

# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES**

### **VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MORFOLÓGICOS E MÉTRICOS PARA A ESTIMATIVA DO SEXO USANDO O GENE AMEL COMO MÉTODO CONFIRMATÓRIO**

Trabalho submetido por

**Alfredo Martins**

para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

**novembro de 2024**



# INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

## MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

### VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MORFOLÓGICOS E MÉTRICOS PARA A ESTIMATIVA DO SEXO USANDO O GENE AMEL COMO MÉTODO CONFIRMATÓRIO

Trabalho submetido por

**Alfredo Martins**

para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

Trabalho orientado por

**Prof. Doutora Nathalie Antunes-Ferreira**

e coorientado por

**Mestre Joana Couceiro**

**novembro de 2024**



## Dedicatória

À minha irmã,  
que sempre me disse para seguir os meus sonhos, e agora ela segue os seus.



## Agradecimentos

Gostaria por começar os meus agradecimentos, agradecendo à Egas Moniz School of Health and Science pela oportunidade de realizar a dissertação de mestrado que desejava e também por financiar a mesma.

Gostaria de agradecer ao Laboratório de antropologia Egas Moniz e o *Forensic, Biochemistry and Toxicology Lab* por me permitirem fazer os testes necessários e onde fui bem recebido.

Um grande obrigado às minhas orientadoras, Prof. Doutora Nathalie Antunes-Ferreira e a Mestre Joana Couceiro que sempre se disponibilizaram para me ajudar e acalmar em momentos que estava mais estressado. Gostaria de agradecer ao Prof. Doutor Alexandre Quintas, Prof. Doutor Carlos Família e Prof. Doutor Nuno Neng, que sempre ofereceram os seus conselhos e estenderam a sua ajuda. Um obrigado ao Dr. Pedro Henriques que foi fundamental para cortar os ossos. Ainda gostaria de agradecer à Daniela Rente e ao Gustavo Rocha, os técnicos dos laboratórios, que estavam sempre dispostos a ajudar e apoiar quando as coisas não corriam como desejado. Um obrigado especial ao Doutor João Teixeira que antes do início do trabalho prático ofereceu os seus conselhos e experiência.

Esta dissertação não poderia ter sido realizada sem o apoio dos meus colegas de ano e amigos. Cristina, Inês, Stella e Maria Beatriz, obrigado por me aturarem ao longo destes longos cinco anos e que venham mais. Rafaela e Catarina obrigado por se tornarem as minhas *work wives*, e estarem sempre lá para rir e para chorar quando era necessário. Bea, obrigado por teres sido a primeira a dizer: “Se precisares de ajuda, estou aqui.”, e ao fim de cinco anos continuas aqui. Sara, obrigado por ouvires os meus áudios de 30 minutos ou mais a falar de tudo e mais alguma coisa, o teu apoio tem sido fundamental ao longo destes 10 anos.

Um obrigado especial à minha família, sem eles não seria possível ter ido para mestrado e ter realizado a dissertação que fiz.

Um obrigado ao meu eu do passado que teve uma ideia louca de extrair DNA de osso para validar métodos e, iniciou assim, uma das minhas primeiras aventuras académicas. E espero que seja a primeira de muitas.

Obrigado a todos!



Declaração de honra:

Declaro, por minha honra, que o presente trabalho acadêmico é original e foi elaborado por mim próprio (a), não se tendo recorrido a quaisquer outras fontes, para além das indicadas, usadas, adotadas literalmente ou adaptados a partir dos seus originais (em fontes impressas, não impressas ou na internet) e encontram-se adequados, identificados e citados, com observância das convenções do trabalho acadêmico em vigor.

Mais declaro que esta Dissertação/Tese Validação de métodos morfológicos e métricos para a estimativa de sexo em adultos usando o gene AMEL como método confirmatório não foi apresentada, para efeitos de avaliação, a qualquer outra entidade ou instituição, para além da(s) diretamente envolvida(s) na sua elaboração, e que os conteúdos das versões impressa e eletrónica são inteiramente coincidentes.

Declaro, igualmente, encontrar-me ciente de que a inclusão, neste texto, de qualquer falsa declaração terá consequências legais.

Data: 22/11/2024



Declaração de Conflitos:

Eu Alfredo Rafael Azinheira Martins, referente a Dissertação/Tese Validação de métodos morfológicos e métricos para a estimativa de sexo em adultos usando o gene AMEL como método confirmatório declaro que não possuo conflitos de interesse de ordem pessoal, comercial, académica, político ou financeiro.

Data: 22/11/2024



Declaração de Financiamento:

Eu Alfredo Rafael Azinheira Martins, referente a Dissertação/Tese Validação de métodos morfológicos e métricos para a estimativa de sexo em adultos usando o gene AMEL como método confirmatório declaro que o meu trabalho se encontra financiado pela Egas Moniz School of health and science no montante de 500 euros.

O montante permitiu comprar *primers* necessários para a amplificação do DNA, material de limpeza e reagentes.



## Resumo

Na bioarqueologia e em antropologia forense, o perfil biológico é imprescindível para o estudo paleobiológico e no processo de identificação humana, respetivamente. No perfil biológico são estimados parâmetros como as afinidades populacionais, o sexo, a idade e a estatura. O sexo é fundamental dado ter impacto na seleção dos métodos para as estimativas da idade e estatura. O sexo pode ser estimado a partir de métodos morfológicos, que têm por base a observação direta do osso e os métodos métricos, que têm por base a medição dos ossos. No entanto, a estimativa do sexo é afetada por vários fatores, como as afinidades populacionais, as mudanças seculares, o nível hormonal, a idade, entre outros. Neste estudo, selecionou-se métodos morfológicos amplamente usados e métodos métricos validados em coleções portuguesas. Para validar os resultados recorreu-se à análise dos genes *AMEL* e *SRY*. O gene *AMEL* está presente em ambos os sexos, apresentando-se nos cromossomas sexuais, enquanto o gene *SRY* só se apresenta no cromossoma Y, ou seja, presente no sexo masculino. A estimativa do sexo em 10 indivíduos adultos revelou resultados contraditórios, entre os diferentes métodos, em oito, havendo somente dois em que os resultados foram concordantes. O osso foi obtido a partir do corte da ponte entre o canal carótico e a fossa jugular para realizar a extração de DNA. O DNA foi extraído utilizando um método de extração orgânica. Dos 10 indivíduos, extraiu-se com sucesso o DNA de quatro indivíduos, sendo dois do sexo masculino e dois do sexo feminino. Um dos indivíduos apresenta resultados contraditórios quando se compara o sexo com o sexo estimado, os restantes três apresentam concordância entre os dois. Concluiu-se que é necessária uma amostra de maiores dimensões para validar e comparar os métodos entre si, de forma a tornar mais rigorosas as estimativas de sexo.

Palavras chave: Adultos; Sexo; Extração de DNA; gene *AMEL*



## Abstract

In bioarcheology and forensic anthropology, the biological profile is essential for palaeobiological studies and in the identification of human remains, respectively. The biological profile studies population affinities, sex, age, and stature. Sex estimation is crucial as it impacts the selection of age and stature estimation methods. Sex can be estimated through morphological methods, based on direct observation of bones, and metric methods, based on bone measurements. However, sex estimation can be influenced by various factors, such as population affinities, secular changes, hormonal levels and age, among others. This study selected widely used morphological methods and metric methods validated in Portuguese collections. *AMEL* and *SRY* genes were analyzed. The *AMEL* gene is present in both sexes, located on the sex chromosomes, while the *SRY* gene only present in the Y chromosome, indicative of a male individual. Sex estimation in 10 individuals revealed contradictory results in eight cases, with only two cases showing agreement. The bone sample was obtained through a cut from the bridge between the carotid canal and the jugular foramen for extraction. DNA was extracted using an organic extraction method. Out of the 10 individuals, DNA was successfully extracted from four: two classified as male and two as female. One individual presented contradictory results when comparing the genetic sex with the estimated sex, while the remaining three showed agreement between the two. It is concluded a larger sample is required to validate and compare the methods, making sex estimates more accurate.

Key words: Adults; Sex; DNA extraction; AMEL gene



## Índice

1. Introdução .....	17
1.1. Coleções de esqueletos identificados (CEI): .....	17
1.2. Dimorfismo Sexual no esqueleto:.....	18
1.3. Problemática: .....	19
1.4. Estrutura molecular óssea e preservação de DNA: .....	20
1.5. Mudanças genéticas e temporais <i>post-mortem</i> : .....	22
1.6. Corte .....	23
1.7. Gene Amelogenina ( <i>AMEL</i> ): .....	23
1.8. Gene da região determinante do sexo Y ( <i>SRY</i> ):.....	24
1.10. Extração .....	25
1.11. <i>Polymerase Chain Reaction – Amplified Product Length Polymorphism</i> (PCR-APLP) .....	26
1.12. Eletroforese .....	28
1.13. Objetivo: .....	30
2. Materiais e Métodos: .....	31
2.1. Materiais: .....	31
2.2. Métodos: .....	31
2.2.1. Índice de Conservação Anatômica (ICA):.....	31
2.2.2. Afinidades Populacionais: .....	32
2.2.3. Sexo: .....	32
2.2.3.1. Métodos morfológicos:.....	32
2.2.3.2. Métodos Métricos:.....	33
2.2.3.2.1. Método de Gama et al. (2015):.....	33
2.2.3.2.2. Método de Curate et al. (2021) para o rádio:.....	33
2.2.3.2.3. Método de Cardoso (2000):.....	33
2.2.3.2.4. Método de Wasterlain (2000):.....	35

2.2.3.2.5. Método de Maio et al. (2024): .....	36
2.2.3.2.6. Método de Harris & Case (2012): .....	37
2.2.3.2.7. Método de Curate et al. (2021) para o tarso: .....	38
2.2.4. Estatura: .....	38
2.2.5. Idade: .....	38
2.2.6. Metodologia de corte: .....	39
2.2.7. Metodologia Genética: .....	40
2.2.7.1. Extração de DNA: .....	40
2.2.7.2. PCR-APLP: .....	41
2.2.7.3. Eletroforese.....	42
2.2.7.4. Sequênciação de Sanger: .....	43
2.2.8. Metodologia estatística – erro intra-observador: .....	43
2.2.9. Metodologia estatística – exatidão: .....	44
3. Resultados e Discussão: .....	45
3.1. Índice de Conservação Anatômica (ICA): .....	45
3.2. Afinidades populacionais: .....	45
3.3. Sexo: .....	46
3.4. Estatura: .....	69
3.5. Idade: .....	70
3.6. Corte da ponte: .....	71
3.7. Genética: .....	72
3.8. Estatística – erro intra-observador: .....	80
3.9. Estatística – exatidão: .....	84
4. Conclusão: .....	91
5. Bibliografia.....	93

## Índice de Figuras

- Figura 1: Dimorfismo sexual no crânio e no osso coxal. (A) Vista frontal e lateral dos indivíduos do sexo masculino e feminino. (B) Vista superior e anterior dos indivíduos do sexo feminino e masculino. (Adaptado de Whiter et al. (2012))...... 19
- Figura 2: Representação gráfica da composição do osso em percentagem por peso (wt%). Imagem retirada de (Shehata & Krap, 2024)..... 21
- Figura 3: Fragmentação, depurinação e desaminação. (A) Desaminação da purina guanina ou adenina seguida de uma fragmentação da cadeia fosfolipídica; (B) Desaminação da citosina em uracilo; (C) Desaminação do 5-metilcitosina em timina. Moléculas criadas a partir d JSME: a free molecule editor in JavaScript (Bienfait & Ertl, 2013) ..... 22
- Figura 4: Bloqueadores da Taq polimerase. (A) Alcalinação de duas timinas que pode ocorrer na mesma cadeia ou entre cadeias de DNA; (B) Mudança nucleotídica de guanina para xantina; (C) Mudança nucleotídica de adenina para hipoxantina . Moléculas criadas a partir d JSME: a free molecule editor in JavaScript (Bienfait & Ertl, 2013) ..... 23
- Figura 5: Imagem alusiva à realização do corte e perfuração ..... 23
- Figura 6: Mapa dos cromossomas sexuais humanos X (esquerda) e Y (direita), imagem retirada de (Butler & Li, 2014)..... 24
- Figura 7: Modo do funcionamento do PCR-APLP. .... 26
- Figura 8: Semelhança entre o exão dois do gene *AMELX* e o exão três do gene *AMELY*. A negrito destaca-se as diferenças entre os exões. A negrito e azul do gene *AMELX* e a negrito e amarelo do gene *AMELY* estão em destaque os locais de ligação dos *primers*, sendo que do gene *AMELY* é o SNP..... 27
- Figura 9: Funcionamento dos *Primers* Sense (S) do gene *AMEL*. No gene *AMELX*, as bases nucleotídicas com fundo rosa representam à base esperada. O *primer* específico *forward* utilizado foi o AMELXE2A (caixa roxa) que se liga à sequência antisense. No gene *AMELY*, o SNP está destacado com fundo amarelo e o complementar ao SNP está destacado com fundo verde. O *primer* específico *forward* usado foi o AMELYE2A (caixa azul-claro), que se liga à sequência antisense. O *primer* reverse AMELE2AR (caixa amarela) é comum aos dois genes, que se liga à sequência sense. .... 27
- Figura 10: Funcionamento dos *Primers* Antisense (AS) do gene *AMEL*. No gene *AMELX*, as bases nucleotídicas com fundo rosa representam à base esperada. O *primer* específico

*reverse* utilizado foi o AMELXE2B (caixa rosa-claro) que se liga à sequência sense. No gene *AMELY*, o SNP está destacado com fundo amarelo e o complementar ao SNP está destacado com fundo verde. O *primer* específico *reverse* utilizado foi o AMELYE2B (caixa azul), que se liga à sequência sense. O *primer forward* AMELE2BF (caixa amarela) é comum aos dois genes, que se liga à sequência antisense. .... 28

Figura 11: Funcionamento dos *primers* do gene *SRY*. O *primer* SRYF (caixa verde) é o *forward*, que se liga à sequência antisense, enquanto o *primer* SRYR (caixa laranja) é o *reverse* que se liga à sequência sense. .... 28

Figura 12: Formação da matriz do gel de agarose. Imagem retirada de (Steward, 2022) ..... 29

Figura 13: Formação da matriz do gel de poliacrilamida. Imagem retirada de National Diagnostics (National Diagnostics, 2011) ..... 29

Figura 14: Programa de PCR-APLP para amplificação do gene *AMEL* e *SRY* com os *primers reverse* ..... 42

Figura 15: Programa de PCR-APLP para amplificação do gene *AMEL* e *SRY* com os *primers forward* ..... 42

Figura 16: Corte da ponte do indivíduo 8, vista inferior da base do crânio. (A) antes do corte; (B) durante o corte; (C) pós o corte. .... 71

Figura 17: Gel de agarose com os resultados da amplificação do gene *AMEL*. Comparação do indivíduo 6 (I6) do qual a ponte foi totalmente usada com o 10 (I10) do qual se utilizou 100 mg de ponte pulverizada. C+, Controlo positivo; C-, controlo negativo. .... 73

Figura 18: Gel de agarose com os resultados da amplificação do gene *AMEL* e *SRY*. CAS-, controlo negativo do gene *AMEL* e *SRY* (*primers* antisense); CA(S)-, controlo negativo do gene *AMEL* (*primers* sense); CS(S)-, controlo negativo do gene *SRY* (*primers* sense). O marcador (M) está ao centro e a zona de interesse apresenta-se entre os 75 pb e 50 pb. .... 74

Figura 19: Gel de agarose com os resultados da amplificação do gene *AMEL* e *SRY*. O gel no lado direito apresenta as amplificações dos *primers* AS. CAas-, controlo negativo do gene *AMEL*; Maas, controlo positivo masculino do gene *AMEL*; MSas, controlo positivo masculino do gene *SRY*; FAas, controlo positivo feminino do gene *AMEL*; FSas, controlo positivo feminino do gene *SRY*; CSas-, controlo negativo do gene *SRY* Ao centro

apresenta-se o marcador (M), a zona de interesse é entre os 75 pb e os 50 pb. No lado esquerdo apresenta as amplificações dos *primers* Sense. CAs-, controlo negativo do gene *AMEL*; MAs, controlo positivo masculino do gene *AMEL*; MSs, controlo positivo masculino do gene *SRY*; FAs, controlo positivo feminino do gene *AMEL*; CSs-, controlo positivo feminino do gene *SRY*; FSs, controlo positivo feminino do gene *SRY*. O marcador (M) está ao centro e a zona de interesse apresenta-se entre os 75 pb e 50 pb..... 75

Figura 20: Géis de agarose com resultados da amplificação do gene *AMEL* e *SRY*. O gel (A) apresenta o branco da 1ª e 2ª extração e do indivíduo 7. CA-, controlo negativo do gene *AMEL*; B1A, branco da 1ª extração do gene *AMEL*; B2A, branco da 2ª extração do gene *AMEL*; I7A, indivíduo 7 do gene *AMEL*; CS-, controlo negativo do gene *SRY*; B1S, branco da 1ª extração do gene *SRY*; B2S, branco da 2ª extração do gene *SRY*; I7S, indivíduo 7 do gene *SRY*. O gel (B) apresenta os indivíduos 1, 2 e 3. CA-, controlo negativo do gene *AMEL*; I1A, indivíduo 1 do gene *AMEL*; I2A, indivíduo 2 do gene *AMEL*; I3A, indivíduo 3 do gene *AMEL*; CS-, controlo negativo do gene *SRY*; I1S, indivíduo 1 do gene *SRY*; I2S, indivíduo 2 do gene *SRY*; I3S, indivíduo 3 do gene *SRY*. O gel (C) apresenta os indivíduos 4, 5 e 6. CA-, controlo negativo do gene *AMEL*; I4A, indivíduo 4 do gene *AMEL*; I5A, indivíduo 5 do gene *AMEL*; I6A, indivíduo 6 do gene *AMEL*; CS-, controlo negativo do gene *SRY*; I4S, indivíduo 4 do gene *SRY*; I5S, indivíduo 5 do gene *SRY*; I6S, indivíduo 6 do gene *SRY*. O marcador (M) está ao centro e a zona de interesse apresenta-se entre os 75 pb e 50 pb. .... 76

Figura 21: Géis de agarose com resultados da amplificação do gene *AMEL* e *SRY*. O gel (A) apresenta os indivíduos 8, 9 e 10. CA-, controlo negativo do gene *AMEL*; I8A, indivíduo 8 do gene *AMEL*; I9A, indivíduo 9 do gene *AMEL*; I10A, indivíduo 10 do gene *AMEL*; CS-, controlo negativo do gene *SRY*; I8S, indivíduo 8 do gene *SRY*; I9S, indivíduo 9 do gene *SRY*; I10S, indivíduo 10 do gene *SRY*. O gel (B) apresenta os indivíduos 10. CA-, controlo negativo do gene *AMEL*; I10A, indivíduo 10 do gene *AMEL*; CS-, controlo negativo do gene *SRY*; I10S, indivíduo 10 do gene *SRY*. O marcador (M) está ao centro e a zona de interesse apresenta-se entre os 75 pb e 50 pb. .... 77

Figura 22: Géis de agarose com resultados da amplificação do gene *AMEL* e *SRY*. O gel (A) apresenta os indivíduos 1, 2 e 3. CAS-, controlo negativo do gene *AMEL*; I1AS, indivíduo 1 do gene *AMEL*; I2AS, indivíduo 2 do gene *AMEL*; I3AS, indivíduo 3 do gene *AMEL*; CSS-, controlo negativo do gene *SRY*; I1SS, indivíduo 1 do gene *SRY*; I2SS, indivíduo 2 do gene *SRY*; I3SS, indivíduo 3 do gene *SRY*. O gel (B) apresenta os

indivíduos 4, 5 e 6. CAS-, controlo negativo do gene *AMEL*; I4AS, indivíduo 4 do gene *AMEL*; I5AS, indivíduo 5 do gene *AMEL*; I6AS, indivíduo 3 do gene *AMEL*; CSS-, controlo negativo do gene *SRY*; I4SS, indivíduo 4 do gene *SRY*; I5SS, indivíduo 5 do gene *SRY*; I6SS, indivíduo 6 do gene *SRY*. O gel (C) apresenta os indivíduos 7, 8, 9 e 10. CAS-, controlo negativo do gene *AMEL*; I7AS, indivíduo 7 do gene *AMEL*; I8AS, indivíduo 8 do gene *AMEL*; I9AS, indivíduo 8 do gene *AMEL*; I10AS, indivíduo 10 do gene *AMEL*; CSS-, controlo negativo do gene *SRY*; I7SS, indivíduo 7 do gene *SRY*; I8SS, indivíduo 8 do gene *SRY*; I9SS, indivíduo 9 do gene *SRY*; I10SS, indivíduo 10 do gene *SRY*. O marcador (M) está ao centro e a zona de interesse apresenta-se entre os 75 pb e 50 pb.78

Figura 23: Eletroferograma do gene *AMEL* do indivíduo 10 e alterações nucleotídicas. Destacado a amarelo está o SNP de interesse para confirmar o sexo do indivíduo. Bases nucleotídicas com cores atrás representam algumas das alterações. .... 79

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Índice de conservação anatómica .....	31
Tabela 2: Ossos e as respectivas metodologias morfológicas aplicadas .....	32
Tabela 3: Ponto de cisão em milímetros e a respetiva classificação correta entre a amostra de treino e a amostra de teste.....	33
Tabela 4: Medidas do sexo feminino (Fem<), masculino (Masc>) e ponto de cisão em milímetros. Classificação correta para os diferentes sexos e total (%) .....	34
Tabela 5: Medidas do ponto de cisão em milímetros. Classificação correta para os diferentes sexos e total (%).....	35
Tabela 6: Medidas do ponto de cisão .....	36
Tabela 7: Equação, em que o resultado é em milímetros. Classificação correta para os diferentes sexos e total (%).....	37
Tabela 8: Pontos de cisão aplicado ao tarso .....	38
Tabela 9: Estimativa da estatura.....	38
Tabela 10: Distribuição de idades .....	39
Tabela 11: Nome dos primers, a sua respetiva sequência e concentração final (uM) na mix de PCR.....	41
Tabela 12: ICA dos esqueletos da amostra.....	45
Tabela 13: Afinidade populacional (%) dos indivíduos da amostra.....	45
Tabela 14: Distribuição por sexo dos indivíduos da amostra.....	46
Tabela 15: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 1 .....	50
Tabela 16: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 2 .....	52
Tabela 17: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 3 .....	54
Tabela 18: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 4 .....	56
Tabela 19: Medições respetivas estimativas do indivíduo 5 .....	58
Tabela 20: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 6 .....	60
Tabela 21: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 7 .....	62

Tabela 22: Medições e respectivas estimativas do indivíduo 8 .....	64
Tabela 23: Medições e respectivas estimativas do indivíduo 9 .....	66
Tabela 24: Medições e respectivas estimativas do indivíduo 10 .....	68
Tabela 25: Estatura dos indivíduos da amostra .....	70
Tabela 26: Idade dos indivíduos da amostra esquelética.....	70
Tabela 27: Peso da ponte no osso temporal dos indivíduos da amostra.....	71
Tabela 28: Erro intra-observador para cada medida do axis, úmero e rádio .....	81
Tabela 29: Erro intra-observador para cada medida do rádio, fémur, rótula e tibia.....	82
Tabela 30: Erro intra-observador para cada medida do tarso .....	83
Tabela 31: Exatidão (Ex%) das medidas utilizadas no úmero .....	85
Tabela 32: Exatidão (Ex%) das medidas utilizadas no rádio e fémur .....	86
Tabela 33: Exatidão (Ex%) das medidas utilizadas na rótula, tibia e talus .....	87
Tabela 34: Exatidão (Ex%) das medidas utilizadas no calcâneo e tarso .....	88
Tabela 35: Exatidão (%) de cada metodologia .....	89

## Lista de Abreviaturas

- CMA – Comprimento máximo do axis
- CMBH – Altura máxima do corpo do calcâneo
- CM8 – Largura do tubérculo do calcâneo
- C1 – Comprimento máximo do calcâneo
- C2 – Comprimento do calcâneo
- C3 – Comprimento do corpo do calcâneo
- C4 – Largura Média
- DCalcLg – Comprimento do calcâneo direito
- DCF1Brd – Largura do 1º cuneiforme direito
- DCF1Ht – Altura do 1º cuneiforme direito
- DCF1Lg – Comprimento do 1º cuneiforme direito
- DCF2Brd – Largura do 1º cuneiforme direito
- DCF2Ht – Altura do 2º cuneiforme direito
- DCF3Ht – Altura do 3º cuneiforme direito
- DCF3Lg – Comprimento do 3º cuneiforme direito
- DCubBrd – Largura do cuboide direito
- DNavBrd – Largura do navicular direito
- DSMC – Diâmetro máximo sagital do corpo do axis
- DTalHt – Altura do talus direito
- DTalLg – Comprimento do talus direito
- ECalcLg – Comprimento do calcâneo esquerdo
- ECF1Brd – Largura do 1º cuneiforme esquerdo
- ECF1Lg – Comprimento do 1º cuneiforme esquerdo
- ECF3Ht – Altura do 3º cuneiforme esquerdo
- ECF3Lg – Comprimento do 3º cuneiforme esquerdo

ECubBrd – Largura do cuboide esquerdo

ENavBrd – Largura do navicular esquerdo

ETalBrd – Largura do talus esquerdo

ETalHt – Altura do talus esquerdo

ETalLg – Comprimento do talus esquerdo

FCF – Comprimento total em posição natural do fémur

FCM – Comprimento máximo do fémur

FCT – Comprimento do trocânter do fémur

FDSM – Diâmetro sagital a meio da diáfise do fémur

FDSS – Diâmetro sagital subtrocanteriano do fémur

FDTC – Diâmetro transversal da cabeça do fémur

FDTS – Diâmetro transversal sub-trocânteriano do fémur

FDTM – Diâmetro transversal a meio da diáfise do fémur

FDVC – Diâmetro vertical da cabeça do fémur

FLB – Largura bicondilar do fémur

FPM – Perímetro mínimo do fémur

F1 – Comprimento máximo do fémur

F2 – Comprimento total em posição natural do fémur

F3 – Diâmetro ântero-posterior a meio da diáfise do fémur

F4 – Diâmetro transversal a meio da diáfise do fémur

F5 – Diâmetro ântero-posterior subtrocanteriano do fémur

F6 – Diâmetro transversal máximo subtrocanteriano do fémur

F7 – Perímetro ao meio do fémur

F8 – Diâmetro transversal da cabeça do fémur

F9 – Diâmetro vertical da cabeça do fémur

HAF – Altura máxima da superfície articular da rótula

IEWR – Largura da epífise do rádio

LMA – Largura máxima do axis

LAFB – Distância máxima entre a crista vertical e o extremo lateral da superfície articular da rótula

LMFSD – Largura máxima da faceta superior direita do axis

MAFB – Distância máxima entre a crista vertical e o extremo media da superfície articular da rótula

MAXB – Distância máxima entre o extremo medial e o lateral da rótula

MAXH – Distância máxima entre a base e o ápex da rótula

MAXT – Espessura máxima entre a região anterior e posterior da rótula

MCDDR – Circunferência mínima da diáfise distal do rádio

RCF – Comprimento funcional do rádio

RCM – Comprimento máximo do rádio

RPM – Perímetro mínimo do rádio

R1 – Comprimento máximo do rádio

R2 – Comprimento fisiológico do rádio

R3 – Perímetro mínimo do rádio

Ta1 – Comprimento do talus

Ta2 – Largura do talus

Ta3 – Altura do talus

TCM – Comprimento máximo da tíbia

TCN – Comprimento natural da tíbia

TCT – Comprimento total da tíbia

TDT – Diâmetro transversal da tíbia ao nível do buraco nutritivo

TDS – Diâmetro sagital da tíbia ao nível do buraco nutritivo

TLB – Largura bi-articular da tíbia

TM1 – Comprimento máximo do talus

TM4 – Comprimento máximo da tróclea do talus

TM5 – Largura máxima da tróclea do talus

TPM – Perímetro mínimo da tíbia

T1 – Comprimento máximo da tíbia

T2 – Comprimento em posição natural da tíbia

T3 – Diâmetro ântero-posterior ao nível do buraco nutritivo da tíbia

T4 – Diâmetro transverso ao nível do buraco nutritivo da tíbia

T5 – Perímetro mínimo da tíbia

T6 – Largura bi-articular da tíbia

T7 – Comprimento total da tíbia

UCM – Comprimento máximo do úmero

UCT – Comprimento total do úmero

UDMA – Diâmetro máximo do úmero a meio da diáfise

UDMI – Diâmetro mínimo do úmero a meio da diáfise

UDTC – Diâmetro transversal da cabeça do úmero

UDVC – Diâmetro vertical da cabeça do úmero

ULB – Largura bi-epicondiliana do úmero

UPM – Perímetro mínimo do úmero

U1 – Comprimento máximo do úmero

U2 – Comprimento fisiológico do úmero

U3 – Diâmetro vertical da cabeça do úmero

U4 – Diâmetro transverso da cabeça do úmero

U5 – Diâmetro máximo a meio da diáfise do úmero

U6 – Diâmetro mínimo a meio da diáfise do úmero

U7 – Perímetro mínimo do úmero

U8 – Largura epicondiliana do úmero

## 1. Introdução

Na bioarqueologia e em antropologia forense a estimativa do perfil biológico é imprescindível, dado que o primeiro permite o estudo demográfico de uma população e o segundo auxilia na identificação dos indivíduos (Curate, 2022). No perfil biológico são estimados parâmetros como o sexo, a idade, a estatura e as afinidades populacionais. Destes, a estimativa do sexo é de elevada importância, dado que o sexo deve ser avaliado previamente aos restantes, pois tem impacto na seleção de métodos para as estimativas da idade e estatura. Importa referir que o sexo que se estima a partir de remanescentes biológicos é o sexo biológico (Curate, 2022).

A bioarqueologia é uma subdisciplina da antropologia biológica, que se foca no estudo do esqueleto. Trabalha em sinergia com a arqueologia, permitindo o estudo paleobiológico de populações (Cheverko et al., 2020; Curate, 2022). Por sua vez, a paleobiologia tem como objetivo reconstruir a vida, história e comportamentos das populações antigas, como a dieta, saúde, doença, práticas culturais, etc. (Eckhardt, 2000).

A antropologia forense é uma subdisciplina da antropologia biológica, com a aplicação em contexto médico legal. Nesta especialidade a avaliação do perfil biológico é essencial no processo de identificação humana (Curate, 2022; Franklin & Marks, 2022).

### 1.1. Coleções de esqueletos identificados (CEI):

As CEI são pilares para a bioarqueologia e a antropologia forense. Sem estas não se poderiam desenvolver metodologias para aplicar no estudo paleodemográfico, perfil biológico e paleopatologia.

As CEI são coleções das quais se tem conhecimento dos dados biográficos dos indivíduos, como o sexo, a idade, a estatura, as afinidades populacionais, ocupação profissional, entre outros (Rowbotham, 2016; Santos, 2020). Estas coleções são criadas com o intuito de serem estudadas por profissionais da área, assim como estudantes. As coleções têm múltiplas origens como cemitérios, hospitais, institutos de medicina legal, doações, etc. Para cada uma destas diferentes fontes de origem, há normas e protocolos que devem ser seguidos e que seguem os conselhos de ética e as leis do país (Henderson, 2018; Rowbotham, 2016; Santos, 2020).

Com a criação das coleções foi possível verificar-se variações no esqueleto humano, como o dimorfismo sexual, e conseqüentemente desenvolver técnicas que podem ser aplicadas a indivíduos não identificados (Santos, 2020). As técnicas têm por base métodos

morfológicos e métricos (Curate, 2022). Há também coleções que servem apenas para o estudo das doenças nos ossos, como a tuberculose, sífilis, entre outras (Santos, 2020).

Em Portugal existem quatro grandes coleções de esqueletos identificados (CEI). A CEI da Universidade de Coimbra (CEIC), a CEI do século XXI (do Laboratório de Antropologia Forense da Universidade de Coimbra), a CEI do Museu Nacional de História Natural de Lisboa, a Coleção Luís Lopes (CEIL) e a CEI da Universidade de Évora (CEIE). A universidade de Coimbra tem ainda a coleção da Faculdade de Medicina e a coleção de troca internacional, ambas apenas com crânios. No Porto existe a coleção Mendes Correia e a coleção da Delegação de Medicina Legal do Norte (Lopes & Fernandes, 2022).

### 1.2. Dimorfismo Sexual no esqueleto:

O dimorfismo sexual é definido como a diferenças de tamanhos, forma, taxa de desenvolvimento e comportamento do esqueleto entre os sexos da mesma espécie, sendo o resultado de fatores internos e externos. No ser humano esta diferença de tamanho varia entre 0 e 20% (Klales, 2020; Moore, 2013; Rowbotham, 2016).

Os fatores intrínsecos são fatores internos do indivíduo, como, por exemplo, o nível hormonal. A variação de testosterona influencia as características masculinas, enquanto a variação de estrogénio influencia as características femininas, em cada um dos sexos. A partir da adolescência manifestam-se as características sexuais no esqueleto, havendo uma maior fiabilidade na estimativa a partir dos 18 anos. Alguns elementos esqueléticos, como a dentição e os ossos da bacia, tornam-se sexualmente dimórficos mais cedo, facilitando a identificação do sexo de indivíduos mais novos (Klales, 2020; Mays & Cox, 2000; Rowbotham, 2016).

Os fatores extrínsecos, são, como o nome indica, externos ao indivíduo. Por exemplo, a nutrição ou a atividade biomecânica (Klales, 2020; Moore, 2013).

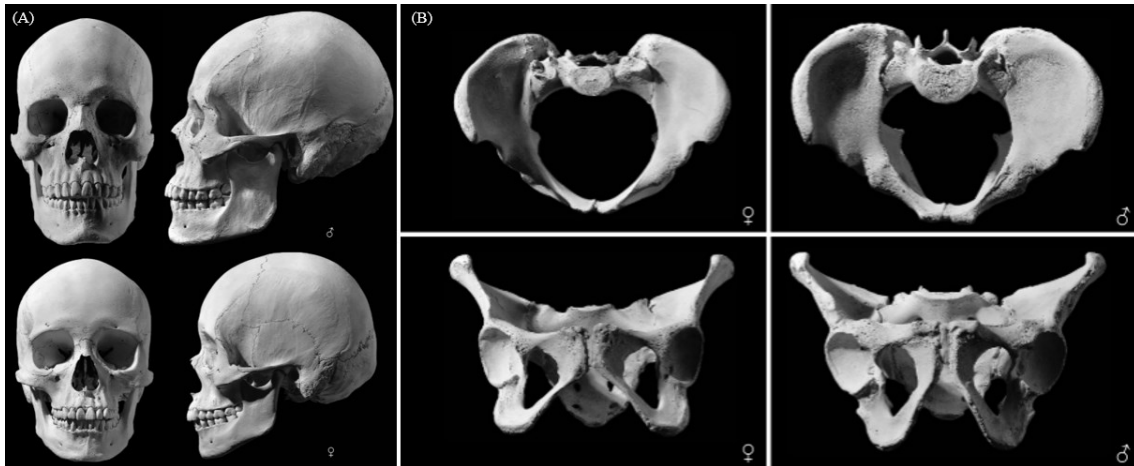


Figura 1: Dimorfismo sexual no crânio e no osso coxal. (A) Vista frontal e lateral dos indivíduos do sexo masculino e feminino. (B) Vista superior e anterior dos indivíduos do sexo feminino e masculino. (Adaptado de Whiter et al. (2012).

### 1.3.Problemática:

Quando se desenvolvem metodologias, a partir das CEI e se a aplica a esqueletos de indivíduos desconhecidos há fatores que não se consideram, ocorrendo, por conseguinte, limitações na sua aplicação.

O primeiro fator a considerar é o contexto de onde provém o esqueleto, se é de natureza arqueológica ou forense. Após determinar a natureza do mesmo, prossegue-se com a seleção das metodologias mais adequadas. Se o indivíduo em estudo for um esqueleto arqueológico utilizar metodologias que provém de uma CEI que tem indivíduos com características biológicas semelhantes terá resultados mais fiáveis do que aplicar metodologias desenvolvidas a partir de uma CEI com esqueletos mais recentes. Como tal é necessário entender a natureza das CEI de forma a garantir que as metodologias aplicadas são as mais adequadas (Henderson, 2018).

As coleções são criadas tendo por base populações específicas, logo com características biológicas específicas. Portanto, as metodologias desenvolvidas nessas coleções só deveriam ser aplicadas a populações semelhantes. Por exemplo, a estimativa das afinidades populacionais é de elevada importância de forma a se selecionar metodologias que proveem de coleções específicas mais indicadas para esse indivíduo. Com efeito, uma metodologia para estimar o sexo de um português de origem europeia não pode ser usado para estimar o sexo de um português de origem africana, dado a haver variações entre as populações (Cunha & Ubelaker, 2020; Rowbotham, 2016).

Mudanças seculares são mudanças que ocorrem ao longo das gerações/ décadas como resultado das mudanças das condições de vida (Langley & Jantz, 2020). Duas destas mudanças são o aumento da estatura e a idade da menarca. Por exemplo, desde o século XX que se verifica uma melhoria de qualidade de vida na Europa, traduzindo-se num aumento de estatura. Como consequência das mudanças do estilo de vida, ocorreram modificações de tamanho e forma do esqueleto humano, como tal o resultado da aplicação de metodologias que tem por base CEI dos séculos passados pode não ser o mais adequado (Langley & Jantz, 2020; White et al., 2012).

Os fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar o esqueleto, por isso, são fatores que devem ser considerados. Um fator intrínseco, como uma baixa produção hormonal, pode resultar num menor dimorfismo sexual, o que, como consequência pode levar a uma estimativa imprecisa. Nos fatores externos as doenças que temporariamente, podem perturbar o crescimento/maturação do esqueleto, afetando negativamente o esqueleto e dificultando a estimativa do sexo. Outros fatores a considerar são nutrição, stress fisiológico, etc. (Mays & Cox, 2000; Rowbotham, 2016; White et al., 2012).

O estado de conservação e representatividade do esqueleto é também uma limitação na estimativa sexual. Se os ossos estiverem muito degradados e/ou fragmentados, não será possível aplicar as metodologias morfológicas e métricas ou então poderão ser aplicadas a ossos ou regiões ósseas menos discriminantes (Rowbotham, 2016).

O último fator a considerar é a idade. Com as alterações hormonais associadas ao avançar da idade têm impacto no esqueleto. Consequentemente, os ossos podem sofrer alterações que afetarão o dimorfismo sexual, dificultando a estimativa do sexo (Rowbotham, 2016). Por exemplo, no sexo feminino, o crânio poderá sofrer uma masculinização, enquanto no sexo masculino, os ossos da bacia poderão ficar mais gráceis (feminização) (Nawrocki, 2010; Walker, 1995).

#### 1.4. Estrutura molecular óssea e preservação de DNA:

A estrutura molecular do osso é dividida entre a matéria orgânica (25%), da qual mais de 90% é colagénio I, inorgânica (60-70%) e água (9-10%). A matéria orgânica, que contém DNA (osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células de revestimento ósseo) representa 2% do tecido ósseo (figura 2) (Andreeva et al., 2022; Feng, 2009; Florencio-Silva et al., 2015; Shehata & Krap, 2024; White et al., 2012).

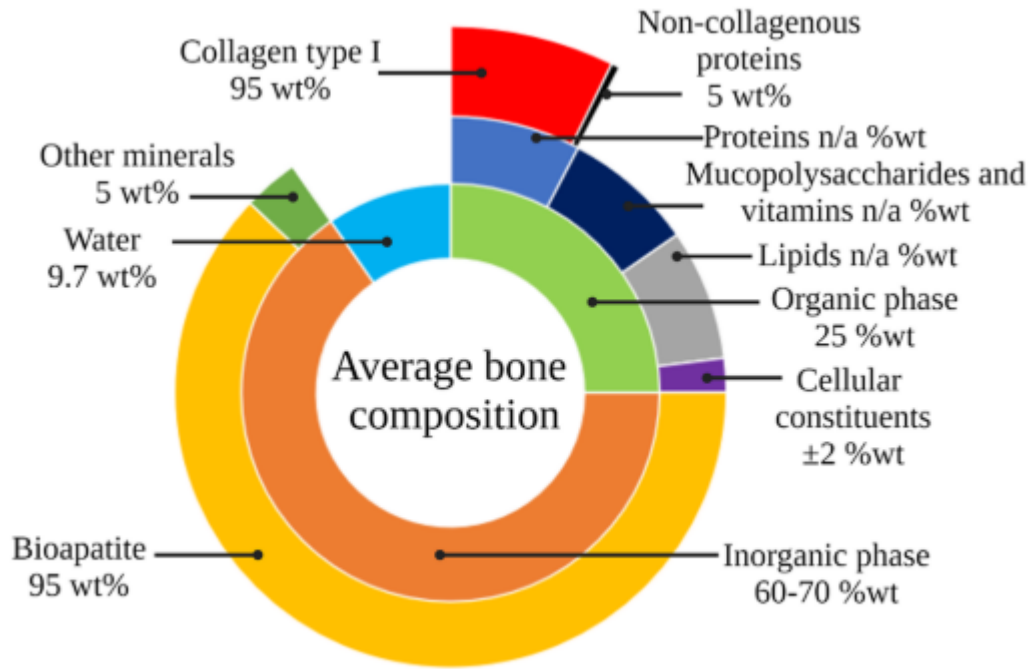


Figura 2: Representação gráfica da composição do osso em porcentagem por peso (wt%). Imagem retirada de (Shehata & Krap, 2024)

A degradação do tecido ósseo divide-se em dois processos. O primeiro acontece rapidamente com a participação de microrganismos (bactérias e fungos), especialmente se o ambiente onde o esqueleto se encontrar for um ambiente aeróbio. O segundo processo é a degradação química dos componentes do osso, que ocorre mais lentamente. A degradação química mais comum é hidrólise das purinas (depurinação). Os fatores que afetam mais a hidrólise é a temperatura, a humidade e o pH (Andreeva et al., 2022; Hagelberg et al., 1991; Turner-Walker et al., 2002).

As modificações post-mortem de DNA acumulam-se conforme a antiguidade do esqueleto, porém a sua frequência relaciona-se não só com a antiguidade, como também com o ambiente onde este se encontra (Bell et al., 1996).

A água tem um papel fulcral na degradação e seleção da área do esqueleto onde se poderá extrair o DNA. A infiltração de água nos ossos irá aumentar a degradação do osso e do DNA. Ossos mais porosos vão permitir uma maior entrada de água em comparação com osso não poroso, tornando osso não poroso e denso melhores para a extração de DNA (Andreeva et al., 2022; Hagelberg et al., 1991).

### 1.5. Mudanças genéticas e temporais *post-mortem*:

Após a morte, as funções enzimáticas cessam, porém, as alterações de DNA mantêm-se. Sem processos de função enzimática para reparar o DNA, o dano efetuado sobre este por fontes externas e internas resulta numa acumulação de danos ao longo do tempo (Andreeva et al., 2022).

A preservação de DNA é afetada pelas condições do ambiente que se encontra, como referido anteriormente. Porém em condições adequadas de congelamento, o DNA consegue ser preservado durante milhões de anos (Andreeva et al., 2022; Shendure et al., 2017).

Dado as alterações acumuladas, ocorre a fragmentação da cadeia de DNA. A fragmentação ocorre pela depurinação hidrolítica seguida de uma eliminação beta resultando em danos num só lado da dupla hélix. Outro tipo de problema que pode surgir é problemas na leitura dos nucleótidos durante a sequenciação por causa da desaminação. As desaminações mais comuns são a da citosina em uracilo e do 5-metilcitosina em timina, como é possível observar na figura 3 (Andreeva et al., 2022; Dabney et al., 2013; Frederico et al., 1990).

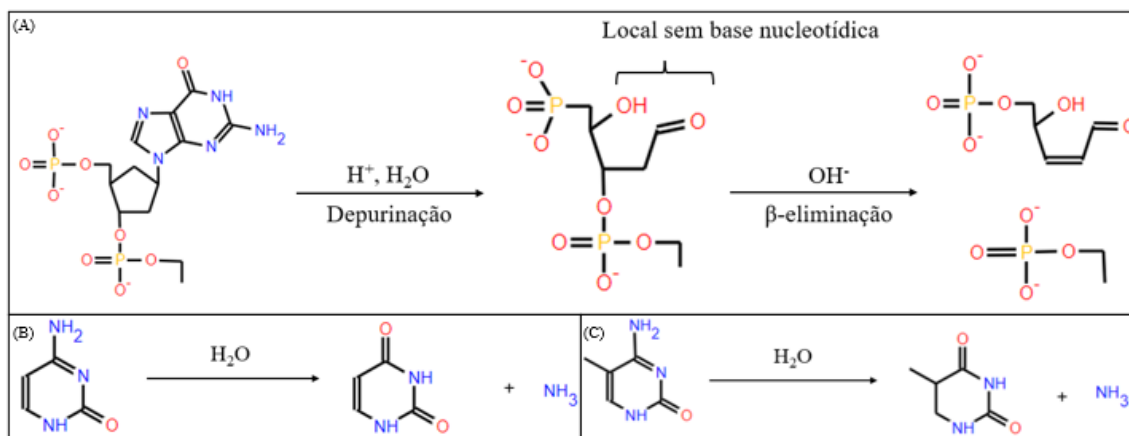


Figura 3: Fragmentação, depurinação e desaminação. (A) Desaminação da purina guanina ou adenina seguida de uma fragmentação da cadeia fosfolipídica; (B) Desaminação da citosina em uracilo; (C) Desaminação do 5-metilcitosina em timina. Moléculas criadas a partir d JSME: a free molecule editor in JavaScript (Bienfait & Ertl, 2013)

Algumas lesões que o DNA sofre podem resultar em bloqueios da Taq polimerase, impedindo assim a amplificação do DNA. Um exemplo destes danos é a alcalinização das timinas adjacentes, as mudanças nucleotídicas da guanina em xantina e da adenina em hipoxantina (figura 4) (Andreeva et al., 2022; Dabney et al., 2013).

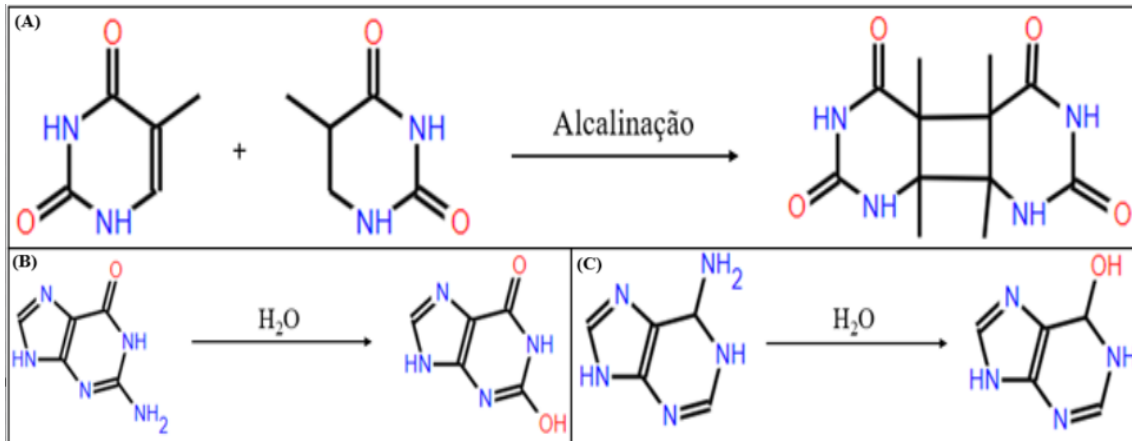


Figura 4: Bloqueadores da Taq polimerase. (A) Alcalinação de duas timinas que pode ocorrer na mesma cadeia ou entre cadeias de DNA; (B) Mudança nucleotídica de guanina para xantina; (C) Mudança nucleotídica de adenina para hipoxantina . Moléculas criadas a partir d JSME: a free molecule editor in JavaScript (Bienfait & Ertl, 2013)

### 1.6. Corte

Como mencionado anteriormente, ossos menos porosos são melhores para a extração de DNA dado estarem mais protegidos de alterações post-mortem (Andreeva et al., 2022; Hagelberg et al., 1991). Segundo Sirak et al. (2017), o labirinto ósseo encontra-se no osso petroso, e é de difícil acesso. O labirinto ósseo, dado a sua natureza não porosa, e estando protegido por camadas de osso externas, desacelera o processo de alterações post-mortem (Andreeva et al., 2022; Dabney et al., 2013; Hagelberg et al., 1991). A metodologia inicia-se com a destruição da ponte que separa o canal carótico da fossa jugular, fazendo uma perfuração de forma a extrair 200 a 300 mg de pó de osso do labirinto ósseo (Sirak et al., 2017).

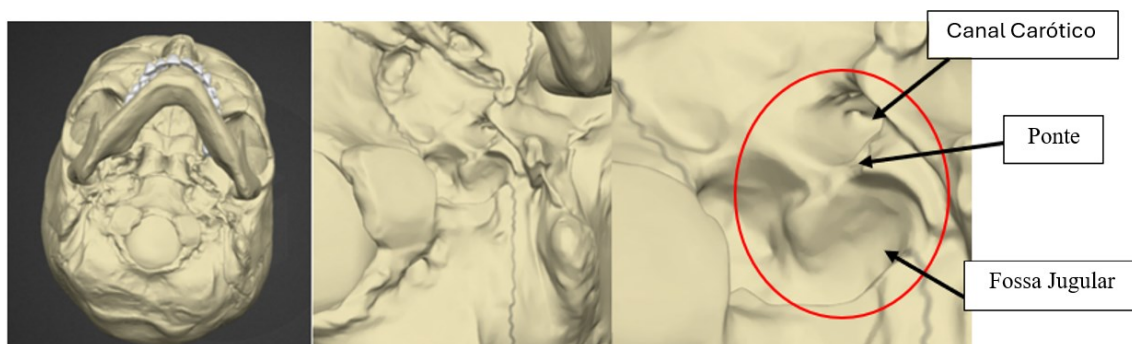


Figura 5: Imagem alusiva à realização do corte e perfuração

### 1.7. Gene Amelogenina (*AMEL*):

O locus *AMEL* tem os genes homólogos *AMELX* e *AMELY*, com 89% de homologia. O gene *AMELX*, localiza-se na zona distal do braço curto do cromossoma X (Xp22.1-

Xp22.3), enquanto o *AMELY* localiza-se perto do centrómero do cromossoma Y (Yp11.2) (Butler & Li, 2014; Lau et al., 1989; Warinner et al., 2022).

O gene *AMEL* é o mais usado em forenses para identificação do sexo do indivíduo, dado o seu poder discriminatório entre os cromossomas sexuais. Os produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) do *AMELX* e do *AMELY* podem ser discriminados usando os *primers* criados por Masuyama et al. (2017) que flanqueiam um polimorfismo de nucleótido único (SNP) presente no 2º exão do gene *AMELX* e o 3º exão do gene *AMELY*. Os produtos da amplificação são diferentes entre o sexo masculino e o sexo feminino, o 1º produzindo um fragmento de 60 pares base (pb) e o 2º produzindo um fragmento de 56 pb. A diferença de quatro pb entre o fragmento masculino e feminino é a presença de quatro inosinas na extremidade 5' dos *primers AMELY*, que permitem visualizar as bandas a partir do método de eletroforese.

Um fragmento menor indica que o indivíduo possui cromossoma X, que é associado a um fenótipo do sexo feminino, porém um fragmento maior indica que o indivíduo apresenta cromossoma X e Y, associado a um fenótipo do sexo masculino (Butler & Li, 2014).

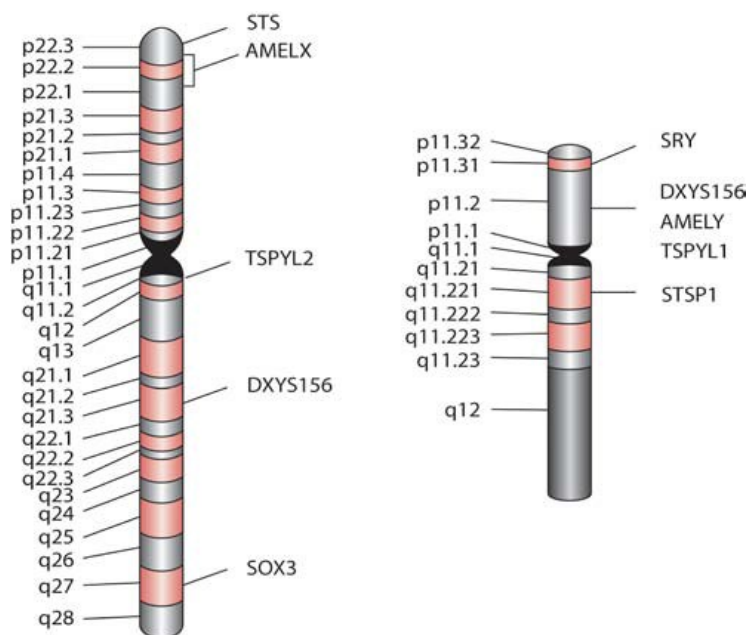


Figura 6: Mapa dos cromossomas sexuais humanos X (esquerda) e Y (direita), imagem retirada de (Butler & Li, 2014)

### 1.8. Gene da região determinante do sexo Y (*SRY*):

O gene *SRY*, localiza-se na zona distal do braço curto do cromossoma Y (Yp11.31) e é um dos poucos genes que afeta diretamente o desenvolvimento sexual. Como

consequência é um dos marcadores sexuais com maior validade, a seguir ao gene *AMEL* (Butler & Li, 2014; Masuyama et al., 2017). Com recurso aos *primers* descritos anteriormente por Masuyama et al. (2017), é amplificado 52 pb do 1º exão do gene *SRY*.

A grande diferença entre o gene *AMEL* e o gene *SRY* é a falta de homologia no sexo feminino, homologia presente no gene *AMEL* (*AMELY* e *AMELX*), criando uma preferência para o gene *AMEL* (Butler & Li, 2014; Masuyama et al., 2017).

#### 1.10. Extração

A lavagem com ácido hipoclorito de sódio, descontaminação com luz UV e raspagem permite a eliminação da maioria dos microrganismos e contaminantes presentes, garantindo que o DNA extraído é o DNA endógeno.

A extração divide-se em três fases, nomeadamente a desmineralização óssea, a lise celular e a extração orgânica. A desmineralização ocorre recorrendo ao ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) que é um ácido orgânico quelante. Este permite a captação de magnésio e cálcio do osso. O recurso ao EDTA, apesar de demorado, permite que a solução de lise extraia o DNA de forma mais eficaz. A solução de lise é constituída por 0,01 M de Tris-HCl, 0,1 M de NaCl, 0,01 M EDTA e 2% SDS a pH 8,0. Esta mistura de componentes permite a destabilização dos restantes minerais do osso e a rotura das células da matriz óssea. A solução de lise foi suplementada com ditioneitol (DTT) e proteínase K de forma a inibir e desnaturar as proteínas, tendo o DTT especial efeito nas proteínas do núcleo que envolvem o DNA (Carvalho, 2009; National Institute of Justice, 2023a).

Para a realização de uma extração orgânica, utilizou-se uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Os diferentes componentes permitem a separação das diferentes moléculas a partir da solubilidade, criando uma fase aquosa, onde se encontra o DNA, e uma fase fenólica, onde se encontra o resto das moléculas (Carvalho, 2009).

### 1.11. Polymerase Chain Reaction – Amplified Product Length Polymorphism (PCR-APLP)

A técnica de PCR é uma técnica que permite um elevado número de cópias da zona de interesse. A sequência de interesse, a ser amplificada, é flanqueada por dois *primers* nos terminais 3' da dupla hélice. Este processo divide-se em 3 fases, nomeadamente a desnaturação *annealing* de *primers* e extensão/síntese das novas cadeias (Vieira, 2011; Zhu et al., 2020).

A técnica de *polymerase chain reaction – amplified product length polymorphism* (PCR-APLP) tem por base o método de PCR. No entanto usa *primers* que na sua extremidade 3' se ligam especificamente ao SNP desejado. Um dos *primers* específicos na extremidade 5' terá uma cadeia não-complementar, de forma a criar ampliações com diferentes tamanhos e consequentemente possibilitar a sua visualização através da técnica de eletroforese. Acompanhando estes *primers* específicos irá haver um “*counter-primer*” que poderá ser *forward* ou *reverse*, como é possível observar na figura 7 (Shojo et al., 2015).

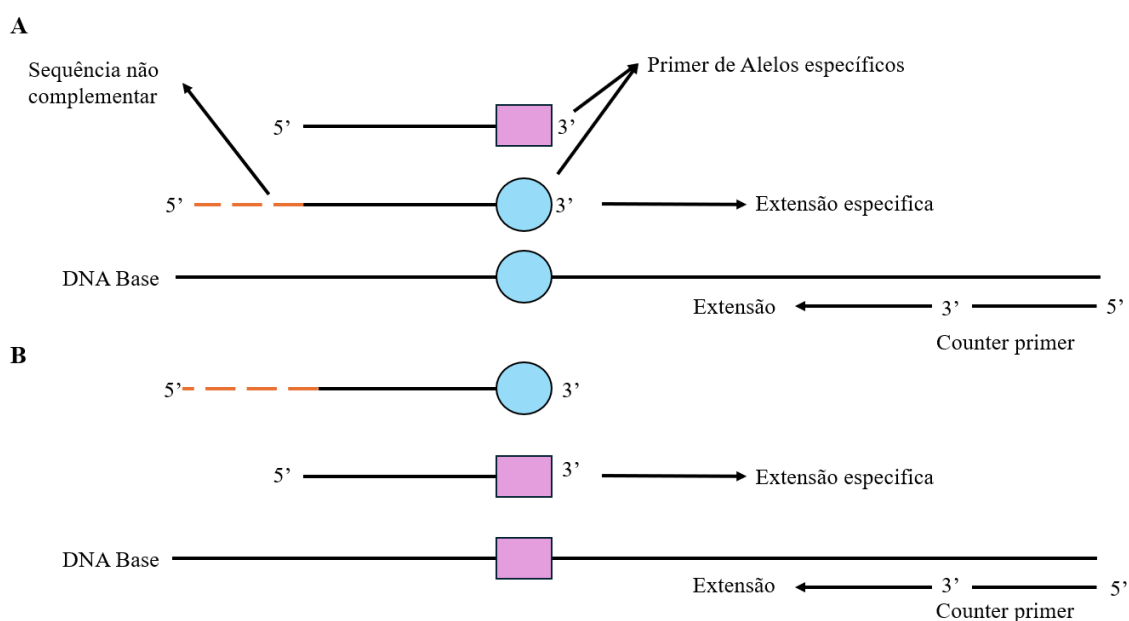


Figura 7: Modo do funcionamento do PCR-APLP.

O PCR-APLP com recurso à Inosina (I), permite uma maior estabilidade do produto de PCR. A inosina é uma base universal, dado que se consegue, a partir de duas ligações com o hidrogénio, ligar-se a qualquer uma das bases nucleotídicas, adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T), permitindo assim uma complementaridade (Shojo et al., 2015).

Como referido anteriormente, o gene *AMELX* e *AMELY* tem uma homologia de 89%. Esta homologia permite uma identificação mais rápida do sexo dos indivíduos. O exão dois do gene *AMELX* e o exão três do gene *AMELY* são diferenciados por um SNP presente no gene *AMELY* (figura 8) (Butler & Li, 2014; Lau et al., 1989; Masuyama et al., 2017; Warinner et al., 2022).

```

X: AACCATCAAGAAATGGGGACCTGGATTTTATTTGCCTGC
Y: AACCATCAAGAAATGGGGACCTGGATTTTGTTTGCCTGC
X: CTCCTGGGAGCAGCTTTTGCCATGCCTgtgagtaaaaca
Y: CTTGTGGGAGCAGCTTTTGCCATGCCTgtgagtaaaaca
    
```

Figura 8: Semelhança entre o exão dois do gene *AMELX* e o exão três do gene *AMELY*. A negrito destaca-se as diferenças entre os exões. A negrito e azul do gene *AMELX* e a negrito e amarelo do gene *AMELY* estão em destaque os locais de ligação dos *primers*, sendo que do gene *AMELY* é o SNP.

Como referenciado anteriormente, a amplificação do gene *AMELY* irá resultar em um fragmento de 60 pb, a do gene *AMELX* irá resultar em 56 pb e a do *SRY* em 52 pb. Nas figuras 9, 10 e 11 é possível observar a representação do funcionamento dos diferentes *primers* em cada um dos genes.

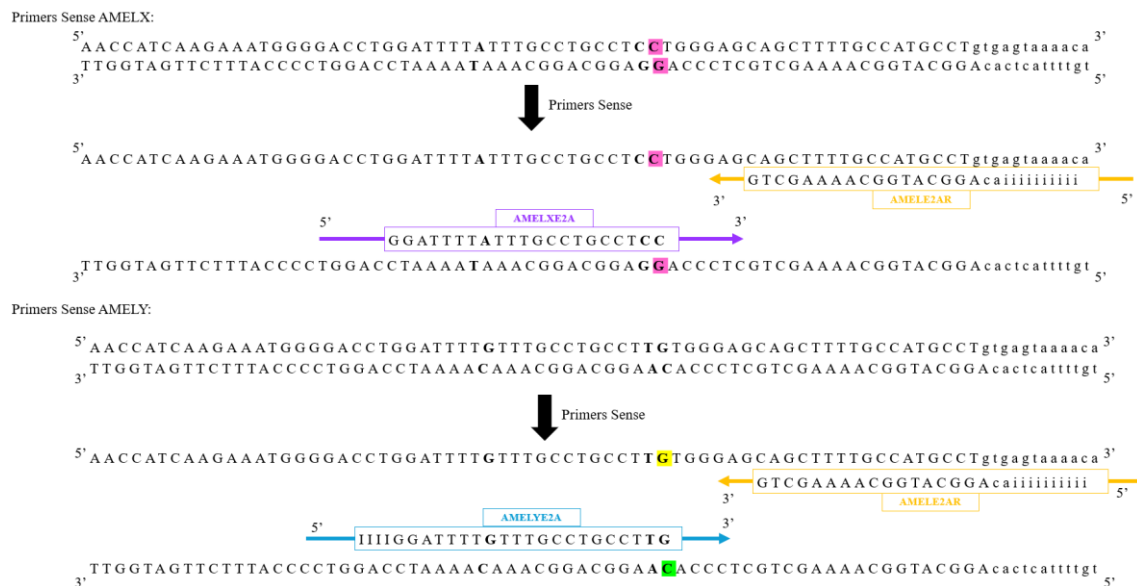


Figura 9: Funcionamento dos *Primers Sense* (S) do gene *AMEL*. No gene *AMELX*, as bases nucleotídicas com fundo rosa representam a base esperada. O *primer* específico *forward* utilizado foi o *AMELXE2A* (caixa roxa) que se liga à sequência antisense. No gene *AMELY*, o SNP está destacado com fundo amarelo e o complementar ao SNP está destacado com fundo verde. O *primer* específico *forward* usado foi o *AMELYE2A* (caixa azul-claro), que se liga à sequência antisense. O *primer* reverse *AMELE2AR* (caixa amarela) é comum aos dois genes, que se liga à sequência sense.

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MORFOLÓGICOS E MÉTRICOS PARA A ESTIMATIVA DO SEXO USANDO O GENE AMEL COMO MÉTODO CONFIRMATÓRIO

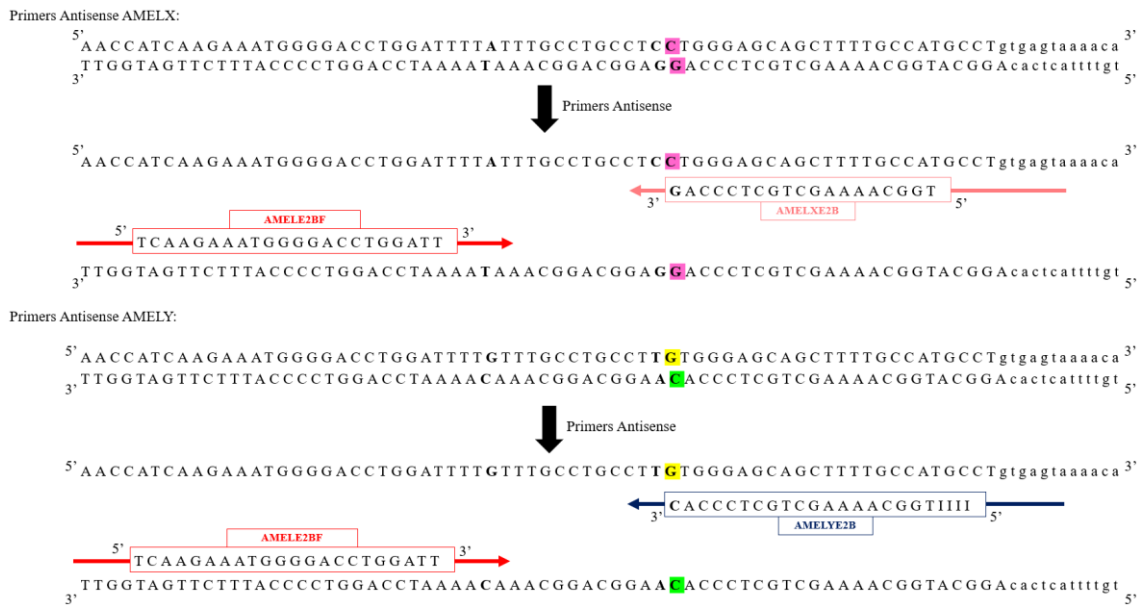


Figura 10: Funcionamento dos *Primers* Antisense (AS) do gene *AMEL*. No gene *AMELX*, as bases nucleotídicas com fundo rosa representam a base esperada. O *primer* específico *reverse* utilizado foi o AMELXE2B (caixa rosa-claro) que se liga à sequência sense. No gene *AMELY*, o SNP está destacado com fundo amarelo e o complementar ao SNP está destacado com fundo verde. O *primer* específico *reverse* utilizado foi o AMELYE2B (caixa azul), que se liga à sequência sense. O *primer forward* AMELE2BF (caixa amarela) é comum aos dois genes, que se liga à sequência antisense.

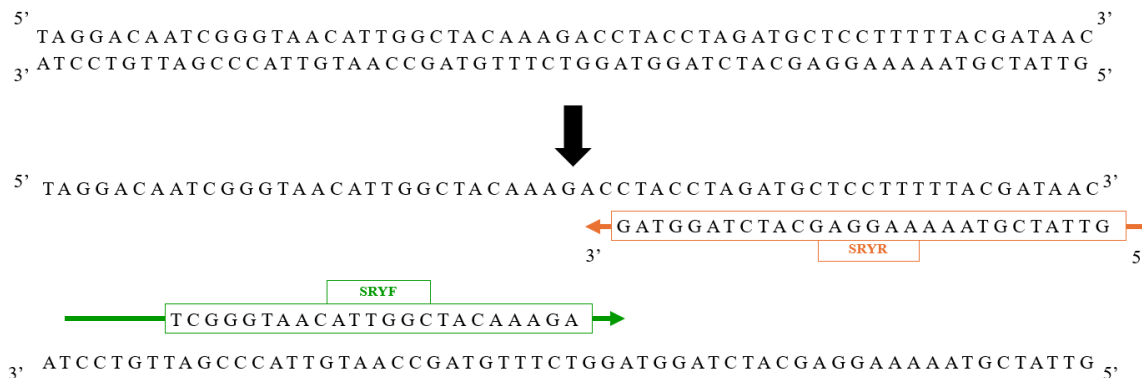


Figura 11: Funcionamento dos *primers* do gene *SRY*. O *primer* SRYF (caixa verde) é o *forward*, que se liga à sequência antisense, enquanto o *primer* SRYR (caixa laranja) é o *reverse* que se liga à sequência sense.

Devido ao estado de degradação do DNA, pode haver a hipótese de apenas um dos fragmentos ser amplificado. No caso de ser amplificado apenas o *AMELX* pode caracterizar-se erroneamente o indivíduo como sendo do sexo feminino. De forma a garantir a validade dos resultados, o gene *SRY* é usado como gene confirmatório para o sexo masculino (Masuyama et al., 2017).

### 1.12. Eletroforese

A eletroforese é uma técnica que permite a separação de fragmentos de DNA. A eletroforese pode ser realizada em géis de agarose ou em géis de poliacrilamida, sendo o

primeiro usado para ampliações de fragmentos de maiores dimensões e o segundo mais usado para ampliações de DNA muito pequenas ou proteínas (National Institute of Justice, 2023b).

O gel de agarose forma-se a partir de moléculas de agar juntarem-se a partir de ligações de hidrogénio. O tamanho do poro de agarose vai depender da quantidade de agarose desejada (figura 12).

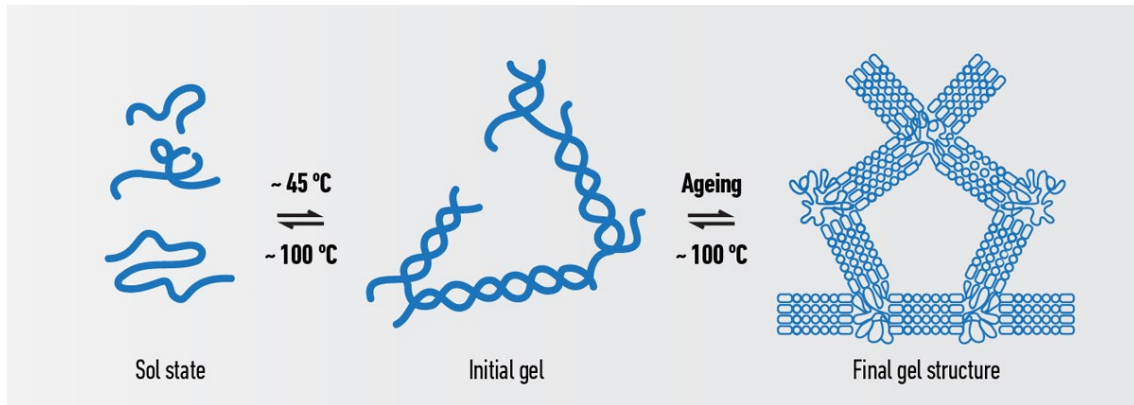


Figura 12: Formação da matriz do gel de agarose. Imagem retirada de (Steward, 2022)

O gel de poliacrilamida tem por base a ligação da acrilamida e da bisacrilamida. O gel inicia a sua polimerização quando a reação com TEMED e persulfato de amónio ocorre (figura 13) (National Diagnostics, 2011).

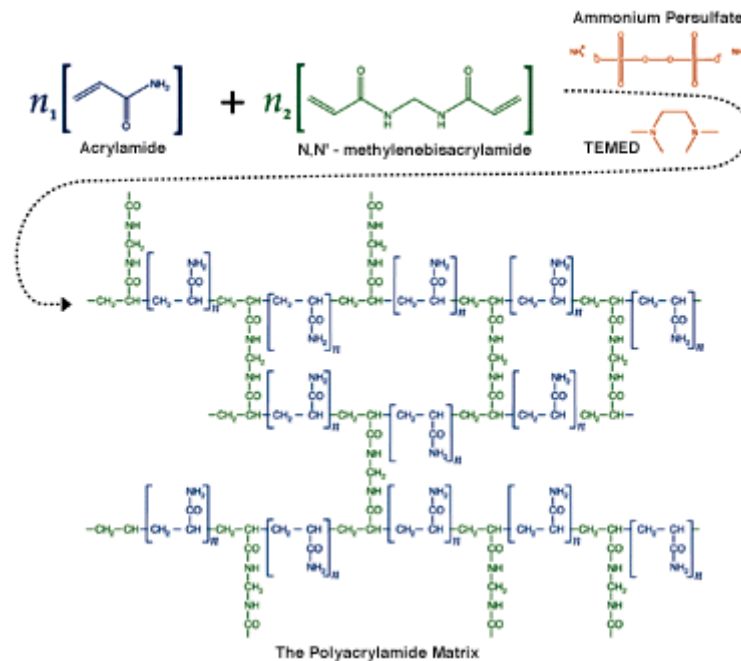


Figura 13: Formação da matriz do gel de poliacrilamida. Imagem retirada de National Diagnostics (National Diagnostics, 2011)

O gel de poliacrilamida pode ser nativo ou desnaturante. O nativo permite que a molécula de DNA se mantenha intacta, enquanto os géis desnaturantes, utilizam agentes desnaturante como a ureia ou por dodecilsulfato de sódio (SDS), causa a desnaturação das moléculas de DNA (Green & Sambrook, 2020; National Diagnostics, 2011).

A acrilamida:bisacrilamida tem três rácios diferentes, sendo nas proporções de 19:1, 29:1 e 37,5:1. Quanto menor a proporção, mais pequeno será o poro, por exemplo a proporção 19:1 é a que tem o poro mais pequeno. O rácio recomendado 29:1 para separação de pequenos fragmentos de DNA (Green & Sambrook, 2020; National Diagnostics, 2011).

#### 1.13. Objetivo:

Propõe-se validar métodos morfológicos e métricos em remanescentes esqueléticos de indivíduos adultos para a estimativa do sexo, usando o gene *AMEL* e o gene *SRY* como método confirmatório. Para além disso, pretende-se a otimização da extração de DNA a partir de ossos humanos.

## 2. Materiais e Métodos:

### 2.1. Materiais:

Analisou-se o perfil biológico de 10 esqueletos doados ao Laboratório de Antropologia pelo Laboratório de Morfologia da Egas Moniz School of Health and Science, provenientes de doações antigas que foram utilizados para fins pedagógicos. Trata-se de esqueletos de indivíduos adultos, não havendo quaisquer informações biográficas ou contextuais disponíveis, sabendo-se apenas que provém de cemitérios municipais, cujas exumações foram realizadas há pelo menos duas décadas.

As medidas foram realizadas com a tábua osteométrica, craveira digital e fita métrica.

### 2.2. Métodos:

#### 2.2.1. Índice de Conservação Anatômica (ICA):

O índice de conservação de esqueletos é essencial para poder avaliar a qualidade e quantidade de informação que pode ser retirada de um esqueleto (Garcia, 2006).

O ICA é afetado por fatores internos, como o sexo, a idade e a saúde do indivíduo, assim como fatores externos como o clima, a humidade, o solo onde foi inumado, entre outros. O esqueleto é dividido em 44 partes das quais 35 são considerados ossos únicos. As restantes nove, são constituídas por vários elementos do mesmo tipo (e.g. dentes, vértebras, costelas, ossos dos pés e das mãos) (Garcia, 2006).

Os ossos únicos são avaliados de 0 a 1, enquanto as partes constituídas por múltiplos elementos ósseos são calculados a partir do índice de representatividade óssea (IRO), que resultam em valores entre 0 e 1. O IRO após calculado é inserido no ICA, com os restantes elementos avaliados. O ICA varia da classe 1 até à 6 (Tabela 1) (Garcia, 2006).

Tabela 1: Índice de conservação anatômica

<b>Classe</b>	<b>Índice de Conservação</b>	
<b>1</b>	0-10	Mau estado
<b>2</b>	11-20	Estado medíocre
<b>3</b>	21-40	Estado razoável
<b>4</b>	41-60	Bom estado
<b>5</b>	61-80	Muito bom estado
<b>6</b>	81-100	Estado excelente

### 2.2.2. Afinidades Populacionais:

Na estimativa das afinidades populacionais utiliza-se geralmente, o crânio, associando-o a uma região geográfica ou a uma origem ancestral (Dunn et al., 2020; Flouri et al., 2022).

Antigamente, recorria-se ao conceito de raça e de diferenças entre o ser humano para criar uma hierarquia. Atualmente, é consensual que o conceito de raça é uma construção cultural e social e não pode ser aplicado ao Homem (Cunha & Ubelaker, 2020; Dunn et al., 2020).

Para a estimativa das afinidades populacionais recorreu-se à ferramenta digital HefneR desenvolvida pela Osteomics e que tem por base a metodologia de Hefner (2009) com uma fiabilidade entre 83 e 94%.

### 2.2.3. Sexo:

A estimativa do sexo em remanescentes esqueléticos é um ato que tem por base a aplicação de metodologias desenvolvidas nas CEI. Após a aplicação de diversas metodologias permite estimar o sexo do indivíduo como masculino ou feminino. Caso as metodologias sejam contraditórias, ou não poderem ser aplicadas, define-se como indeterminado (Mays & Cox, 2000).

#### 2.2.3.1. Métodos morfológicos:

Os métodos morfológicos têm por base a observação direta do osso, comparando com imagens de referência, que apresentam uma classificação que varia do hiper-feminino ao hiper-masculino. Estes são aplicados a todo o esqueleto, porém focam-se sobretudo no crânio e no osso coxal, dado que são os ossos com maior dimorfismo sexual, resultando numa estimativa mais fiável em comparação com outros ossos (Buikstra & Ubelaker, 1994; Rowbotham, 2016).

Tabela 2: Ossos e as respetivas metodologias morfológicas aplicadas

<b>Osso</b>	<b>Metodologia</b>	
<b>Crânio</b>	(Buikstra & Ubelaker, 1994)	(Ferembach et al., 1980)
<b>Osso coxal</b>	(Bruzek, 2002)	(Buikstra & Ubelaker, 1994) (Ferembach et al., 1980)

2.2.3.2. Métodos Métricos:

Os métodos métricos têm por base a medição dos ossos, tendo em conta tabelas de referência, pontos de cisão, funções discriminantes e equações que indicam o sexo mais provável (Curate, 2022).

As metodologias aplicadas foram desenvolvidas e/ou validadas em CEI portuguesas (Cardoso, 2000; Curate et al., 2021; Curate et al., 2021; Gama et al., 2015; Harris & Case, 2012; Maio et al., 2024; Navega et al., 2015; Wasterlain, 2000).

2.2.3.2.1. Método de Gama et al. (2015):

As medidas mais discriminantes para a estimativa do sexo a partir do axis foram CMA, LMA, LMFSD e DSMC (Equação 1) (Gama et al., 2015).

$$L = -62,170 + (0,561 \times CMA) + (0,677 \times LMA) + (-0,818 \times LMFSD) + (0,977 \times DSMC)$$

Equação 1: Regressão logística para estimar o sexo a partir do axis

Se o resultado for negativo o sexo é feminino, se positivo, masculino.

2.2.3.2.2. Método de Curate et al. (2021) para o rádio:

A metodologia, aplica pontos de cisão e uma equação, dada o nome LR5 (regressão logística 5). de forma a poder estimar o sexo do indivíduo (Tabela 3 e Equação 2) (Curate et al., 2021).

Tabela 3: Ponto de cisão em milímetros e a respetiva classificação correta entre a amostra de treino e a amostra de teste

Medida	Ponto de cisão	Classificação correta (%)
<b>MCDDR</b>	37	87,4
<b>IEWR</b>	30,5	89,8

Caso a medida seja inferior ao ponto de cisão, o indivíduo é classificado no sexo feminino, se for superior, no sexo masculino.

$$L = (0,559 \times MCCDR) + (0,700 \times IEWR) - 42,223$$

Equação 2: Regressão logística para estimar o sexo

Se o resultado for negativo o sexo é feminino, se positivo, masculino.

2.2.3.2.3. Método de Cardoso (2000):

O método tem por base pontos de cisão de várias medidas do úmero, rádio, fémur e tibia (Tabela 4) (Cardoso, 2000).

Tabela 4: Medidas do sexo feminino (Fem<), masculino (Masc>) e ponto de cisão em milímetros. Classificação correta para os diferentes sexos e total (%)

<b>Medida</b>	Fem<	Ponto de cisão	Masc>	<b>Classificação correta (%)</b>		
				Fem	Masc	Total
<b>UCM</b>	282	302	324	84	80	82
<b>UCT</b>	276	297	317	81	79	80
<b>UDMI</b>	14	16	18	59	73	66
<b>UDMA</b>	18	21	24	65	57	61
<b>UDVC</b>	41	42	45	84,7	91,8	88,2
<b>UDTC</b>	37	40	41	88	75,3	81,8
<b>ULB</b>	51	56	61	83,9	85,4	84,7
<b>UPM</b>	53	59	63	86	75	80,5
<b>RCM</b>	202	223	233	88	83	85,5
<b>RCF</b>	193	210	221	85	85	85
<b>RPM</b>	33	38	40	90	76	83
<b>FCM</b>	384	425	456	81	81	81
<b>FCF</b>	383	422	452	80	82	81
<b>FCT</b>	366	406	436	82	76	79
<b>FCTM</b>	22	26	29	58	59	58,5
<b>FDSM</b>	24	27	32	63	72	67,5
<b>FDTS</b>	24	28	32	55	67	61
<b>FDSS</b>	22	27	31	61,6	62	61,8
<b>FDVC</b>	40	43	46	87	79,8	83,4
<b>FDTC</b>	40	43	46	85	75,8	80,4
<b>FLB</b>	71	76	78	89,7	84	86,8
<b>FPM</b>	74	84	97	74	76	75
<b>TCM</b>	304	352	384	76	73	74,5
<b>TCN</b>	295	342	374	77	71	74,0
<b>TCT</b>	300	346	378	79	71	75
<b>TDI</b>	20	23	25	65,7	74	69,8
<b>TDS</b>	29	33	36	84,8	74,8	79,8
<b>TLB</b>	64	70	72	89,6	86,2	87,8
<b>TPM</b>	63	70	76	79	75	77

Se a medição for abaixo do ponto de cisão, o indivíduo é classificado no sexo feminino, se for superior, no sexo masculino.

2.2.3.2.4. Método de Wasterlain (2000):

O método utiliza pontos de cisão para estimar o sexo do indivíduo a partir do úmero, rádio, fêmur, tibia, talus e calcâneo (Tabela 5) (Wasterlain, 2000).

Tabela 5: Medidas do ponto de cisão em milímetros. Classificação correta para os diferentes sexos e total (%)

Medida	Ponto de cisão	Classificação correta (%)		
		Feminino	Masculino	Total
U1	302,66	81	80	80,5
U2	298,88	80	81	80,5
U3	42,36	85	85	90
U4	39,38	93,9	86,5	90,2
U5	21,41	86	77	81,5
U6	16,57	82	78	80
U7	58,16	85,9	83	84,45
U8	56,63	92	89	90,5
R1	222,77	85,9	84	84,95
R2	209,35	82,8	84	83,4
R3	37,73	83,8	84	83,9
F1	425,57	77	78	77,5
F2	422,87	77	80	78,5
F3	27,50	80	74	77
F4	26,07	76	56	66
F5	27,29	79	71	75
F6	29,72	67	76	71,5
F7	82,82	75	78	76,5
F8	42,84	82,8	88	85,4
F9	43,23	89	82	85,5
T1	350,2	77	80	78,5
T2	337,1	81	79	80
T3	32,47	90	80	85
T4	23,56	80	76	78
T5	69,29	81	80	80,5
T6	68,18	82	76,8	79,4
T7	346	78	79	78,5

Medida	Ponto de cisão	Classificação correta (%)		
		Feminino	Masculino	Total
<b>Ta1</b>	50,30	89,7	84	86,85
<b>Ta2</b>	39,02	84,5	72	78,25
<b>Ta3</b>	28,99	78,4	92	85,2
<b>C1</b>	74,80	79	81,8	80,4
<b>C2</b>	70,44	84	78,6	81,3
<b>C3</b>	53,44	81	69,7	75,35
<b>C4</b>	39,58	81,8	83,8	82,8

Continuação da tabela 5

Se a medida verificada for abaixo do ponto de cisão, o indivíduo é classificado no sexo feminino, se for superior, no sexo masculino.

#### 2.2.3.2.5. Método de Maio et al. (2024):

O método usa pontos de cisão para poder estimar o sexo dos indivíduos a partir da rótula (Tabela 6) (Maio et al., 2024).

Tabela 6: Medidas do ponto de cisão

Medidas	Ponto de Cisão
<b>MAXH</b>	40
<b>MAXB</b>	42
<b>MAXT</b>	19
<b>HAF</b>	29
<b>MAFB</b>	19
<b>LAFB</b>	26

Caso a medição for abaixo do ponto de cisão, o indivíduo é classificado no sexo feminino, se for superior, no sexo masculino.

Para além dos pontos de cisão, também conta com uma equação para estimar o sexo de um indivíduo (equação 2) (Maio et al., 2024).

$$y = (0,162 \times MAXH) + (-0,040 \times MAXB) + (0,011 \times MAXT) + (0,121 \times HAF) + (0,221 \times MAFB) + (0,127 \times LAFB) - 15,692$$

Equação 3: Equação para a estimativa do sexo

Se  $y$  for negativo, o indivíduo é classificado no sexo feminino, se for positivo, no masculino.

2.2.3.2.6. Método de Harris & Case (2012):

O método tem por base regressões logísticas de forma a estimar o sexo do indivíduo a partir dos ossos do tarso (tabela 7) (Harris & Case, 2012; Navega et al., 2015).

Tabela 7: Equação, em que o resultado é em milímetros. Classificação correta para os diferentes sexos e total (%)

Medida	Regressão logística	Classificação Correta (%)		
		Feminino	Masculino	Total
<b>E</b> CalcLg	$L = -34,571 + 0,419 * \text{CalcLg}$	78,9	81,3	80,1
<b>E</b> TalLg	$L = -35,061 + 0,606 * \text{TalLg}$	87,0	86,4	86,7
<b>E</b> TalBrd	$L = -54,163 + 1,302 * \text{TalBrd}$	88,3	86,6	87,4
<b>E</b> TalHt	$L = -35,879 + 1,107 * \text{TalHt}$	84,4	89,0	86,8
<b>E</b> CubBrd	$L = -34,975 + 1,263 * \text{CubBrd}$	81,7	86,4	86,7
<b>E</b> NavBrd	$L = -26,248 + 0,655 * \text{NavBrd}$	80,8	83,8	82,4
<b>E</b> CF1Lg	$L = -25,583 + 0,962 * \text{CF1Lg}$	81,4	83,1	82,3
<b>E</b> CF1Brd	$L = -31,512 + 1,715 * \text{CF1Brd}$	82,9	82,1	82,4
<b>E</b> CF3Lg	$L = -33,905 + 1,369 * \text{CF3Lg}$	81,9	78,1	80
<b>E</b> CF3Ht	$L = -27,573 + 1,146 * \text{CF3Ht}$	78,3	82,2	80,3
<b>D</b> CalcLg	$L = -40,174 + 0,483 * \text{CalcLg}$	81,6	81,6	81,6
<b>D</b> TalLg	$L = -38,264 + 0,670 * \text{TalLg}$	87,8	87,8	87,8
<b>D</b> TalBrd	$L = -43,763 + 1,054 * \text{TalBrd}$	85,7	85,7	85,7
<b>D</b> TalHt	$L = -37,083 + 1,139 * \text{TalHt}$	85,7	85,7	85,7
<b>D</b> CubBrd	$L = -31,695 + 1,137 * \text{CubBrd}$	84,9	84,9	84,9
<b>D</b> NavBrd	$L = -27,737 + 0,694 * \text{NavBrd}$	80,3	80,3	80,3
<b>D</b> CF1Lg	$L = -27,523 + 1,035 * \text{CF1Lg}$	86,1	86,1	86,1
<b>D</b> CF1Brd	$L = -30,865 + 1,671 * \text{CF1Brd}$	79,2	79,2	79,2
<b>D</b> CF1Ht	$L = -28,793 + 0,878 * \text{CF1Ht}$	79,2	79,2	79,2
<b>D</b> CF2Brd	$L = -23,822 + 1,448 * \text{CF2Brd}$	82,4	82,4	82,4
<b>D</b> CF2Ht	$L = -23,467 + 1,037 * \text{CF2Ht}$	79,4	79,4	79,4
<b>D</b> CF3Lg	$L = -39,775 + 1,598 * \text{CF3Lg}$	85,9	85,9	85,9
<b>D</b> CF3Ht	$L = -26,468 + 1,102 * \text{CF3Ht}$	82,4	82,4	82,4

Se o resultado da regressão linear for negativo, o indivíduo é classificado no sexo feminino, se for positivo, no sexo masculino.

2.2.3.2.7. Método de Curate et al. (2021) para o tarso:

Para a estimativa do sexo a partir do tarso (talus e calcâneo), recorreu-se à ferramenta digital osteomics, CalcTalus, desenvolvida por Curate et al (2021). A partir das regressões logísticas LR\_T3, do talus, e LR\_C2, do calcâneo, permite estimar o sexo com uma probabilidade que varia entre 0 e 1. A metodologia tem ainda por base pontos de cisão (tabela 8).

Tabela 8: Pontos de cisão aplicado ao tarso

Medida	Ponto de cisão	Classificação correta (%)
<b>TM1</b>	52,25	81,1
<b>TM4</b>	31,50	86,0
<b>TM5</b>	26,50	87,1
<b>CMBH</b>	47,75	95,6
<b>CM8</b>	30,25	87,5

2.2.4. Estatura:

Para a estimativa da estatura recorreu-se a metodologia de Mendonça (2000).

Tabela 9: Estimativa da estatura

Osso	Sexo	Fórmula	Desvio Padrão (cm)
<b>Úmero</b>	Feminino	$64,26 + 0,3065 * \text{comprimento máximo (mm)}$	7,70
	Masculino	$59,41 + 0,3269 * \text{comprimento máximo (mm)}$	8,44
<b>Fémur</b>	Feminino	$55,63 + 0,2428 * \text{comprimento fisiológico (mm)}$	5,92
		$57,86 + 0,2359 * \text{comprimento máximo (mm)}$	5,96
	Masculino	$47,18 + 0,2663 * \text{comprimento fisiológico (mm)}$	6,90
		$46,89 + 0,2657 * \text{comprimento máximo (mm)}$	6,96

2.2.5. Idade:

A estimativa da idade foi realizada a partir da superfície auricular do osso coxal.

O método de Buckberry & Chamberlain (2002) têm por base a análise dos aspetos macroscópicos da superfície auricular do osso coxal. A soma desses diferentes aspetos,

resultam numa classificação que se inicia no I e acaba no VII. Cada classificação corresponde a um intervalo etário.

Tabela 10: Distribuição de idades

<b>Soma</b>	<b>Classificação</b>	<b>Intervalo Etário</b>
<b>5-6</b>	I	16-19
<b>7-8</b>	II	21-38
<b>9-10</b>	III	16-65
<b>11-12</b>	IV	29-81
<b>13-14</b>	V	29-88
<b>15-16</b>	VI	39-91
<b>17-19</b>	VII	53-92

#### 2.2.6. Metodologia de corte:

Para a realização do corte foi necessário limpar os crânios com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% (v/v) em água destilada, que segundo a literatura pode variar entre 2% a 10% (Abuidrees et al., 2016; Adler et al., 2011). Para a limpeza utilizou-se uma escova da marca figyidium®, para as superfícies maiores, e escovas interproximais maleáveis da marca interpox®, para as zonas de difícil acesso.

Após a limpeza os crânios secaram à temperatura ambiente. De seguida realizou-se o corte da ponte. Para a realização do corte, adaptou-se a metodologia de Sarik (2017). A ponte localiza-se entre canal carótico e a fossa jugular, tendo esta sido retirada por completo (figura 3), em vez de removida e perfurando o canal carótido. Para a realização do corte utilizou-se uma broca da marca NSK® do modelo *ultimate* 400 de forma a poder retirar a ponte que separa o canal carótico da fossa jugular (Pinhasi et al., 2015; Sirak et al., 2017).

Após o corte, a ponte foi lavada com hipoclorito de sódio a 5 % em água destilada e esterilizada em ambos os lados durante 20 minutos. Após a descontaminação, recorreu-se a broca COXO modelo CX235-3B de forma a retirar a camada mais externa do osso, restando só o osso que não teve em contacto com o exterior. A lavagem e a raspagem foram realizadas na câmara da marca Ninolab interior, modelo ninoSAFE class II 1200.

A ponte do indivíduo 10 foi submersa em nitrogénio líquido para fragilizar a estrutura óssea, e, de seguida, macerada com recurso a um almofariz. Este processo foi somente

realizado nesta ponte para a comparação entre a ponte intacta e o pó de osso, de forma a verificar qual seria a melhor forma de extração.

#### 2.2.7. Metodologia Genética:

A metodologia de genética divide-se em três etapas. A primeira é a extração, a segunda é a amplificação por PCR-APLP e a última é a eletroforese.

##### 2.2.7.1. Extração de DNA:

Após a limpeza e raspagem/pulverização do osso, este foi transferido para um tubo de falcon de 50 mL onde ocorreu a desmineralização em 20 mL 1M EDTA pH 8,0 durante cinco dias a 56°C. A extração de DNA foi realizada na câmara de fluxo laminar Telstar Bio II advance plus.

De seguida retirou-se o EDTA, restando o osso. O osso foi transferido para um eppendorf de 2 mL ao qual foi adicionado 600 µL de solução de lise (0,01 M de Tris-HCl, 0,1 M de NaCl, 0,01 M EDTA e 2% SDS a pH 8,0). Adicionaram-se ainda 60 µL de Proteínase K e 30 µL de ditioneitol (DTT), seguindo-se um *overnight* no thermoshaker biosan modelo TS-100 a 56°C com 900 rpm.

Após o *overnight*, realizou-se uma extração orgânica, adicionando-se 600 µL da solução de extração composta por fenol/clorofórmio/ácido iso-amílico nas proporções 25/24/1 (v/v). Agitando-se a 800 rpm a 56°C no mesmo thermoshaker até ficar com um aspeto “leitoso”. Após ficar com esse aspeto realizou-se uma centrifugação a 9700 g durante sete minutos na minicentrífugadora Ortoalresa, modelo minicen. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se de novo 600 µL da solução de extração, aguardou-se uns minutos para a separação das fases e realizou-se de novo a centrifugação a 9700 g durante sete minutos.

Retirou-se o sobrenadante para um novo eppendorf, do qual se adicionou 600 µL de álcool frio a 100%, deixou-se incubar uns minutos antes de agitar cuidadosamente. Após agitar centrifugou-se a velocidade máxima durante cinco minutos. Decantou-se após retirar da centrifuga e adicionou-se 600 µL de álcool a 70%, fazendo uma “lavagem” do eppendorf e repetiu-se a centrifugação anterior. De seguida, retirou-se o álcool sem perturbar o *pellet*, deixando os tubos abertos para secar o álcool que não se retirou.

Para finalizar o *pellet* foi solubilizado com uma solução de eluição (10 Mm Tris-Cl pH 8,3, 0,1 mM EDTA e 0,4% azida de sódio (NaN<sub>3</sub>)).

## 2.2.7.2. PCR-APLP:

Foi realizado o método de PCR-APLP com recurso a *primers* com inosina desenvolvidos por Masuyama et al. (2017) (tabela 11).

Tabela 11: Nome dos primers, a sua respetiva sequência e concentração final (uM) na mix de PCR

	Primer	Sequência	C.F. (uM)
<b>Sense</b>	AMELYE2A	III GGA TTT TGT TTG CCT GCC TT <b>G</b>	0.5
	AMELXE2A	GGA TTT TAT TTG CCT GCC TCC	
	AMELE2AR	IIIIIIII ACA GGC ATG GCA AAA GCT G	
<b>Antisense</b>	AMELYE2B	III TGG CAA AAG CTG CTC CCA <b>C</b>	
	AMELXE2B	TGG CAA AAG CTG CTC CCA G	
	AMELE2BF	TCA AGA AAT GGG GAC CTG GAT T	
	SRYF	TCG GGT AAC ATT GGC TAC AAA GA	
	SRYR	GTT ATC GTA AAA AGG AGC ATC TAG GTA G	

A negrito e itálico apresentam-se as bases nucleotídicas dos *primers* que se ligam SNP.

O programa de PCR-APLP usado para o *forward* e o *reverse* é diferente. Para os *primers reverse* iniciou-se com uma desnaturação inicial durante 15 minutos a 95°C seguindo 38 ciclos a 94°C durante 30 segundos, o *annealing* dos *primers* ocorreu a 66°C por 90 segundos e uma extensão final a 72°C durante três minutos (Figura 13). Para os *primers forward* iniciou-se com uma desnaturação a 95°C por 15 minutos, seguida de cinco ciclos a 94°C durante 30 segundos e *annealing* a 64°C por cinco minutos. Seguiu-se 33 ciclos a 94°C por 30 segundos, o *annealing* dos *primers* ocorreu a 64°C durante 90 segundos com uma extensão final a 72°C durante três minutos (figura 14).

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MORFOLÓGICOS E MÉTRICOS PARA A ESTIMATIVA DO SEXO USANDO O GENE AMEL COMO MÉTODO CONFIRMATÓRIO

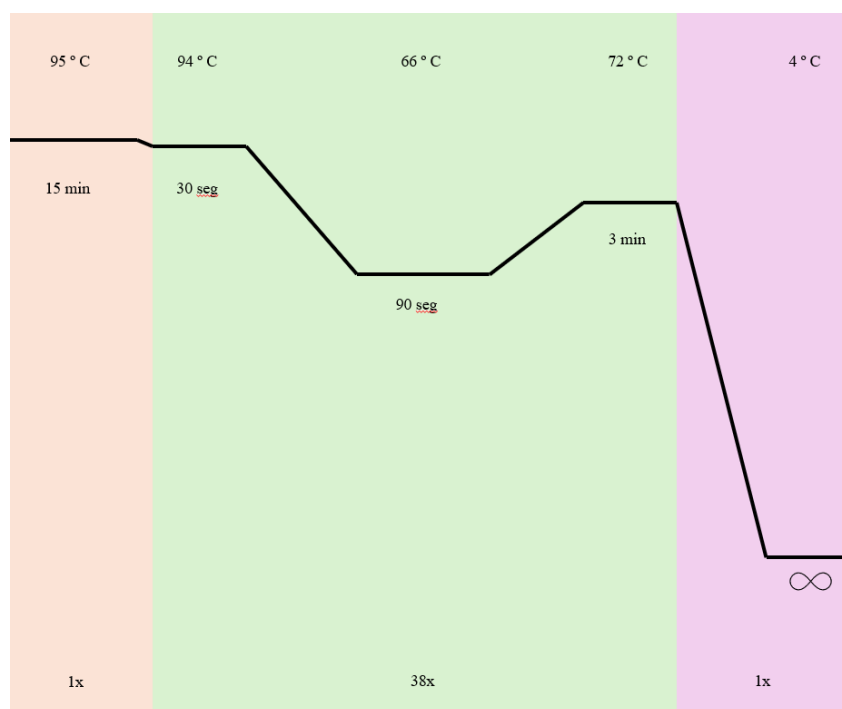


Figura 14: Programa de PCR-APLP para amplificação dos genes *AMEL* e *SRY* com os *primers* sense

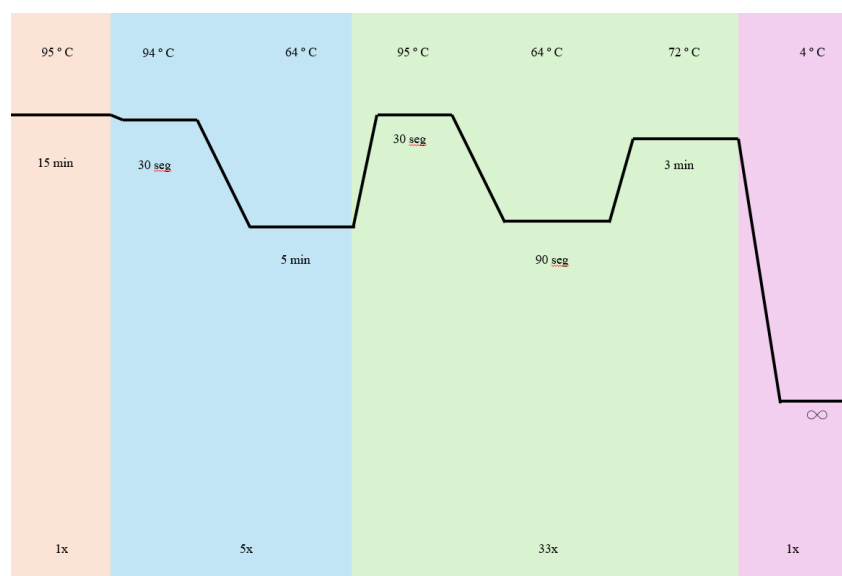


Figura 15: Programa de PCR-APLP para amplificação dos genes *AMEL* e *SRY* com os *primers* antisense

### 2.2.7.3. Eletroforese

Foi realizado um gel de agarose a 3% (p/v) em 70 mL de TAE, utilizando-se o corante greensafe. O gel correu a uma voltagem constante de 100 V.

#### 2.2.7.4. Sequenciação de Sanger:

A sequenciação de Sanger utiliza uma combinação de nucleótidos normais (dNTPs) e nucleótidos modificados que terminam a cadeia (ddNTPs), resultando em vários fragmentos com diferentes tamanhos. Durante a separação por eletroforese capilar, os mais pequenos migram primeiro que os maiores. Ao passarem pelo detetor, este identifica cada nucleótido, dado todos apresentarem fluorescências diferentes, formando assim um eletroferograma da sequência desejada (Sanger et al., 1977). As amostras foram purificadas utilizando o kit *GFX PCR DNA and gel band purification kit* da marca *Cytiva* e sequenciadas nos laboratórios da STABvida.

#### 2.2.8. Metodologia estatística – erro intra-observador:

O erro intra-observador, nos estudos de antropologia, refere-se à reprodução dos valores alcançados pelo mesmo investigador, tendo por base dois ou mais conjuntos de observações na mesma quantidade. Este tipo de erro é influenciado por dois fatores, determinístico e aleatório. Determinístico, são os erros do próprio instrumento, por exemplo, má calibração, enquanto aleatório é erro do observador, por exemplo, fazer uma segunda medição no local incorreto (Curate, 2010).

De forma a verificar o erro intra-observador desenvolveu-se o erro técnico de medida (ETM), o ETM é uma estimativa de precisão absoluta, semelhante ao desvio-padrão. Enquanto o ETM relativo ou percentual (ETMr/ETM%) é semelhante ao coeficiente de variação (Curate, 2010).

$$ETM = \sqrt{\frac{\sum D^2}{2N}}$$

Equação 4: Erro técnico de medida absoluto

$$ETMr = \frac{ETM}{Média da medida} \times 100$$

Equação 5: Erro técnico de medida relativo

No trabalho atual, se o ETMr for superior a 5%, a medida é considerada imprecisa (Curate, 2010).

### 2.2.9. Metodologia estatística – exatidão:

De forma a verificar quais são as melhores medidas e consequentes metodologias para a amostra em estudo, calculou-se a exatidão. De forma a calcular-se primeiro criou-se um índice no programa *Microsoft excel* com cada ponto de cisão e regressão logística e os respectivos *cut-offs*. De seguida atribuiu-se o valor abaixo, igual e/ou superior ao *cut-off* conforme cada metodologia, de forma a poder ter um resultado direto de quando se inseriu os valores das medições.

A fórmula usada para a exatidão pode ser verificada na equação 6:

Equação 6: Fórmula utilizada para verificar a exatidão

$$\frac{n^{\circ} \text{ de medições verdadeiras}}{n^{\circ} \text{ de medições totais}} \times 100$$

### 3. Resultados e Discussão:

#### 3.1. Índice de Conservação Anatômica (ICA):

Da amostra de 10 indivíduos, a maioria dos indivíduos apresenta um estado de conservação muito bom (indivíduo 1, 5, 6, 7, 9 e 10), enquanto dois (2 e 8) apresentam um estado de conservação razoável (tabela 12).

Tabela 12: ICA dos esqueletos da amostra

<b>Indivíduo</b>	<b>IC c</b>	<b>IC ax</b>	<b>IC ap</b>	<b>IC ex</b>	<b>ICA</b>	<b>ICA%</b>	<b>Classe</b>	<b>Estado</b>
<b>1</b>	0,81	0,69	0,82	0,49	0,70	70,03	5	Muito Bom
<b>2</b>	0,58	0,13	0,63	0,21	0,38	38,42	3	Razoável
<b>3</b>	0,94	0,67	0,90	0,78	0,82	82,21	6	Excelente
<b>4</b>	0,93	0,30	0,49	0,00	0,43	42,81	4	Bom
<b>5</b>	0,96	0,36	0,69	0,41	0,61	60,62	5	Muito Bom
<b>6</b>	0,90	0,55	0,82	0,56	0,71	70,66	5	Muito Bom
<b>7</b>	0,88	0,55	0,86	0,39	0,67	66,93	5	Muito Bom
<b>8</b>	0,68	0,18	0,42	0,01	0,32	32,09	3	Razoável
<b>9</b>	0,83	0,69	0,64	0,35	0,63	62,69	5	Muito Bom
<b>10</b>	0,88	0,60	0,83	0,72	0,76	75,92	5	Muito Bom

IC c: índice de conservação do crânio; IC ax: índice de conservação do esqueleto axial; IC ap: índice de conservação apendicular e IC ex: índice de conservação das extremidades (mãos e pés)

#### 3.2. Afinidades populacionais:

Da amostra de 10 indivíduos, a maioria foi considerada europeia, não tendo sido possível realizar a estimativa em três indivíduos (tabela 13).

Tabela 13: Afinidade populacional (%) dos indivíduos da amostra

<b>Indivíduo</b>	<b>Afinidades Populacionais (%)</b>			
	Africano	Nativo americano	Asiático	Europeu
<b>1</b>	-	-	-	-
<b>2</b>	-	-	-	-
<b>3</b>	0,34	1,70	0,04	<b>97,92</b>
<b>4</b>	0,40	29,28	1,79	<b>68,52</b>
<b>5</b>	4,09	33,00	1,52	<b>61,39</b>

Indivíduo	Afinidades Populacionais (%)			
	Africano	Nativo americano	Asiático	Europeu
<b>6</b>	0,44	4,50	0,23	<b>94,83</b>
<b>7</b>	1,66	3,04	0,28	<b>95,01</b>
<b>8</b>	-	-	-	-
<b>9</b>	1,63	4,50	0,20	<b>93,67</b>
<b>10</b>	2,16	24,86	8,42	<b>64,56</b>

Continuação da tabela 15. A negrito encontram-se destacadas as maiores percentagens.

### 3.3. Sexo:

Os resultados obtidos a partir dos métodos morfológicos e métricos são contraditórios para a maioria dos indivíduos. Na amostra de 10 indivíduos, identificaram-se cinco indivíduos do sexo feminino, três indivíduos do sexo masculino e dois indivíduos de sexo indeterminado. Verificou-se a concordância dos resultados para um indivíduo (indivíduo 2). No entanto, o seu estado de conservação razoável impediu a aplicação de vários métodos. (tabela 14).

Tabela 14: Distribuição por sexo dos indivíduos da amostra

Métodos	Indivíduos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Buikstra &amp; Ubelaker (1994)</b>	F	F	M	I	M	F	F	M	M	M
<b>Ferembach et al. (1980)</b>	F	F	M	I	F	F	F	I	M	F
<b>Bruzek (2002)</b>	F	F	M	-	-	M	M	-	M	M
<b>Gama et al. (2015)</b>	F	-	-	-	F	F	-	-	-	F
<b>Curate et al. (2024) (rádio)</b>	M	-	M	-	M	M	M	-	-	M
<b>Cardoso (2000)</b>	F	F	M	F	M	F	F	M	M	F
<b>Wasterlain (2000)</b>	F	F	M	F	I	F	F	F	M	F
<b>Maio et al. (2024)</b>	F	-	F	-	-	F	F	-	-	F
<b>Harris &amp; Case (2012)</b>	F	-	F	-	F	F	F	-	F	F
<b>Curate et al. (2024) (tarso)</b>	M	-	M	-	M	M	F	-	M	F
<b>Biologia Molecular</b>	F		M			F				M

F: sexo feminino; M: sexo masculino; I: Indeterminado

Os resultados das metodologias, na maior parte dos casos correspondeu ao sexo cromossômico dos indivíduos, sendo o indivíduo 10 o único que tem um resultado cromossômico diferente do estimado. As metodologias que resultaram mais vezes em

estimativas incorretas foi o método de Bruzek (2002) e o método de Curate et al. (2024) aplicado ao rádio (tabela 14).

Os métodos morfológicos, como referenciado anteriormente, são mais subjetivos, porém, em cinco dos 10 indivíduos (Indivíduos 1, 2, 3, 4 e 9) os resultados foram concordantes. Nos restantes cinco os resultados são contraditórios. Tal pode acontecer dado a idade biológica, nível hormonal, fatores ambientais que o indivíduo passou terem afetado os ossos, tornando a estimativa do sexo mais complexa. Os métodos morfológicos selecionados são métodos amplamente utilizados em populações portuguesas. No entanto é preciso considerar as diferenças intra e inter-populacionais o que pode levar a estimativas incorretas.

O método de Bruzek (2002) foi desenvolvida com base em duas populações, a CEI de Paris e a CEI de Coimbra. Para a população portuguesa, o método apresenta uma taxa de classificação correta no valor de 95%. No entanto, a metodologia foi desenvolvida em indivíduos com um século de diferença dos estudados no presente estudo. Por conseguinte, mudanças seculares podem ter ocorrido, traduzindo-se em diferenças ósseas. Outro fator a considerar é a idade, enquanto a coleção da metodologia de Bruzek (2002) tem uma grande variabilidade de idades, a do presente estudo constituída por indivíduos idosos. Como foi referido anteriormente, o envelhecimento biológico, pode provocar algumas alterações morfológicas no esqueleto que dificultam a estimativa do sexo.

Os métodos métricos, apesar de serem validados em populações portuguesas, apenas apresentam concordância em dois (indivíduos 2 e 4) dos 10 indivíduos. No entanto são aqueles que têm um nível de ICA inferior (tabela 14). Nos restantes indivíduos os resultados foram contraditórios (tabela 15). Os métodos métricos selecionados foram desenvolvidos e validados em CEI portuguesas, como referido anteriormente.

O método de Gama et al. (2015) utilizou as duas coleções portuguesas, a CEIC e a CEI do século XXI. Na primeira, que serviu para aprimorar a técnica, obteve uma classificação correta de 89,7%, enquanto na segunda, que serviu para validar, obteve-se uma classificação correta de 86,7%. Os próprios investigadores afirmam que dado se tratar de uma amostra pequena e envelhecida, mais testes seriam necessários. Os indivíduos do presente estudo, e os das coleções estudadas Gama et al. (2015) enquadraram-se na mesma cronologia, entre os séculos XIX e XXI. Porém, dado que somente se basearam numa equação, não havendo pontos de cisão, caso ICA seja baixo, torna-se

impossível de aplicar a metodologia. Tal como ocorreu com alguns indivíduos (os indivíduos 2, 3, 4, 7, 8 e 9) (tabela 11).

O método de Cardoso (2000) foi desenvolvido na CEIL. A sua amostra consistiu em indivíduos que faleceram entre 1898 e 1956, tendo nascido entre 1836 e 1938. Quando se compara a amostra com a do presente estudo, há divergências que se podem dever as mudanças seculares e natureza biológica dos indivíduos. É importante realçar que a amostra de Cardoso (2000) apresentava uma maior variabilidade de idades superior à do presente estudo.

O método de Wasterlain (2000) foi desenvolvido a partir da CEIC. A amostra consistiu em 100 indivíduos adultos do sexo masculino e 100 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 20 e 89 anos e que nasceram entre 1822 e 1909. A grande diferença entre a amostra de Wasterlain (2000) e a da amostra no presente estudo é a sua composição etária. Enquanto a da metodologia tem idades compreendidas entre 20 e 89 anos, a do presente estudo apresenta apenas idosos.

O método de Curate et al. (2021) aplicado ao rádio foi desenvolvido e validado em duas amostras. Foi desenvolvido na CEIC e validado na CEIL. As coleções apresentam características similares. A primeira tem indivíduos que nasceram entre 1833 e 1918 e a segunda tem indivíduos que nasceram entre 1859 e 1930. A metodologia divide-se em regressões logísticas, *support vector machine* (SVM) e pontos de cisão, o que permite ao investigador escolher como aplicar a metodologia. No entanto, assim como é mencionado pelos autores, mudanças seculares podem afetar a metodologia.

O método de Maio et al. (2024) foi desenvolvido e validado em duas coleções. A CEI do século XXI serviu para desenvolver a metodologia, enquanto a CEIC serviu para validar a metodologia. Como tal, os indivíduos do presente estudo e da metodologia encontram-se cronologicamente entre o século XIX e XXI. A metodologia, baseia-se em pontos de cisão e numa equação que permite a estimativa do sexo. Em relação aos pontos de cisão, o valor mais elevado, quando se considera ambas as coleções, é a medida entre a distância máxima entre a base e o ápex da rótula (MAXH) com 77%, todas as outras medidas apresentam valores inferiores. Em relação à equação, apresenta uma classificação correta de 81,1% entre as duas coleções, contudo, basta não haver uma medida que se torna impossível de recorrer à equação. No presente estudo, apesar da rótula estar presente, esta encontrava-se num estado de conservação baixo, tornando impossível aplicar a metodologia ou aplicando-se parcialmente.

O método de Curate et al. (2021) aplicado ao tarso foi desenvolvido a partir de 93 indivíduos do sexo feminino e 87 masculino da CEIC, que nasceram entre 1827 e 1912. Com base em análises estatísticas estes investigadores desenvolveram múltiplos modelos preditivos, dividindo-os em regressões logísticas e SVM, criando também pontos de cisão. Estes resultados foram posteriormente comparados com resultados de outras coleções de forma a permitir a sua validação. Uma das grandes vantagens deste método é que, para além de estar dividido em pontos de cisão, regressões logísticas e SVM, apresenta múltiplas regressões logísticas e SVMs, permitindo o investigador decidir qual é a mais correta para a situação em concreto. No entanto aplicar uma metodologia com indivíduos que viveram há mais de um século pode causar resultados incorretos, como consequência das mudanças seculares, dieta, condições higiénicas e sanitárias, entre outros.

O método de Harris & Case (2012), foi aplicado a duas populações portuguesas por Navega et al. (2015). A primeira pertence à CEIC, que serviu para aprimorar a técnica, enquanto a segunda pertence à CEI do século XXI. Navega et al. (2015) verificou que existiam medidas mais dimórficas em comparação com outras, apresentando uma taxa de classificação correta foi semelhante à de Harris & Case (2012), variando entre 88 e 92%. No entanto, a aplicação do modelo criado por Navega et al. (2015) poderá ser mais complexa, quando tendo em conta o modelo de Harris & Case (2012). A primeira apresenta uma árvore de decisão (BFTree) e quem aplica o modelo tem de seguir a árvore, enquanto a segunda é uma substituição direta na equação pelo valor da medida, resultando num valor inferior ou superior a zero, estimando, assim, o sexo do indivíduo. A metodologia de Harris & Case (2012) tem características semelhantes à do presente estudo, sendo a maior diferença as afinidades populacionais americana-europeia, enquanto os do presente estudo são europeus.

O indivíduo 1 apresenta uma maioria de resultados classificados no sexo feminino (tabela 15).

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MORFOLÓGICOS E MÉTRICOS PARA A ESTIMATIVA DO SEXO USANDO O GENE AMEL COMO MÉTODO CONFIRMATÓRIO

Tabela 15: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 1

Cardoso (2000)				Waterman (2000)				Harris & Case (2012)				Miao et al. (2022)					
Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Equação	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo	
UCM	296	F		U1	296	F		ECallg	73	-3,98	F	MAXH	33,46	F			
UCT	285	F		U2	285	F		ETallg	-	-	-	MAXB	37,45	F			
UDMI	15,97	F		U3	38,32	F		ETalBrd	-	-	-	MAXT	18,91	F			
UDMA	18,15	F		U4	37,04	F		ETalH	-	-	-	HAF	31,38	M	-9,73	F	
UDVC	38,32	F		U5	18,15	F		ECobBrd	20	-9,78	F	MAFB	18,11	F			
UDTC	37,04	F		U6	15,97	F		ENavBrd	30	-6,59	F	LAFB	23,97	F			
ULB	42,33	F		U7	54	F		ECFllg	23	-3,45	F	Curate et al. (2021)					
UPM	54	F		U8	42,33	F		ECFIBrd	16	-4,07	F	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo	
RCM	206	F		R1	206	F		ECF3Lg	19	-7,89	F	MCDDR	48	M	0,3	M	
RCF	198	F		R2	198	F		ECF3Ht	14	-11,53	F	IEWR	22,43	F			
RPM	48	M		R3	48	M		DCallg	73	-4,92	F	Curate et al. (2021)					
RCM	418	F		F1	418	F		DTallg	51	-4,09	F	Medida	Medição	Sexo	Probabilidade	Sexo	
FCF	413	F		F2	413	F		DTalBrd	31	-11,09	F	TMI	50	F			
FCT	390	F		F3	25,64	F		DTalHt	24	-9,75	F	TMA	32,17	M	0,57	M	
FDTM	25,62	F		F4	25,62	F		DoubBrd	19	-10,09	F	TMS	26,79	M			
FDSM	25,64	F		F5	23,6	F		DNavBrd	27	-8,99	F	CMBH	73,43	M			
FDTS	29,95	M		F6	29,95	F		DCFllg	21	-5,78	F	CMS	38,13	M	1	M	
FDS8	23,6	F		F7	95	M		DCFIBrd	16	-4,13	F						
FDVC	38,13	F		F8	37,29	F		DCF1Ht	29	-3,33	F						
FDTC	37,29	F		F9	28,13	F		DCF2Brd	-	-	-						
FLB	67,95	F		T1	333	F		DCF2Ht	-	-	-						
FPM	95	M		T2	326	F		DCF3Lg	21	-6,22	F						
TCM	333	F		T3	23,35	F		DCF3Ht	15	-9,34	F						
TCN	326	F		T4	25,5	F		Gama et al. (2015)									
TCT	328	F		T5	80	M		Medida	Medição	Equação	Sexo						
TDT	23,35	M		T6	57,14	F		CMA	39,97								
TDS	25,5	F		T7	328	F		LMA	42,91	-9,73	F						
TLB	57,14	F		T8	44,49	F		LMFDS	13,08								
				T8	31,81	F		DSMVC	11,94								
				T8	20,34	F											

F: sexo feminino; M: sexo masculino; I: Indeterminado. A negrito são as medidas que apresentam um ETMrel superior a 5%

Mesmo havendo concordância na maioria dos resultados, obtiveram-se medidas em que o resultado foi contraditório. As medidas do perímetro mínimo do rádio (RPM), diâmetro transversal sub-trocântero do fêmur (FDTS), diâmetro transversal da tíbia ao nível do buraco nutritivo (TDT) e perímetro mínimo da tíbia (TPM) do método de Cardoso (2000) classificaram o indivíduo no sexo masculino. Estas medidas apresentam uma taxa de classificação correta total mais baixa quando comparadas com outras medidas, como, por exemplo, as medidas comprimento máximo do rádio (RCM), largura bicondilar do fêmur (FLB) e largura bi-articular da tíbia (TLB). Para além destas, as medidas perímetro mínimo do rádio (R3) e perímetro mínimo da tíbia (T5) do método de Wasterlain (2000) resultaram, também, numa estimativa masculina. Estas, assim como as de Cardoso (2000), apresentam uma taxa de classificação correta mais baixa quando em comparação com outras medidas, como, por exemplo, comprimento máximo do rádio (R1), diâmetro vertical da cabeça do fêmur (F9) e diâmetro ântero-posterior ao nível do buraco nutritivo da tíbia (T3). Segundo a medida da altura máxima da superfície articular da rótula (HAF), do método de Maio et al. (2024), o indivíduo é classificado no sexo masculino, o que contradiz os resultados das restantes medidas e da equação. No método de Curate et al (2021), o resultado da medida largura da epífise do rádio (IEWR) classificou o indivíduo como sendo do sexo feminino, que tem um valor correto superior (89,8%) à medida circunferência mínima de diáfise distal do rádio (MCDDR). Porém a equação tem um valor correto superior a ambos (91,8%), por conseguinte estima-se o indivíduo como sendo do sexo masculino. No método de Curate et al. (2021) aplicada ao talus, a medida comprimento máximo do talus (TM1), que é a de maior fiabilidade (81,1%) classificou o indivíduo como feminino. Porém a regressão logística do talus resultou no sexo masculino, assim como as outras medidas do mesmo osso, estimando assim o indivíduo como sendo do sexo masculino. O mesmo método aplicado ao calcâneo resultou numa estimativa do sexo masculino. Tanto o método de Gama et al. (2015), assim como o de Harris & Case (2012) resultaram em estimativas femininas. Assim estima-se que o indivíduo seja do sexo feminino.

O indivíduo 2 apresenta uma maioria de resultados classificados no sexo feminino (tabela 16).

Tabela 16: Medições e respectivas estimativas do indivíduo 2

Cardoso (2000)			Westerhin (2000)			Harris & Casé (2012)			Miao et al. (2024)				
Medida	Medição	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo
UCM1	-	-	U1	-	-	ECall <sub>g</sub>	-	-	MAVH	-	-	-	-
UCT	-	-	U2	-	-	ETal <sub>g</sub>	-	-	MAVB	-	-	-	-
UDMI	16,35	M	U3	-	-	ETABid	-	-	MAXT	-	-	-	-
UDMA	18,26	F	U4	-	-	ETAlH	-	-	HAF	-	-	-	-
UDVC	-	-	U5	18,26	F	ECbBbid	-	-	MAFB	-	-	-	-
UDTC	-	-	U6	16,35	F	ENvBbid	-	-	LAFB	-	-	-	-
ULB	-	-	U7	63	M	ECFl <sub>g</sub>	-	-	Currie et al. (2021)				
UPM	63	M	U8	-	-	ECFlBbid	-	-					
RCM	-	-	R1	-	-	ECF3L <sub>g</sub>	-	-	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo
RCF	-	-	R2	-	-	ECF3H	-	-	MCDDR	-	-	-	-
RPm	-	-	R3	-	-	DCall <sub>g</sub>	-	-	IEWR	-	-	-	-
FCM	-	-	F1	-	-	DTal <sub>g</sub>	-	-	Currie et al. (2021)				
FCF	-	-	F2	-	-	DTAlBbid	-	-					
FCT	-	-	F3	19,65	F	DTAlH	-	-	TN1	-	-	-	-
FDTM	23,18	F	F4	23,18	F	DCubBbid	-	-	TN4	-	-	-	-
FDSM	-	-	F5	19,37	F	DNvBbid	-	-	TN5	-	-	-	-
FDTs	26,84	F	F6	26,84	F	DCFl <sub>g</sub>	-	-	CMBH	-	-	-	-
FDSS	19,37	F	F7	82	F	DCFlBbid	-	-	CMS	-	-	-	-
FDVC	-	-	F8	-	-	DCFlH	-	-					
FDTc	-	-	F9	-	-	DCFlBbid	-	-					
FLB	-	-	T1	-	-	DCFlH	-	-					
FPm	82	F	T2	-	-	DCFl <sub>g</sub>	-	-					
TCM	-	-	T3	-	-	DCFl <sub>g</sub>	-	-					
TCN	-	-	T4	-	-	DCFlH	-	-					
TCT	-	-	T5	-	-	DCFlBbid	-	-					
TDT	24,38	M	T6	-	-	DCFlH	-	-					
TDS	19,02	F	T7	-	-	DCFl <sub>g</sub>	-	-					
TLB	-	-	T8	-	-	DCFlH	-	-					
			T9	-	-	DCFl <sub>g</sub>	-	-					
			Ta1	-	-	DCFlH	-	-					
			Ta2	-	-	DCFl <sub>g</sub>	-	-					
			Ta3	-	-	DCFlH	-	-					

F: sexo feminino; M: sexo masculino; I: Indeterminado. A negrito são as medidas que apresentam um ETMrel superior a 5%

Apesar de haver concordância na maioria dos resultados, obtiveram-se medidas em que o resultado foi discordante. As medidas, diâmetro mínimo do úmero a meio da diáfise (UDMI), perímetro mínimo do úmero (UPM), TDT e TPM, do método de Cardoso (2000), resultaram em uma estimativa masculina. Estas apresentam uma classificação correta total inferior quando comparadas com outras medidas, como o diâmetro vertical da cabeça do úmero (UDVC) e TLB. O mesmo ocorre com o método de Wasterlain (2000). As medidas, perímetro mínimo do úmero (U7), diâmetro transverso ao nível do buraco nutritivo da tíbia (T4) e T5 classificaram o indivíduo no sexo masculino. Estas apresentam uma classificação correta inferior quando em comparação com outras medidas, como por exemplo, diâmetro transverso da cabeça do úmero (U4) e T3. Assim, estima-se que o indivíduo seja do sexo feminino, contudo, é importante referir, que o indivíduo 2 tem um ICA baixo (tabela 12), o que afetou a estimativa do sexo.

O indivíduo 3 apresenta uma maioria de resultados classificados no sexo masculino (tabela 17).

Tabela 17: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 3

Cardoso (2000)			Westerhin (2000)			Harris & Case (2012)			Mairo et al. (2021)				
Medida	Medição	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo
UCM	313	M	U1	313	M	ECaLg	75	-3,15	MAXH	37,17	F		
UCT	310	M	U2	310	M	ETaLg	52	-3,55	MAXB	43,32	M		
UDMI	20,44	M	U3	42,82	M	ETaBrd	39	-3,39	MAXT	19,67	M		
UDMA	20,93	F	U4	40,60	M	ETaIH	30	-2,67	HAf	26,52	F	-0,06	F
UDVC	42,82	M	U5	20,93	M	ECuBrd	<b>24</b>	<b>-4,67</b>	MAFB	21,10	M		
UDTC	40,6	M	U6	20,44	M	ENaBrd	38	-1,36	LAfB	25,52	F		
ULB	60,63	M	U7	77	M	ECfILg	25	-1,53	<b>Currie et al. (2021)</b>				
UPM	77	M	U8	60,63	M	ECfIBrd	19	1,07	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo
RCM	-	-	R1	-	-	ECfILg	15	-13,37	MCDDR	50	M		
RCF	-	-	R2	-	-	ECfIH	23	-1,22	IEWR	33,95	F	9,49	M
RPM	52	M	R3	52	M	DCaLg	75	-3,95	<b>Currie et al. (2021)</b>				
FCM	438	M	F1	438	M	DTaLg	50	-4,76	Medida	Medição	Sexo	Probabilidade	Sexo
FCF	436	M	F2	436	M	DTaBrd	<b>39</b>	<b>-2,66</b>	TMI	49,44	F		
FCT	425	M	F3	29,62	M	DTaIH	29	-4,05	TMI4	35,21	M	0,96	M
FDIM	32,38	M	F4	32,38	M	DcuBrd	30	2,42	TMI5	30,74	M		
FDSM	29,62	M	F5	27,39	M	DNaBrd	39	-0,67	CMBH	74,17	M		
FDTS	34,26	M	F6	34,26	M	DCfILg	25	-1,65	CMIS	41,83	M	1	M
FDSS	27,39	M	<b>F7</b>	<b>110</b>	<b>M</b>	DCfIBrd	21	4,23					
FDVC	44,66	M	F8	44,78	M	DCfIH	32	-0,70					
FDTC	44,78	M	F9	44,66	M	DCfIBrd	21	6,39					
FLB	78,5	M	T1	367	M	DCf2IH	25	2,46					
FPM	<b>110</b>	<b>M</b>	T2	362	<b>M</b>	DCfILg	20	-7,82					
TCM	367	M	T3	37,40	M	DCf3IH	23	-1,12					
TCN	362	M	T4	23,90	M	<b>Gama et al. (2015)</b>							
TCT	364	M	T5	90	M	Medida	Medição	Equação	Sexo				
TDT	23,9	M	T6	71,80	M	CMIA	-	-					
TDS	37,4	M	T7	364	M	LMA	-	-					
TLB	71,8	M	Ta1	50,04	F	LAFDS	-	-					
			Ta2	41,55	M	DSMC	-	-					
			Ta3	24,05	F								

F: sexo feminino; M: sexo masculino; I: Indeterminado. A negrito são as medidas que apresentam um ETMrel superior a 5%

Apesar de haver concordância na maioria das metodologias, também houve resultados contraditórios. A medida do diâmetro máximo do úmero a meio da diáfise (UDMA), do método de Cardoso (2000), foi a única que classificou o indivíduo no sexo feminino. Esta medida apresenta uma classificação correta total mais baixa, quando comparada, como por exemplo, UDVC. As medidas do comprimento e altura do talus (Ta1 e Ta3, respetivamente) e o comprimento do calcâneo (C2) do método de Wasterlain (2000) classificaram o indivíduo no sexo feminino. Contudo, estas apresentam uma classificação inferior quando comparadas com outras medidas, como por exemplo, a largura média do calcâneo (C4). É importante referir que as medidas Ta1 e Ta3, são as medidas com classificação correta total mais elevada do talus, com 86,85% e 85,2% respetivamente. O método de Curate et al. (2021) classificou o indivíduo no sexo masculino, mas a medida IEWR classificou no sexo feminino. A medida referida tem uma classificação correta inferior à da regressão logística (89,8% e 91,8%, respetivamente), que classificou o indivíduo no sexo masculino. O método de Curate et al. (2021) aplicado ao talus e calcâneo classificaram o indivíduo no sexo masculino. A medida TM1, a de maior fiabilidade para o talus (81,1%), classificou o indivíduo no sexo feminino. Contudo, esta apresenta uma classificação correta inferior quando comparado a da regressão logística (88,3%). O mesmo método, aplicado ao calcâneo classificou o indivíduo no sexo masculino. O método de Harris & Case (2012) classificou o indivíduo no sexo feminino. No entanto, as medidas: a largura do 1º cuneiforme esquerdo (ECF1Brd), a largura do cuboide direito (DCubBrd), a largura do 1º cuneiforme direito (DCF1Brd), a largura do 2º cuneiforme direito (DCF2Brd) e a altura do 2º cuneiforme direito (DCF2Ht) resultaram numa estimativa masculina. As medidas referidas têm uma classificação mais baixa, quando comparadas com outras medidas, como por exemplo, a altura do talus direito (DTaHt). O método de Maio et al. (2024) classificou o indivíduo no sexo feminino, no entanto as medidas HAF, a distância máxima entre o extremo medial e o lateral da rótula (MAFB) e a distância máxima entre o extremo medial e o lateral da rótula (MAXB) classificaram no sexo masculino. As medidas referidas apresentam uma classificação mais baixa quando comparadas com a equação. Assim, estima-se que o indivíduo seja do sexo masculino

O indivíduo 4 apresenta uma maioria de resultados classificados no sexo feminino (tabela 18).

Tabela 18: Medições e respectivas estimativas do indivíduo 4

Cardoso (2000)			Westerhain (2000)			Harris & Case (2012)			Miao et al. (2024)				
Medida	Medição	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo
UCM	-	-	U1	-	-	ECaLg	-	-	MAXH	-	-		
UCT	-	-	U2	-	-	ETaLg	-	-	MAXB	-	-		
UDMI	15,84	F	U3	-	-	ETaBrd	-	-	MAXT	-	-		
UDMA	18,29	F	U4	-	-	ETaH	-	-	HAF	-	-		
UDVC	-	-	U5	18,29	F	ECubBrd	-	-	MAFB	-	-		
UDTC	-	-	U6	15,84	F	ENaBrd	-	-	LAFB	-	-		
ULB	-	-	U7	70	M	ECFLg	-	-	Cunite et al. (2021)				
UPM	70	M	U8	-	-	ECFLBrd	-	-	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo
RCM	-	-	R1	-	-	ECF3Lg	-	-	MCDDR	-	-		
RCF	-	-	R2	-	-	ECF3H	-	-	IEWR	-	-		
RPM	49	M	R3	49	M	DCaLg	-	-	Cunite et al. (2021)				
RCM	-	-	F1	-	-	DTaLg	-	-	Medida	Medição	Sexo	Probabilidade	Sexo
FCF	-	-	F2	-	-	DTaBrd	-	-	TMI	-	-		
FCT	-	-	F3	24,62	F	DTaH	-	-	TM4	-	-		
FDTM	24,32	F	F4	24,32	F	DCubBrd	-	-	TM5	-	-		
FDSM	24,62	F	F5	22,19	F	DNaBrd	-	-	CMBH	-	-		
FDTs	27,36	F	F6	27,36	F	DCFLg	-	-	CMB	-	-		
FDSS	22,19	F	F7	89	M	DCF1Brd	-	-					
FDVC	-	-	F8	-	-	DCF1H	-	-					
FDTC	-	-	F9	-	-	DCF2Brd	-	-					
FLB	-	-	T1	-	-	DCF2H	-	-					
FPAL	89	M	T2	-	-	DCF3Lg	-	-					
TCM	-	-	T3	15,64	F	DCF3H	-	-					
TCN	-	-	T4	30,46	M	Cama et al. (2015)							
TCT	-	-	T5	74	M	Medida	Medição	Equação	Sexo				
TDT	30,46	M	T6	-	-	CMA	-	-					
TDS	15,64	F	T7	-	-	LMA	-	-					
TLB	-	-	Ta1	-	-	LMPDS	-	-					
			Ta2	-	-	DSMC	-	-					
			Ta3	-	-								

F: sexo feminino; M: sexo masculino; I: Indeterminado. A negrito são as medidas que apresentam um ETMrel superior a 5%

As medidas UPM, RPM, TDT e TPM do método de Cardoso (2000) classificou o indivíduo no sexo masculino. Estas medidas apresentam uma classificação correta total mais baixa quando comparadas com outras medidas, como por exemplo, UDVC, RPM, FLB e o diâmetro sagital da tibia ao nível do buraco nutritivo (TDS). O método de Wasterlain (2000) classificou o indivíduo no sexo feminino. No entanto, as medidas U7, R3, T4 e T5 classificaram o indivíduo no sexo masculino. As medidas referidas apresentam uma classificação correta total inferior quando comparando com outras medidas, como por exemplo, largura epicondilar do úmero (U8), R1, diâmetro antero-posterior a meio da diáfise do fêmur (F3) e T3. Assim, estima-se que o indivíduo seja do sexo feminino.

O indivíduo 5 apresenta uma maioria de resultados classificados no sexo masculino (tabela 19)

Tabela 19: Medições respectivas estimativas do indivíduo 5

Cardoso (2000)				Waterhain (2000)				Harris & Case (2012)				Miao (2021)							
Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Equação	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo			
UCM	-	-		U1	-	-		ECallg	-	-	-	MAXH	-	-					
UCT	-	-		U2	-	-		ETalLg	50	-4,76	F	MAXB	-	-					
UDMI	22,86	M		U3	-	-		ETABrd	36	-7,29	F	MAXT	-	-					
UDMA	18,98	F		U4	-	-		ETAlH	27	-5,99	F	HAF	-	-					
UDVC	-	-		U5	18,98	F		ECubBrd	-	-	-	MAFB	-	-					
UDTC	-	-		U6	22,86	M		ENaBrd	-	-	-	IAFB	-	-					
ULB	-	-		U7	82	M		ECFlLg	-	-	-	Cunite et al. (2021)							
UPM	82	M		U8	-	-	ECFlBrd	-	-	-	Medida					Medição	Sexo	Equação	Sexo
RCM	-	-		R1	-	-	ECF3Lg	-	-	-	MCDDR					51	M	10,77	M
RCF	-	-		R2	-	-	ECF3H	-	-	-	IEWR	34,98	F						
RPM	50	M		R3	50	M		DCaLg	-	-	-	Cunite et al. (2021)							
FCM	411	F		F1	411	F	DTalLg	54	-2,09	F	Medida					Medição	Sexo	Probabilidade	Sexo
FCF	409	F		F2	409	F	DTABrd	37	-4,77	F	TMI1					48,41	F		
FCT	-	-		F3	30,63	F		DtalH	30	-2,91	F	TMA	32,67	M	0,92	M			
FDTM	29,59	M		F4	29,59	M		DCubBrd	-	-	-	TMS	33,18	M					
FDSM	30,63	M		F5	28,35	M		DNaBrd	-	-	-	CMBH	-	-					
FDTs	34,10	M		F6	34,10	M		DCFlLg	23	-3,72	F	CMB	-	-					
FDSs	28,35	M		F7	107	M		DCFlBrd	15	-5,8	F								
FDVC	-	-		F8	-	-		DCFlH	30	-2,45	F								
FDTC	-	-		F9	-	-		DCFlBrd	-	-	-								
FLB	75,82	F		T1	-	-		DCFlH	-	-	-								
FPM	107	M		T2	-	-		DCFlLg	20	-7,82	F								
TCM	-	-		T3	26,40	F		DCFlH	23	-1,12	F								
TCN	-	-		T4	38,29	M		Gann et al. (2015)											
TCT	-	-		T5	110	M						Medida	Medição	Equação	Sexo				
TDT	38,29	M		T6	-	-						CMA	47,13						
TDS	26,4	F		T7	-	-		LMA	50,01	-0,98	F								
TLB	-	-		T81	49,27	F		LAFDS	15,69										
				T82	37,75	F		DSMC	14,05										
				T83	20,79	F													

F: sexo feminino; M: sexo masculino; I: Indeterminado. A negrito são as medidas que apresentam um ETMrel superior a 5%

O método de Cardoso (2000) classificou o indivíduo no sexo masculino, mas as medidas UDMA, o comprimento máximo do fémur (FCM), o comprimento fisiológico do fémur (FCF), FLB e TDS classificaram no sexo feminino. As medidas referidas, UDMA e TDS, quando comparadas com outras medidas, como por exemplo, UPM e TLB, têm uma classificação correta total mais baixa. Em relação à medida FLB, esta é a medida com maior fiabilidade do fémur, com 86,8% e a terceira mais fiável da metodologia, a seguir a UDVC e TLB, com 88,2% e 87,8%, respetivamente. O método de Wasterlain (2000) classificou o indivíduo como indeterminado. As medidas do diâmetro máximo a meio de diáfise do úmero (U5), comprimento máximo do fémur (F1), comprimento total em posição natural do fémur (F2), F3, T3 e todas as medidas do talus classificaram o indivíduo no sexo feminino. As restantes no sexo masculino. O método de Curate et al. (2021), classificou o indivíduo no sexo masculino. A medida IEWR foi a única que classificou o sexo no sexo feminino, no entanto esta apresenta uma classificação correta mais baixa, quando comparada com a regressão logística. O método de Curate et al. (2021) aplicado ao talus resultou numa estimativa masculina. A medida TM1 foi a única a classificar no sexo feminino, no entanto, esta medida apresenta uma classificação correta inferior quando comparada com outras, como por exemplo, a regressão logística. O método de Gama et al. (2015) e o de Harris & Case (2012) classificaram no sexo feminino. Assim, estima-se que o indivíduo seja do sexo masculino.

O indivíduo 6 apresenta uma maioria de resultados classificados no sexo feminino (tabela 20).

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MORFOLÓGICOS E MÉTRICOS PARA A ESTIMATIVA DO SEXO USANDO O GENE AMEL COMO MÉTODO CONFIRMATÓRIO

Tabela 20: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 6

Cardoso (2000)				Waterhain (2000)				Harris & Case (2012)				Miao (2014)					
Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Equação	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo	
UCM	281	F		U1	281	F		ECaIlg	-	-	-	MAXH	32,89	F			
UCT	278	F		U2	278	F		ETaIlg	49	-5,37	F	MAXB	38,47	F			
UDMII	15,19	F		U3	37,88	F		ETaBrd	34	-9,90	F	MAXT	18,74	F			
UDMA	19,17	F		U4	-	-		ETaIH	27	-5,99	F	HAF	20,81	F	-2,83	F	
UDVC	37,88	F		U5	19,17	F		ECaBrd	-	-	-	MAFB	20,41	M			
UDTC	-	-		U6	15,19	F		ENaBrd	36	-2,67	F	LAFB	14,40	F			
ULB	52,24	F		U7	67	M		ECFIlg	24	-2,50	F	Currie et al. (2021)					
UPM	67	M		U8	52,24	F		ECFIbBrd	15	-5,79	F	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo	
RCM	190	F		R1	190	F		ECF3lg	-	-	-	MCDDR	49	M			
RCF	191	F		R2	191	F		ECF3Hr	-	-	-	IEWR	29,72	F	5,97	M	
RPm	52	M		R3	52	M		DCaIlg	-	-	-	Currie et al. (2021)					
FCM	-	-		F1	-	-		DTaIlg	46	-7,44	F	Medida	Medição	Sexo	Probabilidade	Sexo	
FCF	-	-		F2	-	-		DTaBrd	32	-10,04	F	Tn1	49,44	F			
FCT	-	-		F3	23,64	F		DTaIH	28	-5,19	F	Tn4	35,21	M	0,96	M	
FDTM	22,74	F		F4	22,74	F		DCaBrd	25	-3,27	F	Tn5	30,74	M			
FDSM	23,64	F		F5	23,08	F		DNaBrd	-	-	-	CMBH	74,17	M			
FDTs	26,99	F		F6	26,99	F		DCFIlg	-	-	-	CMS	41,83	M	1	M	
FDSs	23,08	F		F7	108	M		DCFIbBrd	-	-	-						
FDVC	-	-		F8	-	-		DCFIHr	-	-	-						
FDTC	-	-		F9	-	-		DCF2Brd	-	-	-						
FLB	-	-		T1	325	F		DCF2Hr	-	-	-						
FPm	108	M		T2	320	F		DCFIlg	-	-	-						
TCM	325	F		T3	29,3	F		DCFIHr	-	-	-						
TCN	320	F		T4	20,81	F		Gamm et al. (2015)									
TCT	-	-		T5	78	M		Medida	Medição	Equação	Sexo						
TDT	20,81	F		T6	-	-		CMA	39,56								
TDS	29,30	F		T7	-	-		LMA	47,35								
TLB	-	-		T81	46,99	F		LAFDS	16,08	-13,02	F						
				T82	38,10	F		DSMC	8,24								
				T83	20,67	F											

F: sexo feminino; M: sexo masculino; I: Indeterminado. A negrito são as medidas que apresentam um ETMrel superior a 5%

O método de Cardoso (2000) classificou o indivíduo no sexo feminino. No entanto as medidas UPM, RPM e TPM classificaram o indivíduo no sexo masculino. As medidas referidas, contudo, têm uma classificação correta total menor quando em comparação com outras medidas, como por exemplo, UDVC, RCM e TDS. O método de Wasterlain (2000) classificou o indivíduo no sexo feminino. No entanto as medidas U7, R3 e T5 resultaram em estimativas masculinas. Estas medidas apresentam uma classificação correta total inferior quando comparadas com outras, como por exemplo, U8, R1 e T3. O método de Curate et al. (2021) classificou o indivíduo no sexo masculino. A medida IEWR classificou o indivíduo como feminino, no entanto, esta apresenta uma classificação correta (%) inferior quando comparada, como por exemplo, com a regressão logística. O método de Curate et al. (2021) aplicada ao talus e ao calcâneo classificou o indivíduo no sexo masculino. A medida TM1, do talus, classificou o indivíduo no sexo feminino, porém, esta apresenta uma classificação correta (%) menor quando comparada, como por exemplo, com a regressão logística. O método de Maio et al. (2024) classificou o indivíduo no sexo feminino, no entanto a medida MAFB classificou o indivíduo no sexo masculino, o que contraria as restantes medidas e equação. A metodologia de Gama et al. (2015) e a Harris & Case (2012) classificaram o indivíduo no sexo feminino. Como tal, estima-se que o indivíduo seja do sexo feminino.

O indivíduo 7 apresenta uma maioria de resultados classificados no sexo feminino (tabela 21).

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MORFOLÓGICOS E MÉTRICOS PARA A ESTIMATIVA DO SEXO USANDO O GENE AMEL COMO MÉTODO CONFIRMATÓRIO

Tabela 21: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 7

Cardoso (2000)				Waterhain (2000)				Harris & Case (2012)				Mato et al. (2024)				
Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Equação	Sexo	Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo
UCM	295	F		U1	295	F		ECallg	-	-	-	MAHX	33,54	F		
UCT	290	F		U2	290	F		ETallg	48	-5,97	F	MAXB	-	-		
UDMII	19,69	M		U3	38,17	F		ETBrd	35	-8,59	F	MAXT	17,02	F		
UDMA	19,25	F		U4	36,95	F		ETalH	26	-7,09	F	HAF	-	-		
UDVC	38,17	F		U5	19,25	F		ECubBrd	-	-	-	MAFB	16,25	F		
UDTC	36,95	F		U6	19,69	M		ENaBrd	-	-	-	IAFB	20,78	F		
ULB	52,20	F		U7	68	M		ECFlg	-	-	-	Cunite et al. (2021)				
UPM	68	M		U8	52,20	F		ECFlBrd	-	-	-					Medida
RCM	206	F		R1	206	F		ECF3lg	-	-	-	MCDDR	50	M		
RCF	204	F		R2	204	F		ECF3H	-	-	-	IEWR	25,74	F		
RPm	52	M		R3	52	M		DCallg	-	-	-	Cunite et al. (2021)				
FCM	405	F		F1	405	F		DTallg	-	-	-					Medida
FCF	402	F		F2	402	F		DTBrd	-	-	-	TMI	44,94	F		
FCT	382	F		F3	29,92	F		DtalH	-	-	-	TMA	30,74	F		
FDTM	23,35	F		F4	23,35	F		DCubBrd	-	-	-	TMS	26,87	M		
FDSM	29,92	M		F5	26,15	M		DNaBrd	-	-	-	CMBH	-	-		
FDTs	24,68	F		F6	24,68	F		DCFILg	-	-	-	CMB	-	-		
FDSS	26,15	F		F7	99	M		DCFIBrd	-	-	-					
FDVC	40,04	F		F8	39,95	F		DCF1H	-	-	-					
FDTC	39,95	F		F9	-	-		DCF2Brd	-	-	-					
FLB	-	-		T1	-	-		DCF1H	-	-	-					
FPm	99	M		T2	-	-		DCF3lg	-	-	-					
TCM	-	-		T3	21,34	F		DCF3H	-	-	-					
TCN	-	-		T4	29,79	M										
TCT	-	-		T5	78	M										
TDT	29,79	M		T6	-	-										
TDS	21,34	F		T7	-	-										
TLB	-	-		T81	46,48	F										
				T82	34,63	F										
				T83	18,03	F										

F: sexo feminino; M: sexo masculino; I: Indeterminado. A negrito são as medidas que apresentam um ETMrel superior a 5%

O método de Cardoso (2000) classificou o indivíduo no sexo feminino, contudo as medidas UDMI, UPM, RPM, o diâmetro sagital a meio da diáfise do fêmur (FDSM), TDT e TPM classificaram-no no sexo feminina. As medidas referidas têm uma classificação total (%) inferior quando comparadas com outras medidas, como por exemplo, a largura bi-epicondilar do úmero (ULB), RCM, o diâmetro vertical da cabeça do fêmur (FDVC) e TDS. O método de Wasterlain (2000) classificou o indivíduo no sexo feminino, no entanto as medidas do diâmetro mínimo a meio da diáfise do úmero (U6), U7, R3, o diâmetro ântero-posterior subtrocanteriano do fêmur (F5), T4 e T5 classificaram-no no sexo masculino. As medidas referidas têm uma classificação total inferior quando comparado com outras, como por exemplo, U8, R1, o diâmetro transversal da cabeça do fêmur (F8) e T3. O método de Curate et al. (2021) classificou o indivíduo no sexo masculino, contudo a medida IEWR classificou-o no sexo feminino. A medida, referida apresenta uma classificação correta inferior quando comparada com outras, como por exemplo, a regressão logística. O método de Curate et al. (2021) aplicada ao talus classificou o indivíduo no sexo feminino, no entanto a medida da largura máxima da tróclea do talus (TM5) classificou-o no sexo masculino. A medida referida apresenta uma classificação correta (%) inferior quando comparada com outras, como por exemplo, TM1. O método de Maio et al. (2024) e Harris & Case (2012) classificaram o indivíduo no sexo feminino. Assim, estima-se que o indivíduo seja do sexo feminino.

O indivíduo 8, apresenta resultados discordantes (tabela 22).

Tabela 22: Medições e respetivas estimativas do indivíduo 8

Cardoso (2000)				Waterhain (2000)				Harris & Case (2012)				Miao (2024)				
Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Sexo		Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo
UCM	-	-		U1	-	-		ECallg	-	-		MAVH	-	-		
UCT	-	-		U2	-	-		ETallg	-	-		MAVB	-	-		
UDMI	16,57	M		U3	-	-		ETMBrd	-	-		MAVT	-	-		
UDMA	18	F		U4	-	-		ETalH	-	-		HAF	-	-		
UDVC	-	-		U5	18	F		ECubBrd	-	-		MAFB	-	-		
UDTC	-	-		U6	16,57	I		ENaBrd	-	-		LAFB	-	-		
ULB	-	-		U7	67	M		ECF1lg	-	-		Cunite et al. (2021)				
UPM	-	-		U8	-	-		ECF1Brd	-	-						
RCM	67	M		R1	-	-		ECF1lg	-	-		Medida	Medição	Sexo	Equação	Sexo
RCF	-	-		R2	-	-		ECF3H	-	-		MCDDR	-	-		
RPm	-	-		R3	49	M		DCallg	-	-		IEWR	-	-		
FCM	49	M		F1	-	-		DTallg	-	-		Cunite et al. (2021)				
FCF	-	-		F2	-	-		DTMBrd	-	-						Medida
FCT	-	-		F3	20,77	F		DTalH	-	-		TN1	-	-		
FDTM	-	-		F4	24,85	F		DCubBrd	-	-		TN4	-	-		
FDSM	24,85	F		F5	22,13	F		DNaBrd	-	-		TN5	-	-		
FDTS	20,77	F		F6	29,39	F		DCF1lg	-	-		CMBH	-	-		
FDSS	29,39	M		F7	86	M		DCF1Brd	-	-		CMS	-	-		
FDVC	22,13	F		F8	-	-		DCF1H	-	-						
FDTC	-	-		F9	-	-		DCF2Brd	-	-						
FLB	-	-		T1	-	-		DCF2H	-	-						
FPM	86	M		T2	-	-		DCF3lg	-	-						
TCM	-	-		T3	21,39	F		DCF3H	-	-						
TCN	-	-		T4	26,56	F		Gann et al. (2015)								
TCT	-	-		T5	76	M						Medida	Medição	Equação	Sexo	
TDT	26,56	M		T6	-	-		CMA	-	-						
TDS	21,39	F		T7	-	-		LMA	-	-						
TLB	-	-		T81	-	-		LAFDS	-	-						
				T82	-	-		DSMC	-	-						
				T83	-	-										

F: sexo feminino; M: sexo masculino; I: Indeterminado. A negrito são as medidas que apresentam um ETMrel superior a 5%

O método de Cardoso (2000) classificou o indivíduo no sexo masculino, porém as medidas UDMA, o diâmetro transversal a meio da diáfise do fêmur (FDTM), FDSM, o diâmetro sagital subtrocanteriano do fêmur (FDSS) e TDS classificaram-no no sexo feminino. Estas medidas apresentam uma taxa de classificação correta (%) menor quando comparadas com outras medidas, como por exemplo, UPM, FLB e TPM. O método de Wasterlain (2000) classificou o indivíduo no sexo feminino. Contudo, as medidas U7, R3 e T5 classificaram-no no sexo masculino. Estas medidas têm uma classificação correta mais baixa quando em comparação com outras, como por exemplo, U8, R1 e T3. É importante referenciar que dado o estado de conservação do indivíduo 8 (tabela 12), não permitiu verificar todas as medidas. Assim, considerando somente a tabela 22, não é possível determinar o sexo do indivíduo.

O indivíduo 9 apresenta uma maioria de resultados classificados no sexo masculino (tabela 23).



O método de Cardoso (2000) classificou o indivíduo no sexo masculino, no entanto as medidas UDMA, FDSM e TDS classificaram-no no sexo feminino. As medidas referidas apresentam uma classificação correta total inferior quando comparadas com outras, como por exemplo, ULB, FLB e TPM. O método de Wasterlain (2000) classificou o indivíduo no sexo masculino. As medidas U5, F3, F5, T3 e Ta3 classificaram o indivíduo no sexo feminino, porém, estas medidas apresentam uma classificação correta total menor quando comparadas com outras, como por exemplo, U8 e Ta1. As medidas do fêmur (F3 e F5), apesar de não terem uma classificação correta total superior em relação a outras medidas, neste indivíduo são as que apresentam a maior classificação. Em relação à tibia, a medida T3 é a que apresenta maior classificação correta total, no entanto, também foi a única que classificou o indivíduo no sexo feminino. A metodologia de Curate et al. (2021) aplicada ao talus classificou o indivíduo no sexo masculino. O método de Harris & Case (2012) classificou o indivíduo no sexo feminino, no entanto, a medida DTalHt classificou-o no sexo masculino. Esta medida apresenta uma classificação correta inferior quando em comparação com outras, como por exemplo, DTalLg. Como tal, estima-se que o indivíduo seja do sexo masculino.

O indivíduo 10 apresenta uma maioria de resultados classificados no sexo feminino (tabela 24).

Tabela 24: Medições e respectivas estimativas do indivíduo 10

Cardoso (2000)			Wastenhin (2000)			Harris & Case (2012)			Mário (2014)					
Méd	M	S	Méd	M	S	Méd	M	L	S	Méd	M	S	L	S
UCM	278	F	U1	278	F	ECaLg	66	-6,92	F	MAVH	-	-	-	-
UCT	275	F	U2	275	F	ETaLg	50	-4,76	F	MAXB	-	-	-	-
UDM	19,24	M	U3	37,85	F	ETaBd	33	-11,19	F	MAXT	-	-	-	-
UDMA	16,11	F	U4	34,86	F	ETaH	29	-3,78	F	HAF	-	-	-	-
UDVC	37,85	F	U5	16,11	F	ECubBd	-	-	-	MAFB	-	-	-	-
UDTC	34,86	F	U6	19,24	M	ENavBd	34	-3,98	F	LAFB	-	-	-	-
ULB	46,83	F	U7	69	M	ECFLg	20	-6,34	F	Curate et al. (2021)				
UPM	69	F	U8	46,83	F	ECFLBd	14	-7,50	F	Méd	M	S	L	S
RCM	199	F	R1	199	F	ECFLg	-	-	-	MCDDR	48	M	1,32	M
RCF	194	F	R2	194	F	ECF3H	-	-	-	IEWR	23,87	F	-	-
RPm	49	M	R3	49	M	DCaLg	67	-7,81	F	Curate et al. (2021)				
FCM	-	-	F1	-	-	DLaLg	50	-4,76	F	Méd	M	S	L	S
FCF	-	-	F2	-	-	DLaBd	33	-8,98	F	TMI	48	F	0,98	F
FCT	-	-	F3	23,36	F	DLaH	31	-1,77	F	TM4	26,90	F	-	-
FDTM	25,15	F	F4	-	-	DObBd	21	-7,82	F	TM5	25,45	F	-	-
FDSM	23,36	F	F5	25,15	F	DNavBd	33	-4,84	F	CMBH	67,37	M	-	-
FDTS	28,48	M	F6	-	-	DCFLg	20	-6,82	F	CMB	34,33	M	1	M
FDSS	24,01	F	F7	24,01	F	DCFLBd	16	-4,13	F					
FDVC	-	-	F8	-	-	DCF1H	26	-5,97	F					
EDTC	-	-	F9	28,48	F	DCF2Bd	-	-	-					
FLB	66,11	F	T1	308	F	DCF2H	-	-	-					
FPm	92	M	T2	304	F	DCF3Lg	-	-	-					
TCM	308	F	T3	29,26	F	DCF3H	-	-	-					
TCN	304	F	T4	21	F	Gama et al. (2015)								
TCT	305	F	T5	77	M	Méd	M	L	S					
TDT	21	F	T6	60,86	F	CMA	45,52							
TDS	29,26	M	T7	305	F	LMA	48,64							
TLB	60,86	F	Ta1	46,83	F	LMAFDS	15,04	-5,02	F					
			Ta2	35,07	F	DSMVC	12,97							
			Ta3	20,44	F									

F: sexo feminino; M: sexo masculino; I: Indeterminado. A negrito são as medidas que apresentam um ETMrel superior a 5%

O método de Cardoso (2000) classificou o indivíduo no sexo feminino, no entanto as medidas RPM, FDTS, TDS e TPM classificaram-no no sexo masculino. As medidas referidas apresentam uma classificação correta total inferior quando comparadas com outras, como por exemplo, ULB, RCM, FLB e TLB. O método de Wasterlain (2000) classificou o indivíduo no sexo feminino, contudo as medidas U5, U7, R3 e T5 classificaram-no no sexo masculino. Estas medidas apresentam uma classificação correta total menor quando comparadas com outras, como por exemplo, U8, R1 e T3. O método de Curate et al. (2021) classificou o indivíduo no sexo feminino, porém a medida IEWR classificou o indivíduo no sexo masculino. As medidas referenciadas têm uma classificação correta inferior quando comparada com, por exemplo, a regressão logística. O método de Maio et al. (2024) classificou o indivíduo no sexo feminino, mas as medidas MAXT e MAFB resultaram numa estimativa masculina. As medidas referidas contradizem as restantes medidas e equação. O método de Curate et al. (2021) aplicada ao talus classificou o indivíduo no sexo feminino, enquanto a mesma metodologia aplicada ao calcâneo classificou-o no sexo masculino. Tanto o método de Gama et al. (2015), como o de Harris & Case (2012) classificaram o indivíduo no sexo feminino. Assim, estima-se que o indivíduo seja do sexo feminino.

A estimativa do sexo foi afetada por vários fatores como o ICA, as afinidades populacionais e a idade. Apesar da maioria dos indivíduos ter o ICA acima dos 50% de conservação, em todos eles uma medida não foi possível de aplicar. E em sete dos 10 indivíduos, pelo menos uma metodologia não foi possível de aplicar. A estimativa em três dos 10 indivíduos pode ter sido afetada dado não ter sido possível estimar a afinidade populacional dos mesmos. Finalizando, a idade pode ter afetado a estimativa do sexo, dado que os ossos podem ter-se alterado com a idade, resultando em estimativas incorretas.

#### 3.4. Estatura:

No que concerne à estatura, o indivíduo do sexo feminino mais baixo é o indivíduo 6 com  $150 \pm 7,70$  cm, e o mais alto é o indivíduo 1, com  $154 \pm 7,70$  cm, segundo o método de Mendonça (2000) aplicada ao úmero. Para o sexo masculino, o indivíduo mais baixo é o indivíduo 5 com  $156,1 \pm 6,90$  cm e o mais o indivíduo 3 com  $163,28 \pm 6,90$  cm, segundo o método de Mendonça (2000) aplicado ao fémur fisiológico (Tabela 25).

A média das estaturas para o sexo feminino, segundo os resultados antropológicos, a partir do úmero é  $152,38 \pm 7,70$  cm, a partir do fémur fisiológico é  $154,57 \pm 5,92$  cm e a

partir do fêmur máximo é  $154,93 \pm 5,96$  cm. Para o sexo masculino, a partir do úmero é  $166,58 \pm 8,44$  cm, a partir do fêmur fisiológico  $159,69 \pm 6,90$  cm e a partir do fêmur máximo  $158,8 \pm 6,96$  cm.

Tabela 25: Estatura dos indivíduos da amostra

<b>Indivíduo</b>	<b>Úmero (cm)</b>	<b>Fêmur Fisiológico (cm)</b>	<b>Fêmur Máximo (cm)</b>
<b>1</b>	$154 \pm 7,70$	$155,90 \pm 5,92$	$156,46 \pm 5,96$
<b>2</b>	-	-	-
<b>3</b>	$161,72 \pm 8,44$	$163,28 \pm 6,90$	$163,26 \pm 6,90$
<b>4</b>	-	-	-
<b>5</b>	-	$156,1 \pm 6,90$	$154,5 \pm 6,96$
<b>6</b>	$150,39 \pm 7,70$	-	-
<b>7</b>	$154,68 \pm 7,70$	$153,24 \pm 5,92$	$153,29 \pm 5,96$
<b>8</b>	-	-	-
<b>9</b>	-	-	-
<b>10</b>	$149,47 \pm 7,70$	-	-

### 3.5. Idade:

A média de idades, segundo a metodologia de Buckberry & Chamberlain (2002), é entre os 53-92 anos. O indivíduo que poderá ser mais novo é o indivíduo 9, apresentando uma idade entre os 39-91 anos (tabela 26).

Tabela 26: Idade dos indivíduos da amostra esquelética

<b>Indivíduo</b>	<b>Buckberry &amp; Chamberlain (2002)</b>
<b>1</b>	53-92 anos
<b>2</b>	-
<b>3</b>	53-92 anos
<b>4</b>	-
<b>5</b>	-
<b>6</b>	53-92 anos
<b>7</b>	53-92 anos
<b>8</b>	-
<b>9</b>	39-91 anos
<b>10</b>	-

### 3.6. Corte da ponte:

A eliminação da ponte resultou numa destruição mínima, mantendo a maior parte do osso temporal (figura 16). Por conseguinte, o crânio, designadamente o osso temporal, poderá ser usado em futuros estudos químicos e/ou genéticos.

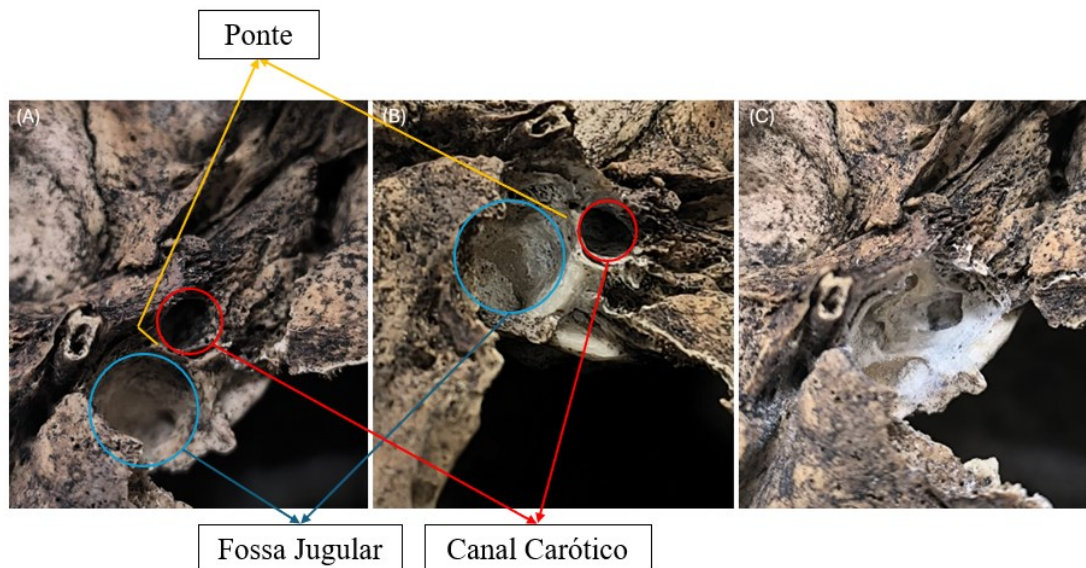


Figura 16: Corte da ponte do indivíduo 8, vista inferior da base do crânio. (A) antes do corte; (B) durante o corte; (C) pós o corte.

A maior parte das pontes extraídas no osso temporal pesam entre 0,2000 e 0,4000 gramas. A média do peso das pontes é de 0,2775 (tabela 27).

Tabela 27: Peso da ponte no osso temporal dos indivíduos da amostra

Indivíduo	Osso	Peso (g)
1	Temporal direito	0,1020
2	Temporal esquerdo	0,2290
3	Temporal direito	0,2890
4	Temporal esquerdo	0,3183
5	Temporal esquerdo	0,1993
6	Temporal direito	0,3662
7	Temporal direito	0,3430
8	Temporal direito	0,3492
9	Temporal esquerdo	0,2054
10	Temporal esquerdo	0,3734

### 3.7. Genética:

De forma a testar a técnica de extração, iniciou-se com um osso de porco e o kit QIAgen Investigator kit. Tanto o porco como o ser humano apresentam o gene *AMEL* nos cromossomas sexuais. O osso de porco, assim como a ponte do indivíduo 10, sofreram os mesmos procedimentos de lavagem e pulverização. Foi também possível realizar a extração de DNA. No entanto, o mesmo não aconteceu com as restantes amostras testadas. Verificando o kit, o protocolo sugerido não informa se é possível ou não extrair DNA de osso antigo, como tal estima-se que a diferença de idades pode ser a responsável pelo resultado negativo para a extração de DNA de osso humano.

Após tentar a extração através do kit, que é a partir de uma coluna com membrana de sílica, realizou-se uma extração orgânica. Dado não se saber se a quantidade de pó de osso seria o suficiente, realizou-se uma extração com 100 mg de pó de osso e outra extração com a utilização e consequente destruição de uma ponte completa.

O uso do osso pulverizado, apesar de maior gasto de tempo e material, também permite a utilização múltipla do mesmo. E, em caso de contaminação durante a extração, permite a repetição da mesma. A desvantagem da pulverização de osso é a perda de material ósseo, a ponte intacta pesava 373,4 mg, e pós pulverização o peso total passou a 289,5 mg. Esta perda de 83,9 mg corresponde a uma perda de 22,46% da amostra óssea (Figura 17).

A vantagem de utilização da ponte intacta, é que em teoria, por haver maior quantidade de material, há um melhor resultado de extração e consequente PCR na análise de resultados. A desvantagem da utilização completa da ponte é que é de utilização única (Figura 17).

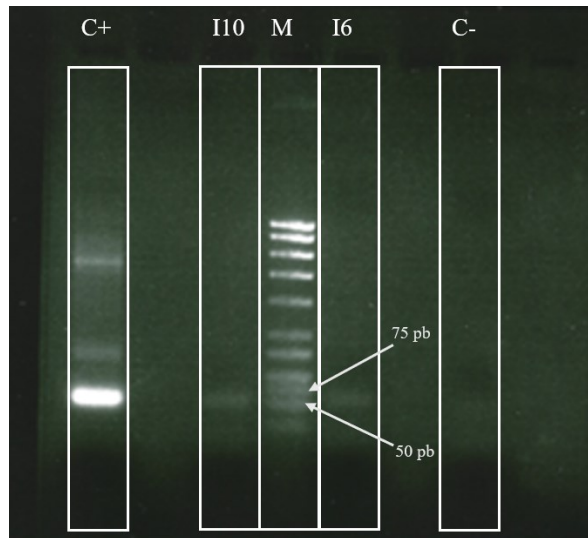


Figura 17: Gel de agarose com os resultados da amplificação do gene *AMEL*. Comparação do indivíduo 6 (I6) do qual a ponte foi totalmente usada com o 10 (I10) do qual se utilizou 100 mg de ponte pulverizada. C+, Controle positivo; C-, controle negativo.

Previamente ao processo de amplificação do DNA dos indivíduos, verificou-se o funcionamento dos *primers* com uma amostra teste. Todos os controles apresentam banda (figura 18). Assumindo serem contaminações, alterou-se o material e os reagentes da mix. No entanto, no segundo teste havia presença de bandas. Como tal, verificou-se a existência de dímeros de *primers* (ligação de *primers* de complementaridade de bases). Recorrendo à ferramenta, Multiple Primer Analyzer (ThermoFisher Scientific), foi possível aferir a existência de dímeros.

Confirmou-se a possibilidade de dímeros entre o primer forward (*AMEL2BF*) e o primer reverse (*SRYP*) (figura 20).

Em todos os *primers* foram utilizadas concentrações mais altas que as utilizadas no artigo de Masuyama et al. (2017) e uma mistura de PCR diferente. Enquanto o artigo utiliza 0,1  $\mu\text{M}$  e 0,2  $\mu\text{M}$  para a concentração final, e uma mistura de PCR de 10  $\mu\text{L}$ , adaptou-se para uma concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{L}$  de mistura de PCR. Estas mudanças podem ser a causa do aparecimento dos dímeros.

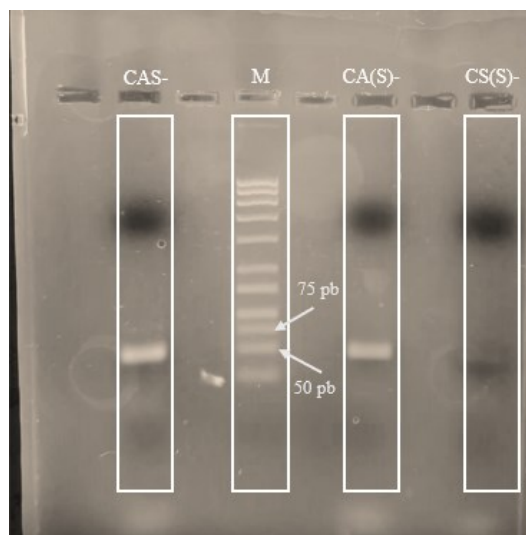


Figura 18: Gel de agarose com os resultados da amplificação do gene *AMEL* e *SRY*. CAS-, controlo negativo do gene *AMEL* e *SRY* (*primers* antisense); CA(S)-, controlo negativo do gene *AMEL* (*primers* sense); CS(S)-, controlo negativo do gene *SRY* (*primers* sense). O marcador (M) está ao centro e a zona de interesse apresenta-se entre os 75 pb e 50 pb.

Após resolvida a ocorrência dos dímeros, prosseguiu-se para a extração de DNA de controlos positivos do sexo masculino e feminino e dos indivíduos em estudo e as respetivas amplificações.

O controlo positivo do sexo masculino (Maas e Mas) apresenta bandas como produto de amplificação dos genes *AMEL* e *SRY*, tanto nos *primers* sense, como nos *primers* antisense. Em relação ao controlo positivo do sexo feminino, este só apresenta bandas correspondentes ao fragmento amplificado do gene *AMEL*, como esperado (figura 19). Em relação à amplificação do gene *AMEL* no sexo masculino, seria esperado a visualização de duas bandas, e só se visualiza uma, como no sexo feminino. O motivo de não ter ocorrido separação das bandas, pode ter sido que a percentagem de gel utilizado não ter sido o suficiente para a separação das mesmas. O sexo feminino apresenta uma banda com os *primers* para o gene *AMEL*. Esta banda corresponde a duas fragmentos com o mesmo tamanho, significando que tem dois X.

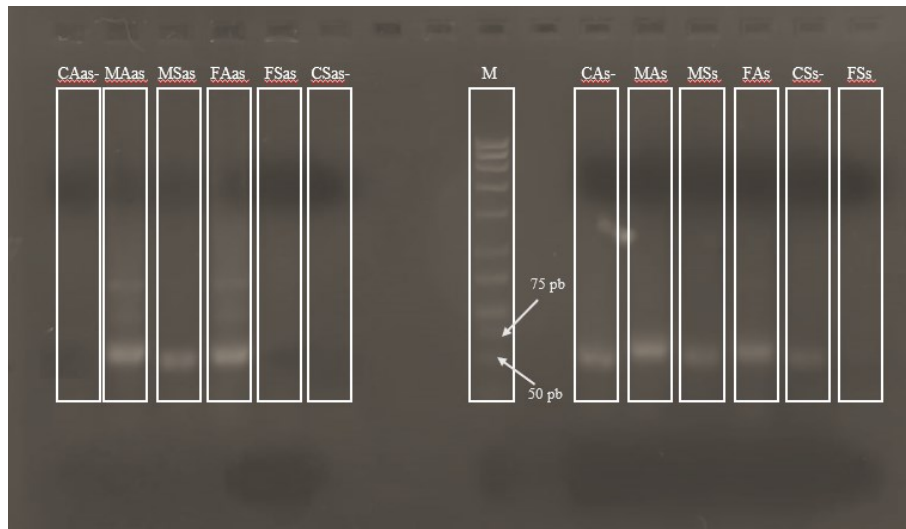


Figura 19: Gel de agarose com os resultados da amplificação do gene *AMEL* e *SRY*. O gel no lado direito apresenta as amplificações dos *primers* AS. CAAs-, controle negativo do gene *AMEL*; MAAs, controle positivo masculino do gene *AMEL*; MSAs, controle positivo masculino do gene *SRY*; FAAs, controle positivo feminino do gene *AMEL*; FSAs, controle positivo feminino do gene *SRY*; CSAs-, controle negativo do gene *SRY*. Ao centro apresenta-se o marcador (M), a zona de interesse é entre os 75 pb e os 50 pb. No lado esquerdo apresenta as amplificações dos *primers* Sense. CAAs-, controle negativo do gene *AMEL*; MAAs, controle positivo masculino do gene *AMEL*; MSAs, controle positivo masculino do gene *SRY*; FAAs, controle positivo feminino do gene *AMEL*; CSAs-, controle positivo feminino do gene *SRY*; FSAs, controle positivo feminino do gene *SRY*. O marcador (M) está ao centro e a zona de interesse apresenta-se entre os 75 pb e 50 pb

Dos 10 indivíduos, três resultaram na amplificação entre os 75 e 50 pares de base com os *primers* antisense (figuras 20 e 21).

Como se verifica, tanto na primeira extração (B1A e B1S)), como na segunda (B2A e B2S), não ocorreu a contaminação durante o processo de extração de DNA a partir do osso ou durante a amplificação do mesmo. Também é possível observar no gel A que não houve amplificação da amostra do indivíduo 7. Em relação ao gel B, pode-se observar duas bandas, ambas pertencentes ao indivíduo 3 (I3A e I3S) e, em relação ao gel C, pode-se observar uma banda pertencente ao indivíduo 6 (I6A) (figura 20). Como tal, o indivíduo 3 corresponde ao sexo masculino por apresentar bandas nos genes *AMEL* e *SRY*. E o indivíduo 6 corresponde ao sexo feminino por apresentar bandas no gene *AMEL*.

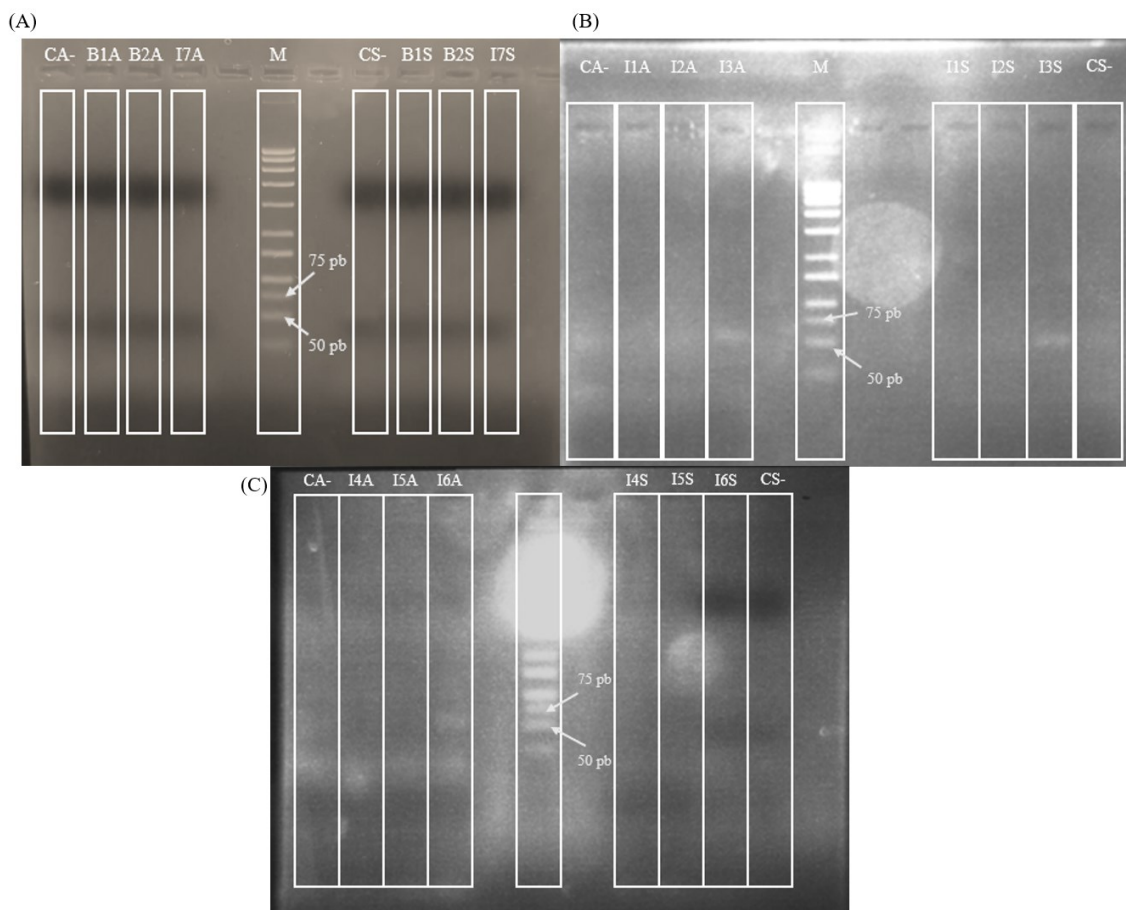


Figura 20: Géis de agarose com resultados da amplificação do gene *AMEL* e *SRY*. O gel (A) apresenta o branco da 1ª e 2ª extração e do indivíduo 7. CA-, controle negativo do gene *AMEL*; B1A, branco da 1ª extração do gene *AMEL*; B2A, branco da 2ª extração do gene *AMEL*; I7A, indivíduo 7 do gene *AMEL*; CS-, controle negativo do gene *SRY*; B1S, branco da 1ª extração do gene *SRY*; B2S, branco da 2ª extração do gene *SRY*; I7S, indivíduo 7 do gene *SRY*. O gel (B) apresenta os indivíduos 1, 2 e 3. CA-, controle negativo do gene *AMEL*; I1A, indivíduo 1 do gene *AMEL*; I2A, indivíduo 2 do gene *AMEL*; I3A, indivíduo 3 do gene *AMEL*; CS-, controle negativo do gene *SRY*; I1S, indivíduo 1 do gene *SRY*; I2S, indivíduo 2 do gene *SRY*; I3S, indivíduo 3 do gene *SRY*. O gel (C) apresenta os indivíduos 4, 5 e 6. CA-, controle negativo do gene *AMEL*; I4A, indivíduo 4 do gene *AMEL*; I5A, indivíduo 5 do gene *AMEL*; I6A, indivíduo 6 do gene *AMEL*; CS-, controle negativo do gene *SRY*; I4S, indivíduo 4 do gene *SRY*; I5S, indivíduo 5 do gene *SRY*; I6S, indivíduo 6 do gene *SRY*. O marcador (M) está ao centro e a zona de interesse apresenta-se entre os 75 pb e 50 pb.

No gel A, ocorreu uma contaminação na análise do gene *AMEL*, mas também houve amplificação de fragmentos fora da zona de interesse. A banda no controle negativo apresenta-se nos 300 pb, enquanto a do indivíduo 10 (I10A e I10S) apresenta-se acima dos 750 pb. Conseqüentemente mudou-se um material e os reagentes da mix de PCR. No gel B, conseguiu-se observar que após as mudanças de material e reagentes conseguiu-se eliminar as contaminações e as ligações inespecíficas (figura 21). Como tal, o indivíduo 10 corresponde ao sexo masculino por apresentar bandas nos genes *AMEL* e *SRY*.

Verificando as bandas presentes nos géis, é indicativo de que tanto o indivíduo 3, como o 10 são do sexo masculino e o indivíduo 6 é do sexo feminino (figura 20 e 21).

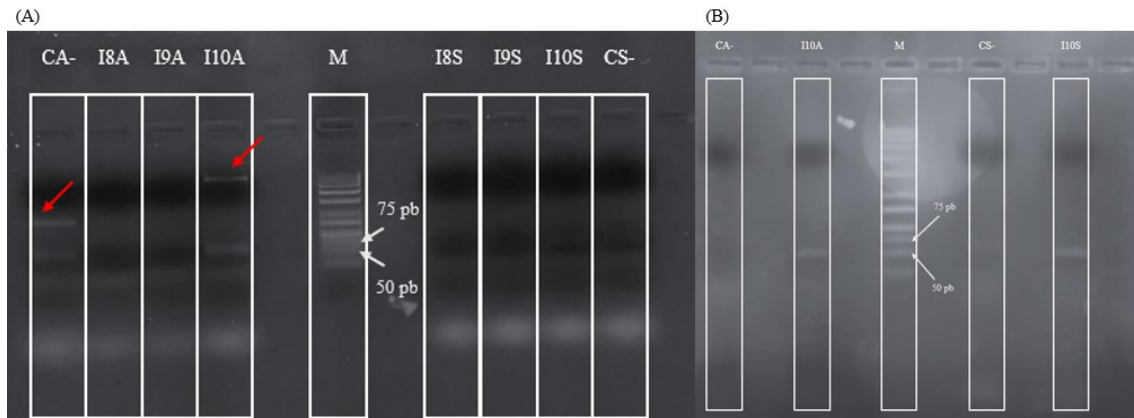


Figura 21: Géis de agarose com resultados da amplificação do gene *AMEL* e *SRY*. O gel (A) apresenta os indivíduos 8, 9 e 10. CA-, controlo negativo do gene *AMEL*; I8A, indivíduo 8 do gene *AMEL*; I9A, indivíduo 9 do gene *AMEL*; I10A, indivíduo 10 do gene *AMEL*; CS-, controlo negativo do gene *SRY*; I8S, indivíduo 8 do gene *SRY*; I9S, indivíduo 9 do gene *SRY*; I10S, indivíduo 10 do gene *SRY*. O gel (B) apresenta os indivíduos 10. CA-, controlo negativo do gene *AMEL*; I10A, indivíduo 10 do gene *AMEL*; CS-, controlo negativo do gene *SRY*; I10S, indivíduo 10 do gene *SRY*. O marcador (M) está ao centro e a zona de interesse apresenta-se entre os 75 pb e 50 pb.

Os indivíduos 3, 6 e 10 apresentam todas as bandas que já seriam esperadas, no entanto o indivíduo 1 (I1AS) também apresenta banda. O indivíduo 1 apresenta banda no gene *AMEL*, não apresentando banda no gene *SRY*, como tal pode ser indicativo de ser do sexo feminino (figura 22).

Tal pode acontecer porque a cadeia 5'-3' (sense) poderá estar mais danificada do que a cadeia 3'-5', resultando que os *primers* antisense não se consigam agregar e consequentemente amplificar. Mas no caso da cadeia 3'-5' (antisense) não estar tão degradada, os *primers* sense conseguem se agregar e amplificar.

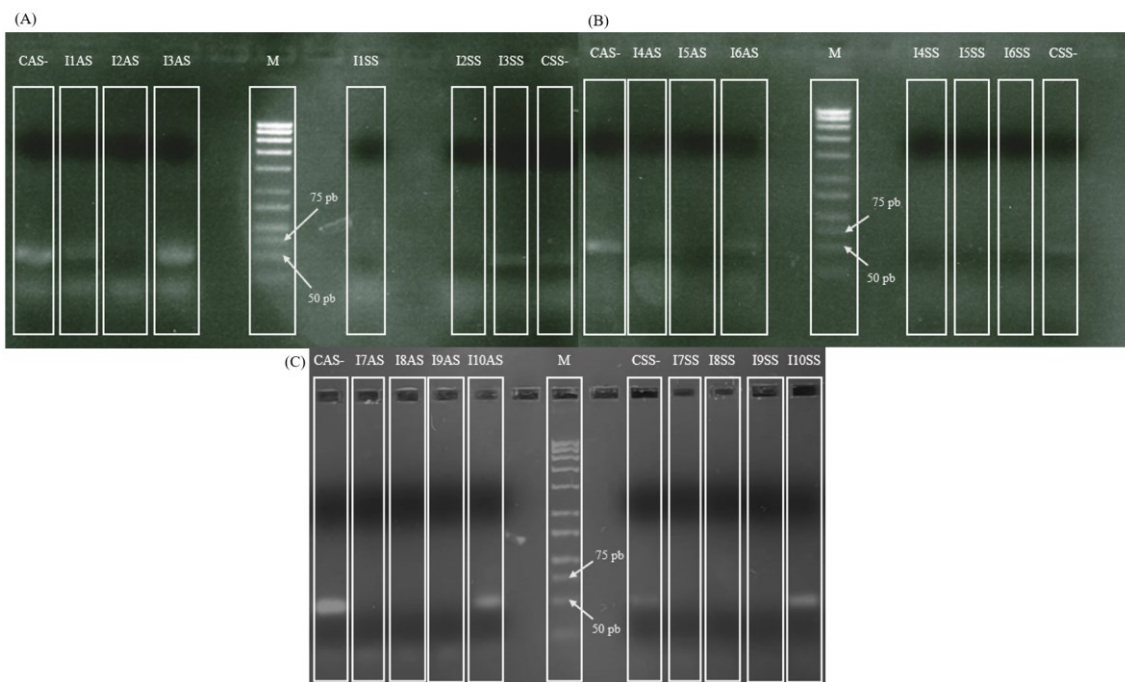
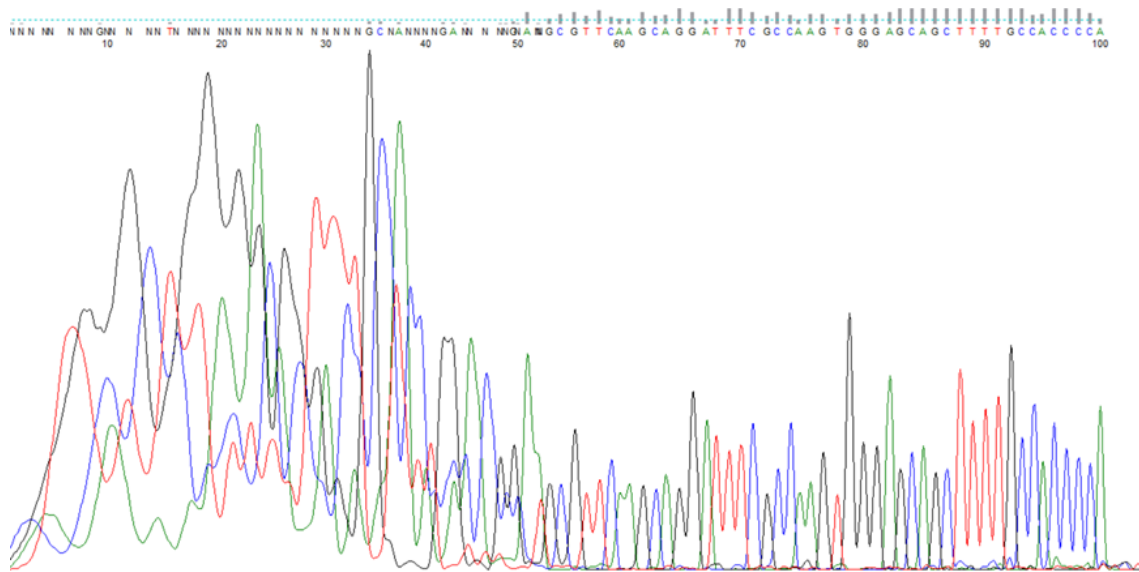


Figura 22: Géis de agarose com resultados da amplificação do gene *AMEL* e *SRY*. O gel (A) apresenta os indivíduos 1, 2 e 3. CAS-, controlo negativo do gene *AMEL*; I1AS, indivíduo 1 do gene *AMEL*; I2AS, indivíduo 2 do gene *AMEL*; I3AS, indivíduo 3 do gene *AMEL*; CSS-, controlo negativo do gene *SRY*; I1SS, indivíduo 1 do gene *SRY*; I2SS, indivíduo 2 do gene *SRY*; I3SS, indivíduo 3 do gene *SRY*. O gel (B) apresenta os indivíduos 4, 5 e 6. CAS-, controlo negativo do gene *AMEL*; I4AS, indivíduo 4 do gene *AMEL*; I5AS, indivíduo 5 do gene *AMEL*; I6AS, indivíduo 3 do gene *AMEL*; CSS-, controlo negativo do gene *SRY*; I4SS, indivíduo 4 do gene *SRY*; I5SS, indivíduo 5 do gene *SRY*; I6SS, indivíduo 6 do gene *SRY*. O gel (C) apresenta os indivíduos 7, 8, 9 e 10. CAS-, controlo negativo do gene *AMEL*; I7AS, indivíduo 7 do gene *AMEL*; I8AS, indivíduo 8 do gene *AMEL*; I9AS, indivíduo 8 do gene *AMEL*; I10AS, indivíduo 10 do gene *AMEL*; CSS-, controlo negativo do gene *SRY*; I7SS, indivíduo 7 do gene *SRY*; I8SS, indivíduo 8 do gene *SRY*; I9SS, indivíduo 9 do gene *SRY*; I10SS, indivíduo 10 do gene *SRY*. O marcador (M) está ao centro e a zona de interesse apresenta-se entre os 75 pb e 50 pb.

Para validação dos resultados da eletroforese, os produtos amplificados dos indivíduos 10 e 6 foram sequenciados pelo método de Sanger. Os resultados da sequenciação, para o indivíduo 10, confirmam que é do sexo masculino. Não foi possível sequenciar os produtos da amplificação do indivíduo 6. É possível observar várias alterações nucleotídicas. A razão destas alterações ocorrerem são variadas. O primeiro fator a considerar é o DNA estar bastante degradado, e consequentemente fragmentado, o que pode ser o motivo de nos primeiros 40 a 50 nucleótidos, ser somente ruído. Na restante sequência, a taq polimerase pode ter adicionado adeninas nas zonas sem base nucleotídica, também pode ter ocorrido a desaminação da adenina e da citosina. O DNA tanto em vida, como post-mortem, pode ter sofrido oxidações tanto em citosinas, como em adeninas. Finalizando, pode também ter havido alterações aleatórias durante a replicação e sequenciação (figura 23).



Sequência da sequenciação:

GCGTTCAAGCAGGATTTCGCCAATGGGAGCAGCTTTTGCCACCCCA

Sequência suposta para o sexo masculino:

GATTTTGTTCCTGCTGCTTGTGGGAGCAGCTTTTGCCATGCTT

Figura 23: Eletroferograma do gene *AMEL* do indivíduo 10 e alterações nucleotídicas. Destacado a amarelo está o SNP de interesse para confirmar o sexo do indivíduo. Bases nucleotídicas com cores atrás representam algumas das alterações.

Como tal, conseguiu-se extrair com sucesso DNA de quatro dos 10 indivíduos, sendo estes o indivíduo 1, 3, 6 e 10. Estima-se que os indivíduos 1 e 6 sejam do sexo feminino e confirma-se que os indivíduos 3 e 10 são do sexo masculino.

O motivo de não ter sido possível extrair DNA de todos os indivíduos pode variar de indivíduo para indivíduo. Primeiramente deve-se considerar em que situação estavam os esqueletos armazenados e onde foram inumados. Dos indivíduos somente se sabe que são adultos. Não se sabe a zona de enterramento nem a sua profundidade, o tipo de solo, a quantidade de água que possa ter circulado e por fim a fauna e flora. Todos estes afetaram de forma diferente a conservação óssea, assim como a conservação do DNA, dado que um osso mais fragilizado irá permitir uma maior degradação do DNA. Para além de não se saber esses fatores, também não se sabe se os esqueletos têm esses fatores em comum ou não. Como tal a extração pode ter tido mais sucesso em alguns esqueletos quando comparados com outros dado o seu estado de preservação e o que sofreram.

Vários tipos de degradações podem ter causado alterações ao DNA. As primeiras, e mais comuns, são a metilação e desaminação do DNA que podem levar a que não haja agregação de *primers* no local de ligação, resultando na falha de ampliação de DNA. A segunda é a depurinação das bases, o que leva a fragmentação do DNA podendo levar a

que a zona de ligação dos *primers* não exista por completo, ou esteja incompleta. Esta situação pode só ocorrer numa das cadeias de DNA e pode ser o motivo de, por exemplo, o indivíduo 1 ter resultado com um grupo de *primers* e não o outro. Finalizando a alcalinização das timinas pode ser também um problema, dado resultar em bloqueios da Taq polimerase.

Também podem ter ocorrido erros durante o processo de extração. O tempo em que o osso esteve em contacto com o EDTA pode ter sido incorreto, assim como a temperatura, o que pode ter comprometido a desmineralização do osso. O *overnight* pode ter estado demasiado tempo, o que inicialmente pode ter tido os resultados desejados, mas mais tempo que o necessário pode ter danificado o DNA. Por fim a eluição pode ter falhado, seja por mau manuseamento ou por impossibilidade de extrair o DNA.

### 3.8. Estatística – erro intra-observador:

Apenas quatro medidas (F7, FPM, ECubBrd e DTalBrd), apresentam com um ETMr acima de 5% (tabela 28, 29 e 30).

Estes erros podem ter ocorrido por vários fatores. O primeiro poderá ser a baixa variabilidade. A amostra é diminuta (10 indivíduos), do qual nada se sabe, inclusive o sexo. Para além disso a amostra diminui quando algumas medidas não se mediram dado o estado de conservação dos ossos ser baixo. Como consequência de uma baixa amostra, e ocorrendo grandes variações entre indivíduos, leva a um maior ETMr e ETMabs.

Outro dos fatores a considerar é o sexo. Como foi referenciado anteriormente, o dimorfismo sexual no ser humano é entre 0 a 20%. Não havendo segregação entre os sexos, dado a natureza do estudo, o erro intra-observador é afetado de forma negativa, aumentando significativamente em alguns casos. Também pode ter ocorrido uma observação incorreta do valor.

Tabela 28: Erro intra-observador para cada medida do axis, úmero e rádio

Osso	Metodologia	Medida	Nº de Indivíduos	ETMabs	ETMr
<b>Axis</b>	Gama et al. (2015)	CMA	4	0,04	0,1
		LMA	6	0,19	0,41
		LMFSD	6	0,03	0,16
		DSMC	6	0,01	0,05
<b>Úmero</b>	Wasterlain (2000)	U1	5	2,53	0,86
		U2	5	1,58	0,54
		U3	5	0,46	1,18
		U4	4	0,03	0,07
		U5	10	0,01	0,06
		U6	10	0,12	0,69
		U7	10	0,44	0,64
		U8	6	0,21	0,4
	Cardoso (2000)	UCM	5	2,53	0,86
		UCT	5	1,58	0,54
		UDVC	5	0,46	1,18
		UDTC	4	0,13	0,35
		UDMA	10	0,01	0,06
		UDMI	10	0,12	0,69
		UPM	10	0,44	0,64
		ULB	6	0,21	0,4
<b>Rádio</b>	Wasterlain (2000)	R1	4	1,06	0,53
		R2	4	0	0
		R3	9	0,44	0,87
<b>Rádio</b>	Cardoso (2000)	RCM	4	1,06	0,53
		RCF	4	0	0
		RPM	9	0,44	0,87

Os ETMr com valor igual ou superior a 5% apresentam-se a negrito.

Tabela 29: Erro intra-observador para cada medida do rádio, fêmur, rótula e tibia

Osso	Metodologia	Medida	Nº de Indivíduos	ETMabs	ETMr
<b>Rádio</b>	Curate et al. (2021)	MCDDR	6	0,86	1,74
		IEWR	6	0,14	0,49
<b>Fémur</b>	Wasterlain (2000)	F1	4	1,41	0,33
		F2	4	2,47	0,59
		F3	10	0,37	1,47
		F4	10	0,52	2
		F5	10	0,19	0,79
		F6	10	0,09	0,31
		F7	10	5,36	<b>5,61</b>
		F8	3	0,26	0,66
		F9	2	0,08	0,19
		Cardoso (2000)	FCM	4	1,41
	FCF		4	2,47	0,59
	FCT		3	4,08	1,02
	FDSM		10	0,37	1,47
	FDTM		10	0,52	2
	FDSS		10	0,19	0,79
	FDTS		10	0,09	0,31
	FPM		10	5,36	<b>5,61</b>
	FLB		5	0,19	0,27
	FDTC		3	0,26	0,66
	<b>Rótula</b>	Maio et al. (2024)	FDVC	2	0,08
MAXH			5	0,05	0,13
MAXB			4	0,12	0,34
MAXT			5	0,07	0,4
HAF			4	0,16	0,62
LAFB			5	0,2	0,93
MAFB			5	0,2	1,17

Os ETMr com valor igual ou superior a 5% apresentam-se a negrito.

<b>Osso</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Medida</b>	<b>Nº de Indivíduos</b>	<b>ETMabs</b>	<b>ETMr</b>
<b>Tíbia</b>	<b>Wasterlain (2000)</b>	T1	4	2,47	0,74
		T2	4	1,06	0,32
		T3	10	0,03	0,12
		T4	10	0,46	1,7
		T5	10	0,22	0,26
		T6	3	0,17	0,27
		T7	3	1,63	0,49
	<b>Cardoso (2000)</b>	TCM	4	1,56	0,46
		TCN	4	0,67	0,2
		TDS	10	0,03	0,12
		TDT	10	0,46	1,7
		TPM	10	0,22	0,26
		TLB	3	0,17	0,27
		TCT	3	1,63	0,49

Continuação da Tabela 29

Tabela 30: Erro intra-observador para cada medida do tarso

<b>Osso</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Medida</b>	<b>Nº de Indivíduos</b>	<b>ETMabs</b>	<b>ETMr</b>
<b>Tarso</b>	<b>Wasterlain (2000)</b>	TA1	7	0,21	0,44
		TA2	7	0,8	2,13
		TA3	7	0,84	4,04
		C1	3	0,44	0,61
		C2	3	0,42	0,67
		C3	3	0,56	1,12
		C4	3	0,57	1,57
	<b>Curate et al. (2021)</b>	TM1	7	0,40	0,82
		TM4	7	0,26	0,82
		TM5	7	1,41	4,84
		CMBH	3	0,27	0,38
		CM8	3	1,22	1,84

Os ETMr com valor igual ou superior a 5% apresentam-se a negrito.

Osso	Metodologia	Medida	Nº de Indivíduos	ETMabs	ETMrel
Tarso	Harris & Case (2012)	ECalcLg	3	1,22	1,84
		ETalLg	6	0,57	1,09
		ETalBrd	6	0,86	2,51
		ETalHt	6	0	0
		ECubBrd	3	2,04	<b>8,56</b>
		ENavNrd	4	0,35	1,02
		ECF1Lg	4	1,06	0,05
		ECF1Brd	4	0,7	0,43
		ECF3Lg	2	0,5	2,89
		ECF3Ht	2	0,5	2,66
		DCalcLG	3	0,81	1,13
		DTalLg	6	0,86	1,71
		DTalBrd	6	3,46	<b>9,85</b>
		DTalHt	6	0,57	1,84
		DCubBrd	4	0,35	1,48
		DNavBrd	3	0,4	1,24
		DCF1Lg	4	1,06	4,68
		DCF1Brd	4	0,7	4,09
		DCF1Ht	4	0,7	2,43
		DCF2Brd	1	0	0
DCF2Ht	1	0	0		
DCF3Lg	3	0,4	2		
DCF3Ht	3	0	0		

Continuação da Tabela 30. Os ETMr com valor igual ou superior a 5% apresentam-se a negrito.

### 3.9. Estatística – exatidão:

Os resultados da exatidão são variados, sendo que variam entre 25% e 100% (tabelas 31, 32, 33, 34 e 35).

A metodologia com maior taxa de exatidão foi a de Cardoso (2000) e a menor foi a de Curate et al. (2021) (tarso). A exatidão foi realizada utilizando somente os quatro indivíduos que se soube o sexo cromossômico, como tal, a amostra é pequena. A metodologia de Curate et al. (2021) aplicada ao tarso pode ter sofrido considerando a equação e medidas selecionadas, como tal não se pode considerar a metodologia toda,

mas sim somente as medidas e equação selecionadas. O mesmo acontece com a metodologia de Curate et al. (2021) aplicada ao rádio (Tabela 35).

É possível observar que há múltiplos valores acima de 80%. Do método de Cardoso (2000) as medidas UDMI, FCM, FCF, FCT, FDVC, FCVT apresentam exatidão de 100%. A metodologia de Wasterlain (2000), também apresenta as medidas U6, F1, F2, F8 e F9 com exatidão de 100%. As medidas DCF2Brd e DCF2Ht do método Harris & Case (2012) também apresentam exatidão de 100%, no entanto estas têm somente um indivíduo. Considerando somente as medidas que apresentam os quatro indivíduos, só a medida UDMI da metodologia de Cardoso (2000) e a medida U6 da metodologia de Wasterlain (2000) apresentam uma exatidão de 100%. O fêmur revela ser o osso mais discriminante, como esperado, com 80% de exatidão (tabelas 31, 32, 33 e 34).

Tabela 31: Exatidão (Ex%) das medidas utilizadas no úmero

Osso	Metodologia	Ex %	Medida	Nº de indivíduos	Ex %
Úmero	Áxis	66,67	Equação	4	66,67
			UCM	4	75
	Cardoso (2000)	73,96	UCT	4	75
			UDMI	4	<b>100</b>
			UDMA	4	50
			UDVC	4	75
			UDTC	3	66,67
			ULB	4	75
			UPM	4	75
			Wasterlain (2000)	73,96	U1
	U2	4			75
	U3	4			75
	U4	3			66,67
	U5	4			50
	U6	4			<b>100</b>
	U7	4			75
	U8	4			75

As medidas que apresentam um valor de TEM% superior a 5% não foram consideradas e a negrito estão presentes as medidas que tiveram acima de 80%

Tabela 32: Exatidão (Ex%) das medidas utilizadas no rádio e fêmur

Osso	Metodologia	Ex %	Medida	Nº de indivíduos	Ex %
Rádio	Cardoso (2000)	61,11	RCM	3	66,67
			RCF	3	66,67
			RPM	4	50
	Wasterlain (2000)	61,11	R1	3	66,67
			R2	3	66,67
			R3	4	50
	Curate et al. (2021)	50	IEWR	4	50
			MCDDR	4	50
			Equação	4	50
Fémur	Cardoso (2000)	81,06	FCM	2	<b>100</b>
			FCF	2	<b>100</b>
			FCT	2	<b>100</b>
			FCTM	4	75
			FDSM	4	75
			FDTS	4	50
			FDSS	4	75
			FDVC	2	<b>100</b>
			FDTC	2	<b>100</b>
	FLB	3	66,67		
	Wasterlain (2000)	80,56	F1	2	<b>100</b>
			F2	2	<b>100</b>
			F3	4	75
			F4	4	75
			F5	4	75
			F6	4	50
			F8	2	<b>100</b>
			F9	2	<b>100</b>

As medidas que apresentam um valor de TEM% superior a 5% não foram consideradas e a negrito estão presentes as medidas que tiveram acima de 80%

Tabela 33: Exatidão (Ex%) das medidas utilizadas na rótula, tibia e talus

Osso	Metodologia	Ex %	Medida	Nº de Indivíduos	Ex %
<b>Rótula</b>	Maio et al. (2024)	53,57	MAXH	4	50
			MAXB	4	75
			MAXT	4	75
			HAF	4	25
			MAFB	4	50
			LAFB	4	50
			Equação	4	50
<b>Tíbia</b>	Cardoso (2000)	65,48	TCM	4	75
			TCN	4	75
			TCT	3	66,67
			TDT	4	50
			TDS	4	75
			TLB	3	66,67
			TPM	4	50
	Wasterlain (2000)	69,05	T1	4	75
			T2	4	75
			T3	4	75
			T4	4	75
			T5	4	50
			T6	3	66,67
			T7	3	66,67
<b>Talus</b>	Wasterlain (2000)	58,33	Ta1	4	50
			Ta2	4	75
			Ta3	4	50
	Curate et al. (2021)	43,75	TM1	4	50
			TM4	4	50
			TM5	4	25
			Equação	4	50

As medidas que apresentam um valor de TEM% superior a 5% não foram consideradas e a negrito estão presentes as medidas que tiveram acima de 80%

Tabela 34: Exatidão (Ex%) das medidas utilizadas no calcâneo e tarso

Osso	Metodologia	Ex%	Medida	Nº de Indivíduos	Ex%
Calcâneo	Wasterlain (2000)	66,67	C1	3	66,67
			C2	3	33,33
			C3	3	66,67
			C4	3	66,67
	Curate et al. (2021)	44,44	CMBH	3	33,33
			CM8	3	33,33
			Equação	3	66,67
Tarso	Harris & Case (2012)	47,22	ECalLg	3	33,33
			ETalLg	3	66,67
			ETalBrd	3	33,33
			ETalHt	3	33,33
			ENavBrd	4	50
			ECF1Lg	4	50
			ECF1Brd	4	75
			ECF3Lg	2	50
			ECF3Ht	2	50
			DCalLg	3	33,33
		53,21	DTalLg	4	50
			DTalHt	4	50
			DCubBrd	4	75
			DNavBrd	3	33,33
			DCF1Lg	4	25
			DCF1Brd	4	25
			DCF1Ht	4	25
			DCF2Brd	1	<b>100</b>
			DCF2Ht	1	<b>100</b>
			DCF3Lg	2	50
DCF3Ht	2	50			

As medidas que apresentam um valor de TEM% superior a 5% não foram consideradas e a negrito estão presentes as medidas que tiveram acima de 80%

Tabela 35: Exatidão (%) de cada metodologia

<b>Metodologia</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>Gama et al. (2015)</b>	66,67
<b>Cardoso (2000)</b>	73,28
<b>Wasterlain (2000)</b>	70,34
<b>Curate et al. (2021) (rádio)</b>	50
<b>Maio et al. (2024)</b>	53,57
<b>Curate et al. (2021) (tarso)</b>	44,1
<b>Harris &amp; Case (2012)</b>	51,45

*VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MORFOLÓGICOS E MÉTRICOS PARA A ESTIMATIVA DO SEXO USANDO O GENE AMEL COMO MÉTODO CONFIRMATÓRIO*

#### 4. Conclusão:

A amostra de 10 indivíduos, é diminuta, limitando a exploração dos fatores que influenciam o dimorfismo sexual e de como este pode ter sido incorretamente estimado com as diferentes técnicas. Para além disso tem variabilidade limitada. Em estudos futuros, seria importante utilizar amostras maiores para poder identificar quais são os métodos e medidas mais adequados a aplicar e determinar se poderiam alcançar uma taxa de exatidão superior a 95% independentemente das variáveis envolvidas. Os resultados indicam que as medidas UDMI do método de Cardoso (2000) e a U6 da metodologia de Wasterlain (2000) apresentam uma taxa de exatidão superior às restantes. Sendo que o método com maior exatidão foi o método de Cardoso (2000) com 73,28% e o osso mais discriminante foi o fémur.

Foi possível extrair DNA da pirâmide petrosa do osso temporal, garantindo a esterilidade e conseguir resultados acerca do sexo. Contudo, seria importante otimizar a técnica, conseguindo relacionar o ICA do indivíduo com os procedimentos que seriam mais adequados para ocorrer uma extração de DNA bem-sucedida. A extração de DNA em quatro indivíduos pode ser considerada bem-sucedida, demonstrando assim que mesmo sem qualquer conhecimento prévio da preservação óssea, é possível extrair DNA de ossos.

Finalizando, conclui-se que o objetivo deste estudo não foi atingido, dado não ter sido possível a validação dos métodos, dado a amostra ser pequena. No entanto, a análise comparativa entre os resultados genéticos com os morfológicos e métricos demonstram que há uma tendência em algumas medidas e em alguns métodos, tornando-se imperativo ter uma amostra maior para confirmar estes resultados. É imprescindível em estudos futuros reavaliar as técnicas atualmente empregues, antropológicas e genéticas, de forma a melhorar a precisão e eficácia das estimativas do sexo em remanescentes esqueléticos, assim como as técnicas de extração de DNA a partir de ossos antigos.

*VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MORFOLÓGICOS E MÉTRICOS PARA A ESTIMATIVA DO SEXO USANDO O GENE AMEL COMO MÉTODO CONFIRMATÓRIO*

## 5. Bibliografia:

- Abuidrees, A. S., Alhamad, N. A., & Alsaadany, K. (2016). A Suitable Method for DNA Extraction from Bones for Forensic Applications: A Case Study. *Arab Journal of Forensic Sciences and Forensic Medicine*. <https://doi.org/10.12816/0026468>
- 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*(5), 956–964. <https://doi.org/10.1016/J.JAS.2010.11.010>
- Andreeva, T. V., Malyarchuk, A. B., Soshkina, A. D., Dudko, N. A., Plotnikova, M. Yu., & Rogaev, E. I. (2022). Methodologies for Ancient DNA Extraction from Bones for Genomic Analysis: Approaches and Guidelines. *Russian Journal of Genetics*, *58*(9), 1017–1035. <https://doi.org/10.1134/S1022795422090034>
- Bell, L. S., Skinner, M. F., & Jones, S. J. (1996). The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Science International*, *82*(2), 129–140. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(96\)01984-6](https://doi.org/10.1016/0379-0738(96)01984-6)
- Bienfait, B., & Ertl, P. (2013). JSME: a free molecule editor in JavaScript. *Journal of Cheminformatics*, *5*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-5-24>
- Bruzek, J. (2002). A method for visual determination of sex, using the human hip bone. *American Journal of Physical Anthropology*, *117*(2), 157–168. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10012>
- Buikstra, J. E., & Ubelaker, D. H. (1994). *Standards For Data Collection From Human Skeletal Remains: Vol. 3rd edition*. Arkansas Archeological Survey.
- Butler, E., & Li, R. (2014). Genetic Markers for Sex Identification in Forensic DNA Analysis. *Journal of Forensic Investigation*, *2*(3).
- Cardoso, H. F. V. (2000). *Dimorfismo sexual na estatura, dimensões e proporções dos ossos longos dos membros : o caso de uma amostra portuguesa dos séculos XIX-XX* [Master]. Universidade de Coimbra.
- Carvalho, H. (2009). *Extração de DNA de ossos humanos, sem pulverização, para uso em identificação forense* [Master]. Universidade Federal de Pernambuco.
- Cheverko, C. M., Prince-Buithenuys, J. R., & Hubbe, M. (2020). Theory in bioarchaeology: An introduction. In C. M. Cheverko, J. R. Prince-Buitenhuis, & M.

- Hubbe (Eds.), *Theoretical Approaches in Bioarchaeology* (1st ed., pp. 1–14). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780429262340>
- Cunha, E., & Ubelaker, D. H. (2020). Evaluation of ancestry from human skeletal remains: a concise review. *Forensic Sciences Research*, 5(2), 89–97. <https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1697060>
- Curate, F. (2010). *O Perímetro do Declínio: osteoporose e fraturas de fragilidade em três amostras osteológicas identificadas portuguesas - século XIX & XX [Tese de Doutoramento]* [Universidade de Coimbra]. <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/35793/1/PhD%20Francisco%20Curate.pdf>
- Curate, F. (2022). The Estimation of Sex of Human Skeletal Remains in the Portuguese Identified Collections: History and Prospects. *Forensic Sciences*, 2(1), 272–286. <https://doi.org/10.3390/forensicsci2010021>
- Curate, F., Coelho, J., & Silva, A. M. (2021). CalcTalus: an online decision support system for the estimation of sex with the calcaneus and talus. *Archaeological and Anthropological Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s12520-021-01327-y>/Published
- Curate, F., Mestre, F., & Garcia, S. J. (2021). Sex assessment with the radius in Portuguese skeletal populations (late 19th – early to mid 20th centuries). *Legal Medicine*, 48. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2020.101790>
- Dabney, J., Meyer, M., & Paabo, S. (2013). Ancient DNA Damage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), a012567–a012567. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012567>
- Dunn, R. R., Spiros, M. C., Kamnikar, K. R., Plemons, A. M., & Hefner, J. T. (2020). Ancestry estimation in forensic anthropology: A review. *WIREs Forensic Science*, 2(4). <https://doi.org/10.1002/wfs2.1369>
- Eckhardt, R. B. (2000). Paleobiology: present perspectives on the past. In *Human Biology* (pp. 1–16). Cambridge University Press.
- Feng, X. (2009). Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Current Chemical Biology*, 3(2), 189–196. <https://doi.org/10.2174/187231309788166398>

- Ferembach, D., Schwindezy, I., & Stoukal, M. (1980). Recommendations for Age and Sex Diagnoses of Skeletons. *Journal of Human Evolution*, 9, 517–549.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Flouri, D. E., Alifragki, A., Gómez García-Donas, J., & Kranioti, E. F. (2022). Ancestry Estimation: Advances and Limitations in Forensic Applications. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, Volume 12, 13–24. <https://doi.org/10.2147/RRFMS.S272224>
- Franklin, D., & Marks, M. K. (2022). The professional practice of forensic anthropology: Contemporary developments and cross-disciplinary applications. *WIREs Forensic Science*, 4(2). <https://doi.org/10.1002/wfs2.1442>
- Frederico, L. A., Kunkel, T. A., & Shaw, B. R. (1990). A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry*, 29(10), 2532–2537. <https://doi.org/10.1021/bi00462a015>
- Gama, I., Navega, D., & Cunha, E. (2015). Sex estimation using the second cervical vertebra: a morphometric analysis in a documented Portuguese skeletal sample. *International Journal of Legal Medicine*, 129(2), 365–372. <https://doi.org/10.1007/S00414-014-1083-0/TABLES/8>
- Garcia, S. (2006). Conservação diferencial dos esqueletos humanos da série medieval de S. Martinho (Leiria): implicações para a paleodemografia e para a paleopatologia. *Antropologia Portuguesa*, 273–294. <https://www.researchgate.net/publication/305149135>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(12), pdb.prot100412. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100412>
- Hagelberg, E., Bell, L. S., Allen, T., Boyde, A., Jones, S. J., & Clegg, J. B. (1991). Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 333(1268), 399–407. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0090>

- Harris, S. M., & Case, D. T. (2012). Sexual Dimorphism in the Tarsal Bones: Implications for Sex Determination. *Journal of Forensic Sciences*, 57(2), 295–305. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.02004.x>
- Henderson, C. (2018). Introduction. In C. Y. Henderson & F. A. Cardoso (Eds.), *Identified Skeletal Collections: The Testing Ground Of Anthropology?* (pp. 1–8). Archaeopress.
- Klales, A. R. (2020). Introduction to sex estimation and this volume. In A. R. Kales (Ed.), *Sex Estimation of the Human Skeleton: History, Methods, and Emerging Techniques* (1st ed.). Elsevier.
- Langley, N. R., & Jantz, R. L. (2020). Secular change. In *Sex Estimation of the Human Skeleton* (pp. 295–306). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815767-1.00018-3>
- Lau, E. C., Moi-Iandas, T. K., Shapiro, L. J., Slavkin, H. C., & Snead, M. L. (1989). Human and Mouse Amelogenin Gene Loci Are on the Sex Chromosomes. In *GENOMICS* (Vol. 4).
- Lopes, C., & Fernandes, T. (2022). The Identified Skeleton Collection of Évora: importance for forensic science and bioarchaeology in the southern inland of Portugal. *International Journal of Legal Medicine*, 136(3), 955–962. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02725-6>
- Maio, C., Cunha, E., & Navega, D. (2024). Metric Analysis of the Patella for Sex Estimation in a Portuguese Sample. *Forensic Sciences Research*, 9(2). <https://doi.org/10.1093/fsr/owae015/7608775>
- Masuyama, K., Shoji, H., Nakanishi, H., Inokuchi, S., & Adachi, N. (2017). Sex Determination from Fragmented and Degenerated DNA by Amplified Product-Length Polymorphism Bidirectional SNP Analysis of Amelogenin and SRY Genes. *PLOS ONE*, 12(1), e0169348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169348>
- Mays, S., & Cox, M. (2000). Sex determination in skeletal remains. In M. Cox & S. Mays (Eds.), *Human Osteology: In Archaeology and Forensic Science* (pp. 117–130). Cambridge University Press.

- Moore, M. K. (2013). Sex Estimation and Assessment. In E. A. DiGangi & M. K. Moore (Eds.), *Research Methods in Human Skeletal Biology* (pp. 91–116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385189-5.00004-2>
- National Diagnostics. (2011, August 12). *The Polyacrylamide Matrix*.
- National Institute of Justice. (2023a, July 6). *Denaturation and Hydrolysis of Proteins*. [https://nij.ojp.gov/nij-hosted-online-training-courses/dna-extraction-and-quantitation-forensic-analysts/organic-extraction/organic-extraction-process/denaturation-and-hydrolysis-proteins#:~:text=Dithiothreitol%20\(DTT\)%20reduces%20disulfides%20to,a%20high%20concentration%20of%20disulfides](https://nij.ojp.gov/nij-hosted-online-training-courses/dna-extraction-and-quantitation-forensic-analysts/organic-extraction/organic-extraction-process/denaturation-and-hydrolysis-proteins#:~:text=Dithiothreitol%20(DTT)%20reduces%20disulfides%20to,a%20high%20concentration%20of%20disulfides).
- National Institute of Justice. (2023b, July 21). *Gel Matrix*. Amplified DNA Product Separation for Forensic Analysts.
- Navega, D., Vicente, R., Vieira, D. N., Ross, A. H., & Cunha, E. (2015). Sex estimation from the tarsal bones in a Portuguese sample: a machine learning approach. *International Journal of Legal Medicine*, 129(3), 651–659. <https://doi.org/10.1007/s00414-014-1070-5>
- Nawrocki, S. P. (2010). The nature and sources of error in the estimation of age at death from the skeleton. In K. E. Latham & M. J. Finnegan (Eds.), *Age Estimation from the Human Skeleton* (pp. 79–101). Charles C Thomas.
- Pinhasi, R., Fernandes, D., Sirak, K., Novak, M., Connell, S., Alpaslan-Roodenberg, S., Gerritsen, F., Moiseyev, V., Gromov, A., Raczky, P., Anders, A., Pietruszewsky, M., Rollefson, G., Jovanovic, M., Trinhhoang, H., Bar-Oz, G., Oxenham, M., Matsumura, H., & Hofreiter, M. (2015). Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone. *PLOS ONE*, 10(6), e0129102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129102>
- Rowbotham, S. K. (2016). Anthropological Estimation of Sex. In D. H. Ubelaker & S. Blau (Eds.), *Handbook of Forensic Anthropology and Archaeology* (pp. 261–272). Routledge.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 74(12), 5463–5467.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Santos, A. L. (2020). A particular heritage: The importance of identified osteological collections. *Metode Science Studies Journal*, 0(10), 91–97.  
<https://doi.org/10.7203/METODE.10.13711>
- Shehata, T. P., & Krap, T. (2024). An overview of the heat-induced changes of the chemical composition of bone from fresh to calcined. *International Journal of Legal Medicine*, 138(3), 1039–1053. <https://doi.org/10.1007/s00414-024-03160-z>
- Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 550(7676), 345–353. <https://doi.org/10.1038/nature24286>
- Shojo, H., Tanaka, M., Takahashi, R., Kakuda, T., & Adachi, N. (2015). A Unique Primer with an Inosine Chain at the 5'-Terminus Improves the Reliability of SNP Analysis Using the PCR-Amplified Product Length Polymorphism Method. *PLOS ONE*, 10(9), e0136995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136995>
- Sirak, K. A., Fernandes, D. M., Cheronet, O., Novak, M., Gamarra, B., Balassa, T., Bernert, Z., Cséki, A., Dani, J., Gallina, J. Z., Kocsis-Buruzs, G., Kővári, I., László, O., Pap, I., Patay, R., Petkes, Z., Szenthe, G., Szeniczey, T., Hajdu, T., & Pinhasi, R. (2017). A minimally-invasive method for sampling human petrous bones from the cranial base for ancient DNA analysis. *BioTechniques*, 62(6), 283–289. <https://doi.org/10.2144/000114558>
- Steward, K. (2022, February). *Agarose Gel Electrophoresis, How It Works and Its Uses*. Technology Networks.
- Turner-Walker, G., Nielsen-Marsh, C. M., Syversen, U., Kars, H., & Collins, M. J. (2002). Sub-micron spongiform porosity is the major ultra-structural alteration occurring in archaeological bone. *International Journal of Osteoarchaeology*, 12(6), 407–414. <https://doi.org/10.1002/oa.642>
- Vieira, A. (2011). *Engenharia Genética - Princípios e Aplicações* (2nd ed.).
- Walker, P. L. (1995). Problems of preservation and sexism in sexing: some lessons from historical collections for palaeodemographers. In S. R. Saunders & A. Herring

- (Eds.), *Grave Reflections: Portraying the Past Through Cemetery Studies* (pp. 31–47). Canadian Scholars Press.
- Warinner, C., Korzow Richter, K., & Collins, M. J. (2022). Paleoproteomics. In *Chemical Reviews* (Vol. 122, Issue 16, pp. 13401–13446). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00703>
- Wasterlain, R. (2000). *Morphé : análise das proporções entre os membros, dimorfismo sexual e estatura de uma amostra da colecção de esqueletos identificados do Museu Antropológico da Universidade de Coimbra* [Master]. Universidade de Coimbra.
- White, T. D., Black, M., & Folkens, P. A. (2012). *Human Osteology* (3rd ed.). Elsevier.
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). PCR past, present and future. *BioTechniques*, 69(4), 317–325. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>