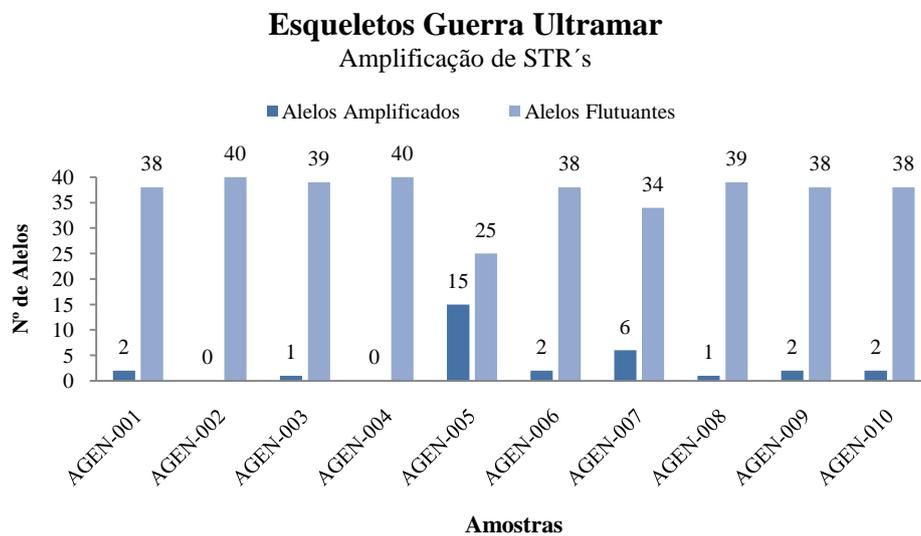


Figura 3. 8 - Resultados obtidos na amplificação de 20 marcadores STR, utilizando diferentes Kits comerciais para cada uma das 10 amostras da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.

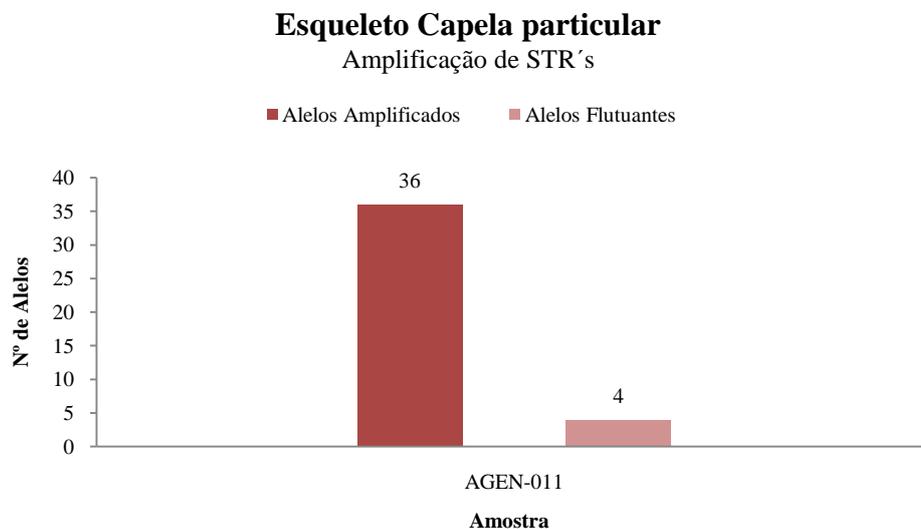


Figura 3. 9 - Resultados obtidos na amplificação de 20 marcadores STR, utilizando diferentes Kits comerciais para a amostra da capela particular - Grupo controlo C.

Todos os resultados são apresentados nos gráficos com as amostras distribuídas pelo ano de exumação dos esqueletos. Assim, ao ler-se da esquerda para a direita, as amostras 053 e 054 foram exumadas em 1990, as amostras entre as 035 e 040 foram exumadas em 1992, as amostras 055 e 056 foram exumadas em 1993, amostras entre as 041 e 058 foram exumadas em 1995, amostras entre as 042 e 047 foram exumadas em 1996, amostras entre as 066 e 069 foram exumadas em 1997, amostras entre as 050 e 073 foram exumadas em 1998, amostras entre as 074 e 077 foram exumadas em 2000 e amostras entre as 078 e 084 foram exumadas em 2010. No entanto, ao contrário do que era esperado, não foi possível estabelecer uma relação entre o ano de escavação e os resultados obtidos, apesar de artigos recentes defenderem que quanto menos tempo decorrer entre o processo de escavação do osso e a análise em laboratório, melhor serão os resultados (Pruvost *et al.*, 2007).

Apesar da maioria dos casos apontar para concentrações de ADN indetetáveis na quantificação, em 24 das 50 amostras (equivalente a 48%) foi amplificado pelo menos 1 alelo dos 40 possíveis de ser amplificados. Obtivemos uma média de amplificação de 3 alelos (2,8 alelos) por amostra (Figuras 3.6 e 3.13).

Relativamente ao grupo de controlo A, esqueletos da rotina pericial, todos os 40 alelos de todas as amostras foram amplificados, correspondendo a 100% de amplificação neste grupo (Figuras 3.7 e 3.10). Já no grupo de controlo B, esqueletos de soldados da guerra do ultramar, apesar de sujeitos, sensivelmente, ao mesmo tempo de inumação que o grupo controlo A, os resultados são bem diferentes, apresentando mais semelhanças com o grupo de esqueletos em estudo, da população medieval. Embora os resultados da quantificação tenham revelado concentrações indetetáveis para a maioria das amostras, em 8 das 10 amostras (equivalente a 80%) foram amplificados, pelo menos, 1 alelo dos 40 alelos possíveis, obtivemos uma média de amplificação de 3 alelos (3,1 alelos) por amostra (Figuras 3.8 e 3.11). Quanto ao esqueleto da capela particular, os resultados revelaram-se surpreendentemente superiores ao esperado por se tratar de um esqueleto do século XV. 36 dos 40 alelos foram amplificados, traduzindo-se numa amplificação de 90%, muito semelhante ao grupo de controlo A (Figuras 3.9 e 3.12).

Esqueletos rotina pericial
Amplificação de STR's

■ % de Alelos Amplificados ■ % de Alelos Flutuantes

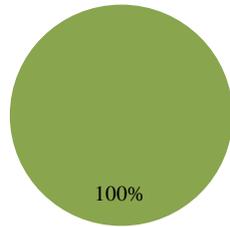


Figura 3. 10 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores STR no grupo de esqueletos da rotina pericial - Grupo controlo A.

Esqueletos Guerra Ultramar
Amplificação de STR's

■ % de Alelos Amplificados ■ % de Alelos Flutuantes

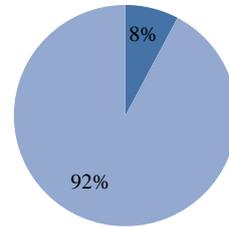


Figura 3. 11 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores STR no grupo de esqueletos da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.

Esqueleto Capela particular
Amplificação de STR's

■ % de Alelos Amplificados ■ % de Alelos Flutuantes

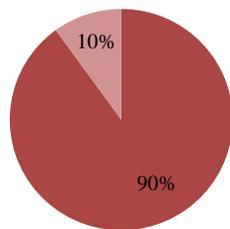


Figura 3. 12 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores STR no esqueleto da Capela particular - Grupo controlo C.

Esqueletos população Medieval
Amplificação de STR's

■ % de Alelos Amplificados ■ % de Alelos Flutuantes

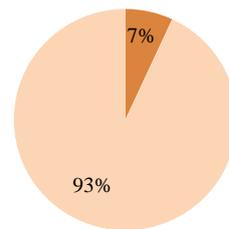


Figura 3. 13 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores STR no grupo de esqueleto da população Medieval em estudo.

Resultados de amplificação por tamanho de Marcadores
Amplificação de STR's

■ <150 pb ■ >150 - <200 pb ■ >200 - <300 pb ■ >300 pb

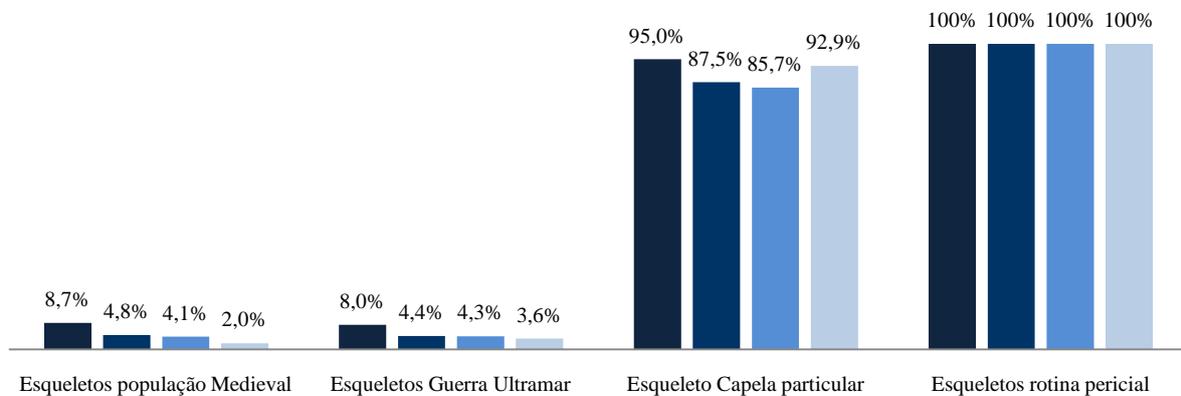


Figura 3. 14 - Representação gráfica dos resultados da amplificação de marcadores tendo em conta o tamanho dos produtos de amplificação dos diferentes kits comerciais utilizados no estudo de marcadores do tipo STR e Mini-STR para os esqueletos da população Medieval em estudo e grupos controlo A, B e C.

Quanto à amplificação de marcadores do tipo STR e Mini-STR tendo em conta o tamanho dos produtos amplificados (Figura 3. 14), é possível também constatar uma semelhança entre os esqueletos da população medieval e os esqueletos dos soldados da guerra do ultramar e entre o esqueleto da capela particular e os esqueletos da rotina pericial. Nas amostras dos esqueletos da população medieval e guerra do ultramar verificam-se baixas taxas de amplificação e um decréscimo na percentagem de amplificação à medida que os produtos de amplificação vão sendo maiores. Trata-se de um resultado característico de ADN degradado, ou seja, amplificamos mais facilmente as regiões com tamanhos até 150 pb do que as regiões com 200 ou 300 pb.

3.2.2 InDel

Na amplificação de marcadores do tipo InDel, pelos produtos de amplificação serem mais pequenos (entre 75 a 155 pb), esperavam-se melhores resultados que nos marcadores do tipo STR (entre 80 a 460 pb). Como é visível no Figuras 3.15 e 3.22, os resultados da amplificação de marcadores InDel nos esqueletos da população medieval foram bastante superiores aos resultados obtidos com marcadores STR, no entanto não são suficientes para determinar a ancestralidade, uma vez que seria necessário obter o perfil completo.

No estudo de marcadores InDel, o kit comercial permite amplificar 31 marcadores, 30 dos quais são bialélicos, e 1 é o gene da Amelogenina, o que equivale a 62 alelos possíveis de detetar (ver Apêndice 4). Na população em estudo, em 48 das 50 amostras (96%) foram amplificados pelo menos 2 alelos, atingindo-se uma média de 15 alelos (15,08 alelos) amplificados por amostra, traduzindo-se numa amplificação total de 24%. Nos grupos controlo, tal como a população em estudo, os resultados foram superiores aos registados no estudo de marcadores STR. Para os esqueletos da rotina pericial, tal como o esperado, obtivemos amplificação para todos os marcadores (Fig. 3.16 e 3.19).

Os resultados do grupo de esqueletos da guerra do ultramar, revelaram que em todas as amostras amplificamos, pelo menos, 2 alelos (100%), alcançando-se uma média de 26 alelos (25,6 alelos) por amostra e uma amplificação de 41% no total do grupo (Figura 3.17 e 3.20). No esqueleto da capela particular amplificamos os 62 alelos, correspondendo a uma amplificação de 100% (Figura 3.18 e 3.21).

Esqueletos população Medieval Amplificação de InDel

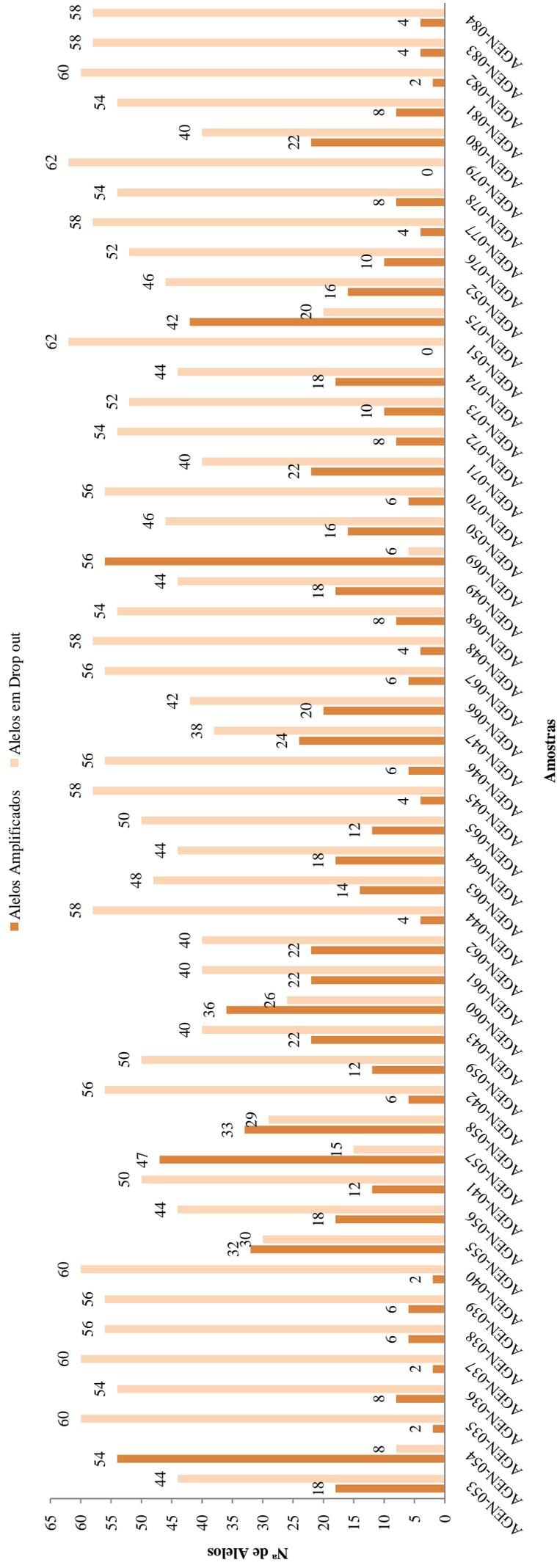


Figura 3. 15 - Resultados obtidos da amplificação de 31 marcadores InDel para cada uma das 50 amostras da população Medieval.

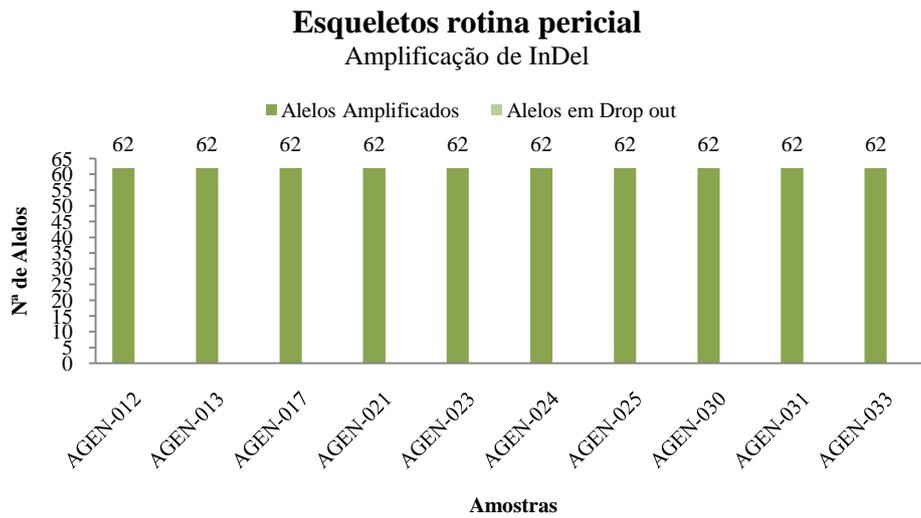


Figura 3. 16 - Resultados obtidos da amplificação de 31 marcadores InDel, para cada uma das 10 amostras da rotina pericial - Grupo controlo A.

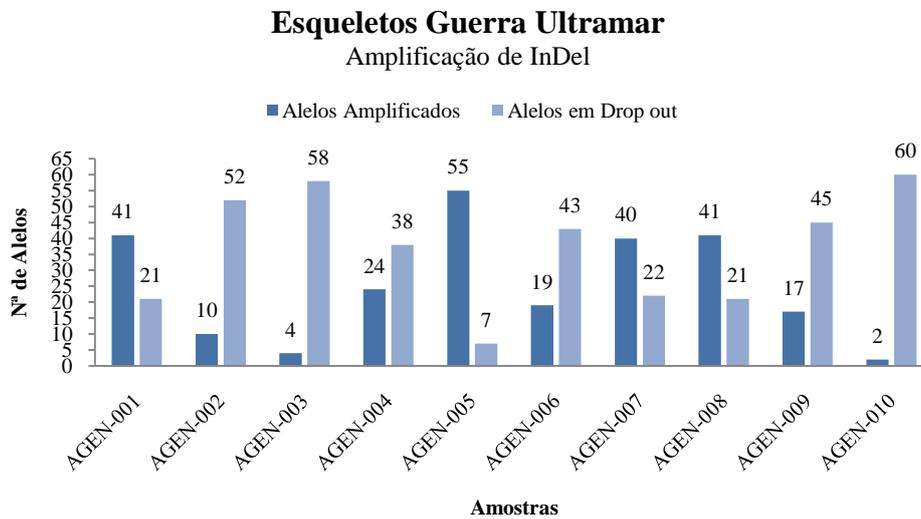


Figura 3. 17 - Resultados obtidos da amplificação de 31 marcadores InDel, para cada uma das 10 amostras da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.

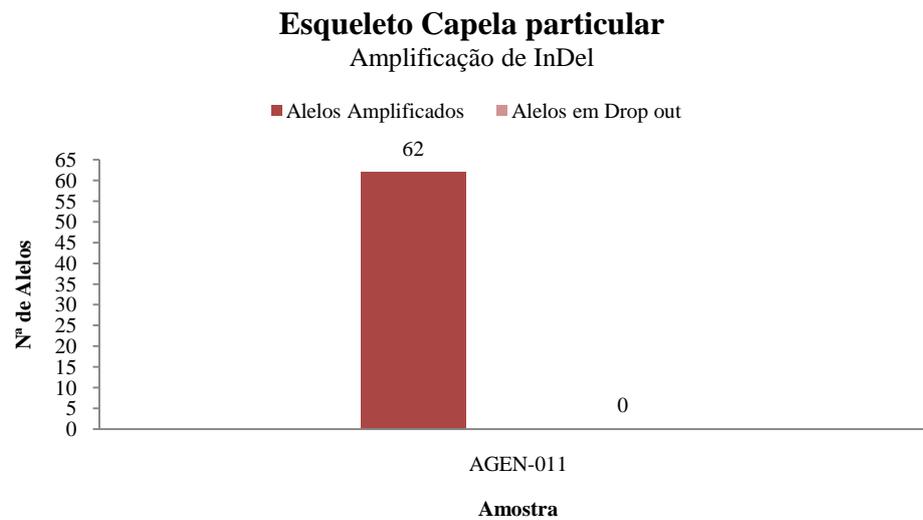


Figura 3. 18 - Resultados obtidos da amplificação de 31 marcadores InDel, para a amostra da Capela particular - Grupo controlo C.

Esqueletos rotina pericial

Amplificação de InDel

■ % Alelos Amplificados ■ % Alelos em Drop out

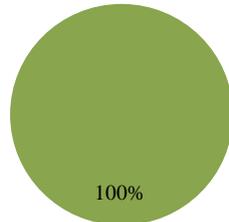


Figura 3. 19 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores InDel no grupo de esqueletos da rotina pericial - Grupo controlo A.

Esqueletos Guerra Ultramar

Amplificação de InDel

■ % Alelos Amplificados ■ % Alelos em Drop out

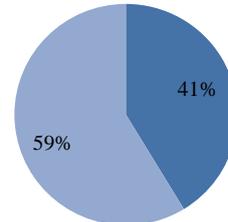


Figura 3. 20 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores InDel no grupo de esqueletos da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.

Esqueleto Capela particular

Amplificação de InDel

■ % Alelos Amplificados ■ % Alelos em Drop out

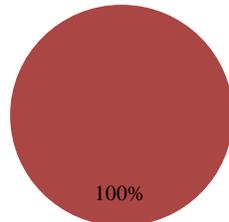


Figura 3. 21 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores InDel no esqueleto da Capela particular - Grupo controlo C.

Esqueletos população Medieval

Amplificação de InDel

■ % Alelos Amplificados ■ % Alelos em Drop out

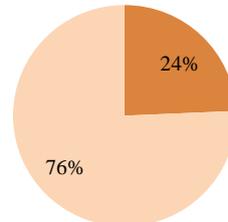


Figura 3. 22 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores InDel no grupo de esqueleto da população Medieval em estudo.

Tal como nos resultados da amplificação de marcadores STR, não é visível uma relação entre o ano de escavação e o número de alelos amplificados. Os resultados encontram-se bastante difusos relativamente aos diferentes anos de escavação. Em relação ao tamanho dos produtos amplificados, (ver Apêndice 5) os resultados revelaram-se bastante próximos dos obtidos nos STR, ou seja, quanto maior foi o tamanho do produto de amplificação, menor é a probabilidade de amplificação em ADN degradado.

Mais uma vez, verificou-se uma maior proximidade dos esqueletos em estudo da população medieval com o grupo de controlo B (esqueletos de soldados da guerra do ultramar) e uma semelhança de resultados entre os esqueletos da rotina pericial (grupo controlo A) e o esqueleto da capela particular (grupo controlo C). Isto poderá sugerir que as condições de inumação serão mais importantes na conservação do ADN em material ósseo que o tempo de decorrer entre a morte do indivíduo e a análise em laboratório.

3.3 Amelogenina

Em todos os kits com marcadores de identificação humana do tipo STR, MiniSTR e InDel, o gene da amelogenina é amplificada com o intuito de diferenciar o sexo dos indivíduos. No entanto, não foi possível amplificar esta região para todas as amostras em estudo (esqueletos da população medieval). Por isso, desenhamos uma reação de PCR que amplificasse apenas uma região comum do cromossoma X e Y e que diferenciasse os cromossomas homólogos. Selecionou-se uma região que apresenta diferentes tamanhos de produto amplificado bem como diferenças em algumas posições nucleotídicas entre os dois cromossomas - X e Y -. Esta região já demonstrou utilidade em estudos anteriores (Afonso, 2010; Morikawa *et al.* 2011; Tozzo *et al.*, 2013).

Com esta amplificação pretende-se não só determinar o sexo de todos os indivíduos estudados da população medieval (uma vez que todos os esqueletos dos grupos controlo pertencem a indivíduos masculinos, esta análise efetuou-se apenas na população em estudo), bem como comparar os resultados obtidos pela análise genética com os resultados dos estudos antropológicos. A grande maioria dos esqueletos foi-lhe atribuído o sexo através de métodos antropológicos (apenas 5 dos 50 ficaram com este diagnóstico por definir - AGEN 043, 048, 049, 060 e 064 - ver Apêndice 6 Tabela 6.1). No entanto é importante referir que por vezes não foi possível aplicar todos os métodos de diagnóstico sexual propostos nos estudos antropológicos devido ao mau estado de preservação dos esqueletos, sendo que, para alguns indivíduos apenas foram utilizados alguns dos parâmetros possíveis (Leandro, 2011), e por isso estão sujeitos a erros de diagnóstico.

No estudo genético da amelogenina, nem sempre foi possível obter resultados no gel de poliacrilamida e sequenciação tal como era desejável. Por isso, considerou-se válida a atribuição do sexo dos indivíduos que apresentem resultados em um ou mais dos três métodos propostos: amplificação da amelogenina através dos kits de STR, MiniSTR ou InDel (desde que a região seja amplificada em pelo menos 2 ensaios); resultados claros no gel de poliacrilamida ou sequenciação da região amplificada (comparando com a sequência de referência do cromossoma Y) bem como a confirmação da sequência com a ferramenta Blast do site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a qual permite identificar o cromossoma amplificado eliminando o erro do observador. Como exemplo de resultados esperados nos **kits comerciais** com a amplificação da amelogenina eletroferogramas com resultados conforme apresentados na figura 3.23.

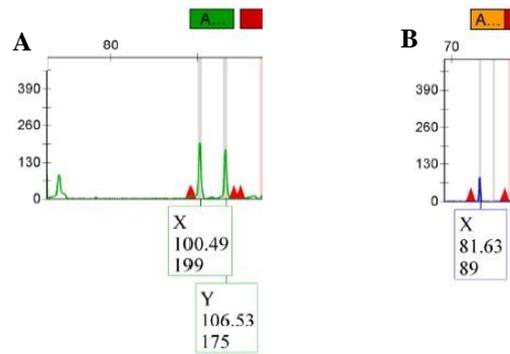


Figura 3. 23 -Eleetroferogramas de kit comerciais com a amplificação da amelogenina. **A** - Indivíduo masculino (amostra AGEN-054 amplificada com o kit AmpFISTR® *MiniFiler*). **B** - Indivíduo feminino (amostra AGEN-061 amplificada com o kit PowerPlex® ESX 17 System).

O exemplo de resultados obtidos em **gel de poliacrilamida** após a amplificação da amelogenina com os primers *Amel F* e *Amel R* é apresentado na figura 3.24:

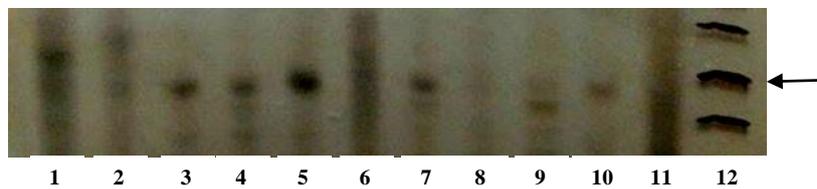


Figura 3. 24 - Gel de poliacrilamida após a segunda amplificação da Amelogenina para amostras da população medieval. Poços 1, 2, 6 e 8 não foi possível obter resultado (AGEN-077; 078; 082 e 084 respectivamente); poços **3** - Amostra feminina (AGEN - 079) **4** - Amostra Masculina (AGEN - 080); **5** - Amostra feminina (AGEN-081); **7** - Amostra Masculina (AGEN - 083); **9** - controlo positivo masculino; **10** - controlo positivo feminino, **11** - Controlo negativo; **12** - marcador de pesos moleculares; **seta** - marcador para os 100 pb.

E por fim, o exemplo dos resultados obtidos após a **sequenciação** das amostras amplificadas com os primers *Amel F* e *Amel R* (a sequência amplificada é numerada entre as posições 1 e 111 para facilitar a deteção e representação das alterações) é apresentado na figura 3.25:

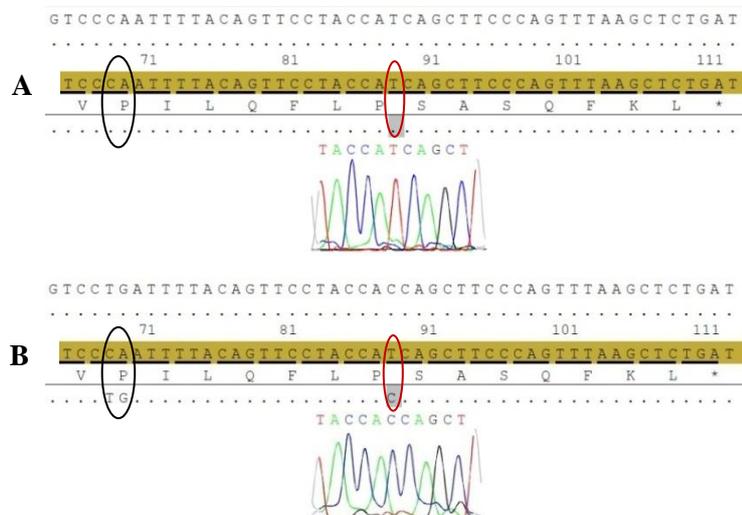


Figura 3. 25 - Sequenciação da Amelogenina de amostras da população medieval (apenas estão representadas as posições 64 até 111). **A** - Indivíduo masculino (AGEN - 058) - não reconhece qualquer alteração uma vez que é igual à sequência de referência (cromossoma Y); **B** - Indivíduo feminino (AGEN - 068) - reconhece alterações na posição 68, 69 (evidenciadas a preto) e 88 (evidenciada a vermelho) em comparação com a sequência de referência.

Os resultados obtidos, tendo em conta os três métodos propostos para a determinação do sexo dos indivíduos da população medieval nem sempre foram coincidentes com os resultados apresentados pelos estudos antropológicos. A Figura 3.26 representa os sexos dos indivíduos em estudo, combinando os resultados da antropologia (colunas de baixo) com os da genética (colunas de cima). É possível verificar que dos 50 indivíduos em estudo, 45 deles (90%) tinham o sexo atribuído pela antropologia (32 masculinos e 13 femininos) e 27 (54%) foram atribuídos pela genética. Em apenas 2 indivíduos não obtivemos qualquer resultado (AGEN - 043 e 064). Dos indivíduos em que foi possível obter resultados tanto na antropologia como na genética, 11 deles coincidiram em ambos os seus resultados (AGEN - 035; 038; 041; 044; 047; 051; 054; 057; 062; 072; 080), no entanto em 13 não houve acordo entre a genética e a antropologia (AGEN - 036; 039; 050; 053; 055; 058; 061; 066; 068; 069; 079; 081; 083). Dos 11 coincidentes, 7 são masculinos, e 4 são femininos enquanto dos 13 que não coincidiram, 7 deles a antropologia define como masculino e a genética como feminino e em 6 a antropologia define como feminino e a genética como masculino.

Dos 27 casos em que obtivemos resultados pela genética, 3 não tinham género atribuído pela antropologia (AGEN - 048; 049 e 060), 15 dos 27 são indivíduos masculinos (AGEN - 036; 038; 039; 041; 044; 048; 053; 054; 057; 058; 060; 069; 072; 080 e 083) e 12 são femininos (AGEN - 035; 047; 049; 050; 051; 055; 061; 062; 066; 068; 079 e 081).

Com base nestes resultados, no estudo de Y-STRs e Y'SNPs apenas serão analisados os indivíduos para os quais se confirmou como sendo do sexo masculino.

Género dos indivíduos Antropologia vs Genética

■ Genética M ■ Genética F ■ Antropologia M ■ Antropologia F

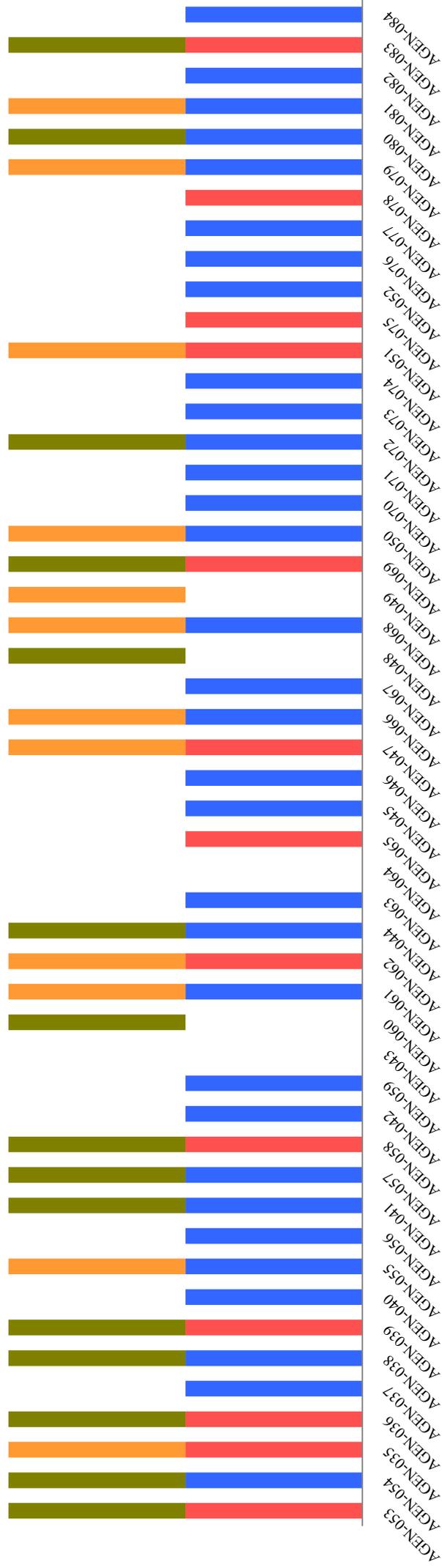


Figura 3. 26 - Resultados da atribuição do sexo aos 50 indivíduos da população medieval por métodos Antropológicos e Genéticos.

3.4 Y-STR

Tendo em conta os resultados obtidos no estudo do gene da amelogenina, sejam eles obtidos através dos kits comerciais de STRs autossómicos, gel de poliacrilamida, ou sequenciação, selecionaram-se apenas os indivíduos do sexo masculino para a análise dos marcadores STR no cromossoma Y. Dos 27 indivíduos em estudo da população medieval em que foi possível determinar o género, 15 deles são masculinos. O kit AmpFlSTR® *Yfiler*®, permite amplificar 16 marcadores, cada um apenas com um alelo, uma vez que representam regiões no cromossoma Y, à exceção de um marcador (DYS385) que amplifica dois fragmentos, resultando em 17 alelos possíveis de serem amplificados.

Esperávamos resultados semelhantes aos encontrados com os STR autossómicos, uma vez que os produtos de amplificação se encontram entre os 100 a 320 pb.

Na população em estudo, em 13 das 15 amostras (87%) amplificamos pelo menos 1 alelo, sendo alcançada uma média de 2 alelos (2,33 alelos) amplificados por amostra, traduzindo-se, numa amplificação de 14% (ver Figuras 3.27 e 3.34).

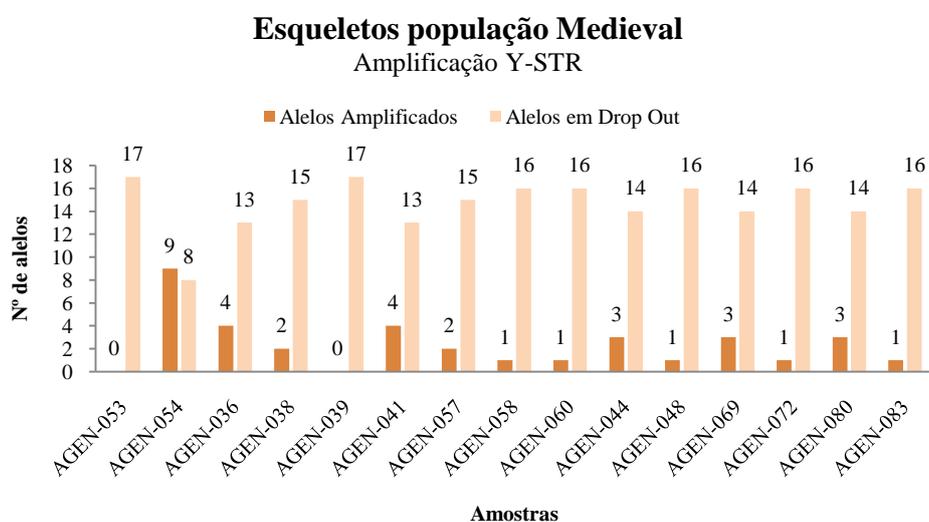


Figura 3. 27 - Resultados obtidos na amplificação de 16 marcadores Y-STR com o kit AmpFlSTR® *Yfiler*®.

Os resultados do AmpFlSTR®*Yfiler* poderiam ser analisados com o objetivo de detetar possíveis linhagens paternas na população em estudo, no entanto os resultados não são suficientes para determinar tal relação de parentesco entre os indivíduos estudados. Relativamente aos grupos de controlo, os resultados são semelhantes aos obtidos com marcadores já definidos anteriormente. No grupo controlo A, 100% dos alelos foram amplificados (Figuras 3.28 e 3.31).

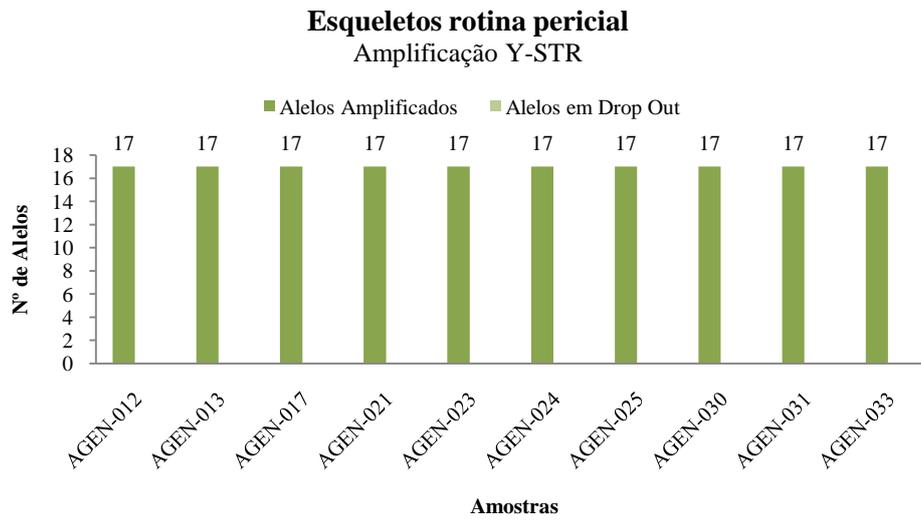


Figura 3. 28 - Resultados obtidos na amplificação de 16 marcadores Y-STR, para cada uma das 10 amostras da rotina pericial - Grupo controlo A.

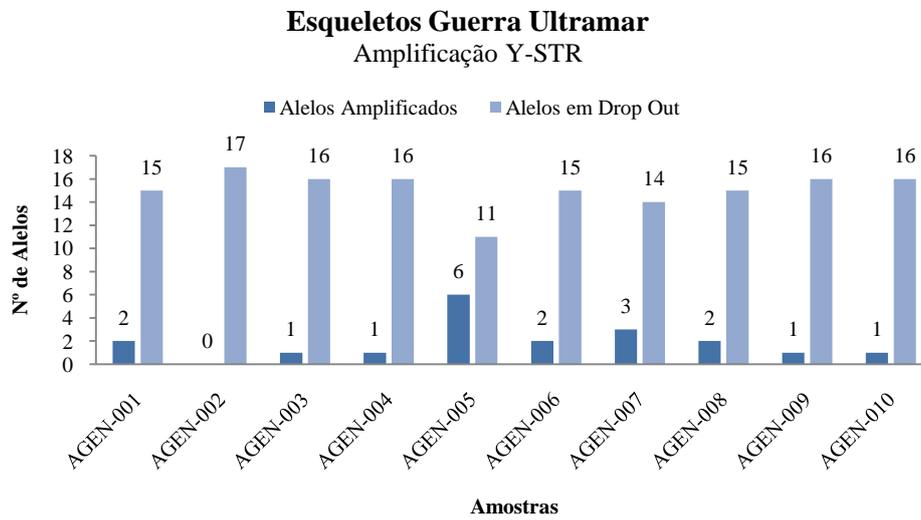


Figura 3. 29 - Resultados obtidos na amplificação de 16 marcadores Y-STR, para cada uma das 10 amostras da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.

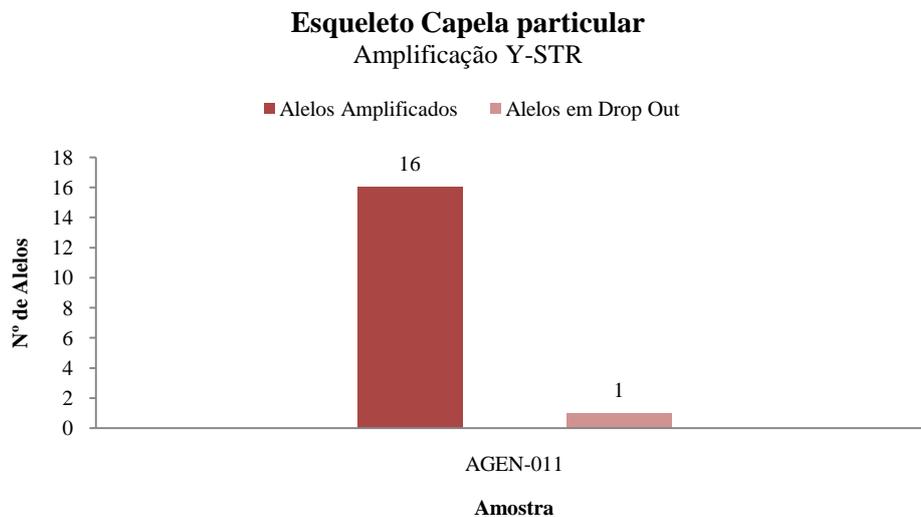


Figura 3. 30 - Resultados obtidos na amplificação de 16 marcadores Y-STR, para cada uma das 10 amostras da Capela particular - Grupo controlo C.

Esqueletos rotina pericial

Amplificação Y-STR

■ % Alelos amplificados ■ % Alelos emDrop out

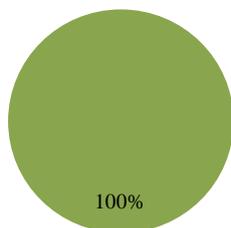


Figura 3. 31 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-STR no grupo de esqueletos da rotina pericial - Grupo controlo A.

Esqueletos Guerra Ultramar

Amplificação Y-STR

■ % Alelos amplificados ■ % Alelos emDrop out

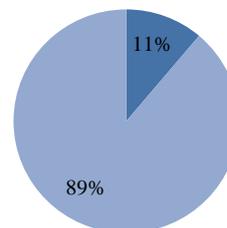


Figura 3. 32 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-STR no grupo de esqueletos da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.

Esqueleto Capela particular

Amplificação Y-STR

■ % Alelos amplificados ■ % Alelos emDrop out

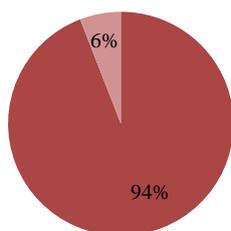


Figura 3. 33 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-STR no esqueleto da Capela particular - Grupo controlo C.

Esqueletos população Medieval

Amplificação Y-STR

■ % Alelos amplificados ■ % Alelos emDrop out

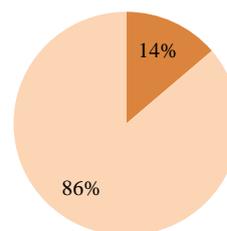


Figura 3. 34 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-STR no grupo de esqueleto da população Medieval em estudo.

No grupo controlo B, em 9 das 10 amostras (90%) amplificamos, pelo menos, 1 alelo, com uma média de 2 alelos (1,9 alelos) amplificados, o que se traduziu numa amplificação de 11% (Figuras 3.29 e 3.32). Por último, no grupo controlo C, foram amplificados 16 dos 17 alelos possíveis equivalendo a 94% de amplificação (Figuras 3.30 e 3.33).

3.5 Y-SNPs

Selecionaram-se apenas os indivíduos aos quais atribuímos o sexo masculino pelos estudos genéticos para a análise de SNPs no cromossoma Y, tal como na análise de marcadores Y-STR. Eram esperados melhores resultados que os obtidos a partir da amplificação de Y-STR, uma vez que a técnica de Y-SNPs amplifica fragmentos mais pequenos, aumentando a probabilidade de obter resultados em ADN degradado.

Selecionamos 9 marcadores SNPs do cromossoma Y. No entanto, em dois deles (P25 e 92R7) é possível obter mais do que um nucleótido para uma só posição, devido à duplicação do fragmento amplificado, como já foi referido anteriormente. Um exemplo dos resultados obtidos no estudo de Y-SNPs das amostras da população medieval é apresentado na figura 3.35:

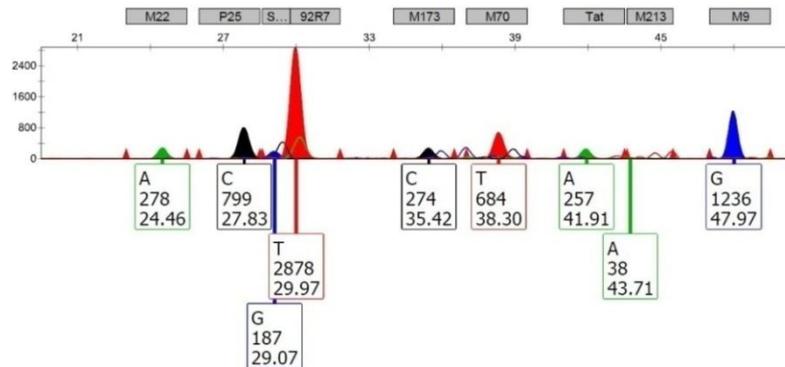


Figura 3. 35 - Resultado obtido para a análise de Y-SNPs numa amostra da população medieval (AGEN - 083).

Na população em estudo, verificou-se uma melhoria nos resultados em relação aos resultados obtidos com o estudo de Y-STRs. Todas as amostras amplificaram pelo menos em 1 marcador SNP, alcançando-se uma média de 6 marcadores (6,1 marcadores) amplificados, o que significa uma amplificação de 67% (Figuras 3.36 e 3.43). Em nenhuma das amostras se verificou a duplicação nos marcadores P25 e 92R7.

Esqueletos população Medieval

Amplificação de Y-SNP

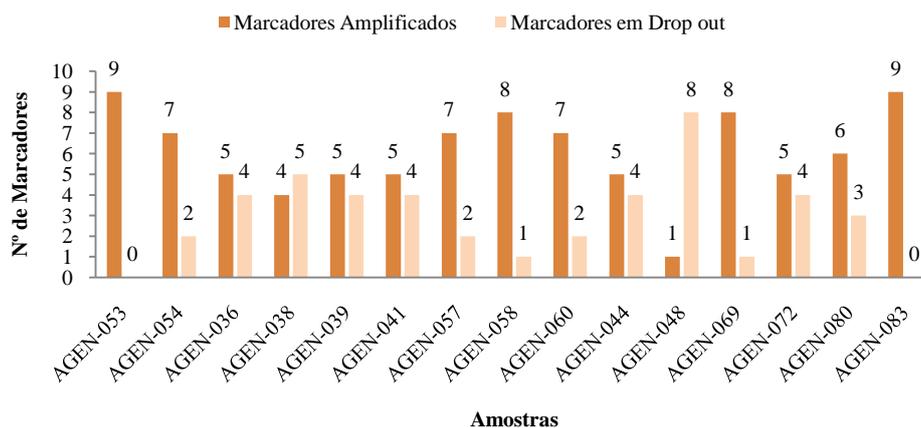


Figura 3. 36 - Resultados obtidos da amplificação de 9 marcadores Y-SNP em 15 amostras da população medieval.

No grupo controlo A, os resultados não corresponderam ao esperado uma vez que, embora em todas as amostras tenhamos amplificado pelo menos 7 dos marcadores, atingimos uma média de 9 marcadores (8,5 marcadores) amplificados, equivalendo a uma amplificação de 94% para o total das amostras e não os 100% (Figura 3.37 e 3.40).

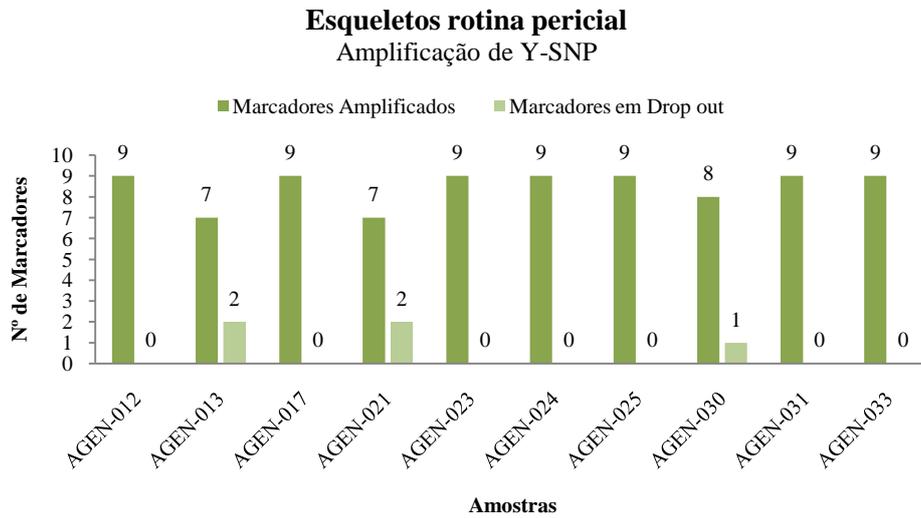


Figura 3. 37 - Resultados obtidos da amplificação de 9 marcadores Y-SNP, para cada uma das 10 amostras da rotina pericial - Grupo controlo A.

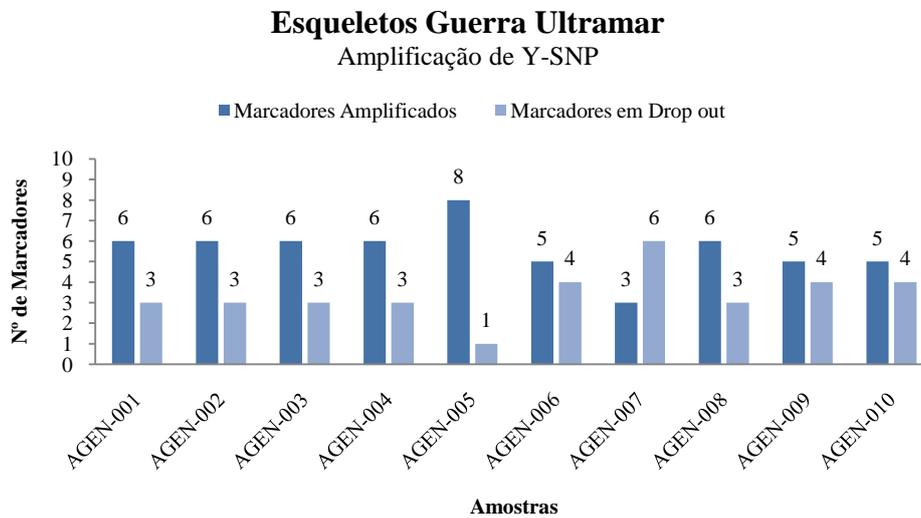


Figura 3. 38 - Resultados obtidos da amplificação de 9 marcadores Y-SNP, para cada uma das 10 amostras da Guerra Ultramar - Grupo controlo B.

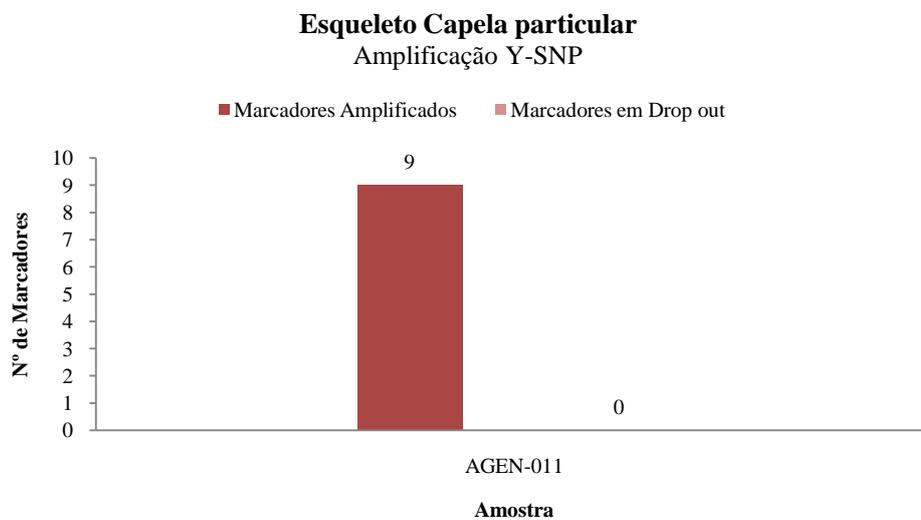


Figura 3. 39 - Resultados obtidos da amplificação de 9 marcadores Y-SNP, para a amostra da Capela particular - Grupo controlo C.

Esqueletos rotina pericial

Amplificação de Y-SNP

■ % Marcadores Amplificados ■ % Marcadores em Drop out

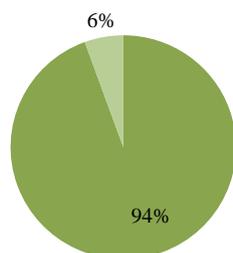


Figura 3. 40 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-SNP no grupo de esqueletos da rotina pericial - Grupo controlo A.

Esqueletos Guerra Ultramar

Amplificação de Y-SNP

■ % Marcadores Amplificados ■ % Marcadores em Drop out

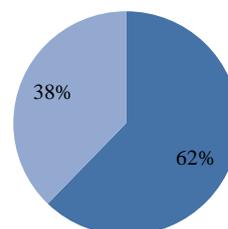


Figura 3. 41 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-SNP no grupo de esqueletos da Guerra do Ultramar - Grupo controlo B.

Esqueleto Capela particular

Amplificação Y-SNP

■ % Marcadores Amplificados ■ % Marcadores em Drop out

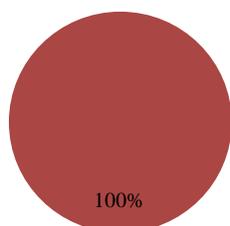


Figura 3. 42 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-SNP no esqueleto da Capela particular - Grupo controlo C.

Esqueletos população Medieval

Amplificação de Y-SNP

■ % Marcadores Amplificados ■ % Marcadores em Drop out

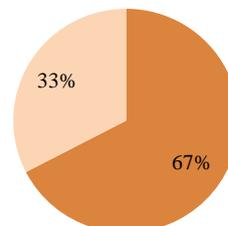


Figura 3. 43 - Percentagem de alelos amplificados com marcadores Y-SNP no grupo de esqueletos da população Medieval em estudo.

O facto do estudo de Y-SNPs ser bastante mais sensível, pode levar a que este seja mais suscetível à inibição da amplificação quando as concentrações de ADN são mais elevadas. A solução nestes casos pode passar por diluir as amostras e repetir o ensaio.

Já no grupo controlo B, os resultados superaram o esperado, pois em todas as amostras foram amplificados pelo menos 3 marcadores, com uma média de 6 marcadores (5,6 marcadores) amplificados, e 62% de amplificação (Fig. 3.38 e 3.41). No grupo controlo C, os resultados também superaram os obtidos com Y-STRs, sendo amplificados os 9 marcadores, equivalendo uma amplificação de 100% (Fig.3.39 e 3.42).

Os resultados obtidos no conjunto de marcadores estudados para cada amostra, constitui o haplótipo dessa mesma amostra e a partir deste, é possível incluir num haplogrupo cada indivíduo estudado. Contudo, é necessário que os resultados estejam completos, ou seja, que a amostra tenha resultados de amplificação para os 9 marcadores estudados. Por isso, apenas é possível determinar haplogrupos em duas das amostras do grupo de esqueletos da população medieval, em 7 do grupo controlo A, em nenhuma amostra do grupo controlo B e à amostra do grupo controlo C. A atribuição dos haplogrupos é feita

com recurso à árvore filogenética do cromossoma Y construída pelo *Y chromosome consortium* (Y Chromosome Consortium, 2002). Os resultados para os grupos geográficos das amostras em estudo e para as amostras dos grupos controlo encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1 - Resultados obtidos para a atribuição de haplogrupos das amostras em estudo e amostras dos grupos controlo

Grupos	Amostras	M22	P25	SRY1532	92R7	M173	M70	Tat	M213	M9	Haplogrupos
Pop. Medieval	AGEN - 053	A	C	G	A	C	A	T	T	G	C, D ou E
	AGEN - 083	A	C	G	A	C	A	T	T	G	C, D ou E
Grupo controlo A	AGEN - 012	A	C	G	A	C	A	T	C	G	R1
	AGEN - 017	A	C	G	A	C	A	T	C	G	R1
	AGEN - 023	A	C	G	A	C	A	T	C	G	R1
	AGEN - 024	A	C	G	A	C	A	T	C	G	R1
	AGEN - 025	A	C	G	A	C	A	T	T	G	C, D ou E
	AGEN - 031	A	C	G	A	C	A	T	C	C	F
	AGEN - 033	A	C	G	A	C	A	T	C	C	F
Grupo controlo C	AGEN - 011	A	C	G	A	C	A	T	C	G	R1

O haplogrupo R1 representa um ramo bastante recente da árvore filogenética do cromossoma Y, encontrando-se amplamente distribuído pela Europa (constituindo um dos haplogrupos mais comum) (Underhill *et al.*, 2010, 2014). Alguns estudos sugerem que o haplogrupo F tem origens na África Oriental de onde se dispersou até Eurásia através do Médio Oriente (Underhill *et al.*, 2001). O haplogrupo C estende-se desde a Austrália, Nova Guiné, sudeste da Ásia, Japão até Ásia Central (Underhill *et al.*, 2001). Já os haplogrupos D e E apresentam uma grande frequência em países africanos, uma frequência intermédia no Médio Oriente e a sul da Europa e ocorre ocasionalmente na Ásia Central, Paquistão e América (Underhill *et al.*, 2001).

Apesar de os haplogrupos terem especial relação com certas regiões geográficas, têm uma função meramente indicativa, ou seja, devemos considerar como uma estimativa e não como algo exclusivo de uma região (uma vez que é possível encontrar os mesmos haplogrupos em diversas áreas distintas). No entanto, o conjunto de marcadores utilizados no nosso estudo está, especialmente indicado para o estudo de populações europeias, o que poderá enviesar os resultados. A solução seria elaborar um estudo com mais e diferentes marcadores Y - SNPs que nos permitiriam identificar mais claramente a origem geográfica da linhagem paterna de cada indivíduo.

3.6 ADN mitocondrial

O facto de o ADN mitocondrial possuir mais cópias em cada célula que o ADN nuclear e de ser uma molécula com dupla cadeia circular torna-o menos suscetível à degradação e por isso mais promissor no que se refere a resultados em amostras com ADN degradado (Foran, 2006; Butler, 2011; Parson *et al.*, 2014). Por vezes, a amplificação do ADN mitocondrial é o último recurso para a análise de amostras com ADN degradado, designadamente quando não é possível a análise de STRs (Foran, 2006; Parson e Bandelt, 2007).

Neste estudo da região de controlo, que inclui as regiões hipervariáveis HV1 e HV2, foram seguidas algumas recomendações de Parson e colaboradores (Parson *et al.*, 2014) nomeadamente:

- Utilizamos controlos positivos, negativos e brancos da amplificação;
- Apenas consideramos a sequência de ADN mitocondrial consenso entre o primer *forward* e o *reverse* (no caso de não ser possível, consideramos dois primers *forward* ou dois primers *reverse*, desde que a partir de amplificações diferentes com a mesma amostra);
- A sequência de consenso foi confirmada por uma segunda amplificação;
- As sequências foram alinhadas e comparadas com a sequência de referência de Cambridge revista (rCRS);
- As alterações das sequências em comparação com a rCRS foram descritas utilizando as regras de nomenclatura da IUPAC.

Em teoria, os nossos resultados do estudo do ADN mitocondrial deveriam ser melhores que os obtidos com o estudo de marcadores STR, Mini-STR, InDel ou SNP. No entanto, não foi isso que se observou. Apenas em 8 das 50 amostras (16%) da população medieval em estudo obtivemos resultados de amplificação para, pelo menos, 1 das regiões estudadas do ADN mitocondrial. Das 8 amostras referidas, em 7 amplificamos a região HV1 e apenas em 5 amplificamos a região HV2. Os resultados dos haplótipos e haplogrupos para as amostras da população medieval e grupos controlo são apresentados nas tabelas 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 respetivamente.

Tabela 3. 2 - Haplótipos e haplogrupos das amostras da população medieval.

Amostras	HV1	HV2	Haplogrupo	Origem Geográfica
AGEN - 035	16126C; 16260T; 16294T; 16296T	263G; 315.1C	T2j	Oeste da Eurásia
AGEN - 041	16111T; 16223T; 16228Y ; 16278T; 16294T; 16309G; 16341Y	*	L2a1	África
AGEN - 043	16223T; 16304Y	185A; 263G; 315.1C	R0	Oeste da Eurásia
AGEN - 052	16126C; 16260T; 16294T; 16296T	73G; 263G; 309.1C; 315.1C	T2j	Oeste da Eurásia
AGEN - 054	*	73G; 189G; 194T; 195C; 204C; 207A; 263G; 309.1C; 315.1C	W	Oeste da Eurásia
AGEN - 057	16085T; 16111Y ; 16129R ; 16223T; 16278Y ; 16294Y ; 16309G	*	L2a1	África
AGEN - 059	16126C; 16260T; 16294T; 16296T	*	T2	Oeste da Eurásia
AGEN - 064	**	263G; 315.1C	R0	Oeste da Eurásia

* - Apenas foi possível a amplificação de HV1/ HV2 ; ** - Não tem qualquer alteração em relação à rCRS.

Tabela 3. 3 - Haplótipos e haplogrupos das amostras do grupo controlo A - Esqueletos da rotina pericial.

Amostras	HV1	HV2	Haplogrupo	Origem Geográfica
AGEN - 012	**	263G; 309.1C; 315.1C	R0	Oeste da Eurásia
AGEN - 013	16126C; 16294T; 16304C	73G; 151T; 189G; 215G; 263G; 309.1C; 309.2C	T2b	Oeste da Eurásia
AGEN - 017	16235G; 16291T	93G; 263G; 309.1C	R0	Oeste da Eurásia
AGEN - 021	16069T; 16126C; 16241G	73G; 150T; 152C; 189G; 195C; 263G; 295T; 315.1C	J2a	Oeste da Eurásia
AGEN - 023	16126C; 16163G; 16186T; 16189C; 16294T	73G; 152C; 195C; 263G; 309.1C; 315.1C	T1a1'3	Oeste da Eurásia
AGEN - 024	16069T; 16126C; 16193T; 16278T	73G; 150T; 152C; 263G; 295T; 309.1C; 315.1C	J2b1a	Oeste da Eurásia
AGEN - 031	*	73G; 152C; 182T; 185T; 195C; 198T; 247A; 263G; 309.1C; 315.1C	L1b	África
AGEN - 033	16223T	73G; 199C; 204C; 250C; 263G; 291.1A; 309.1C; 315.1C	N1a1'2	Oeste da Eurásia

* - Apenas foi possível a amplificação de HV2 ; ** - Não tem qualquer alteração em relação à rCRS.

Tabela 3. 4 - Haplótipos e haplogrupos das amostras do grupo controlo B - Esqueletos da Guerra do Ultramar.

Amostras	HV1	HV2	Haplogrupo	Origem Geográfica
AGEN - 004	16126C; 16163G; 16186T; 16189C; 16294T	73G; 152C; 195C; 263G; 309.1C; 315.1C	T1a1'3	Oeste da Eurásia
AGEN - 006	*	93G; 263G; 309.1C; 315.1C	R0	Oeste da Eurásia
AGEN - 008	16356C	73G; 195C; 263G; 310Y ; 315.1C	U4a2	Oeste da Eurásia

* - Apenas foi possível a amplificação de HV2.

Tabela 3. 5 - Haplótipo e haplogrupo do grupo controlo C - Esqueleto da Capela particular

Amostras	HV1	HV2	Haplogrupo	Origem Geográfica
AGEN - 011	16069T; 16126C; 16193T; 16278T	73G; 150T; 152C; 263G; 295T; 309.1C; 315.1C	J2b1a	Oeste da Eurásia

Tabela 3. 6 - Haplótipo e haplogrupo do grupo controlo D - operador.

Amostras	HV1	HV2	Haplogrupo	Origem Geográfica
Joana Lopes	16126C; 16260T; 16294T; 16296T	73G; 263G; 309.1C; 315.1C	T2j	Oeste da Eurásia

As amostras AGEN - 035, 052, 054, 059 e 64 revelaram linhagens maternas com origem a Oeste da Eurásia, sendo que para AGEN - 054 o resultado se baseou apenas em HV2 e AGEN - 059 se baseou apenas em HV1. O facto de não ter sido possível a amplificação de HV1 ou HV2 poderá ser explicado por variadas razões, entre elas, elevados níveis de degradação do ADN. Em relação às amostras AGEN - 041, 043 e 057, como apresentam heteroplasmias de posição, os resultados serão discutidos mais adiante.

Relativamente ao grupo controlo A (Tabela 3.3), em 8 das 10 amostras (80%) amplificamos ADN mitocondrial. Todas elas amplificaram para HV2, apenas uma (AGEN - 031) não amplificou para HV1. Para a amostra AGEN - 031, apenas através da região HV2, verificamos pertencer a uma linhagem materna com origem em África. Todas as outras amostras demonstraram origens na região Oeste da Eurásia.

No grupo controlo B (Tabela 3.4) apenas foi possível amplificar ADN mitocondrial em 3 das 10 amostras (30%) em estudo. Apenas AGEN - 006 não amplificou para HV1 e todas as amostras exibiram haplótipos associados a origem materna na região Oeste da Eurásia. A heteroplasmia registada na posição 310 na amostra AGEN - 008 será discutida mais adiante.

Na amostra do grupo controlo C (Tabela 3.5) amplificamos tanto para HV1 como para HV2 e concluímos pertencer a uma linhagem materna com origem na região Oeste da Eurásia.

Por fim, na tabela 3.6 está registado o haplótipo de HV1 e HV2 e o haplogrupo do operador (grupo controlo D) que realizou o trabalho laboratorial deste estudo, sendo possível concluir que pertence a uma linhagem materna com origem na região a Oeste da Eurásia.

A análise de HV1 e HV2, é delimitada entre as posições 16024 e 16365 para HV1 e as posições 73 e 340 para HV2 (Butler, 2011; Parson *et al.*, 2014). Contudo, não foi possível obter a confirmação de toda a extensão das duas regiões com ambos os primers para todas as amostras. Reduziu-se, por isso, a extensão da análise para algumas amostras. Na Tabela 3.7 estão representadas as regiões em análise para cada amostra, bem como a presença de heteroplasmias de comprimento na região de poli-C - região com variado número de Citosinas que irá ser discutida mais adiante.

Tal como aconteceu para as amostras AGEN - 054 e 059, também para a amostra AGEN - 031, do grupo controlo A, e AGEN - 006 ,do grupo controlo B, não foi possível a análise para ambas as regiões hipervariáveis. Desta forma apenas se considerou o haplótipo de HV1 ou HV2 para a atribuição de haplogrupo, pelo que, com a informação limitada, o haplogrupo pode não ser o mais correto (Afonso, 2010).

Tabela 3. 7 - Extensão da análise para HV1 e HV2 de ADN mitocondrial para as amostras em estudo e grupos controlo e registo da presença de heteroplasmias de comprimento (H.C) na região de poli-C para as amostras em estudo da população medieval e grupos controlo (G.C.A; G.C.B; G.C.C e G.C.D).

Grupo	Amostra	HV1	HV2	H.C
Pop. Medieval	AGEN - 035	16024 - 16365	73 - 340	
	AGEN - 041	16065 - 16365	-----	
	AGEN - 043	16047 - 16365	73 - 340	
	AGEN - 052	16024 - 16365	73 - 340	
	AGEN - 054	-----	73 - 340	
	AGEN - 057	16053 - 16325	-----	
	AGEN - 059	16105 - 16318	-----	
	AGEN - 064	16098 - 16365	73 - 340	
G. C. A	AGEN - 012	16043 - 16354	93 - 340	HV2
	AGEN - 013	16024 - 16305	73 - 310	HV2
	AGEN - 017	16024 - 16365	73 - 310	HV2
	AGEN - 021	16024 - 16365	73 - 340	
	AGEN - 023	16024 - 16365	73 - 340	HV2
	AGEN - 024	16024 - 16365	73 - 340	
	AGEN - 031	-----	73 - 340	
	AGEN - 033	16024 - 16365	73 - 340	HV2
G. C. B	AGEN - 004	16024 - 16362	73 - 340	HV2
	AGEN - 006	-----	73 - 325	
	AGEN - 008	16024 - 16365	73 - 315	HV2
G.C.C	AGEN - 011	16024 - 16365	73-340	
G.C.D	Joana Lopes	16024-16365	73-340	

Por exemplo, se apenas considerarmos a região HV2 nas amostras AGEN - 035 e 64, ambas integrarão o mesmo haplogrupo. Já no caso de apenas considerarmos a região HV1 das amostras AGEN - 035 e 052 constata-se que ambas apresentam haplótipos iguais. Ao analisar HV2, verifica-se que apresentam 2 diferenças entre as suas sequências. Diferenças essas, que, apesar de as integrar a ambas no mesmo haplogrupo, pode apontar para o facto de que pertençam a diferentes linhagens maternas.

Na Tabela 3.8 estão representadas as frequências estimadas para os haplótipos obtidos na população europeia (e africana no caso da amostra AGEN - 031) com recurso à base de dados EMPOP. As amostras que não estão referidas na tabela correspondem a haplótipos que não se encontram presentes na base de dados EMPOP.

Tabela 3. 8 - Frequência estimada para cada amostra na população europeia (africana para o caso de AGEN - 031) e o número de haplótipos idênticos presentes na base de dados EMPOP.

Amostras	Nº de haplótipos	Frequência estimada
AGEN - 052	2	$3,418 \times 10^{-4}$
AGEN - 054	57	$6,609 \times 10^{-3}$
AGEN - 059	2	$3,092 \times 10^{-4}$
AGEN - 064	683	$7,794 \times 10^{-2}$
AGEN - 012	683	$7,794 \times 10^{-2}$
AGEN - 023	83	$9,572 \times 10^{-3}$
AGEN - 024	17	$2,051 \times 10^{-3}$
AGEN - 031	5	$2,857 \times 10^{-3}$
AGEN - 033	1	$2,279 \times 10^{-4}$
AGEN - 004	83	$9,572 \times 10^{-3}$
AGEN - 006	118	$1,356 \times 10^{-2}$
AGEN - 011	17	$2,051 \times 10^{-3}$
Joana Lopes	2	$3,418 \times 10^{-4}$

As amostras AGEN - 023 do grupo controlo A e AGEN - 004 do grupo controlo B, apresentam o mesmo haplótipo para HV1 e HV2, no entanto sendo amostras extraídas, amplificadas e sequenciadas em dias diferentes (com um intervalo temporal de várias semanas), em princípio nada aponta para a possibilidade de contaminações. Além do mais, o haplótipo em comum a estas duas amostras apresenta uma frequência elevada para a população europeia (ver Tabela 3.8). O mesmo acontece entre as amostras AGEN - 024 do grupo controlo A e AGEN - 011 do grupo controlo C, que foram extraídas, amplificadas e sequenciadas com grande intervalo temporal e ambas apresentam uma

frequência bastante comum na população europeia. Para estes dois últimos casos, podemos, também, em princípio, excluir a possibilidade de se tratar de contaminação, uma vez que, como já referido se tratam de haplótipos comuns na população europeia.

3.6.1 Heteroplasmias de posição

A análise de ADN mitocondrial é naturalmente, suscetível a contaminações. Uma vez que o nosso estudo envolve ADN antigo, maior a possibilidade de contaminações com ADN exógeno que, em caso de mistura, será amplificado preferencialmente (Hernandez *et al.*, 2003; Butler, 2011; Parson *et al.*, 2014).

Para as amostras AGEN - 041, 043 e 057, da população medieval, foram registadas heteroplasmias de posição, representadas de acordo com as recomendações da IUPAC por Y (em que T e C estão presentes) e R (em que A e G estão presentes). Este fenómeno é bastante raro no entanto, já foram reportadas no máximo duas heteroplasmias no mesmo indivíduo (Butler, 2011; Parson *et al.*, 2014).

No caso da amostra AGEN - 057, foram observadas mais do que duas heteroplasmias, o que nos deve levar a considerar a possibilidade de que esta amostra apresenta uma mistura de mais do que um contribuidor (Butler, 2011). Esta mistura poderá resultar de uma contaminação com ADN exógeno pertencente a qualquer pessoa que tenha estado em contacto com os ossos (desde arqueólogos e antropólogos responsáveis pela escavação, estudantes responsáveis pelo estudo antropológico e estudo genético ou mesmo contaminação ocorridas na fase de análise em laboratório).

Em 2000, Grybowski reportou o caso de indivíduos nos quais foram observadas 6 heteroplasmias no seu estudo de ADN mitocondrial (Grzybowski, 2000; Butler, 2011). As heteroplasmias foram registadas na região HV1 e eram predominantemente transições de T/C, embora também se verificassem transições de A/G (Grzybowski, 2000). Este trabalho foi criticado por eventuais falhas no procedimento experimental e na interpretação dos resultados (Budowle *et al.*, 2002; Butler, 2011). Entre os erros apontados ao trabalho de Grzybowski, estão as concentrações iniciais das amostras em estudo, com magnitudes muito acima do recomendado (as amostras teriam entre 20 a

80ng/ μ L de concentração) e o facto de ter sido realizada nested PCR, aumentando para cerca do dobro o número de ciclos de amplificação (62 ciclos) (Budowle, *et al.*, 2002). Uma re-análise do trabalho de Grzybowski, revelou que a sequenciação do ADN mitocondrial sem recurso à nested PCR diminuiu a ocorrência de heteroplasmias (sendo assim, as heteroplasmias reportadas com a amplificação por nested PCR poderão ser interpretados como artefactos da amplificação) (Grzybowski *et al.*, 2003).

De facto, uma vez que as amostras do nosso estudo foram sujeitas a uma amplificação por nested PCR com o intuito de aumentar a probabilidade de obtenção de resultados em amostras com ADN degradado, à semelhança do que aconteceu no trabalho de Grzybowski e colaboradores, esta mesma técnica pode também, eventualmente ser a causa de algumas heteroplasmias registadas.

Existem posições em que a probabilidade de ocorrerem heteroplasmias é maior que noutras, sendo designadas por "*hotspots*" ou zonas com taxa de mutação elevada (Butler, 2011). A posição 16129 é registada como um *hotspot* (presente na amostra AGEN - 057), contudo registamos outras heteroplasmias que, não sendo habitualmente referidas como *hotspots*, já foram identificadas como sendo heteroplasmicas (Budowle, *et al.*, 2002; Grzybowski *et al.*, 2003; Butler, 2011). As posições 16278, 16294 e 16111 da amostra AGEN - 057 estão entre elas (Budowle, *et al.*, 2002; Grzybowski *et al.*, 2003; Butler, 2011).

De forma a confirmar se existem diferentes contribuidores nas amostras que apresentam heteroplasmias, ou se se tratam de artefactos criados pelo nested PCR, procedeu-se à desconstrução dos haplogrupos para o caso de todas as combinações possíveis de haplótipos diferentes construídos a partir das amostras AGEN - 041, 043 e 057. Os resultados estão resumidos nas tabelas 3.9, 3.10 e 3.11.

Para o caso da amostra AGEN - 043 (Tabela 3.9), como só apresenta uma heteroplasmia, há dois haplótipos possíveis. No caso da posição 16304 apresentar um T, o haplótipo é integrado no haplogrupo R0; no caso de apresentar um C, já poderá ser incluído no haplogrupo H5. Contudo, o haplogrupo H5 é um ramo dentro do haplogrupo R0, ou seja, uma Citosina na posição 16304 atribui um maior poder de discriminação na

árvore filogenética de haplogrupos de ADN mitocondrial, não representando assim informação contraditória.

Tabela 3. 9 - Todos os haplótipos e haplogrupos possíveis construídos a partir da heteoplasmia na posição 16304 da amostra AGEN - 043.

Amostra	HV1			HV2			Haplogrupo	Origem Geográfica
AGEN-043	16223T	<u>16304Y</u>	185A	263G	315.1C		R0	Oeste da Eurásia
AGEN-043	16223T	16304T	185A	263G	315.1C		R0	Oeste da Eurásia
AGEN-043	16223T	16304C	185A	263G	315.1C		H5	Oeste da Eurásia

No caso da amostra AGEN - 041 (Tabela 3.10) esta possui duas heteroplasmias, resultando em 4 possíveis combinações de nucleótidos, não causando alteração na obtenção do haplogrupo (apenas é considerado polimorfismo a presença de uma Timina na posição 16228 e uma Citosina na posição 16341). Apenas foi possível analisar HV1, mas as alterações em relação à sequência de referência na posição **16294T** e **16309G** são as principais responsáveis pela introdução desta amostra no haplogrupo L2a1 (haplogrupo de origem africana), por isso as posições em que se verificou heteroplasmia não tiveram grande influência e assim, todas as possíveis combinações integram a amostra no mesmo haplogrupo.

Para amostra AGEN - 057 (Tabela 3.11) que possui 4 heteroplasmias, já resulta em 16 possíveis combinações de nucleótidos. Apenas é considerado polimorfismo quando a Timina está presente na posição 16111; quando a Adenina está presente na posição 16129, quando a Timina está presente na posição 16278 e a Timina na posição 16294. Só foi possível a análise de HV1, mas ainda assim algumas das combinações possuem alterações responsáveis pela atribuição de um haplogrupo africano. Apenas para as combinações que não possuem o polimorfismo na posição 16129 (presença de uma Guanina) se atribui haplogrupo, caso contrário, mesmo que tenham outros polimorfismos que permitam a inclusão num haplogrupo, o polimorfismo na posição 16129 será sempre uma incongruência. Desta forma, apenas as combinações que possuem polimorfismo na posição 16294 (presença de uma Timina) são incluídas no haplogrupo L2a1, uma vez que, como já foi referido, os polimorfismos 16294T e 16309G são essenciais para a atribuição do haplogrupo L2a1.

Tabela 3. 10 - Todos os haplótipos e haplogrupos possíveis construídos a partir das heteoplasmas na posição 16228 e 16341 da amostra AGEN - 041.

Amostra	HVI					Haplogrupo	Origem Geográfica
	16111T	16223T	16228Y	16278T	16294T		
AGEN-041	16111T	16223T	16228Y	16278T	16294T	L2a1	África
AGEN-041	16111T	16223T	16228T	16278T	16294T	L2a1	África
AGEN-041	16111T	16223T	16228T	16278T	16294T	L2a1	África
AGEN-041	16111T	16223T	16228C	16278T	16294T	L2a1	África
AGEN-041	16111T	16223T	16228C	16278T	16294T	L2a1	África

Tabela 3. 11 - Todos os haplótipos e haplogrupos possíveis construídos a partir das heteoplasmas na posição 16111, 16129, 16278 e 16294 da amostra AGEN - 057.

Amostra	HVI					Haplogrupo	Origem Geográfica
	16085T	16111Y	16129R	16223T	16278Y		
AGEN-057	16085T	16111Y	16129R	16223T	16278Y	?	
AGEN-057	16085T	16111T	16129A	16223T	16278T	?	
AGEN-057	16085T	16111T	16129A	16223T	16278T	?	
AGEN-057	16085T	16111T	16129A	16223T	16278C	?	
AGEN-057	16085T	16111T	16129A	16223T	16278C	?	
AGEN-057	16085T	16111T	16129G	16223T	16278T	L2a1	África
AGEN-057	16085T	16111C	16129A	16223T	16278T	?	
AGEN-057	16085T	16111C	16129G	16223T	16278T	L2a1	África
AGEN-057	16085T	16111T	16129G	16223T	16278T	?	
AGEN-057	16085T	16111C	16129A	16223T	16278T	?	
AGEN-057	16085T	16111C	16129G	16223T	16278T	?	
AGEN-057	16085T	16111T	16129G	16223T	16278C	L2a1	África
AGEN-057	16085T	16111C	16129A	16223T	16278C	?	
AGEN-057	16085T	16111C	16129G	16223T	16278C	L2a1	África
AGEN-057	16085T	16111T	16129G	16223T	16278C	?	
AGEN-057	16085T	16111C	16129A	16223T	16278C	?	
AGEN-057	16085T	16111C	16129G	16223T	16278C	?	

? - Não é possível a atribuição de haplogrupo sem informação adicional

No caso das combinações que não têm o polimorfismo 16294T, o polimorfismo presente em todas as combinações 16309G não é suficiente para incluir as amostras nos haplogrupos L, uma vez que, apesar de ter a Guanina na posição 16129, este nucleótido significa não ter alteração em relação à sequência de referência, e como não tem qualquer outro polimorfismo relevante não é possível atribuir um haplogrupo com os polimorfismos presentes. Sendo assim, para estas e todas as outras combinações restantes não foi possível atribuir qualquer haplogrupo uma vez que seria necessário informação adicional.

Como foi possível verificar, a combinação de todos os haplótipos possíveis para atribuir um haplogrupo, origina o mesmo haplogrupo ou um haplogrupo mais específico, não alterando a relação à mesma área geográfica. Estes resultados sugerem que não houve contaminação com ADN exógeno e que as heteroplasmias poderão ser interpretadas como eventuais artefactos causados pelo elevado número de ciclos de amplificação.

Sendo assim, para a amostra AGEN - 043 foi possível verificar que faz parte de uma linhagem materna com origens na região Oeste da Eurásia e com alguma surpresa, constatamos que as amostras AGEN -041 e 057 pertencem a uma linhagem materna com origem em África. Excluímos a possibilidade de contaminação por parte do operador, uma vez que se trata de um indivíduo com linhagem materna de origem europeia, bem como a contaminação pela amostra AGEN - 031 (de haplogrupo africano) pois apresentam haplótipos diferentes.

3.6.2 Heteroplasmias de comprimento

Enquanto as heteroplasmias de posição são eventos raros, as heteroplasmias de comprimento são bastante frequentes (Parson *et al.*, 2014). Na população da região Oeste da Eurásia, a região HVI apresenta uma percentagem de 14% de heteroplasmias de comprimento, e em HV2 atinge os 74% (Parson *et al.*, 2014). As heteroplasmias de comprimento são causadas por inserções ou deleções, preferencialmente na região de poli-C, em algumas das moléculas de ADN mitocondrial, alterando o tamanho da sequência. Podem ocorrer em HV1 entre as posições 16184 e 16193 ou em HV2, entre as posições 303 e 315 - (Butler, 2011).

Na tabela 3.7 estão registadas as amostras onde foi possível verificar heteroplasmias de comprimento, todas elas na região HV2, equivalendo a 35% para o total de todas as amostras de tecido ósseo que demonstraram resultados para ADN mitocondrial neste estudo, incluindo grupos de controlo A, B e C. O grupo de esqueletos da população medieval não apresentou amostras com heteroplasmia de comprimento, o grupo controlo A apresentou 63%, o grupo controlo B apresentou 67% e no grupo controlo C não verificamos existência de heteroplasmias de comprimento.

Em nenhuma das amostras a heteroplasmia de comprimento provocou grandes alterações na região subsequente pois a zona de poli-C é muito perto da região onde termina a análise (posição 340) e os últimos nucleótidos foram detetados com o *primer reverse*. No entanto, na amostra AGEN - 008 do grupo controlo B, foi detetado uma Citosina e uma Timina (Y) na posição **310** e é reportada uma heteroplasmia de comprimento em HV2. Esta aparente heteroplasmia de posição pode ser justificada por um variado número de eventos que, no entanto, não foi possível confirmarmos. Nesta posição pode ter ocorrido uma inserção de uma Citosina em algumas das moléculas de ADN mitocondrial e noutras não; pode ter ocorrido uma deleção de uma Timina em algumas moléculas e noutras não, pode ter ocorrido uma substituição de uma Timina por uma Citosina em algumas das moléculas e noutras não, ou até uma combinação entre inserções e deleções. De facto, é evidente uma heteroplasmia de comprimento a jusante da posição 310, sendo possível inferir que esta é uma posição provável para a origem de heteroplasmias.

A posição 310 está incluída na região poli-C de HV2 que, como já foi referido, é a uma das regiões preferenciais para a ocorrência de heteroplasmias de comprimento. Embora raros, já foram reportados casos de uma substituição de Timina por Citosina na posição 310, criando uma região mononucleotídica de 13 citosinas (7 citosinas a montante e 5 citosinas a jusante da posição 310) (Parson *et al.*, 2014) . Estas regiões causam normalmente problemas à polimerase aquando da sintetização da cadeia complementar do ADN mitocondrial, podendo ser interpretado como heteroplasmia de comprimento (Butler, 2011). A heteroplasmia de comprimento pode, então, ser efetivamente a real sequência de ADN da amostra, ou pode ser gerada a partir da reação de sequenciação (Butler, 2011). As heteroplasmias de comprimento, maioritariamente, resultam de

transições de Timina para Citosina nas posições 16189 na região HVI, e mais raramente, na posição 310 na região HV2, ambas ladeadas por zonas de poli-C (Butler, 2011).

Finalmente, tendo em conta o elevado número de cópias de ADN mitocondrial em cada célula, os nossos resultados ficaram aquém do que era expectável. Bastante visível no grupo controlo A que, para a grande maioria dos outros métodos permitiu obter 100% de amplificação e na sequenciação do ADN mitocondrial apenas 80% de amplificação.

A própria estrutura do ADN mitocondrial torna-o menos suscetível a degradações em comparação com o ADN nuclear. No entanto, é necessário, também, considerar que o produto amplificado tem cerca de 600 pb, numa amplificação inicial, e cerca de 400 pb na reação de nested PCR (superior aos produtos amplificados com outros métodos), podendo provocar problemas na amplificação (Eichmann e Parson, 2008). Alguns estudos têm revelado soluções para este problema. Sugerem uma subdivisão das amplificações das regiões hipervariáveis, ou seja, em vez de amplificar as regiões HV1 e HV2 em bloco, são realizadas várias amplificações para HV1 e HV2 com primers mais próximos entre si e após a sequenciação os resultados são sobrepostos (Hernandez *et al.*, 2003; Eichmann e Parson, 2008; Berger e Parson, 2009; Butler, 2011). Desta forma é possível maximizar a amplificação de ADN mitocondrial, aumentando significativamente o sucesso da sequenciação de amostras muito degradadas (Eichmann e Parson, 2008). No entanto, esta estratégia também traz desvantagens, uma vez que os procedimentos envolvem entre 6 a 20 reações por amostra, o que se traduz em mais trabalho laboratorial, aumentando a probabilidade de contaminações e maior consumo de reagentes (Berger e Parson, 2009).

3.7 Ancestralidade

Através dos estudos antropológicos, é possível inferir sobre a ancestralidade dos indivíduos, a partir de características do crânio associadas a 3 grandes áreas geográficas; Europa, África e Ásia. O estudo antropológico realizado anteriormente nas mesmas amostras por nós estudadas, revelaram características europeias (Couto, 2008; Currais, 2008; Morgado, 2008; Silvério, 2008; Cunha, 2011; Leandro, 2011; Santos, 2012). No entanto, como o crânio é a única zona informativa em relação à ancestralidade, por vezes este pode encontrar-se fragmentado ou ausente e ter induzido os observadores em erro.

Neste estudo, pretende-se averiguar a ancestralidade dos indivíduos a partir de métodos de análise genética. A análise de marcadores InDel, Y-SNPs, ADN mitocondrial e mesmo STRs pode permitir obter uma indicação da origem geográfica de cada indivíduo. Como se pôde concluir, no estudo dos marcadores InDel obtivemos melhores resultados que no estudo de marcadores STR, no entanto seria necessário obter o perfil completo das amostras para concluir quanto à sua ancestralidade.

A partir de marcadores Y-SNPs, é possível apontar uma possível origem da linhagem paterna. A análise do ADN mitocondrial permite, igualmente apontar uma linhagem materna (ver capítulos 3.5 e 3.6).

Os resultados permitiram concluir que a linhagem paterna dos indivíduos a quem pertencem as amostras AGEN - 053 e 083 os distribuiu desde África, Médio Oriente, Austrália, Ásia e sul da Europa (seria necessário uma análise mais detalhada para obter resultados mais conclusivos). Já as linhagens maternas dos indivíduos a quem pertencem as amostras AGEN - 035, 043, 052, 054, 059 e 064 apontam para origens na região Oeste da Eurásia. Apenas as amostras AGEN - 041 e 057 pertencem a indivíduos com linhagens maternas com origem em África.

Existe, ainda, uma ferramenta online capaz de inferir sobre a ancestralidade de um indivíduo a partir de 17 marcadores STR (CSF1PO; D2S1338; D3S1358; D5S818; D7S820; D8S1179; D13S317; D16S539; D18S51; D19S433; D21S11; FGA; Penta-D; Penta E; TH01; TPOX e VWA) - *PopAffiliator* - (Pereira *et al.*, 2011). O *PopAffiliator* é um programa gratuito, disponível online, capaz de calcular as probabilidades de um perfil de STRs pertencer a 3 grandes grupos populacionais (Eurásia, Ásia, e África sub-

sariana) com uma precisão de cerca de 86% (Pereira *et al.*, 2011). O programa foi construído com base nos genótipos de aproximadamente 15 000 indivíduos pertencentes às mais variadas regiões geográficas (Pereira *et al.*, 2011). Contudo, a ancestralidade calculada pelo *PopAffiliator* indica apenas uma probabilidade e deve ser interpretada como tal (Pereira *et al.*, 2011).

Os kits utilizados para amplificar marcadores STR no nosso estudo incluem 13 dos 17 marcadores do *PopAffiliator*, (os kits utilizados no nosso estudo não incluem os marcadores D5S818; Penta-D; Penta E e TPOX) no entanto, é possível determinar a ancestralidade com apenas 10 destes marcadores. Apenas foi possível obter resultados com o *PopAffiliator* para uma das 50 amostras da população medieval, uma vez que na maioria das amostras obtivemos resultados bastante fracos na amplificação de STRs. Por isso, não é possível inferir sobre a ancestralidade da população medieval mas apenas caracterizar um dos indivíduos. Na Figura 3.44 está representado o resultado do cálculo da ancestralidade para a amostra AGEN-054 e, claramente, demonstra uma forte probabilidade de ter origens na Eurásia (99%).

Esqueleto população Medieval Ancestralidade segundo STR's

■ Eurásia ■ África sub-sariana ■ Ásia

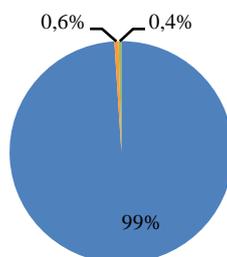


Figura 3. 44 - Resultados obtidos para o cálculo da ancestralidade a partir de marcadores STR com o programa *PopAffiliator* para uma amostra da população medieval (AGEN-054).

Na amostra AGEN - 054 obtivemos, assim, resultados coincidentes para a origem geográfica a partir de dois métodos - o *PopAffiliator* e ADN mitocondrial -. Ambos apontam para uma origem na Eurásia, tal como indicavam os estudos da ancestralidade através de métodos antropológicos. Para todas as outras amostras, não foi possível confirmar a ancestralidade com os métodos genéticos, uma vez que a obtenção de haplogrupos para Y-SNP, ADN mitocondrial e o programa *PopAffiliator* apresentaram resultados para diferentes amostras.

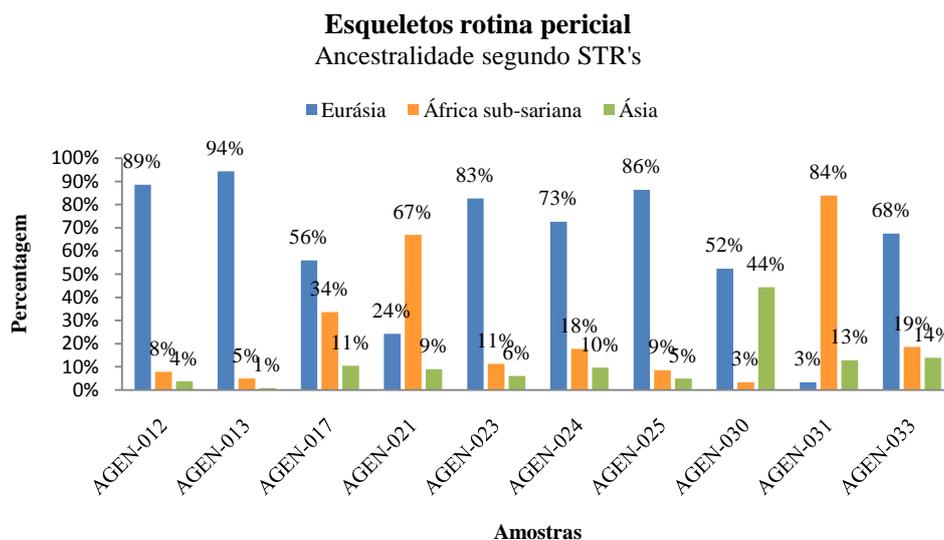


Figura 3. 45 - Resultados obtidos para o cálculo da ancestralidade a partir de marcadores STR com o programa *PopAffiliator* para os esqueletos da rotina pericial - Grupo controlo A.

Esqueleto Capela particular
Ancestralidade segundo STR's

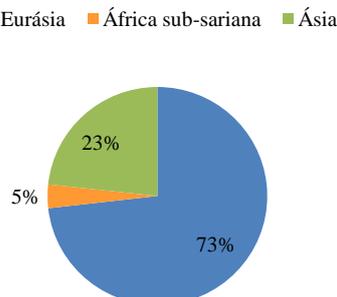


Figura 3. 46 - Resultados obtidos para o cálculo da ancestralidade a partir de marcadores STR com o programa *PopAffiliator* para o esqueleto da Capela particular - Grupo controlo C.

O mesmo programa foi utilizado nos grupos controlo. No grupo controlo A, foi possível obter resultados para todas as amostras e os resultados estão representados na Figura 3.45 (todas as amostras têm maior percentagem para a Eurásia à exceção de duas que indicam maior probabilidade de origens em África sub-sariana - AGEN - 021 e 031). Para a amostra AGEN - 031 já foi confirmada a linhagem materna com origem em África, bem como a linhagem paterna poderá ter surgido em países Africanos. Já para a amostra AGEN - 021, pressupõe-se uma maior probabilidade de ter origens em África sub-sariana (67%) a partir dos STRs, no entanto a linhagem materna aponta para uma origem a Oeste da Eurásia. Estes resultados poderão sugerir tratar-se de um caso de

miscigenação, contudo não foi possível confirmar a linhagem paterna através dos Y-SNP.

Uma vez que as amostras do grupo controlo B obtiveram resultados bastante fracos para a amplificação de marcadores STR, para nenhuma delas foi possível calcular a ancestralidade a partir deste método. Já para o esqueleto da capela particular o programa calculou 73% de origem na Eurásia, também esta confirmada pela análise de ADN mitocondrial e Y-SNP's que indica uma linhagem materna e paterna europeia (Figura 3.46).

3.8 Amplificação total

Todos os métodos aqui desenvolvidos tiveram o intuito de obter o máximo resultado a partir de amostras com ADN degradado. Diferem em relação às regiões do genoma amplificadas (ADN nuclear vs ADN mitocondrial), em relação ao tipo de polimorfismos (bialélicos vs múltiplos alelos) e em relação ao tamanho do produto amplificado (desde 55pb até cerca de 320pb).

Como foi possível verificar, os resultados obtidos através da amplificação de ADN mitocondrial não foram de acordo com o expectável, tendo em conta as características deste tipo de genoma. Já a amplificação de marcadores bialélicos (InDel e Y-SNPs) revelaram melhores resultados relativamente à amplificação de marcadores do tipo STR. Isto deve-se ao facto dos produtos amplificados nestes marcadores terem tamanho mais reduzido. Esta é uma das condições do ADN degradado, que, como já foi referido, pode encontrar-se bastante fragmentado, podendo impossibilitar, assim, a amplificação de grandes regiões. A análise da comparação do número de alelos amplificados tendo em conta o tamanho do produto amplificado para marcadores do tipo STR e InDel (Figura 3.14 e Apêndice 5 respetivamente) vem confirmar esta mesma hipótese, uma vez que se verificou um decréscimo claro na amplificação de marcadores com o aumento do seu tamanho.

Todo o conjunto de técnicas já reconhecidas como eficazes em tecido ósseo e agora aplicadas nas amostras da população medieval, demonstraram que os esqueletos aqui estudados se encontram num elevado estado de degradação, impossibilitando melhores resultados do que os que obtivemos.

As condições de inumação (esqueletos sepultados diretamente num solo ácido do terreno de Mértola) deverão ter tido um papel relevante para a fraca conservação do ADN. No entanto, o facto de após a escavação terem sido armazenados em condições sujeitas à temperatura ambiente e ainda o facto de diversas pessoas, antropólogos e arqueólogos, terem estado em contacto direto com os ossos, poderá também representar uma possível fonte de degradação e contaminação do ADN, já por si fracamente preservado no tecido ósseo.

Apesar de o ADN se encontrar visivelmente degradado e fragmentado, ainda foi possível amplificar alguns dos marcadores propostos neste trabalho. Nas Figuras 3.47, 3.48, 3.49 e 3.50 estão representadas as percentagens da amplificação total tendo em conta todos os marcadores de ADN nuclear usados neste estudo para as amostras da população medieval e grupos controlo. Para o máximo de 126 alelos possíveis de serem amplificados, pertencentes a todos os marcadores analisados, 38 deles são alelos de marcadores do tipo STR (40 alelos de STR e Mini-STR excluindo a Amelogenina), 60 alelos pertencem a marcadores do tipo InDel (62 alelos excluindo a Amelogenina), 17 alelos correspondem a marcadores Y-STR (apenas nos indivíduos que se confirmou serem do sexo masculino), 9 alelos são de marcadores Y-SNP (nos indivíduos masculinos) e por fim, os últimos 2 alelos correspondem à amplificação da amelogenina a partir de todos os métodos utilizados.

Nas amostras da população medieval amplificamos 19% do total dos marcadores. No grupo de esqueletos de soldados da guerra do ultramar tivemos melhores resultados (28%), muito devido à amplificação de marcadores InDel. Já no grupo de esqueletos da rotina pericial e no esqueleto da capela particular amplificamos cerca de 100% dos marcadores (99,7% e 96% respetivamente). Ainda assim, no total, a população medieval partilha mais semelhanças com os esqueletos dos soldados da guerra do ultramar, em termos de número de marcadores amplificados e tamanho de produtos amplificados do que com o esqueleto da capela particular, com o qual partilha o tempo de inumação, mesmo tratando-se de um só osso.

Esqueletos rotina pericial
Amplificação total

■ % Alelos Amplificados ■ % Alelos em Drop out

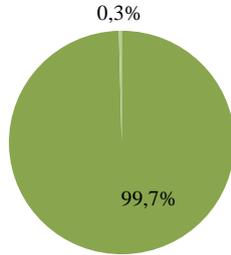


Figura 3. 47- Representação gráfica da amplificação total dos 126 alelos em estudo usando diferentes técnicas - Grupo controlo A.

Esqueletos Guerra Ultramar
Amplificação total

■ % Alelos Amplificados ■ % Alelos em Drop out

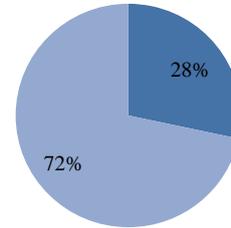


Figura 3. 48 - Representação gráfica da amplificação total dos 126 alelos em estudo usando diferentes técnicas - Grupo controlo B.

Esqueletos Capela particular
Amplificação total

■ % Alelos Amplificados ■ % Alelos em Drop out

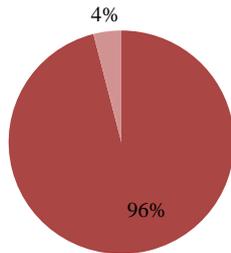


Figura 3. 49 - Representação gráfica da amplificação total dos 126 alelos em estudo usando diferentes técnicas - Grupo controlo C.

Esqueletos população Medieval
Amplificação total

■ % Alelos Amplificados ■ % Alelos em Drop out

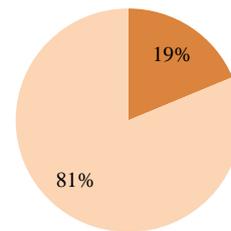


Figura 3. 50 - Representação gráfica da amplificação total dos 126 alelos em estudo usando diferentes técnicas - Esqueletos da população medieval.

4. Conclusão e Discussão

4. Conclusão e Discussão

Os esqueletos exumados do Campo Arqueológico de Mértola pertencem a uma das maiores metrópoles da época medieval alguma vez descobertas em Portugal. Desde 2007 que alunos da Universidade de Coimbra têm vindo a desenvolver o estudo desta coleção osteológica. A partir de métodos antropológicos é possível estimar a idade à morte, determinar o sexo, a estatura de cada indivíduo, possíveis patologias que afetem o tecido ósseo, identificar caracteres discretos, entre outros parâmetros.

No presente trabalho pretendeu-se apresentar a perspetiva da genética através do estudo dos mesmos esqueletos e aumentar a informação sobre esta população medieval.

A obtenção de um perfil genético a partir de amostras ósseas envolve técnicas frequentemente utilizadas na investigação de parentesco ou identificação de desconhecidos da rotina pericial do INMLCF, I.P.. O desafio deste estudo foi aplicar os métodos de rotina pericial, adequados e já testados em tecido ósseo, em amostras desta coleção osteológica.

É necessário ter em conta que, a obtenção de bons resultados na análise genética está diretamente dependente do estado de conservação em que os ossos se encontram aquando a sua chegada ao laboratório. Por sua vez, o estado de conservação dos ossos está dependente de vários fatores tafonómicos. Estes fatores podem ser intrínsecos ou extrínsecos como já foi referido anteriormente.

Para este estudo foram selecionados apenas fémures de indivíduos adultos, uma vez que se trata do osso mais denso do corpo humano e por isso menos suscetível à degradação (excluímos os dentes por não estarem disponíveis para análise). As condições de inumação destes esqueletos não foram as mais favoráveis. Os indivíduos foram sepultados em contacto direto com o solo de Mértola que é, na sua generalidade, seco e com clima ameno, contudo é bastante ácido causando a desmineralização dos ossos e consequente perda da estabilidade da estrutura e manutenção do ADN no tecido ósseo, para além da degradação causada pela ação de microrganismos, roedores e raízes de plantas.

Aos esqueletos da população medieval, adicionamos 3 grupos controlo com dupla função; a de confirmar a eficácia dos métodos utilizados em tecido ósseo e de eventualmente estabelecer uma comparação entre esqueletos com o mesmo tempo de inumação, sujeitos a condições de inumação diferentes. Através dos resultados do grupo controlo A provou-se que os métodos estão completamente otimizados para este tipo de amostras, uma vez que foi possível obter resultados de amplificação dos marcadores do tipo STR, InDel, Y-STR em 100%, Y-SNP em 94% e de ADN mitocondrial em 80% das amostras. Os grupos de controlo B e C permitiram ainda verificar a importância que as condições de inumação exercem na preservação e obtenção de um perfil genético.

A quantificação de ADN das amostras da população medieval em estudo revelou valores abaixo dos 100 pg/ μ L que, por definição, se inclui na classificação de ADN degradado (Gill *et al.*, 2000). No entanto não invalida a continuação da análise, concedendo apenas uma referência pré-amplificação, o que se veio a confirmar com a amplificação de marcadores do tipo STR, uma vez que amostras que apresentavam concentrações indetetáveis de ADN na quantificação, ainda assim, permitiram obter resultados na amplificação de STRs. Numa análise geral, com base em todas as amostras de tecido ósseo estudadas, verificou-se que o método de extração por Fenol clorofórmio apresenta melhores resultados em comparação com os obtidos através do método automático PrepFiler Express BTA.

Verificou-se uma semelhança entre os esqueletos da população medieval e os esqueletos de soldados da guerra do ultramar, bem como entre os esqueletos da rotina pericial e o esqueleto da capela particular, tanto na percentagem de amplificação, como na relação estabelecida entre a amplificação e o tamanho dos produtos amplificados para cada marcador. A semelhança encontrada entre os esqueletos da população medieval e os da guerra do ultramar são as condições de inumação em contacto direto com o solo, em condições abrasivas para o tecido ósseo, enquanto a semelhança entre os esqueletos da rotina pericial e o da capela particular se refere à inumação em caixão e condições estáveis de temperatura e humidade. Os resultados observados contrariam o que era expectável pois, esperávamos obter semelhanças entre os esqueletos sepultados há 40 anos (Grupo controlo A e B) e entre os esqueletos sepultados entre o séc. XIV e XVI (Grupo controlo C e população medieval em estudo). Estes resultados sugerem então que, a preservação do ADN no material ósseo pode não ser tão condicionada pelo tempo

que decorre entre a morte e a análise em laboratório, mas sim pelas condições de inumação do corpo. Estudos recentes já têm vindo a demonstrar a dificuldade em provar a relação direta entre preservação do ADN e o tempo de inumação uma vez que variáveis físicas, químicas, biológicas, condições de armazenamento, oxigenação, pH, entre outras, também têm influencia na conservação do ADN (Allentoft *et al.*, 2012). Por isso, é importante salientar que, para confirmar esta teoria, é necessário efetuar estudos complementares, como por exemplo, os grupos em comparação, devem diferir apenas através de uma variável, mantendo todas as outras em controlo constante, o que se torna difícil numa experiência que não é desenhada inicialmente com esse objetivo. Ou seja, numa comparação ideal, teríamos grupos de esqueletos com o mesmo número de indivíduos, o mesmo osso, o mesmo género e idades à morte semelhantes, inumados sensivelmente na mesma altura, variando apenas o facto de ser sepultado em caixão ou diretamente em solo (em vez de variar ainda a região em que são inumados, como é o exemplo do grupo controlo A que é constituído por esqueletos sepultados em Lisboa e o grupo controlo B por esqueletos sepultados na Guiné-Bissau).

Os grupos controlo não foram criados inicialmente para o efeito comparativo das condições de inumação, apenas se verificou ao longo da análise, certas semelhanças nos grupos de esqueletos disponíveis no INMLCF, I.P. Ainda assim, apesar desta análise apenas incluir um esqueleto do séc. XV inumado num túmulo de uma capela particular, os resultados obtidos representam um incentivo ao estudo de corpos esqueletizados nas mesmas condições que este.

Todos os resultados suportam esta mesma tendência. Na análise de marcadores InDel verificou-se uma melhoria significativa na percentagem de amplificação para a população total (de 7% nos STR para 24% em InDel), e esta melhoria também se fez sentir nos esqueletos da guerra do ultramar (de 8% para 41%), enquanto que ambos os grupos controlo A e C conseguiram uma amplificação de 100%. Esta melhoria deve-se ao tamanho dos produtos amplificados, pois nos marcadores bialélicos InDel os tamanhos são reduzidos e por isso, é maior a probabilidade de obter amplificação em ADN degradado.

Pruvost e colaboradores defendem que quanto menos tempo decorre entre a escavação e a análise em laboratório, melhor serão os resultados obtidos (Pruvost *et al.*, 2007). Neste

estudo estão incluídos ossos exumados entre 1990 e 2010, no entanto não foi possível estabelecer uma relação direta entre o ano de escavação e os resultados obtidos. Tanto os resultados da quantificação como da amplificação de STRs e InDels (métodos para os quais são apresentados resultados para todas as amostras) se encontram bastante distribuídos dentro do período de 20 anos que distancia a primeira amostra exumada e a última.

Antes de proceder à análise de Y-STRs e Y-SNPs, foi necessário confirmar o género atribuído pelos métodos antropológicos. Foi possível atribuir o género através de diferentes métodos genéticos a 27 das 50 amostras (15 masculinos e 12 femininos). Para algumas amostras foi confirmado o género atribuído pela antropologia, e para outras os resultados não coincidiram. As amostras que apresentam resultados para ambos os tipos de métodos aplicados (antropologia e genética) poderão contribuir para um aperfeiçoamento dos métodos antropológicos utilizados (Afonso, 2010). O conjunto de resultados obtidos sugerem que a aliança entre métodos genéticos e antropológicos podem ser um forte contribuidor para a correta identificação do sexo em indivíduos esqueletizados.

Quanto à amplificação de marcadores Y-STR, o tamanho dos produtos amplificados são equiparáveis aos dos STR's. E comparativamente, os resultados melhoraram nesta técnica para uma percentagem de amplificação de 14% para a população (contudo, o grupo de esqueletos em estudo é reduzido aos 15 indivíduos masculinos). E tal como era esperado, ficaram muito próximo dos esqueletos de guerra do ultramar com 11% de amplificação. O objetivo deste kit seria também detetar possíveis linhagens paternas na população em estudo, uma vez que há a indicação nos estudos anteriores de que as amostras AGEN - 072 e 073 estariam inumadas na mesma sepultura, podendo indicar alguma relação familiar (Currais, 2008). No entanto, para a amostra AGEN - 073 não foi possível a confirmação do género, contudo, ainda que se confirmasse tratar-se de um indivíduo masculino, o número de marcadores amplificados em média para estas amostras não é o suficiente para determinar qualquer relação de parentesco.

É importante sublinhar que os resultados da amplificação de marcadores STR, Mini-STR, InDel e Y-STR demonstraram pouca reprodutibilidade entre as repetições das amplificações para cada amostra, Eventualmente, isto dever-se-á ao efeito estocástico

que ocorre na amplificação de ADN degradado (Taberlet *et al.*, 1996; Iwamura *et al.*, 2004). O efeito estocástico ocorre nos ciclos iniciais da amplificação por PCR, quando a concentração do ADN molde é baixa. Nestes casos nem sempre os *primers* se ligam às regiões específicas de amplificação em todas as moléculas de ADN (Butler, 2011). Assim, ocorre uma amplificação aleatória de alelos (Butler, 2011). Eventos como o *drop in*, *drop out* ou o desbalanceamento dos alelos heterozigóticos (quando um dos alelos é preferencialmente amplificado em relação ao outro) são exemplos dos artefactos causados pelo efeito estocástico (Butler, 2011).

Este efeito estocástico dificulta a verificação de um mesmo determinado alelo através da repetição, uma vez que em amplificações diferentes a partir da mesma amostra, é possível obter resultados divergentes (Taberlet *et al.*, 1996; Iwamura *et al.*, 2004; Afonso, 2010) A solução passa por aumentar o número de repetições da mesma amostra e determinar um perfil consenso, considerando apenas os alelos que se encontram repetidos, tal como se efetuou no nosso estudo (Navidi *et al.*, 1992; Taberlet *et al.*, 1996; Afonso, 2010).

O estudo de Y-SNPs revelou uma melhoria nos resultados da amplificação de indivíduos masculinos, uma vez que o tamanho dos produtos amplificados são mais reduzidos (de 14% em Y-STR para 67% em Y-SNPs) tal como era expectável. Contudo, não foi possível a atribuição de haplogrupos para todas as amostras, já que seria necessário a amplificação de todos os marcadores.

A falha na deteção dos SNPs pode dever-se à fraca concentração ou degradação de ADN, por falha da extensão do primer ou em alguns casos à inibição da amplificação por concentrações de ADN elevadas (caso do grupo controlo A). A solução passa por repetir a amplificação das amostras. No entanto, mesmo após repetições das amplificações, a maioria das amostras não apresentou resultados para todo o conjunto de marcadores, devido ao mau estado de preservação do ADN das amostras em estudo.

O principal interesse da análise de Y-SNPs é atribuir ao haplótipo um haplogrupo que estará associado a uma região geográfica (Jobling, 2001). O objetivo da estratégia de amplificar os 9 marcadores aqui estudados foi abranger os haplogrupos mais comuns em populações europeias com o mínimo de marcadores possível já estudados por outros autores de forma a evitar gastos excessivos de recursos, tempo e ADN molde (Brion *et al.*, 2004). Contudo, os resultados das amostras da população medieval revelaram

haplogrupos, eventualmente, não pertencentes a linhagens paternas europeias. Por isso seria necessário a amplificação de mais conjuntos de marcadores de Y - SNPs para definir um haplogrupo preciso, uma vez que estes resultados não são conclusivos.

Quanto ao estudo do ADN mitocondrial, é considerado, muitas vezes, como o último recurso para a análise de amostras com ADN degradado devido à sua estrutura e elevado número de cópias presentes em cada célula (Foran, 2006; Parson e Bandelt, 2007). Contudo, os resultados obtidos não foram de encontro ao que era expectável, ou seja, apenas em 8 das 50 amostras da população medieval amplificamos para HV1 ou HV2 da região controlo de ADN mitocondrial. A análise de ADN mitocondrial é ser bem mais complexa que a análise com qualquer outro tipo dos métodos descritos neste trabalho. Foram detetadas diversas heteroplasmias de posição, que podem ser explicadas como sendo artefactos da amplificação devidos ao nested PCR, resultado de um elevado número de ciclos total. Ainda assim, após a desconstrução dos possíveis haplótipos das amostras com heteroplasmias, estas demonstraram pertencer sempre ao mesmo haplogrupo, o que pode sugerir que, de facto se trate do real haplogrupo a que pertence o indivíduo de quem provém o osso, excluindo a possibilidade de as heteroplasmias serem fruto de uma mistura causada por contaminação de ADN exógeno. Os resultados dos haplogrupos revelaram que a maioria das amostras faz parte de uma linhagem materna com origem na região Oeste da Eurásia e inesperadamente, duas amostras (AGEN - 041 e 057) demonstraram pertencer a uma linhagem com origens em África. É um cenário provável, uma vez que entre o séc. XIV e XVI era comum a prática da escravatura sobre indivíduos originários do continente africano.

Os resultados de ADN mitocondrial também poderão ser úteis no sentido de detetar possíveis linhagens maternas em comum entre as amostras estudadas. Dois pares de amostras (AGEN - 035 e 052, e AGEN - 043 e 064) demonstraram pertencer ao mesmo haplogrupo, contudo, não apresentam o mesmo haplótipo (diferem em 2 ou mais posições nucleotídicas) sendo assim, podemos excluir a probabilidade de serem indivíduos relacionados entre si por linhagem materna.

Uma solução futura para a análise de ADN mitocondrial será a subdivisão da amplificação (multi-amplificações) das regiões controlo do ADN mitocondrial com mais pares de primers mais perto entre si. Desta forma são garantidos produtos de

amplificação mais pequenos e por isso, com maior probabilidade de obter resultados (Hernandez *et al.*, 2003; Eichmann e Parson, 2008; Berger e Parson, 2009).

Através do conjunto dos resultados obtidos para todas as técnicas aplicadas aos esqueletos da população medieval, bem como aos grupos controlo, podemos concluir que os métodos utilizados são apropriados para tecido ósseo, no entanto não apresentam a sensibilidade e eficácia desejáveis, uma vez que o estado de degradação do ADN não permitiu obter resultados na maior parte dos casos. A análise dos resultados sugere ainda que as condições de inumação podem ter mais importância na preservação do ADN do que o tempo decorrido entre a morte e o estudo em laboratório. Estudos revelam, ainda, que a diferença de ambiente entre o solo e o meio ambiente após a escavação também tem influência na degradação do ADN (Pruvost *et al.*, 2007). Por isso, seria aconselhável que durante e após a escavação, os esqueletos fossem manuseados com luvas para evitar possíveis contaminações com ADN exógeno e fossem conservados em ambiente seco e fresco de forma a preservar o estado de conservação do ADN tal qual se encontrava ainda no solo, caso haja intenção de, no futuro serem estudados por métodos genéticos.

5. Bibliografia

5. Bibliografia

Adler, C.J.; Haak, W.; Donlon, D.; Cooper, A. (2011). "Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones." *Journal of Archaeological Science*, **38**, p.956–964. doi:10.1016/j.jas.2010.11.010

Afonso, C.A.P. (2010). "Contribuição do ADN antigo para o estudo das populações do Neolítico final/ Calcolítico portuguesas." Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Alaeddini, R.; Walsh, S.J.; Abbas, A. (2010). "Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA-a review." *Forensic Science International. Genetics*, **4**, p.148–157. doi:10.1016/j.fsigen.2009.09.007

Allentoft, M.E.; Collins, M.; Harker, D.; Haile, J.; Oskam, C.L.; Hale, M.L.; Campos, P.F.; Samaniego, J.A.; Gilbert, M.T.P.; Willerslev, E.; Zhang, G.; Scofield, R.P.; Holdaway, R.N.; Michael, B. (2012). "The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, **279**, p.4724–4733. doi:10.1098/rspb.2012.1745

Amorim, A. (2011). "A comment on «The hare and the tortoise: One small step for four SNPs, one giant leap for SNP-kind»." *Forensic Science International: Genetics*, **5**, p. 358–360. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.04.002.

Amorim, A.; Pereira, L. (2005). "Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: A comparative analysis with STRs." *Forensic Science International*, **150**, p.17–21. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.06.018.

AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit, User Guide. (2012). *Applied Biosystems by Life Technologies*, (Part no.4373872) Revision date: August 2012.

AmpFlSTR® Yfiler® PCR Amplification Kit, User Guide. (2012). *Applied Biosystems by Life Technologies*, (Part no.4359513) Revision date: September 2012.

Anderson, S.; Bankier, A.T.; Barrell, B.G.; Bruijn, M.H.L.; Coulson A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith A.J.H.; Staden, R.; Young, I.G. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature*, **290**, p.457–465. doi:10.1038/290457a0

Andrews, R.M.; Kubacka, I.; Chinnery, P.F.; Lightowlers, R.N.; Turnbull, D.M.; Howell, N. (1999). "Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA." *Nature Genetics*, **23**, p.147. doi:10.1038/13779

Barbisin, M.; Fang, R.; O'Shea, C.E.; Calandro, L.M.; Furtado, M.R.; Shewale, J.G. (2009). "Developmental validation of the Quantifiler Duo DNA Quantification kit for simultaneous quantification of total human and human male DNA and detection of PCR inhibitors in biological samples." *Journal of Forensic Sciences*, **54**(2), p.305–19. doi:10.1111/j.1556-4029.2008.00951.x

Benoit, J.-N.; Quatrehomme, G.; Carle, G.F.; Pognonec, P. (2013). "An alternative procedure for extraction of DNA from ancient and weathered bone fragments." *Medicine, Science, and the Law*, **53**, p.100–106. doi:10.1258/msl.2012.012026

Berger, C.; Parson, W. (2009). "Mini-midi-mito: Adapting the amplification and sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples." *Forensic Science International: Genetics*, **3**, p.149–153. doi:10.1016/j.fsigen.2009.01.011

Bolnick, D.A.; Bonine, H.M.; Mata-Míguez, J.; Kemp, B.M.; Snow, M.H.; LeBlanc, S. A. (2012). "Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and mitochondrial DNA." *American Journal of Physical Anthropology*, **147**, p.293–300. doi:10.1002/ajpa.21647

- Brion, M.; Sobrino, B.; Blanco-Verea, A.; Lareu, M.V; Carracedo, A. (2004). "Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations." *International Journal of Legal Medicine*, **119**, p.10–15. doi:10.1007/s00414-004-0439-2
- Brown, K. (2000). "Ancient DNA applications in human osteoarchaeology: Achievements, problems and potencial." Em: Cox, M.; Mays, S. (Eds.) (2000). *Human Osteology in Archaeology and Forensic Science* (pp. 455–473). *Greenwich Medical Media Ltd*, Londres.
- Brown, K.A.; Brown, T.A. (2013). "Biomolecular Archaeology." *Annual Review of Anthropology*, **42**, p.159–174. doi:10.1146/annurev-anthro-092412-155455
- Buckleton, J.; Triggs, C.; Walsh, S. J. (Eds.) (2005). "**Forensic DNA Evidence Interpretation**". *CRC Press*. ISBN 0849330173.
- Budowle, B.; Allard, M.W.; Wilson, M.R. (2002). "Critique of interpretation of high levels of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA hypervariable region I from hair." *Forensic Science International*, **126**, p.30–33. doi:10.1016/S0379-0738(02)00019-1
- Buikstra, J.E.; Ubelaker, D.H. (Eds.) (1994). "**Standards for data collection from human skeletal remains.**". *Arkansas Archeological Survey*.
- Butler, J.M. (2003). "Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis" *Forensic Science Review*. **15**(2), p.91–111.
- Butler, J.M. (2005). "**Forensic DNA Typing**" (2ª edição). *Elsevier Academic Press*. ISBN: 0-12-147952-8.
- Butler, J.M. (2011). "**Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.**" *Elsevier*. ISBN: 978-0-12-374513-2.
- Campos, L.S. (2005). "**Entender a Bioquímica**" (4a Edição.) *Escolar Editora*. Lisboa.

Campos, P.F.; Craig, O.E.; Turner-Walker, G.; Peacock, E.; Willerslev, E.; Gilbert, M. T.P. (2012). "DNA in ancient bone - Where is it located and how should we extract it?" *Annals of Anatomy*. **194**, p.7–16. doi:10.1016/j.aanat.2011.07.003

Caputo, M.; Irisarri, M.; Alechine, E.; Corach, D. (2013). "A DNA extraction method of small quantities of bone for high-quality genotyping." *Forensic Science International. Genetics*, **7**, p.488–493. doi:10.1016/j.fsigen.2013.05.002

Carmo, T.M.G.S. (2011). "Estudo antropológico de uma amostra populacional da Necrópole da Alcáçova do Castelo de Mértola (sécs. XIV a XVI)." Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Carolineberry, A; Berry, R. J. (1967). "Epigenetic variation in the human cranium." *Journal of anatom*, **101**:2, p.361–379.

Chelomina, G.N. (2006). "Ancient DNA". *Russian Journal of Genetics*. **42**(3), p.219–233. doi:10.1134/S102279540603001X

Costa Francez, P.A.; Rodrigues, E.M.R.; de Velasco, A.M.; dos Santos, S.E.B. (2012). "Insertion-deletion polymorphisms - utilization on forensic analysis." *International Journal of Legal Medicine*, **126**, p.491–496. doi:10.1007/s00414-011-0588-z

Couto, M.L.E.C. (2008). "O passado de Mértola: estudo antropológico de 17 esqueletos exumados da Alcáçova do Castelo de Mértola." Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Cox, M.M.; Doudna, J.A.; O'Donnell, M. (2012). "**Molecular Biology: Principles and Practice.**" *W.H. Freeman and Company*. New York. ISBN: 978-1429288750.

Cunha, H. (2011). "Mértola: no caminho do passado. Estudo paleoantropológico dos esqueletos exumados de 25 sepulturas da Necrópole Cristã Baixo-Medieval da Alcáçova do Castelo de Mértola." Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Currais, D. (2008). "Histórias post mortem: estudo de restos ósseos humanos provenientes da Alcáçova do Castelo de Mértola - *Portugal*." Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Draus-barini, J.; Walsh, S.; Pospiech, E.; Kupiec, T.; Glab, H.; Branicki, W.; Kayser, M. (2013). "Bona fide colour : DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains." *Investigative Genetics*. **4**(3), p.1-15
doi:10.1186/2041-2223-4-3

Eichmann, C.; Parson, W. (2008). "'Mitominis': Multiplex PCR analysis of reduced size amplicons for compound sequence analysis of the entire mtDNA control region in highly degraded samples." *International Journal of Legal Medicine*, **122**, p.385–388.
doi:10.1007/s00414-008-0227-5

Ferreira, S. (2013). "Vestígios osteológicos da Baixa Idade média em Mértola: O estudo paleobiológico de uma amostra de 22 esqueletos provenientes da Alcáçova do Castelo. Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Fondevila, M.; Pereira, R.; Gusmão, L.; Phillips, C.; Lareu, M.V.; Carracedo, A.; Butler, J.M.; Vallone, P.M. (2011). "Forensic performance of insertion–deletion marker systems." *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. ISFG.
doi:10.1016/j.fsigss.2011.09.083

Fondevila, M.; Phillips, C.; Santos, C.; Pereira, R.; Gusmão, L.; Carracedo, A, Butler, J.M.; Lareu, M.V.; Vallone, P.M. (2012). "Forensic performance of two insertion-deletion marker assays." *International Journal of Legal Medicine*, **126**, p.725–737.
doi:10.1007/s00414-012-0721-7

Foran, D.R. (2006). "Relative degradation of nuclear and mitochondrial DNA: An experimental approach." *Journal of Forensic Sciences*, **51**(4), p.766–770.
doi:10.1111/j.1556-4029.2006.00176.x

Fukushima, H. (2010). "Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method." *Legal Medicine*. **12**, p.84–89. doi:10.1016/j.legalmed.2009.12.004

Genomic DNA from forensic samples, User manual. NucleoSpin® DNA Trace (2012). *Macherey-Nagel Rev.05*.

Gill, P.; Whitaker, J.; Flaxman, C.; Brown, N. (2000). "An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA". *Forensic Science International*. **112**, p.17–40.

Gómez-Sánchez, D.; Olalde, I.; Pierini, F.; Matas-Lalueza, L.; Gigli, E.; Lari, M.; Civit, S.; Lozano, M.; Vergès, J.M.; Caramelli, D.; Ramírez, O.; Lalueza-Fox, C. (2014) "Mitochondrial DNA from El Mirador cave (Atapuerca, Spain) reveals the heterogeneity of Chalcolithic populations." *PLoS ONE*. **9**:8, p.1-8 doi: 10.1371/journal.pone.0105105.

Goodwin, W; Linacre, A.; Hadi, S. (2007). "**An introduction to Forensic Genetics**". *John Wiley & Sons, Ltd*. Inglaterra. ISBN - 9780470010259.

Green, R. E.; Krause, J.; Briggs, A.W.; Maricic, T.; Stenzel, U.; Kircher, M.; Patterson, N.; Li, H.; Zhai, W.; Fritz, H.-Y.; Hansen, N.F.; Durand, E.Y.; Malaspinas, A.-S.; Jensen, J.D.; Marques-Bonet, T.; Alkan, C.; Prüfer, K.; Meyer, M.; Burbano, H.A.; Good, J.;M.; Schultz, R.; Aximu-Petri, A.; Butthof, A.; Höber, B.; Höffner, B.; Siegemund, M.; Weihmann, A.; Nusbaum, C.; Lander, E.S.; Russ, C.; Novod, N.; Affourtit, J.; Egholm, M.; Verna, C.; Rudan, P.; Brajkovic, D.; Kucan, Z.; Gusic, I.; Doronichev, V.B.; Golovanova, L.V.; Lalueza-Fox, C.; de la Resilla, M.; Fortea, J.; Rosas, A.; Schmitz, R.W.; Johnson, P.L.F.; Eichler, E.E.; Falush, D.; Birney, E.; Mullikin, J.C.; Slatkin, M.; Nielsen, R.; Kelso, J.; Lachmann, M.; Reich, D.; Pääbo, S. (2010). "A Draft Sequence of the Neandertal Genome". *Science*. **329**, p.710- 722.

Grilo, L.T. (2001). "O DNA." Em: Videira, A. (Ed.) (2001). "**Engenharia Genética Princípios e Aplicações**." *Lidel*. Lisboa. ISBN-13:978-972-757-163-5.

Grzybowski, T. (2000). "Extremely high levels of human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots." *Electrophoresis*, **21**, p.548–553. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000201)21:3<548::AID-ELPS548>3.0.CO;2-U

Grzybowski, T.; Malyarchuk, B.A.; Czarny, J.; Miścicka-Sliwka, D.; Kotzbach, R. (2003). "High levels of mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots: reanalysis and revision." *Electrophoresis*. **24**, p.1159–1165. doi:10.1002/elps.200390149

Haas, C.; Shved, N.; Rühli, F.J.; Papageorgopoulou, C.; Purps, J.; Geppert, M.; Willuweit, S.; Roewer, L.; Krawczak, M. (2013). "Y-chromosomal analysis identifies the skeletal remains of Swiss national hero Jörg Jenatsch (1596-1639)." *Forensic Science International. Genetics*, **7**, p.610–617. doi:10.1016/j.fsigen.2013.08.006

Hammer, M.F.; Chamberlain, V.F.; Kearney, V.F.; Stover, D.; Zhang, G.; Karafet, T.; Walsh, B.; Redd, A.J. (2006). "Population structure of Y chromosome SNP haplogroups in the United States and forensic implications for constructing Y chromosome STR databases." *Forensic Science International*, **164**, p.45–55. doi:10.1016/j.forsciint.2005.11.013

Hernandez, A.; Mamey, I.; Sanchez, J.J.; Cuellas, J.; Alonso, A.; Rodriguez, C. (2003). "Mitochondrial DNA analysis of ancient human teeth from a XVIth century archeological excavation." *International Congress Series*, **1239**, p.601–604. doi:10.1016/S0531-5131(02)00223-6

Herrmann, B.; Hummel, S. (Eds) (1994). **Ancient DNA Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens**. Springer-Verlag. New York. ISBN: 978-0387943084.

Hofreiter, M.; Serre, D.; Poinar, H.N.; Kuch, M.; Pääbo, S. (2001). "ANCIENT DNA". *Nature Reviews*. 2, p. 353–359.

Investigator ® DIPplex Handbook. (2013). *Qiagen Sample & Assay Technologies*. February 2013.

Iwamura, E.S.M.; Soares-Vieira, J.A.; Muñoz, D.R. (2004). "Human identification and analysis of DNA in bones." *Revista Do Hospital Das Clínicas*, **59**(6), p.383–388. doi:10.1590/S0041-87812004000600012

Jakubowska, J.; Maciejewska, A.; Pawłowski, R. (2012). "Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation." *International Journal of Legal Medicine*. **126**, 173–178. doi:10.1007/s00414-011-0590-5

Jobling, M.A.; Tyler-Smith, C. (2003). "The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age." *Nature Reviews. Genetics*, **4**, p.598–612. doi:10.1038/nrg1124

Jobling, M.A. (2001). "Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis." *Forensic Science International*, **118**, p.158–162. doi:10.1016/S0379-0738(01)00385-1

Kaestle, F.A.; Horsburgh, K.A. (2002). "Ancient DNA in anthropology: methods, applications, and ethics." *Yearbook of Physical Anthropology*. **45**, p.92–130. doi:10.1002/ajpa.10179

Kaur, J.; Choudhry, R.; Raheja, S.; Dhissa, N.C. (2012). "Non metric traits of the skull and their role in anthropological studies." *Journal of Morphological Sciences*, **29**:4, p.189–194.

Keyser, C.; Bouakaze, C.; Crubézy, E.; Nikolaev, V.G.; Montagnon, D.; Reis, T.; Ludes, B. (2009). "Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people." *Human Genetics*, **126**, p.395–410. doi: 10.1007/s00439-009-0683-0.

Keyser, C.; Crubézy, E.; Ludes, B. (2003). "Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia." *American journal of human genetics*. **73**, p.247–260. doi: 10.1086/377005.

Kirsanow, K.; Burger, J. (2012). "Ancient human DNA." *Annals of Anatomy*. **194**, p.121–132. doi:10.1016/j.aanat.2011.11.002

Kitayama, T.; Ogawa, Y.; Fujii, K.; Nakahara, H.; Mizuno, N.; Sekiguchi, K.; Kasai, K.; Yurino, N.; Yokoi, T.; Fukuma, Y.; Yamamoto, K.; Oki, T.; Asamura, H.;

Knapp, M.; Clarke, A.C.; Horsburgh, K.A.; Matisoo-Smith, E.A. (2012). "Setting the stage – Building and working in an ancient DNA laboratory." *Annals of Anatomy*. **194**, p.3–6. doi:10.1016/j.aanat.2011.03.008

Krings, M.; Stone, A.; Schmitz, R.W.; Krainitzki, H.; Stoneking, M.; Pääbo, S. (1997). "Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans". *Cell*. **90**, p.19–30.

Leandro, I. (2011). "Mértola: testemunhos de um passado medieval. Estudo paleobiológico de 30 esqueletos provenientes da Alcáçova do Castelo de Mértola." Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Lessig, R.; Zoledziewska, M.; Fahr, K.; Edelmann, J.; Kostrzewa, M.; Dobosz, T.; Kleemann, W.J. (2005). "Y-SNP-genotyping - a new approach in forensic analysis." *Forensic Science International*, **154**, p.128–36. doi:10.1016/j.forsciint.2004.09.129

Levy, S.; Sutton, G.; Ng, P.C.; Feuk, L.; Halpern, A.L.; Walenz, B.P.; Axelrod, N.; Huang, J.; Kirkness, E.F.; Denisov, G.; Lin, Y.; MacDonald, J.R.; Pang, A.W.C.P.; Shago, M.; Stockwell, T.B.; Tsiamouri, A.; Bafna, V.; Bansal, V.; Kravitz, S.A.; Buram, D.A.; Beeson, K.Y.; McIntosh, T.C.; Remington, K.A.; Abril, J.F.; Gill, J.; Borman, J.; Rogers, Y.-H.; Frazier, M.E.; Scherer, S.W.; Strausberg, R.; Venter, J.C. (2007). "The diploid genome sequence of an individual human." *PLoS Biology*, **5**:10 p. 2113–2144. doi: 10.1371/journal.pbio.0050254.

Loreille, O.M.; Diegoli, T.M.; Irwin, J.A.; Coble, M.D.; Parsons, T.J. (2007). "High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization." *Forensic Science International. Genetics*. **1**, p.191–195. doi:10.1016/j.fsigen.2007.02.006

MacMillan, G.P. (1997). "A Preliminary analysis of the paleochristian and islamic cemeteries of Rossio do Carmo, Mértola, Portugal." *Arqueologia Medieval*. **572**, p.13-20.

Meyer, M.; Fu, Q.; Aximu-Petri, A.; Glocke, I.; Nickel, B.; Arsuaga, J.-L.; Martínez, I.; Gracia, A.; Bermúdez de Castro, J.M.; Carbonell, E.; Pääbo, S. (2014) "A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos." *Nature*. **505**, p 403-406. doi: 10.1038/nature12788.

Monteiro, R. (2010). "Paleobiologia da Necrópole da Baixa Idade Média da Alcáçova do Castelo de Mértola: estudo paleoantropológico de uma amostra de 28 esqueletos." Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Morgado, N. (2008). "Mértola: despertar no presente recordações do passado". Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Morikawa, T.; Yamamoto, Y.; Miyaishi, S. (2011). "A New Method for Sex Determination Based on Detection of SRY , STS and Amelogenin Gene Regions with Simultaneous Amplification of Their Homologous Sequences by a Multiplex PCR." *Acta Medica Okayama*, **65**(2), p.133–122.

Mrevlishvili, G.M.; Svintradze, D.V. (2005). "DNA as a matrix of collagen fibrils." *International Journal of Biological Macromolecules*, **36**, p.324–326. doi:10.1016/j.ijbiomac.2005.07.006

Nakahori, Y.; Takenaka, O.; Nakagome, Y. (1991). "A human X-Y homologous region encodes "Amelogenin". *Genomics*, **9**, p.264–269. doi: 10.1016/0888-7543(91)90251-9.

Navidi, W.; Arnheim, N.; Waterman, M.S. (1992). "A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations." *American Journal of Human Genetics*, **50**, p.347–359.

Noonan, J.P.; Coop, G.; Kudaravalli, S.; Smith, D.; Krause, J.; Alessi, J.; Chen, F.; Platt, D.; Pääbo, S.; Pritchard, J.K.; Rubin, E.M. (2006). "Sequencing and Analysis of Neanderthal Genomic DNA", *Science*. **314**, p.1113–1118.

Nussbaum, R.L.; McInnes, R.R.; Willard, H.F. (2007). "**Thompson & Thompson Genetics in Medicine**". (7ª edição). *Saunders Elsevier*. ISBN: 1416030808.

Okazaki, M.; Yoshida, Y.; Yamaguchi, S.; Kaneno, M.; Elliott, J.C. (2001). "Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals." *Biomaterials*, **22**, p.2459–2464.

Pääbo, S. (1989). "Ancient DNA : Extraction , characterization , molecular cloning , and enzymatic amplification" *Proceedings of the National Academy Sciences USA* **86**, p.1939–1943.

Pääbo, S.; Higuchii, R.G.; Wilson, A.C. (1989). "Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction". *The Journal of Biological Chemistry*. **264**(17), p.9709–9712.

Pääbo, S.; Poinar, H.; Serre, D.; Jaenicke-Després, V.; Hebler, J.; Rohland, N.; Kuch, M.; Krause, J.; Vigilant, L.; Hofreiter, M. (2004). "Genetic analyses from ancient DNA." *Annual Review of Genetics*, **38**, p.645–679. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143214

Parson, W.; Bandelt, H.J. (2007). "Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science." *Forensic Science International: Genetics*, **1**, p.13–19. doi:10.1016/j.fsigen.2006.11.003

Parson, W.; Dür, A. (2007). "EMPOP - A forensic mtDNA database." *Forensic Science International: Genetics*, **1**, p.88–92. doi:10.1016/j.fsigen.2007.01.018

Parson, W.; Gusmão, L.; Hares, D.R.; Irwin, J.A.; Mayr, W.R.; Morling, N.; Pokorak, E.; Prinz, M.; Salas, A.; Schneider, P.M; Parsons, T.J. (2014). "DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing." *Forensic Science International. Genetics*, **13**, p.134–142. doi:10.1016/j.fsigen.2014.07.010

Payne, B.A.I.; Wilson, I.J.; Yu-Wai-Man, P.; Coxhead, J.; Deehan, D.; Horvath, R.; Taylor, R.W.; Samuels, D.C.; Santibanez-Koref; Chinnery, P.F. (2013). "Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA." *Human Molecular Genetics*, **22**(2), p.384–390. doi:10.1093/hmg/dds435

Pereira, L.; Alshamali, F.; Andreassen, R.; Ballard, R.; Chantratita, W.; Cho, N.S.; Coudray, C.; Dugoujon, J.-M.; Espinoza, M.; Gonzalez-Martin, A.; Mertens, G.; Parson, W.; Perone, C.; Prieto, L.; Takeshita, H.; Villalobos, H.R.; Zeng, Z.; Zhivotovsky, L.; Camacho, R.; Fonseca, N.A. (2011). "PopAffiliator: Online calculator for individual affiliation to a major population group based on 17 autosomal short tandem repeat genotype profile." *International Journal of Legal Medicine*, **125**, p.629–636. doi:10.1007/s00414-010-0472-2

Pereira, L.; Prata, M.J.; Amorim, A. (2000). "Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation." *Annals of human genetics*. **64**, p. 491–506. doi: 10.1046/j.1469-1809.2000.6460491.x.

Pereira, M. de F.T.P. (2009). "**CSI Catástrofes**." *Edições Universidade Fernando Pessoa*.

Pereira, R.; Phillips, C.; Alves, C.; Amorim, A.; Carracedo, A.; Gusmão, L. (2009 a). "A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms." *Electrophoresis*, **30**, p.3682–3690. doi:10.1002/elps.200900274

Pereira, R.; Philips, C.; Alves, C.; Amorim, A.; Carracedo, A.; Gusmão, L. (2009 b). "Insertion/deletion polymorphisms: A multiplex assay and forensic applications." *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, **2**, p.513–515. doi: 10.1016/j.fsigs.2009.09.005.

Perićić, M.; Lauc, L.B.; Klarić, I.M.; Rootsi, S.; Janićijević, B.; Rudan, I.; Terzić, R.; Colak, I.; Kvesic, A.; Popovic, D.; Sijacki, A.; Behluli, I.; Dordevic, D.; Efremovska, L.; Bajec, D.; Stefanovic, B.D.; VILLEMS, R.; Rudan, P. (2005). "High-resolution phylogenetic analysis of southeastern Europe traces major episodes of paternal gene

flow among Slavic populations." *Molecular Biology and Evolution*, **22**(10), p.1964–1975. doi:10.1093/molbev/msi185

Pinheiro, M. de F.T. (2008). "**CSI Criminal.**" *Edições Universidade Fernando Pessoa*. ISBN: 978-989-643-003-0.

Pinheiro, M. de F. T. (2010). "**Genética Forense Perspectivas da indentificação genética.**" *Edições Universidade Fernando Pessoa*. ISBN: 978-989-643-050-4.

PowerPlex® ESI 17 Pro System Technical Manual. (2013). *Promega Corporation*. Revised 5/13. Part# TMD036.

PowerPlex® ESI 17 System. Technical Manual. (2011). *Promega Corporation*. Revised 5/11. Part #TMD028.

PowerPlex® ESX 17 System Technical Manual. (2013). *Promega Corporation*. Revised 5/13. Part # TMD024.

PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits, User Guide. (2010). *Applied Biosystems by Life Technologies*. Part Number 4442699 Rev.B 06/2010.

Pruvost, M.; Schwarz, R.; Correia, V.B.; Champlot, S.; Braguier, S.; Morel, N.; Fernandez-Jalvo, Y.; Grange, T.; Geigl, E.-M. (2007). "Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**(3), p.739–744.

QIAGEN Multiplex PCR Handbook For fast and efficient multiplex PCR without optimization. (2010). *QIAGEN Sample & Assay Technologies*. October 2010.

Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit - User's Manual. (2012). *Applied Biosystems*. Part Number 4391294. Rev D 03/2012.

Raff, J.A.; Bolnick, D.A.; Tackney, J.; O'Rourke, D.H. (2011). "Ancient DNA Perspectives on American Colonization and Population History." *American Journal of Physical Anthropology*, **146**, p.503–514. doi:10.1002/ajpa.21594

Rapley, R.; Whitehouse, D. (Eds) (2007). "**Molecular Forensics.**" *John Wiley & Sons, Ltd.* ISBN: 978-0-470-02495-9.

Rohland, N.; Hofreiter, M. (2007a). "Ancient DNA extraction from bones and teeth." *Nature Protocols*, **2**(7), p.1756–1762. doi:10.1038/nprot.2007.247

Rohland, N.; Hofreiter, M. (2007b). "Comparison and optimization of ancient DNA extraction." *BioTechniques*, **42**, p.343–352. doi:10.2144/000112383

Rohland, N.; Siedel, H.; Hofreiter, M. (2004). "Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analysis of museum specimens." *Bio Techniques*, **36**(5), p.2–6.

Rohland, N.; Siedel, H.; Hofreiter, M. (2010). "A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput." *Molecular Ecology Resources*, **10**, p.677–683. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02824.x

Romanini, C.; Catelli, M.L.; Borosky, A.; Pereira, R.; Romero, M.; Puerto, M.S.; Phillips, C.; Fondevila, M.; Freire, A.; Santos, C.; Carracedo, A.; Lareu, M.V.; Gusmão L.; Vullo, C.M. (2012). "Typing short amplicon binary polymorphisms: supplementary SNP and Indel genetic information in the analysis of highly degraded skeletal remains." *Forensic science international. Genetics*, **4**, p.469–476. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.10.006.

Salas, A; Bandelt, H.-J.; Macaulay, V.; Richards, M. B. (2007). "Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics." *Forensic Science International*, **168**, p.1–13. doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.037

Sanchez, J.J.; Brión, M.; Parson, W.; Blanco-Verea, A.J.; Børsting, C.; Lareu, M.; Niederstätter, H.; Oberacher, H.; Morling, N.; Carracedo, A. (2004). "Duplications of

the Y-chromosome specific loci P25 and 92R7 and forensic implications." *Forensic Science International*, **140**, p.241–250. doi:10.1016/j.forsciint.2003.11.035

Santos, T. (2012). "Villa de Mertolla e ho Castello: caracterização populacional e ocupacional da necrópole da Alcáçova do Castelo." Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Schmitt, A.; Cunha, E.; Pinheiro, J. (Eds) (2006). "**Forensic Anthropology and Medicine. Complementary Sciences from Recovery to Cause of Death.**" *Humana Press*. ISBN: 1-59745-099-5.

Silvério, C.A.C. (2008). "Mértola Medieval, uma vila com história: estudo osteológico de uma população da Baixa Idade Média (sécs. XIV a XVI) da Alcáçova dos Castelo." Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Steinlechner, M.; Berger, B.; Niederstätter, H.; Parson, W. (2002). "Rare failures in the amelogenin sex test." *International Journal of Legal Medicine*, **116**, p.117–120. doi: 10.1007/s00414-001-0264-9.

Taberlet, P.; Griffin, S.; Goossens, B.; Questiau, S.; Manceau, V.; Escaravage, N.; Waits, L.P.; Bouvet, J. (1996). "Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR." *Nucleic Acids Research*, **24**(16), p.3189–3194.

Tibbett, M. (2008). "The Basics of Forensic Taphonomy: Understanding Cadaver Decomposition in Terrestrial Gravesites." Em: Oxenham, M. (Eds) (2008). "Forensic Approaches to Death Disaster and Abuse." *Australian Academic Press*. ISBN: 9781875378906.

Tozzo, P.; Giuliadori, A.; Corato, S.; Ponzano, E.; Rodriguez, D.; Caenazzo, L. (2013). "Deletion of amelogenin Y-locus in forensics: Literature revision and description of a novel method for sex confirmation." *Journal of Forensic and Legal Medicine*, **20**, p.387–391. doi:10.1016/j.jflm.2013.03.012

Underhill, P.A.; Myres, N.M.; Rootsi, S.; Metspalu, M.; Zhivotovsky, L.A.; King, R.J.; Lin, A.A.; Chow, C.-E.; Semino, O.; Battaglia, V.; Kutuev, I.; Järve, M.; Chaubey, G.; Ayub, Q.; Mohyuddin, A.; Mehdi, S. Q.; Sengupta, S.; Rogaev, E.I.; Khusnutdinova, E.K.; Pshenichnov, A.; Balanovsky, O.; Balanovska, E.; Jeran, N.; Augustin, D.H.; Baldovic, M.; Herrera, R.J.; Thangaraj, K.; Singh, V.; Singh, L.; Majumder, P.; Rudan, P.; Primorac, D.; VILLEMS, R.; Kivisild, T. (2010). "Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a." *European Journal of Human Genetics*. **18**, p.479–484. doi:10.1038/ejhg.2009.194

Underhill, P.A.; Passarino, G.; Lin, A.A.; Shen, P.; Lahr, M.M.; Foley, R.A.; Oefner, P.J.; Cavalli-Sforza, L.L. (2001). "The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations." *Annals of Human Genetic*. **65**, p.43–62.

Underhill, P.A.; Poznik, G.D.; Rootsi, S.; Järve, M.; Lin, A.A.; Wang, J.; Passarelli, B.; Kanbar, J.; Myres, N.M.; King, R.J.; Cristofaro, J.D.; Sahakyan, H.; Behar, D.M.; Kushniarevich, A.; Sarac, J.; Saric, T.; Rudan, P.; Pathak, A.K.; Chaubey, G.; Grugni, V.; Semino, O.; Yepiskoposyan, L.; Bahmanimehr, A.; Farjadian, S.; Balanovsky, O.; Khusnutdinova, E.K.; Herrera, R.J.; Chiaroni, J.; Bustamante, C.D.; Quake, S.R.; Kivisild, T.; VILLEMS, R. (2014). "The phylogenetic and geographic structure of Y-chromosome haplogroup R1a." *European Journal of Human Genetics*. **23**, p.124-131. doi:10.1038/ejhg.2014.50

Vallone, P.M.; Butler, J.M. (2004). "Y-SNP typing of US African American and Caucasian samples using allele-specific hybridization and primer extension." *Journal of Forensic Sciences*, **49**(4), p.1–10.

Van Oven, M.; Kayser, M. (2008). "Updated Comprehensive Phylogenetic Tree of Global Human Mitochondrial DNA variation." *Human Mutation*. **30**, p.386–394. doi:10.1002/humu.20921

Walsh, P.S.; Metzger, D.A.; Higuchi, R. (1991). "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material." *Biotechniques*. **10**(4), p.506–513.

Wei, W.; Ayub, Q.; Xue, Y.; Tyler-Smith, C. (2013). "A comparison of Y-chromosomal lineage dating using either resequencing or Y-SNP plus Y-STR genotyping." *Forensic Science International. Genetics*, **7**, p.568–572. doi:10.1016/j.fsigen.2013.03.014

White, T.D.; Black, M.T.; Folkens, P.A. (2012). "**Human osteology**" (3ª Adição). *Elsevier Academic Press*. ISBN:978-0-12-374134-9.

Woide, D.; Zink, A.; Thalhammer, S. (2010). "Technical note: PCR analysis of minimum target amount of ancient DNA." *American Journal of Physical Anthropology*. **142**, p.321–327. doi:10.1002/ajpa.21268

Y Chromosome Consortium (2002). "A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups." *Genome Research*, **12**, p.339–48. doi:10.1101/gr.217602

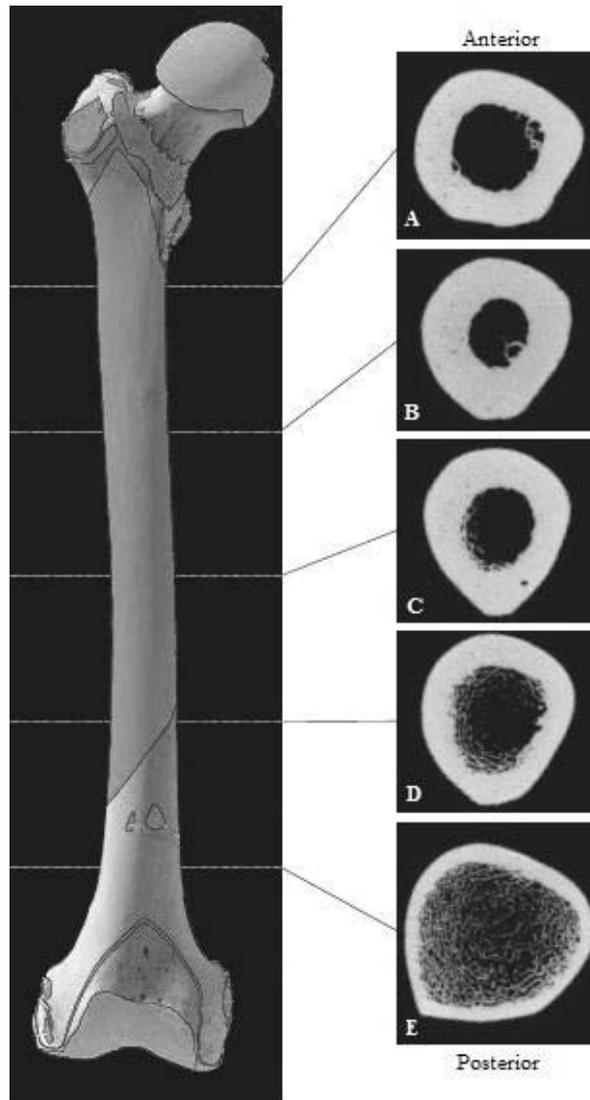
Yang, D.Y.; Watt, K. (2005). "Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis." *Journal of Archaeological Science*. **32**, p.331–336. doi:10.1016/j.jas.2004.09.008

Zaumsegel, D.; Rothschild, M.A.; Schneider, P.M. (2013). "A 21 marker insertion deletion polymorphism panel to study biogeographic ancestry." *Forensic Science International. Genetics*. **7**, p.305–312. doi:10.1016/j.fsigen.2012.12.007

6. Apêndices

6. Apêndices

Apêndice 1: Representação de um fêmur direito e as diferentes secções de A a E correspondendo de um corte mais anterior para o mais posterior. A zona de interesse para o corte de uma pequena janela nos ossos em estudo é a região B (região mais densa da diáfise). (adaptado de White *et al.*, 2012)

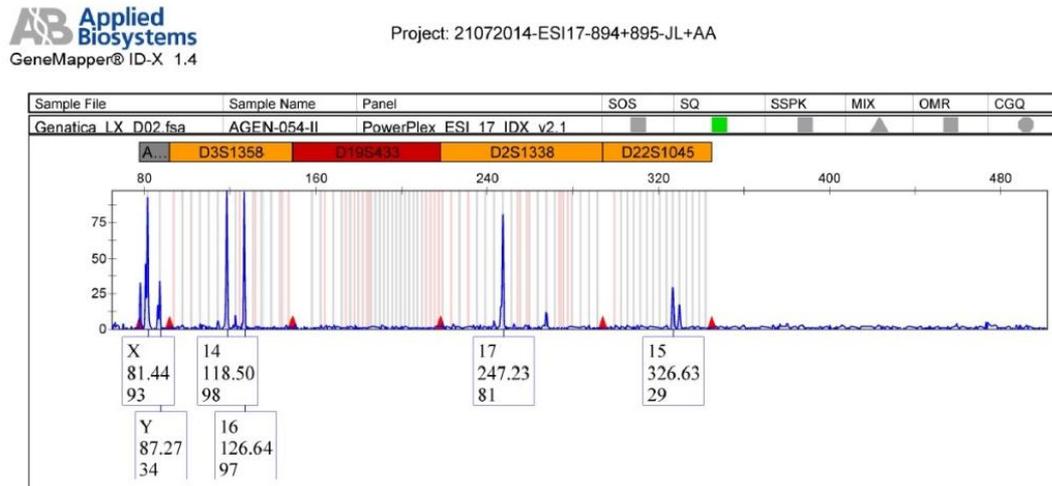


Apêndice 2: Composição do Tampão de extração de tecidos ósseos

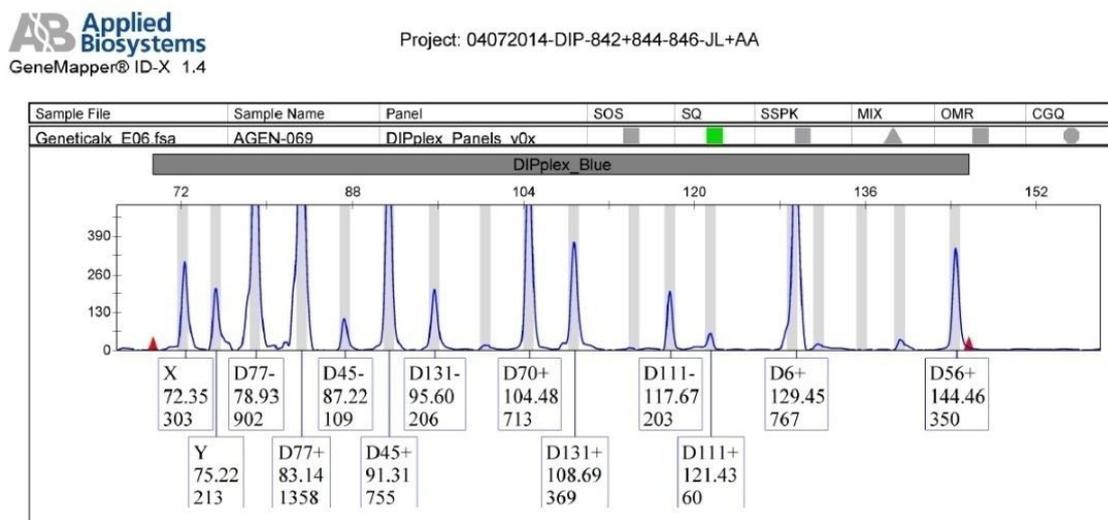
Tampão de extração de tecidos ósseos:

Para um volume final de 100mL de tampão, juntar: 1mL de TrisHCL (1M); 2mL de EDTA (0,5M); 10mL de NaCL (1M); 4mL de DTT (1M); 10mL de SDS (20%) e perfazer até ao volume final com água mili-Q.

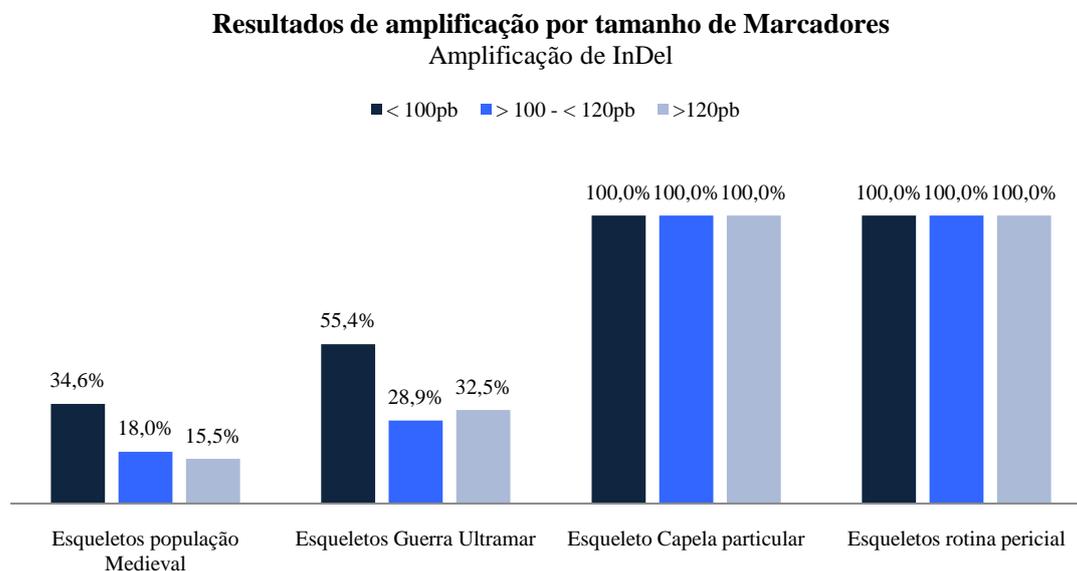
Apêndice 3: Exemplo de um resultado obtido a partir de eletroforese capilar após a amplificação de uma amostra para 5 dos marcadores STR usados no *Kit PowerPlex® ESX 17 System* (amostra AGEN - 054).



Apêndice 4: Exemplo de um resultado obtido a partir de eletroforese capilar após a amplificação de uma amostra para 8 dos marcadores InDel usados no *Kit Investigator® DIPplex* (amostra AGEN - 069).



Apêndice 5: Representação gráfica dos resultados da amplificação de marcadores tendo em conta o tamanho dos produtos de amplificação de marcadores InDel com o *Kit Investigator® DIPplex* para os esqueletos da população Medieval em estudo e grupos controlo A, B e C.



Apêndice 6:

Tabela 6. 1 - Tabela de dados antropológicos recolhidos a partir dos estudos realizados previamente às sepulturas seleccionadas para este trabalho. Indicados estão os nomes de código de cada uma das 50 amostra no laboratório, correspondente a cada sepultura; a região onde se efetuou o corte; o ano de escavação; o ano em que a sepultura foi estudada e o responsável pelo estudo; a idade estimada à morte, o sexo do indivíduo atribuído por técnicas antropológicas; o fémur esquerdo/direito seleccionado para este trabalho e a condição de cada fémur (presença/ausência ou fratura de cada região do osso).

AGEN	Corte	Sepultura	Ano	Estudo	Tese	Idade	Sexo	E	D	EP	DP	DD	ED
053	P	317	1990	2012	Santos, T.	[30-35]	F		X	X	X	X	A
054	P	324	1990	2012	Santos, T.	[40-66]	M		X	F	X	X	X
035	P	382	1992	2011	Cunha, H.	[21-25]	M/F	X		X	X	X	F
036	P	386	1992	2011	Cunha, H.	[36-66]	F	X		X	X	X	F
037	P	402	1992	2011	Cunha, H.	[45-74]	M	X		X	X	X	A
038	P	418	1992	2011	Cunha, H.	[45-74]	M		X	X	X	X	A
039	P	429	1992	2011	Cunha, H.	[40-70]	F	X		X	X	X	A
040	P	447	1992	2011	Cunha, H.	[20-25]	M		X	F	X	X	X
055	P	457	1993	2012	Santos, T.	[45-49]	M		X	F	X	X	F
056	P	461	1993	2012	Santos, T.	[35-66]	M	X		X	X	A	A
041	P	529	1995	2008	Couto, M.	>30	M	X		X	X	X	X
057	P	534	1995	2008	Couto, M.	I	M	X		A	X	X	A

AGEN	Corte	Sepultura	Ano	Estudo	Tese	Idade	Sexo	E	D	EP	DP	DD	ED
058	P	537	1995	2008	Couto, M.	I	F	X		X	X	X	A
042	P	546	1996	2008	Silvério, C.	[20-50]	M	X		F	X	X	A
059	P	547	1996	2008	Silvério, C.	>30	M	X		F	X	X	A
043	P	551	1996	2008	Silvério, C.	[15-21]	I		X	X	X	X	A
060	P	553	1996	2008	Silvério, C.	I	I		X	F	X	X	F
061	P	555	1996	2008	Silvério, C.	I	M		X	A	X	X	A
062	D	558	1996	2008	Silvério, C.	>30	M/F		X	F	X	X	F
044	P	560	1996	2008	Silvério, C.	>30	M		X	X	X	X	A
063	P	561	1996	2008	Silvério, C.	I	M	X		F	X	X	A
064	P	562	1996	2008	Silvério, C.	I	I		X	F	X	X	F
065	P	564	1996	2007	Morgado, N.	[23-57]	M/F		X	A	X	X	A
045	D	565	1996	2007	Morgado, N.	[30-34]	M/F	X		X	X	X	F
046	P	566	1996	2007	Morgado, N.	<30	M/F		X	X	X	X	F
047	P	567	1996	2007	Morgado, N.	[20-30]	F		X	X	X	X	A
066	P	574	1997	2011	Leandro, I.	[36-50]	M		X	X	X	A	A
067	P	577	1997	2011	Leandro, I.	[36-50]	M	X		X	X	X	X
048	D	590	1997	2011	Leandro, I.	[20-35]	I	X		X	X	X	X
068	P	591	1997	2011	Leandro, I.	I	M		X	X	X	X	A
049	P	594	1997	2011	Leandro, I.	[36-50]	I		X	X	X	X	F
069	P	596	1997	2011	Leandro, I.	[20-35]	F	X		X	X	A	A
050	P	604	1998	2007	Morgado, N.	>30	M/F	X		X	X	X	A
070	P	613	1998	2007	Morgado, N.	I	M		X	F	X	X	A
071	P	617	1998	2008	Currais, D.	<30	M/F	X		F	X	X	F
072	P	619/1	1998	2008	Currais, D.	I	M	X		F	X	A	A
073	P	619/2	1998	2008	Currais, D.	59	M		X	F	X	X	F
074	P	642	2000	2008	Currais, D.	>65	M	X		F	X	X	F
051	P	645	2000	2008	Currais, D.	[30-35]	F	X		X	X	X	F
075	P	647/1	2000	2008	Currais, D.	[19-25]	F	X		F	X	X	F
052	D	648	2000	2008	Currais, D.	[30-35]	M		X	X	X	X	F
076	P	652	2000	2008	Currais, D.	I	M	X		F	X	X	F
077	P	656	2000	2008	Currais, D.	70	M		X	F	X	X	F
078	P	659/1	2010	2012	Santos, T.	<30	F	X		F	X	F	F
079	P	659/2	2010	2012	Santos, T.	[33-42]	M	X		X	X	A	A
080	P	661	2010	2012	Santos, T.	[30-34]	M		X	X	X	X	F
081	P	662	2010	2012	Santos, T.	[24-28]	M	X		F	X	X	F
082	P	673	2010	2012	Santos, T.	[20-21]	M		X	F	X	X	F
083	P	677	2010	2012	Santos, T.	[42-87]	F	X		X	X	X	F
084	P	678	2010	2012	Santos, T.	[33-53]	M		X	X	X	X	F

Legenda Tabela I - **AGEN** - Nome de código das amostras no laboratório; **P**- Corte na região proximal do fémur; **D** - corte na região distal do fémur; **Sepultura** - número de sepultura da escavação; **Ano** - ano de escavação; **Estudo** - ano de estudo antropológico; **Tese** - Responsável pelo estudo antropológico; **Idade** - idade estimada à morte; **I** - indefinido; **Sexo** - género atribuído pelo estudo antropológico; **M** - Masculino; **F** - Feminino, **M/F** - indivíduo masculino mas com algumas dúvidas na caracterização do género; **M/F** - indivíduo Feminino mas com algumas dúvidas na caracterização do género; **E/D** - Fémur escolhido para o estudo genético (**E** - esquerdo, **D** - direito); **EP** - Epífise Proximal; **DP** - Diáfise Proximal; **DD** - Diáfise Distal; **ED** - Epífise Distal; **X** - Presente; **A** - Ausente; **F** - Fraturado.

7. Anexos

7. Anexos

Anexo1: Anexo referente ao estudo de STRs e InDel

Tabela 7. 1 - Marcadores estudados para diferentes Kits de STR (*PowerPlex ESI 17*, *PowerPlex ESI 17 Pro* e *PowerPlex ESX17* da Promega e *AmpFlSTR® MiniFiler™* da Applied Biosystems), bem como a sequência de repetição e a localização no cromossoma de cada marcador.

Marcadores	<i>PowerPlex ESI 17</i>			<i>Applied</i>	Seq.Repetição5'-3'	Cromossoma
	<i>Promega</i>	<i>PowerPlex ESI 17 Pro</i>	<i>PowerPlex ESX 17</i>			
Amelogenin	X	X	X	X	NA	Xp22.1–22.3 and Y
D1S1656	X	X	X		TAGA Complex	1q42
D2S441	X	X	X		TCTA	2p14
D2S1338	X	X	X	X	TGCC/TTCC	2q35
D3S1358	X	X	X		TCTA Complex	3p
D7S820				X	GATA	7q11.21–22
D8S1179	X	X	X		TCTA Complex	8q24.13
D10S1248	X	X	X		GGAA	10q26.3
D12S391	X	X	X		AGAT/AGAC Complex	12p12
D13S317				X	TATC	13q22–q31
D16S539	X	X	X	X	GATA	16q24.1
D18S51	X	X	X	X	AGAA	18q21.3
D19S433	X	X	X		AAGG Complex	19q12
D21S11	X	X	X	X	TCTA Complex	21q11–21q21
D22S1045	X	X	X		ATT	22q12.3
TH01	X	X	X		AATG	11p15.5
CSF1PO				X	AGAT	5q33.3–34
vWA	X	X	X		TCTA Complex	12p13.31
FGA	X	X	X	X	TTTC Complex	4q28
SE33	X	X	X		AAAG Complex	6q14

Tabela 7. 2 - Marcadores STRs estudados no cromossoma Y com o kit *AmpFlSTR® Yfiler®* da Applied Biosystems.

Marcadores	<i>AmpFlSTR® Yfiler®</i>	
	Applied	
DYS456	X	
DY389 I	X	
DYS390	X	
DYS389 II	X	
DYS458	X	
DYS19	X	
DY385 a/b	X	
DYS393	X	
DYS391	X	
DYS439	X	
DYS635	X	
DYS392	X	
Y GATA H4	X	
DYS437	X	
DYS438	X	
DYS448	X	

Tabela 7. 3 - Marcadores InDel estudados para o kit *Investigator® DIPplex* da Quiagen.

Marcadores	<i>DIPplex</i>	
	Quiagen	Cromossoma
Amelogenin	X	Xp22.1-22.3 e Yp11.2
HLD77	X	7q31.1
HLD45	X	2q31.1
HLD131	X	7q36.2
HLD70	X	6q16.1
HLD6	X	16q13
HLD111	X	17p11.2
HLD58	X	5q14.1
HLD56	X	4q25
HLD118	X	20p11.1
HLD92	X	11q22.2
HLD93	X	12q22
HLD99	X	14q23.1
HLD88	X	9q22.32
HLD101	X	15q26.1
HLD67	X	5q33.2
HLD83	X	8p22
HLD114	X	17p13.3

Marcadores	Quiagen	Cromossoma
HLD48	X	2q11.2
HLD124	X	22q12.3
HLD122	X	21q22.11
HLD125	X	22q11.23
HLD64	X	5q12.3
HLD81	X	7q21.3
HLD136	X	22q13.1
HLD133	X	3p22.1
HLD97	X	13q12.3
HLD40	X	1p32.3
HLD128	X	1q31.3
HLD39	X	1p22.1
HLD84	X	8q24.12

Anexo 2: Anexo referente ao estudo de ADNmt

Tabela 7. 4 - Primers utilizados na amplificação de ADNmt, para a região controlo total (HVI e HV2 e 3):

Região	Primers	Sequência 5' - 3'
HV1	L15997	5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3'
	H016	5'-TGA TAG ACC TGT GAT CCA TCG TGA-3'
HV2 e 3	L16555	5'-CCC ACA CGT TCC CCT TAA AT-3'
	H639	5'-GGG TGA TGT GAG CCC GTC TA-3'

Tabela 7. 5 - Primers utilizados no nested de ADNmt, para a região HV1 e HV2:

Região	Primers	Sequência 5' - 3'
HV1	L15997	5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3'
	H16401	5'-TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG-3'
HV2	L048	5'-CTC ACG GGA GCT CTC CAT GC-3'
	H408	5'-CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A-3'

Anexo 3: Anexo referente ao estudo da Amelogenina

Tabela 7. 6 - Par de primers usados na amplificação da amelogenina:

	Primer	Sequência 5' - 3'
Amel	Amel F	5'-GTT TCT TCC CTG GGC TCT GTA AAG AAT AGT G-3'
	Amel R	5'-ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG-3'

Anexo 4: Anexo referente ao estudo de Y-SNPs

Tabela 7. 7 - Pares de primers dos marcadores usados na amplificação multiplex para Y-SNPs e o tamanho dos produtos amplificados em pares de bases (pb):

Primer	Sequência 5' - 3'	Tamanho (pb)
M22 - F	5'-GCT GAT AGT CCT GGT TTC CCT A-3'	106
M22 - R	5'-TGA GCA TGC CTA CAG CAG AC-3'	
P25 - F	5'-GGA CCA TCA CCT GGG TAA AGT-3'	121
P25 - R	5'-AGT GCT TGT CCA AGG CAG TA-3'	
92R7 -F	5'-TGC ATG AAC ACA AAA GAC GTA-3'	55
92R7 -R	5'-GCA TTG TTA AAT ATG ACC AGC-3'	
SRY1532 -F	5'-TCC TTA GCA ACC ATT AAT CTG G-3'	167
SRY1532 - R	5'-AAA TAG CAA AAA CTG ACA CAA GGC-3'	
M70 - F	5'-TCA TAG CCC ACT ATA CTT TGG AC-3'	158
M70 - R	5'-CTG AGG GCT GGA CTA TAG GG-3'	
M173 - F	5'-GCA CAG TAC TCA CTT TAG GTT TGC-3'	172
M173 - R	5'-GCA GTT TTC CCA GAT CCT GA-3'	
Tat - F	5'-GAC TCT GAG TGT AGA CTT GTG A-3'	112
Tat - R	5'-GAA GGT GCC GTA AAA GTG TGA A-3'	
M213 - F	5'-GGC CAT ATA AAA ACG CAG CA-3'	208
M213 - R	5'-TGA ATG GCA AAT TGA TTC CA-3'	
M9 - F	5'-GCA GCA TAT AAA ACT TTC AGG-3'	340
M9 - R	5'-AAA ACC TAA CTT TGC TCA AGC-3'	

Tabela 7. 8 - Volumes de cada primer *forward* (F) e *reverse* (R) para amplificação de Y-SNPs, aplicados em cada reação.

Primers (10µM)	Volume total de 1µL (F + R)
M22	0,02µL + 0,02µL
P25	0,02µL + 0,02µL
92R7	0,02µL + 0,02µL
SRY1532	0,02µL + 0,02µL
M70	0,02µL + 0,02µL
M173	0,02µL + 0,02µL
Tat	0,03µL + 0,03µL
M213	0,04µL + 0,04µL
M9	0,035µL + 0,035µL

Tabela 7. 9 - Primers usados na minisequenciação por *SNaPshot* em Y-SNPs:

Primer	Sequência 5' - 3'
M22 - F (II)	5'-CCG CCA TTC CTG GTG GCT CT-3'
P25 - F (II)	5'-CCC CCC CTC TGC CTG AAA CCT GCC TG-3'
92R7 - R (II)	5'-CCC CGC ATG AAC ACA AAA GAC GTA GAA G-3'
SRY1532 - F(II)	5'-CCC CCC TTG TAT CTG ACT TTT TCA CAC ATG-3'
M70 - R (II)	5'-CCC CCC CCT AGG GAT TCT GTT GTG GTA GTC TTA G-3'
M173 - F (II)	5'-CCC CCC CCC CTT ACA ATT CAA GGG CAT TTA GAA C-3'
Tat - R (II)	5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC TCT GAA ATA TTA AAT TAA AAC AAC-3'
M213 - R (II)	5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC TCA GAA CTT AAA ACA TCT CGT TAC-3'
M9 - F (II)	5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CGA AAC GGC CTA AGA TGG TTG AAT-3'

Tabela 7. 10 - Volumes do primer *forward* (F) ou *reverse* (R) para a reação de *SNaPshot* aplicados em cada reação.

Primers (10µM)	Volume total de 1,27µL
M22 (F)	0,005µL
P25 (F)	0,0075µL
92R7 (R)	0,01µL
SRY1532 (F)	0,0075µL
M70 (R)	0,0075µL
M173 (F)	0,01µL
Tat (R)	0,01µL
M213 (R)	0,018µL
M9 (F)	0,0125µL

