

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ROGÉRIO NOGUEIRA DE OLIVEIRA

**FREQÜÊNCIA ALÉLICA DOS LÓCUS DYS390, DYS391 E DYS393
EM INDIVÍDUOS BRASILEIROS E
SUA APLICAÇÃO À IDENTIFICAÇÃO HUMANA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de Doutor
em Odontologia Legal e Deontologia

PIRACICABA
2001

ROGÉRIO NOGUEIRA DE OLIVEIRA

**FREQÜÊNCIA ALÉLICA DOS LÓCUS DYS390, DYS391 E DYS393
EM INDIVÍDUOS BRASILEIROS E
SUA APLICAÇÃO À IDENTIFICAÇÃO HUMANA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de Doutor
em Odontologia Legal e Deontologia

Orientadora: Profa. Dra. Heloísa Amélia de Lima Castro

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Daruge
Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior
Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes
Profa. Dra. Heloísa Amélia de Lima Castro
Prof. Dr. Moacyr da Silva

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 17/4/2001

Assinatura do Orientador

PIRACICABA
2001

Ficha Catalográfica

OL4f

Oliveira, Rogério Nogueira de.

Frequência alélica dos locos DYS390, DYS391 e DYS393 em indivíduos brasileiros e sua aplicação à identificação humana. / Rogério Nogueira de Oliveira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001. xiv, 137p. : il.

Orientadora : Profª Drª Heloísa Amélia de Lima Castro.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Odontologia legal. 2. Homem – Identificação. 3. DNA. 4. Cromossomo Y. I. Castro, Heloísa Amélia de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 2001, considerou o candidato ROGÉRIO NOGUEIRA DE OLIVEIRA aprovado.

1. Profa. Dra. HELOISA AMELIA DE LIMA CASTRO

2. Prof. Dr. FABIO DAUMAS NUNES

3. Prof. Dr. MOACYR DA SILVA

4. Prof. Dr. EDUARDO DARUGE

5. Prof. Dr. EDUARDO DARUGE JUNIOR

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas por patrocinar em seus quadros o único Programa de Doutorado em Odontologia Legal e Deontologia de nosso país, possibilitando assim a continuidade de nossa formação acadêmica.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP pelo tratamento cordial e sempre enriquecedor, em especial aos professores da Disciplina de Odontologia Legal e Deontologia: Prof. Dr. Eduardo Daruge e Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior.

Aos demais professores que mesmo oriundos de outros Departamentos colaboram no Curso de Pós-Graduação em Ciências, Área de Odontologia Legal e Deontologia, como minha orientadora a Profa Dra. Heloísa Amélia de Lima Castro que sempre mostrou-se acessível e instigadora.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, em nome do Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes que com a cessão da infra estrutura, insumos e seus conhecimentos viabilizou nosso trabalho. Da mesma forma ao Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

As novas amizades que fiz durante os meses de convívio no aprendizado laboratorial: Ricardo A. Mesquita, Evelyn K. Anzai e Adriana N. Ozaki. E as velhas amizades plantadas durante os cursos de Mestrado e Doutorado: Léa Maria Bezerra de Menezes, Luís Carlos C. Galvão, Rodolfo F. H. Melani, Cléa Adas Saliba Garbin, Tânia Adas Saliba e Eunice Moura Vitória.

Aos colegas de Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, os Professores Doutores Dalton Luiz de Paula Ramos, Edgard Crosato, Hilda F. Cardozo, Ida Tecla P. Calvielli, José Leopoldo Ferreira Antunes, Maria Ercilia de Araújo, Moacyr da Silva e Rodolfo Francisco H. Melani e às funcionárias Andréia dos Santos Teixeira, Aparecida Domingues, Marieta Trancoso de Castro e Sonia Castro Lúcia Lopes, pelo incentivo, colaboração e algumas concessões para que me concentrasse na conclusão deste trabalho.

Em especial à Flávia e aos meus familiares.

E à todos que nominalmente citados ou não, mas que tem participado de minha trajetória de vida, meu muito obrigado.

“Não há progresso sem utopia”

Michel Serres
Filosofo Francês

Sumário

	PÁGINA
GLOSSÁRIO	1
LISTA DE ABREVIATURAS	3
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISTA DA LITERATURA	19
2.1 BREVE RETROSPECTO DA ODONTOLOGIA LEGAL RELACIONADA À IDENTIFICAÇÃO HUMANA	19
2.2 PEQUENAS REPETIÇÕES CONSECUTIVAS (STRS) E ESTUDOS POPULACIONAIS	26
2.3 INCORPORAÇÃO DOS ESTUDOS GENÉTICOS Á ODONTOLOGIA LEGAL	52
3. PROPOSIÇÃO	63
4. MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 CASUÍSTICA	65
4.2 EQUIPAMENTOS E REAGENTES	66
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS	69
4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DO DNA	69
4.5 EXTRAÇÃO DO DNA EM DIFERENTES MATERIAIS BIOLÓGICOS	70
4.6 AMPLIFICAÇÃO DO DNA	71
4.7 CONFECÇÃO E ANÁLISES DOS GÉIS	73
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
5. RESULTADOS	75
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	109

Glossário

- **Alelo** = formas alternativas de um gene ou STR em um dado locus. Uma das várias formas alternativas de um gene. Se o cromossomo é autossômico possuirá 2 alelos, podendo ser homozigoto (o indivíduo possui os 2 alelos iguais) ou heterozigoto (o indivíduo possui os 2 alelos diferentes).
- **Amplificação** = um aumento do número de cópias de fragmentos específicos de DNA.
- **Autossomo** = qualquer outro cromossomo que não seja um cromossomo sexual. Um cromossomo não envolvido na determinação sexual. O genoma diplóide humano consiste de 46 cromossomos, 22 pares de autossomos, e um par de cromossomos sexuais (X ou Y).
- **Base** = termo geralmente usado para purinas e pirimidinas do DNA e do RNA.
- **Blotting** = técnica bioquímica na qual macromoléculas (proteína, DNA ou RNA), separadas em géis de agarose ou poliacrilamida, são transferidas e imobilizadas em uma membrana de papel para subsequente análise.
- **Cromossomo** = estrutura composta de uma molécula muito longa de DNA e proteínas associadas que carregam parte - ou toda - informação hereditária de um indivíduo.
- **Cromossomo homólogo** = uma das cópias de um cromossomo determinado em uma célula haplóide, sendo uma cópia de origem materna e outra de origem paterna.
- **Cromossomos sexuais** = cromossomos que podem estar presentes ou ausentes, ou ainda presentes em número variável de cópias, de acordo com o sexo do indivíduo; em mamíferos, são os cromossomos X e Y.
- **Diplóide** = contém dois conjuntos de cromossomos homólogos e, portanto, duas cópias de cada gene ou locus genético.
- **Eletroforese** = técnica na qual moléculas são separadas em solução coloidal (géis de agarose ou poliacrilamida) sob a influência de um campo elétrico.
- **Enzima** = proteína que catalisa uma reação química específica.
- **Enzima de restrição (endonuclease de restrição)** = derivada de bactérias, reconhece uma sequência específica de bases no DNA e corta a molécula de DNA no sítio de reconhecimento ou próximo dele. Uma, entre uma enorme variedade de enzimas, que pode clivar uma molécula de DNA em qualquer sítio em que uma pequena sequência de nucleotídeos ocorra.
- **Fenótipo** = o caráter observável de uma célula ou organismo.

- **Fingerprint** = de um DNA é o padrão polimórfico dos fragmentos, obtido após digestão do DNA com enzimas de restrição. Esse padrão é particular para cada genoma.
- **Gene** = região do DNA que controla uma característica hereditária particular.
- **Genoma** = informação genética total carregada por uma célula ou organismo.
- **Genótipo** = constituição genética de uma célula ou organismo.
- **Haplóide** = que possui apenas um conjunto de cromossomos.
- **Hibridização** = processo pelo qual duas fitas complementares de ácidos nucleicos formam uma dupla hélice, após um período de anelamento.
- **Lócus** = em genética, refere-se à posição de um gene em um cromossomo. Alelos diferentes do mesmo gene ocupam o mesmo lócus. Uma precisa localização em um cromossomo, a qual pode ser ocupada por um gene ou por seqüências de DNA não codificador.
- **PCR** (reação em cadeia da polimerase) = técnica para amplificação de regiões específicas de DNA, por meio de ciclos múltiplos de polimerização de DNA, cada um seguido por breve tratamento de calor para separar fitas complementares.
- **Polimorfismo** = regiões de variação genética que servem de base para a distinção entre os indivíduos.
- **Primer** = pequena seqüência de DNA conhecida e sintetizada, utilizada como iniciador da PCR.
- **RFLP** = um polimorfismo de DNA resultante da perda ou criação de um sítio de restrição, que é clivado por uma enzima específica.
- **Sonda** = fragmento definido de DNA ou RNA, radioativo ou marcado quimicamente, utilizado na localização de seqüências nucleotídicas por hibridização.
- **Tandem** = seqüências adjacentes alinhadas na mesma orientação. *Short tandem repeats* (STR) - múltiplas cópias de idêntica seqüência do DNA arranjadas em sucessivas direções nos lócus.

ALBERTS *et al.* (1997)

FARAH, S.B. (2000)

GLOSSARY OF COMMONLY USED TERMS (2000)

SMITH *et al.* (1997)

Lista de abreviaturas

ABO = sistema sangüíneo ABO

pb = pares de base

CPI = valor combinado de paternidade

DMSO = dimetil sulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucléico

dNTP = desoxirribonucleotídeos trifosfatos

EDTA= ácido etilenodiaminotetracético

HLA = antígenos leucocitários humanos

HVR = regiões hiper variáveis

INTERPOL = *International Criminal Police Organization*

MN = sistema sangüíneo MN

MtDNA = DNA mitocondrial

ng = nanograma

PCR = reação em cadeia da polimerase

PE = poder de exclusão

pg = picograma

Pr = probabilidade prévia

RFLP = polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição

Rh = sistema sangüíneo Rh

RNA = ácido ribonucléico

SDS = dodecil sulfato de sódio

SI = índices de sistemas

Sis = sistema individual

STRs = pequenas repetições consecutivas

VNTR = repetições consecutivas de número variado

W = probabilidade de paternidade

Lista de ilustrações

Quadro 1	Bases purínicas e pirimidínicas do DNA e do RNA	27
Gráfico 1	Representação esquemática dos reagentes pela técnica de PCR	32
Tabela 1	Informação da frequência alélica do locus DYS390 em diferentes populações	49
Tabela 2	Informação da frequência alélica do locus DYS391 em diferentes populações	50
Tabela 3	Informação da frequência alélica do locus DYS393 em diferentes populações	51
Tabela 4	Tipos e quantidades de reagentes utilizados na PCR	72
Tabela 5	Ciclagem padrão utilizada nas PCRs dos <i>primers</i> marcados	72
Gráfico 1	Distribuição de frequência dos alelos do locus DYS390 em 100 indivíduos brasileiros leucodérmicos do sexo masculino, não correlacionados	75
Gráfico 2	Distribuição de frequência dos alelos do locus DYS391 em 100 indivíduos brasileiros leucodérmicos do sexo masculino, não correlacionados	76
Gráfico 3	Distribuição de frequência dos alelos do locus DYS393 em 100 indivíduos brasileiros leucodérmicos do sexo masculino, não correlacionados	77
Tabela 6	Resultado da análise conjunta dos fragmentos amplificados do locus DYS393 utilizando-se DNAs de dentes e saliva de mesmos indivíduos	78
Anexo 1	STRs do cromossomo Y	109
Anexo 2	Iniciais e idades dos indivíduos do sexo masculino, amostra de SANGUE	110
Anexo 3	Iniciais e idades dos indivíduos do sexo masculino, amostra de SALIVA e DENTE	111
Anexo 4	Iniciais e idades dos indivíduos do sexo feminino, amostra de SALIVA	111
Anexo 5	Modelo de termo de consentimento empregado na obtenção de amostras de SALIVA e DENTES	112
Anexo 6	Modelo de termo de consentimento empregado na obtenção de amostras de SANGUE	113
Anexo 7	Endereço eletrônico da empresa que sintetizou os <i>primers</i> (DYS390, DYS391 e DYS393) e descrição do componente fluorescente adicionado aos mesmos	114

Anexo 8	Protocolo utilizado para extração de DNA a partir de amostras de SANGUE	115
Anexo 9	Protocolo utilizado para extração de DNA a partir de amostras de SALIVA	117
Anexo 10	Protocolo utilizado para extração de DNA a partir de amostras de DENTES	119
Anexo 11	Protocolo de confecção de gel de agarose	120
Anexo 12	Protocolo de confecção de gel de poliacrilamida	121
Anexo 13	Protocolo de revelação do gel de poliacrilamida, utilizando-se prata.	122
Anexo 14	Protocolo para utilização do sistema ALFexpress®, e descrição da confecção do gel de poliacrilamida empregado	125
Anexo 15	Quadro 2: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS390 para 30 indivíduos brasileiros (parte I)	126
Anexo 16	Quadro 3: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS390 para 27 indivíduos brasileiros (parte II)	127
Anexo 17	Quadro 4: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS390 para 28 indivíduos brasileiros (parte III)	128
Anexo 18	Quadro 5: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS391 para 32 indivíduos brasileiros (parte I)	129
Anexo 19	Quadro 6: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS391 para 30 indivíduos brasileiros (parte II)	130
Anexo 20	Quadro 7: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS391 para 31 indivíduos brasileiros (parte III)	131
Anexo 21	Quadro 8: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS393 para 32 indivíduos brasileiros (parte I)	132
Anexo 22	Quadro 9: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS393 para 31 indivíduos brasileiros (parte II)	133
Anexo 23	Quadro 10: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS393 para 32 indivíduos brasileiros (parte III)	134
Anexo 24	Quadro 11: Resultados das análises conjuntas dos fragmentos amplificados dos locos DYS393 utilizando-se DNAs de dente e saliva de mesmos indivíduos	135
Anexo 25	Quadro 12: Resultados individuais da repetição da análise eletroforética dos locos DYS390, DYS391 e DYS393 para 11, 3 e 3 indivíduos respectivamente (parte I)	136
Anexo 26	Quadro 13: Resultados individuais da repetição da análise eletroforética dos locos DYS390, DYS391 e DYS393 para 4, 4 e 2 indivíduos respectivamente (parte II), há também a realização do primeiro teste com 3 amostras de saliva	137

Resumo

A identificação humana pode ser realizada por meio dos mais variados procedimentos técnicos, principalmente pela análise comparativa dos documentos do prontuário odontológico. Atualmente, as técnicas de biologia molecular têm se apresentado como o recurso comparativo mais eficaz, contudo parcela significativa desses métodos requer, além do estabelecimento prévio de parâmetros de coleta de material biológico, a verificação da frequência alélica da população na qual será aplicada. Assim, o presente estudo procurou evidenciar a frequência dos alelos em 3 loci de STR do cromossomo Y (DYS390, DYS391 e DYS393) numa população de indivíduos brasileiros leucodérmicos. Para tanto, foram padronizados protocolos de coleta e armazenamento de diferentes materiais biológicos, e estabelecidas rotinas de extração e amplificação do DNA. Os resultados apresentaram o locus DYS390 com frequência nos alelos 21, 22, 23, 24, 25 e 26, sendo o alelo 24 o que apresentou maior frequência desse locus, com 46%; o STR DYS391 com presença nos alelos 8, 9, 10, 11 12 e 13, tendo o alelo 11 incidência de 37% desse STR; e o STR DYS393 nos alelos 11, 12, 13 14 e 15, tendo o alelo 13 apresentado frequência de 45% desse locus. Esses dados, comparados àqueles de outras populações, demonstraram haver individualidade no perfil alélico da população estudada, comprovando que, mais do que aplicar as metodologias disponíveis, é prudente que se verifiquem os padrões dos alelos na população alvo, pois a utilização de padrões alélicos de populações diversas da nossa pode levar a imprecisões nos diagnósticos de identificação humana.

Palavras chave:

Identificação humana; DNA; STR cromossomo Y, odontologia legal

Abstract

Human identification can be accomplished by several technical procedures, especially by the comparative analysis of dental documents. Nowadays, molecular biology introduced more effective resources for the human identification. However, these methods demand the previous definition of parameters to the collection of biological material, and the verification of the allele frequency of the population in which they will be applied. Aiming to subsidize these methods, we observed the frequency of the alleles in three loci of STRs of the Y chromosome (DYS390, DYS391 and DYS393) in a group of Brazilian white subjects. We also standardized protocols for the collection and storage of different biological materials, besides defining routines for the extraction and amplification of the DNA. Results presented alleles 21, 22, 23, 24, 25 and 26 in the locus DYS390, being the allele 24 the most frequent with 46%. STR DYS391 presented alleles 8, 9, 10, 11 12 and 13, and the allele 11, with 37%, was the most frequent. STR DYS393 presented alleles 11, 12, 13 14 and 15, and the allele 13, with 45%, was the most frequent. The comparative analysis of these data, with information related to other populations, stresses the singularity of the allele profile of the studied population. Therefore, prior to the introduction of recent methods of molecular biology to the human identification, we should carefully verify allele patterns of the population, because the use of allele standards of other populations could produce imprecision in human identification processes.

Key words:

Human identification, DNA; STR, Y chromosome; forensic dentistry.

1. Introdução

Recentemente publicações científicas e a mídia em geral destacaram a decodificação do genoma humano, e a revolução que essa descoberta trará à terapêutica médica. Concomitantemente, esses avanços da biologia molecular aplicada trouxeram novos paradigmas a outras áreas das ciências biológicas, como a de ciências forenses, sobretudo no que concerne à identificação humana.

Há muito tempo a odontologia legal vem contribuindo para a identificação humana. Em 1903, AMOEDO já salientava a importância dos conhecimentos odontológicos sob o ponto de vista pericial, reportando sua atuação na identificação de corpos carbonizados na Ópera Cômica de Paris e Bazar da Caridade em 1897. Naquela circunstância, os aspectos odontológicos foram preponderantes, e o autor ressalta a relevância social e humanitária dos processos de identificação.

Freqüentemente os peritos se utilizam de elementos comparativos anteriores à morte do indivíduo, como por exemplo o prontuário odontológico (ficha clínica), para proceder à identificação. Entretanto, essa condição básica para executar tecnicamente a identificação individual de uma pessoa (documentação prévia – prontuário odontológico) nem sempre se faz presente ou se mostra deficiente, o que faz com que a ilação dos exames esteja sujeita a

imprecisões, como constatou CLARK (1994) analisando a contribuição prestada pela odontologia legal em 10 desastres de massa ocorridos na Grã Bretanha.

Mesmo na presença de uma documentação prévia adequada há casos em que, devido à exposição corpórea a fatores exógenos (físicos, químicos ou biológicos), o processo de análise odontolegal torna-se de difícil execução ou mesmo inconcludente.

Antes do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, situações como essas levavam os peritos a procederem à identificação geral do indivíduo sem contar com o subsídio de elementos comparativos anteriores à morte. E, quando a documentação existia, mas os despojos estavam extremamente degradados, os exames procuravam reconstruir o perfil do indivíduo por meio do estabelecimento de sua espécie animal, da determinação do seu sexo, estatura, idade e cor da pele, entre outras características. Para tanto, contavam com o auxílio inestimável dos estudos antropométricos, que, entretanto, não possibilitavam a individualização – ou seja, a nomeação - do examinando.

Com a aplicação dos recursos da biologia molecular na identificação humana, é possível identificar uma pessoa mesmo sem informações *ante mortem* de ordem física - como uma documentação prévia (prontuário odontológico) -, ou até mesmo na presença de material biológico deteriorado em ínfimas quantidades, condições estas relativamente freqüentes nas análises forenses (CORACH *et al.*, 1997).

Nestes casos, como postulam OLIVEIRA *et al.* (2000a), a extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) da polpa dentária, ou do dente em sua totalidade, é um dos procedimentos plausíveis, pois a dureza das estruturas dentárias (esmalte, cemento, dentina e osso alveolar) propicia condições para a preservação e integridade do DNA mesmo em circunstâncias adversas do meio, como as altas temperaturas.

MARTIN HERAS *et al.* (1999) evidenciaram essa possibilidade ao relatarem a conduta assumida por equipe espanhola na identificação de 28 pessoas vítimas de carbonização. Apesar de adotar o formulário proposto pela “International Criminal Police Organization” (INTERPOL) e realizar diversos exames, como avaliação externa dos remanescentes corpóreos, exames odontológicos (intra e extra-oral), fotografias e radiografias, a equipe não pôde prescindir das investigações de DNA.

Os estudos de identificação humana, porém, não se restringe aos casos que envolvem análises *post mortem*. Na clínica médico legal, ainda hoje, tais estudos são majoritariamente voltados a casos de investigação de paternidade, que têm por finalidade identificar o verdadeiro progenitor excluindo todos os homens falsamente acusados - idealmente com a utilização de mais de um sistema genético -, e fornecer evidências de que o homem examinado, se não for excluído, é o pai.

Desde a descrição dos grupos sanguíneos ABO por Landsteiner em 1900, outros sistemas foram paulatinamente se incorporando ao estudo do vínculo familiar, incluindo os sistemas Rh, Duffy, Kell, Kidd, MNs e antígenos leucocitários humanos (HLA), além de sistemas adicionais (proteínas e enzimas). O uso conjunto desses testes permite que se obtenha probabilidade de exclusão acima de 95% (POLESKY, 1994).

Entretanto, tais métodos de investigações laboratoriais têm sido substituídos pelos testes de DNA. Esses testes, de maneira geral, iniciam-se pela extração do DNA de dentro do núcleo das células por meio das mais variadas metodologias, que dependem do tipo de material biológico a ser analisado (sangue, sêmen, saliva, dentes, ossos, fios de cabelo, urina etc.). Prosseguindo a análise, busca-se identificar os alelos em diferentes loci do indivíduo obtendo-se, assim, bases para comparações com a mãe e com o provável pai - nos casos de investigação de paternidade ou identificação *post-mortem* -, ou de um suspeito ou indiciado - nos casos de estupro, lesão corporal (marcas de mordida) ou qualquer outro crime que deixe indícios. Ao final, é necessário um trabalho estatístico, que verificará as possibilidades de exclusão e inclusão do indivíduo com base no cálculo de índices e probabilidades de paternidade; é importante salientar que a fidedignidade desses cálculos aumenta com o maior conhecimento da frequência dos alelos de cada locus da população estudada (JOBIM *et al.*, 1999).

Realizando estudos comparativos, HENKE *et al.* (1999) verificaram o polimorfismo dos testes de paternidade em 24 sistemas diferentes de marcação -

desde os sistemas ditos clássicos (ABO, MNS, Rh etc.), os de minissatélites e os de pequenas repetições consecutivas (STRs). Concluíram que nenhum sistema é perfeito e/ou infalível, uma vez que existe a possibilidade de ocorrerem mutações ou alelos silenciosos, que não são amplificados pelos métodos usuais. Na casuística estudada pelos autores, a análise dos minissatélites apresentou melhores resultados que os outros métodos.

Devemos considerar, entretanto, que, para que quaisquer desses recursos sejam incorporados com efetiva confiabilidade à população brasileira, é necessária a realização de estudos populacionais prévios, que já começam a ser divulgados (OZAKI, 1999). Nesse sentido, JOBIM *et al.* (1999) recomendam que a verificação da frequência alélica seja realizada em pelo menos cem indivíduos não relacionados, elegendo para aplicação forense as STR com maior índice de polimorfismo e de heterozigose.

Os estudos voltados à relação genética das evidências que contenham saliva humana – aqui entendidas como marcas de mordida, mordanças, manchas em vestimentas etc. – constituem-se em uma linha de pesquisa que vem se firmando dentro da odontologia legal. Em casos de lesões provocadas por mordeduras - que freqüentemente estão associadas a crimes sexuais (vitima mulher e agressor indivíduo do sexo masculino) - é possível, além da investigação das características físicas do agressor - conformação do arco, número, posição e particularidades dos dentes -, confirmar a eficácia da individualização genética com a utilização das STR do cromossomo Y; isso ocorre até mesmo quando há

mistura entre os materiais orgânicos da vítima - sangue ou secreção vaginal - e do agressor - saliva ou espermatozóides.

Profissionais de outras áreas, ou mesmo cirurgiões-dentistas desinformados sobre a legislação que regulamenta o exercício da odontologia, podem considerar que realizar perícias analisando dentes, ossos ou fluidos orgânicos - sangue ou saliva - sob a óptica da biologia molecular excede a área de competência profissional do cirurgião-dentista. Todavia, a Lei 5081, de 24 de agosto de 1966 (Brasil, 1966), que regula o exercício da odontologia e estabelece as competências do profissional; em seu Art. 6º, incisos IV e IX, diz o seguinte:

“Compete ao Cirurgião-Dentista:

...

IV - proceder à perícia Odonto-Legal em foro civil, criminal, e trabalhista e em sede administrativa;

...

IX - utilizar, no exercício da função de perito-odontólogo, em caso de necropsia, as vias de acesso do pescoço e da cabeça”.

Além dessa legislação, de alçada federal, temos a Resolução CFO-185/1993 (Conselho Federal de Odontologia-CFO, 1993), também de âmbito federal, que estabelece o elenco das especialidades odontológicas. Em seu artigo 54, encontramos a Odontologia Legal definida da seguinte forma:

“Odontologia Legal é a especialidade que tem como objetivo a pesquisa de fenômenos psíquicos, físicos, químicos e biológicos que podem atingir ou ter atingido o homem, vivo, morto ou ossada, e mesmo fragmentos ou vestígios, resultando lesões parciais ou totais reversíveis ou irreversíveis.

Parágrafo único: A atuação da Odontologia legal restringe-se à análise, perícia e avaliação de eventos relacionados com a área de competência do Cirurgião-Dentista podendo, se as circunstâncias o

exigirem, estender-se a outras áreas, se disso depender à busca da verdade, no estrito interesse da justiça e da administração.”

Em seu artigo 55, a mesma Resolução define as áreas de atuação do especialista em Odontologia Legal, que incluem: identificação humana; perícias logísticas no vivo, no morto, íntegro ou em suas partes em fragmentos, e ainda perícia em vestígios correlatos, inclusive de manchas ou líquidos oriundos da cavidade bucal ou nela presentes (CFO, 1993).

Conseqüentemente, fica patente o respaldo jurídico para que os cirurgiões-dentistas executem perícias envolvendo quaisquer materiais biológicos, não havendo também impedimento para que empreguem as técnicas de biologia molecular. Assim, parece-nos oportuno que os profissionais que atuam em odontologia legal na área pericial se familiarizem com os conhecimentos tecnológicos das análises do DNA, e gradualmente incorporem essas metodologias à sua prática, pois tais recursos certamente terão caráter preponderante no contexto das ciências forenses relacionadas à identificação humana.

2. Revisão da literatura

2.1 BREVE RETROSPECTO DA ODONTOLOGIA LEGAL RELACIONADA À IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Inúmeros estudos concernentes à identificação humana têm sido realizados pela odontologia legal. Neste tópico temos como objetivo precípua apresentar, aos não iniciados na área, alguns trabalhos que dão uma idéia da abrangência e evolução da arte. Cabe salientar que, em muitos casos, somente o odontologista, com seus conhecimentos específicos, será capaz de respaldar adequadamente a justiça.

SOPHER (1972) salienta o auxílio que os conhecimentos do cirurgião-dentista podem fornecer nos casos de identificação humana *post-mortem*. O autor lembra que os métodos científicos de identificação são as impressões digitais; o exame dental; o exame do esqueleto ou de suas partes, por meio do qual é possível determinar o grupo racial, o sexo, a idade provável e a estatura do indivíduo em vida; o exame médico; as comprovações sorológicas e as comprovações tricológicas - estudo dos pêlos e cabelos. E salienta que o exame dental pode envolver cento e sessenta faces dentais visíveis, mas pode ter pouco valor se não tiverem sido colhidas e armazenadas as características dentais anteriores à morte, que possibilitariam a comparação dos dados. A identificação

dental é indispensável quando os métodos de identificação visual – reconhecimento - e as impressões digitais mostrarem-se ineficientes. O autor afirma, ainda, que as Forças Armadas Americanas há anos têm reconhecido o valor da identificação dental e têm enfatizado a importância da acuracidade no preenchimento dos dados dentais previamente, em vida.

Para BERNSTEIN (1983), a utilização de fotografias é de grande valor para a acurácia da documentação odontológica *post-mortem*; e justifica essa assertiva lembrando que as evidências dentais, apesar de resistentes, são compostos de materiais orgânicos e, como todo material orgânico, são perecíveis. O autor faz uma explanação sobre o equipamento fotográfico necessário para que os resultados obtidos (fotografias) tenham efetividade na identificação dental. E fornece exemplos explicativos de técnicas para fotografar corpos no local do acidente/crime, arcadas dentárias, esqueletos, face humana, dentes anteriores e radiografias anteriores à morte.

Descrevendo caso de repercussão internacional, ENDRIS (1985) ressalta a contribuição da Odontologia Legal na identificação do carrasco nazista Josef Mengele. As características dentais e dos ossos maxilares anteriores à morte do nazista - extraídas de fichas de exame físico realizado quando Mengele ainda estava no campo de concentração de Auschwitz -, comparadas aos eventos encontrados na ossada suspeita, apresentaram marcas evidentes de positividade na identificação, com uma alta probabilidade.

LORTON & LANGLEY (1986) esboçaram um sistema de computador para auxiliar na identificação *post-mortem* pelos elementos dentários. Os autores simularam um processo de identificação com quinhentos e setenta e oito registros dentais distintos, de 578 pessoas diferentes. O sistema selecionava grupos a partir de quatro ou mais características semelhantes - cada obturação ou dente ausente -, e mostrou-se efetivo num ensaio de até vinte e cinco mil registros, de maneira rápida e econômica.

Comentando os serviços prestados pelo Departamento de Odontologia Forense do “*Royal Dental College of Copenhagen*” num período de vinte e cinco anos, KEISER-NIELSEN (1989) relata que haviam sido realizadas quatrocentas e quarenta e quatro necropsias bucais naquele hiato de tempo, e que estas foram decisivas na identificação de duzentas e cinqüenta e cinco pessoas. O autor fala também dos serviços de avaliação da idade - através do estudo da cronologia de mineralização dental -, comuns em casos de imigrantes sem registros de nascimento; dos serviços de identificação do agressor através das marcas de mordidas deixadas na vítima ou em materiais – alimentos - maleáveis. E ressalta a inestimável colaboração da odontologia legal na identificação das vítimas em seis casos de catástrofes aéreas e em três hotéis incendiados.

Para ROTHWELL *et al.* (1989), a odontologia legal possui papel preponderante na identificação de remanescentes corpóreos, para a certificação da identidade de pessoas falecidas, e particularmente nas investigações de homicídios. Descrevem o caso de uma série de assassinatos ocorridos a partir de

1982, e até aquele momento não solucionados, no qual o *serial killer* conhecido como o Assassino de Green River fez quarenta vítimas, todas do sexo feminino. As vítimas foram encontradas em vários estágios de decomposição ou já em estado de esqueletização, sendo trinta e seis delas identificadas principalmente pelas evidências dentais. Os autores, entretanto, destacam as dificuldades de obtenção dos prontuários dentais anteriores à morte das desaparecidas - supostas vítimas -, e apontam problemas nos documentos analisados. E concluem, afirmando que a odontologia legal pode contribuir significativamente para o avanço dos processos de identificação, desde que haja um contínuo treinamento dos dentistas especialistas para a área forense.

Em trabalho publicado em 1993, KESSLER & PEMBLE descrevem a atuação da odontologia legal na identificação das vítimas americanas na “Operação Tempestade no Deserto”. Dos 251 exames de identificação dental realizados, 244 possibilitaram a individualização e positiva identidade das pessoas. Tais exames foram facilitados pela existência de um arquivo com radiografias panorâmicas da maioria das pessoas envolvidas com a “Operação”; os casos não identificados foram justamente aqueles que não apresentavam registros dentais prévios.

FERRI (1993) sugeriu a utilização de um método simples de identificação permanente e seguro, que consistia na colocação de códigos individuais (número do seguro social) nas superfícies linguais de coroas de

porcelana. O autor descreve a técnica destacando que, após o *glaze* da porcelana, esta codificação é facilmente legível.

Descrevendo os princípios organizacionais e indicando os resultados alcançados nos processos de identificação das vítimas da guerra da Croácia, STRINOVIC *et al.* (1994) lembram que, até 25 de fevereiro de 1993, seis mil quatrocentas e noventa e três vítimas tinham sido identificadas, de um total estimado em mais de quatorze mil vítimas, ainda sem identificação. Os autores salientam que, apesar de a odontologia ter colaborado em inúmeros casos, as identificações eram complicadas devido à carência de documentação médico/odontológica antes da morte.

Para contribuir com a justiça em casos de julgamento de processos por crimes de responsabilidade profissional, MENEZES (1996) realizou um estudo que buscava correlacionar as concentrações de flúor no osso, as doses dessa substância administradas a animais e as mortes ocorridas nessa população. A autora pretendia utilizar o esqueleto como prova *post-mortem* de intoxicação aguda por flúor, mas os resultados obtidos demonstraram que, para adoção dessa metodologia em humanos, os padrões de normalidade teriam que ser estabelecidos previamente através de pesquisa. Além disso, seria necessário que outras observações - como o quadro clínico e a história relatada de exposição ao flúor - fossem analisadas e somadas aos resultados das análises de flúor na camada óssea superficial.

STEAGALL & SILVA (1996) fizeram uma pesquisa sobre a importância da dentística e de seus materiais no processo de identificação humana. Os autores ressaltam que é de grande importância que o prontuário odontológico - fichas clínicas - contenha anotações detalhadas sobre cada procedimento realizado, inclusive dos materiais forradores utilizados. E verificaram as alterações sofridas por diferentes materiais (amálgama, resina acrílica, resina composta, cimento policarboxilato e cimento de silicato), em diferentes temperaturas (200°C, 400°C e 600°C), por um período de dez minutos a cada vez, simulando as temperaturas ocorridas nos incêndios dos edifícios Joelma e Andraus em São Paulo. Tal estudo fornece-nos valiosos subsídios sobre as alterações sofridas – de textura, contração, cor e permanência ou não na cavidade - por esses materiais, quando diante de processos de identificação *post-mortem* de pessoas carbonizadas.

Para FELIZ (1999) os peritos odontológicos devem interagir e familiarizar-se com outras áreas do conhecimento, como a química. O autor reafirma a possibilidade de diagnóstico a partir de manchas de saliva, verificando se as mesmas pertenciam a indivíduos fumantes ou não fumantes, dado este pertinente para a individualização de indiciados.

OLIVEIRA *et al.* (2000b) relatam a contribuição complementar dada pelo estudo comparativo dos seios frontais da face. E descrevem casos ocorridos na cidade de São Paulo no ano de 1998, quando a cidade foi atormentada por um *serial killer*. Com sua prisão foram comprovadas, até o momento, 11 vítimas, das

quais duas apresentavam radiografias da face anteriores ao seu fim trágico. Essa documentação prévia possibilitou estabelecer uma correlação positiva entre os registros e os crânios analisados.

A aplicação da holografia no estudo da cronologia do fechamento das suturas cranianas pode ser de grande valia na estimativa da idade em indivíduos adultos pois, até o presente, os estudos antropométricos existentes mostram dificuldades em sua reprodutibilidade e precisão. Assim, OLIVEIRA *et al.* (2000c) realizaram ensaio no qual verificaram, qualitativamente, a dissipação de tensões no crânio. Os autores observaram, como aspecto mais relevante, que algumas imagens reconstituídas do crânio apresentavam suturas cranianas abertas, havendo uma alteração no padrão de dissipação das franjas. Essa observação levou-os a supor que, em futuros estudos com crânios de idade conhecida, é possível buscar uma padronização na aplicação das forças no crânio que produzam alterações nos padrões de franjas. Assim, será possível constatar, com precisão técnica, o estágio em que encontram essas franjas: obliteradas, parcialmente obliteradas ou abertas.

Procuramos apresentar uma rápida visão dos trabalhos odontológicos relacionados à identificação humana. Não mencionamos trabalhos que empregassem a biologia molecular pois, dada a sua relevância para o presente estudo, eles serão destacados nos tópicos seguintes.

2.2 PEQUENAS REPETIÇÕES CONSECUTIVAS (STRs) E ESTUDOS POPULACIONAIS

A incorporação das tecnologias de DNA à história forense é recente: teve início na década de 80 e, portanto, as terminologias e os recursos empregados ainda não são de conhecimento comum. Assim, e para um exato entendimento deste tópico, faz-se necessário explicar alguns termos e metodologias, antes de passarmos a pormenorizar os trabalhos sobre STR e estudos populacionais.

O estudo das seqüências polimórficas do DNA tem se mostrado o mais efetivo recurso para diferenciar - e em última análise identificar - os indivíduos. Há inúmeros métodos de detecção dessas regiões hipervariáveis, mas dois se destacam em sua aplicação forense. São eles: as análises de polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) pelo método de sondas, e a técnica de amplificação de locus gênicos utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (OZAKI, 1999).

Mas, para o emprego – e a eleição – de qualquer uma dessas metodologias, necessitamos reconhecer o DNA. Assim, é importante tecer algumas considerações sobre esse componente. Sucintamente, podemos começar discorrendo sobre as três macromoléculas fundamentais das células, que são os polissacarídeos, as proteínas e os ácidos nucleicos. Os polissacarídeos são compostos de cadeias de açúcares e geralmente servem como fonte de energia.

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas, constituídas por um conjunto de aminoácidos, e estão envolvidas em inúmeras funções biológicas: enzimática; transportadora; nutritiva e de reserva; contrátil ou de movimento; estrutural; de defesa e reguladora. Mas são os dois ácidos nucléicos - ácido desoxirribunucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) - que fornecem a bagagem genética pela qual todas as outras atividades são direcionadas, através das funções de armazenamento, transmissão e tradução da informação genética (SMITH *et al.*, 1997)

Os componentes característicos do DNA e do RNA são: **base nitrogenada, pentose e ácido fosfórico**. As **bases nitrogenadas** são divididas em dois grupos: pirimidina e purina (SMITH *et al.*, 1997). Assim sendo, as principais bases purínicas e pirimidínicas do DNA e do RNA são, conforme o QUADRO 1:

QUADRO 1 – Bases purínicas e pirimidínicas do DNA e do RNA

BASES	DNA	RNA
Purinas	Adenina Guanina	Adenina Guanina
Primidina	Citosina Tiamina	Citosina Uracila

As **pentoses** encontradas nos ácidos nucléicos podem ser as unidades desoxirribonucleotídicas do DNA que contêm a *2'-desoxi-D-ribose*, e as unidades ribonucleotídicas do RNA que contêm a *D-ribose* (SMITH *et al.*, 1997).

É através do grupo fosfato (**ácido fosfórico**) que os nucleotídeos sucessivos dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) são unidos entre si. O grupo hidroxila 5' da pentose de uma unidade nucleotídica é ligado ao grupo 3' da pentose do próximo nucleotídeo; esta ligação fósforo-diéster sempre ocorre entre o carbono 3' de um açúcar e o carbono 5' de um nucleotídeo adjacente, originando a polaridade da molécula ou a sua "direção". Por convenção, a sequência de DNA é definida nas direções 5' e 3' (SMITH *et al.*, 1997).

Em sua forma natural, fitas simples de DNA são cadeias cruzadas por pontes de hidrogênio que ocorrem entre bases nitrogenadas de fitas emparelhadas. Esta configuração resulta em uma dupla cadeia/fita de DNA, que se espiraliza para melhor reorganização na forma de dupla hélice.

O pareamento das bases entre as duas fitas é muito específico, e a ligação de hidrogênio ocorre somente entre a adenina e a timina, e entre a guanina e a citosina (JOBIM *et al.*, 1999).

Com uma cadeia percorrendo a direção 5' para 3' e perfeitamente pareada, ainda que percorrendo cadeia oposta na direção 3' para 5', as cadeias são ditas antiparalelas e complementares. No processo de amplificação as duas fitas se separam, cada uma serve de molde para gerar uma nova fita e o único

resultado esperado são duas moléculas de DNA idênticas nos pareamentos de base à molécula original. A replicação do DNA é dirigida pela enzima DNA polimerase (COLEPICOLO *et al.*, 1999).

Segundo OZAKI (1999), uma propriedade do DNA que merece destaque é a sua capacidade de absorver luz ultravioleta de 260nm de onda, o que permite a sua quantificação pela espectrofotometria.

Os genes estão situados nos cromossomos em posições específicas - denominadas *lôcus* -, que são unidades funcionais de herança. Usualmente correspondem a um segmento do DNA que codifica uma proteína específica; o conjunto de muitos genes formará o cromossomo.

A constituição genética de um indivíduo em um determinado *lôcus* ou conjunto de *lôcus* é denominada de genótipo. A expressão desses genes é representada pelas nossas características físicas que, além do genótipo, sofrem influência do meio – o que é denominado fenótipo (OTTO *et al.*, 1998). Devido a essa influência ambiental podem existir indivíduos com fenótipos semelhantes - por exemplo a cor da pele – mas com genótipos diferentes (HARTL & CLARK, 1997).

A primeira técnica de biologia molecular que foi empregada em análise forense utilizava a caracterização de regiões do DNA que apresentam polimorfismos de tamanho por fragmentos de restrição, observados por meio do processo de hibridização. Esse processo analisa regiões que apresentam

seqüências de minissatélites de grande polimorfismo e possibilita o estabelecimento da diversificação dos indivíduos pela utilização de sondas marcadas - com radioatividade ou quimiluminescência -, que podem ser de locus simples (SLPs) ou multilocus (MLPs). Os resultados são analisados por meio da identificação de fragmentos com número de pares de bases definidos (INMAN & RUDIM, 1997; SMITH *et al.*, 1997; JOBIM *et al.*, 1999).

As SLPs buscam, no locus de um par de determinado cromossomo, a seqüência de DNA complementar à sonda utilizada. Assim, o emprego dessas sondas resulta em, no máximo, dois fragmentos diferentes - nos casos de indivíduos heterozigotos -, ou em apenas um fragmento - nos casos de homozigotos. Já as sondas multilocus detectam vários segmentos de DNA repetitivos, localizando diferentes regiões dos diversos cromossomos. O emprego destas sondas fornece um padrão que varia entre 20 e 30 fragmentos de DNA em cada indivíduo. Por causa desse elevado número de caracteres, a probabilidade de igualdade entre duas ou mais amostras analisadas é muitíssimo baixa. E, sendo esse padrão tão individual quanto aquele das impressões digitais, a metodologia ficou conhecida como DNA *fingerprinting* (INMAN & RUDIM, 1997; SMITH *et al.*, 1997; JOBIM *et al.*, 1999).

Entretanto, as análises pelo método de RFLP através do processo de hibridização requerem grandes quantidades de DNA íntegro de alto peso molecular. Portanto, DNA degradado, em quantidade insuficiente - inferior a 100ng

-, ou que apresente essas duas características simultaneamente, pode resultar na impossibilidade de análise completa pelo RFLP (SMITH *et al.*, 1997).

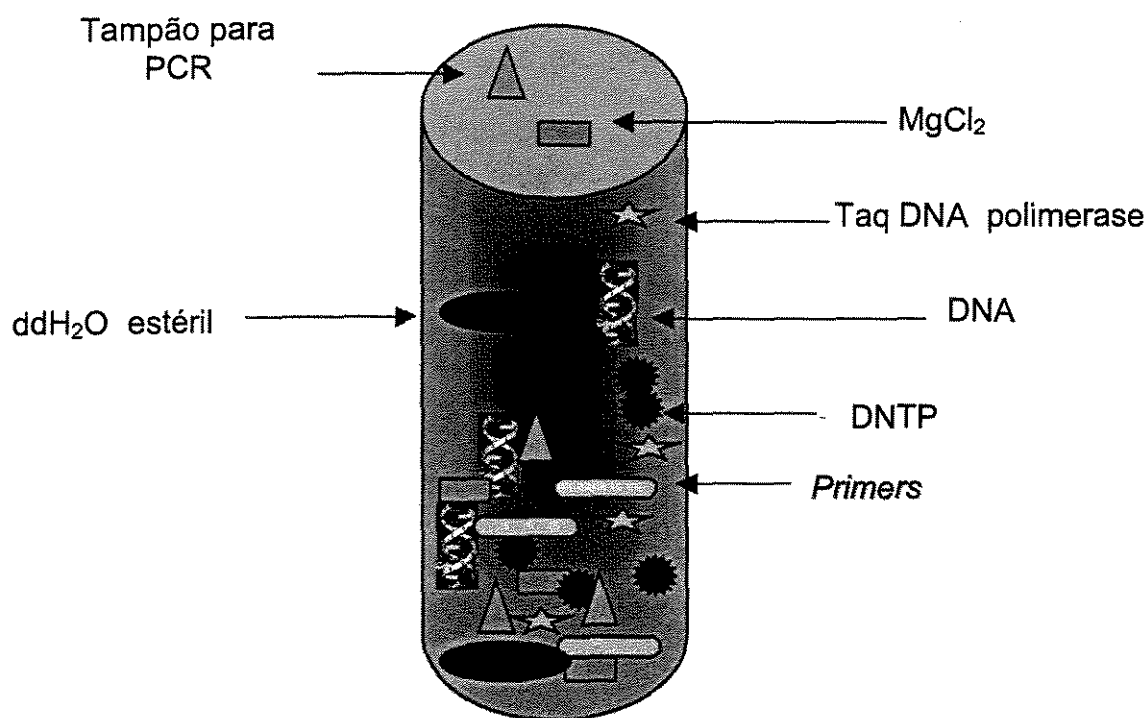
Apesar de BÄR *et al.* (1988) comprovarem a estabilidade *post-mortem* do DNA em diferentes tecidos orgânicos – como córtex cerebral, nódulos linfáticos, músculos, sangue, baço, fígado, rim e glândula tireóide -, há estimativas de que 20% das investigações forenses que utilizam o RFLP em suas análises não chegam a um bom termo; e essas porcentagens de insucesso são maiores quando o DNA é recolhido de tecido cadavérico (SMITH *et al.*, 1997).

Já as repetições consecutivas de número variado (VNTR) são seqüências de nucleotídeos hipervariáveis que se caracterizam por apresentar muitos alelos, sendo consideradas como uma classe de RFLP. Os polimorfismos de VNTR podem ser estudados sob o prisma de locus de minissátelites - comprimento intermediário da unidade repetidora de 15-65 pares de base (bp) - como também de locus de microsatélites, denominados STR com seqüências genômicas de tamanho variando entre 2 e 9 bp (ALVES, 2000).

Para ambos os grupos de VNTR, o uso da técnica de PCR tem sido eletivo. Com a amplificação de regiões restritas do genoma, principalmente de STR, houve a possibilidade de análise de quantias de DNA até inferiores a 100pg, aumentando o poder de avaliação das amostras forenses. (SMITH *et al.*, 1997).

A PCR consiste na amplificação de seqüências do DNA extraído empregando-se um par de iniciadores ou *primers* compostos por pequenas

seqüências de oligonucleotídeos, que são complementares a uma certa extensão em ambas as fitas do DNA a ser amplificado, usados para iniciar a reação. A reação ocorre em meio estável, pela adição de uma solução tampão. A solução contém ainda a TaqDNA polimerase, que é a enzima que propicia o pareamento dos nucleotídeos que estão livres. O DNA, cuja seqüência é originalmente conhecida, é denominado de DNA *template* ou molde. Uma representação esquemática dos reagentes utilizados nessa técnica de amplificação é apresentada a seguir, na FIGURA 1:



Fonte: OZAKI (1999)

FIGURA 1 – Representação esquemática dos reagentes utilizados pela técnica de PCR.

Quando a molécula de DNA - dupla hélice – é aquecida acima da temperatura de 90°C, suas pontes de hidrogênio se rompem e ocorre a separação das cadeias complementares. Esse processo é denominado desnaturação do DNA ou *melting* (COLEPICOLO *et al.*, 1999; JOBIM *et al.*, 1999; OZAKI, 1999).

Com o rápido resfriamento da solução, cada cadeia encontra-se com sua complementar e a estrutura de dupla hélice reconstitui-se, num processo denominado hibridação ou *annealing*. Essa habilidade de renaturação da molécula de DNA permite a ligação entre a fita, que está unitária (*single strand*), e o *primer*. A prevalência de ligação dos *primers* ocorre pela sua alta concentração no meio da reação.

Durante esse processo, altas concentrações de nucleotídeos tornam-se disponíveis - desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTP) -, e servirão na composição da nova seqüência a ser replicada (COLEPICOLO *et al.*, 1999; JOBIM *et al.*, 1999; OZAKI, 1999).

Com um novo aumento de temperatura, a enzima denominada TaqDNA polimerase catalisa a reação, incorpora o nucleotídeo na posição terminal do *primer* complementando as bases do DNA molde - a ser amplificado -, e promove o alongamento da fita. Esse processo denomina-se polimerização ou extensão (COLEPICOLO *et al.*, 1999; JOBIM *et al.*, 1999; OZAKI, 1999).

O conjunto de reações - em série - de **desnaturação, hibridação e polimerização** é definido como um **CICLO**. A execução de um ciclo resulta na

amplificação da sequência do DNA desejada. O produto de um ciclo de amplificação serve como *template*/molde para o próximo.

Os loci de microssatélites existem em profusão no genoma humano, inclusive nos cromossomos sexuais, fornecendo uma grande variabilidade de opções para a eleição de loci para testes de identificação (BECKMAN & WEBER, 1992). Há muitos alelos nos loci de microssatélites, o que faz com que seja muito pouco provável que dois indivíduos escolhidos ao acaso possuam os mesmos perfis alélicos nesses loci, à exceção de gêmeos univitelinos (ALVES, 2000).

Nos cromossomos autossômicos, os loci podem apresentar-se em homo ou heterozigose, ou seja, para cada região de VNTR estudada podemos ter um alelo - indivíduo homozigoto - ou dois alelos - indivíduo heterozigoto -, sendo este dado de heterozigose importante em estudos populacionais e de seleção, para aplicação forense de determinado loci. Entretanto, em ambos os casos, sempre haverá um alelo paterno e um alelo materno para cada loci; a homozigose ocorrerá quando os alelos recebidos pelo indivíduo forem coincidentes (JOBIM *et al.*, 1999).

No caso do estudo de loci do cromossomo Y (como por exemplo DYS390, DYS391, DYS393, entre outros), as STR não se recombinaram durante a meiose - e não possuem cromossomo homólogo, sendo todos homozigotos -; assim, só ocorre a identificação dos alelos de origem masculina, que são

herdados em bloco dos antepassados masculinos. “*Esta herança em bloco de alelos diferentes STR do mesmo cromossomo é denominada herança haplotípica, e o conjunto desses alelos chama-se haplótipos*” (JOBIM *et al.*, 1999).

O grau de polimorfismo de um locus estará na dependência do diferente número de repetições de unidades de nucleotídeos, que em última análise nos darão o número de alelos presentes nesse locus para dada população estudada. Por exemplo, no locus DYS393 a unidade de repetição é a $(GATA)_n$; estudos populacionais demonstraram que o número de repetições consecutivas dessa unidade varia de 9 a 16 vezes; assim, o locus DYS393 possui oito alelos diferentes, e sua região de amplificação varia entre 108 e 136bp. Já o locus DYS391 também tem a unidade de repetição $(GATA)_n$, mas apresenta repetições variando entre 7 e 14 vezes com o mesmo número de alelos distintos, e sua região de amplificação está compreendida entre 271 e 299bp. O locus DYS390 que possui duas unidades de repetição, $(GATA)_n$ e $(GACA)_n$, com repetições variando de 18 a 27 vezes e nove alelos diferentes; sua região de amplificação varia entre 191 e 227bp (ANEXO 1).

A escolha desses loci para casos forenses de identificação humana também se dá em decorrência do pequeno tamanho dos alelos, geralmente menores que 300bp, o que possibilita que mesmo espécimes antigos e/ou mal acondicionados, que habitualmente contêm DNA degradado, sejam analisados (SMITH *et al.*, 1997).

Após estas conceituações iniciais, passamos a descrever trabalhos sobre as STR e estudos populacionais que vêm sendo realizados por vários grupos do mundo todo, a partir de amostras biológicas contemporâneas ou de materiais arqueológicos.

Em 1997, MOURA-NETO & BUDOWLE verificaram a distribuição de alelos em um conjunto de loci de VNTR D1S7, D2S44, D4S139, D5S110, D10S28 e D14S13, em amostras de sangue obtidas na cidade do Rio de Janeiro com indivíduos não negros. Os dados dos seis loci estudados foram comparados com loci de indivíduos caucasianos americanos e foi encontrada substancial discrepância, reforçando a importância de estudos populacionais previamente à aplicação forense das metodologias disponíveis.

HANAOKA & MINAGUCH (1998) investigaram a frequência alélica do locus de VNTR D4S43 na população japonesa com utilização da PCR. Observaram 11 alelos e 16 genótipos diferentes. Quando o produto foi amplificado entre 184 e 369bp, a taxa de heterozigose foi de 58,7% e o alelo mais comum teve 60,3% de presença na amostra. A partir desse alelo mais frequente foram feitas novas amplificações mais precisas com géis de poliacrilamida mais concentrados, o que possibilitou a subdivisão desse alelo em quatro grupos.

Estudando quatro populações distintas originárias da Áustria (100 indivíduos), da Itália (158 indivíduos), do Egito (100 indivíduos) e do Iêmen (104 indivíduos) sob o ponto de vista das STR D12S391 e CSF1PO, KLINTSCHAR *et*

al. (1998) amplificaram as amostras pela PCR e analisaram-nas por eletroforese. Comprovaram não haver, para o locus D12S391, diferenças relevantes entre as populações árabes e européias estudadas. Já o locus CSF1PO apresentou divergências significativas entre a população do lêmen e as outras três populações estudadas; ainda para o locus CSF1PO, a população egípcia apresentou divergência no equilíbrio Hardy-Weinberg.

A lei de Hardy-Weinberg é uma ferramenta estatística freqüentemente utilizada em estudos genéticos de populações, pois estabelece critérios para afirmar se determinada população se encontra em equilíbrio e, portanto, se servirá de fonte para calcular freqüências alélicas em estudos de vínculo familiar. De acordo com tais estudos, as freqüências gênicas não se alterarão, e as proporções genotípicas atingirão um equilíbrio estável - mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo - em uma população que obedeça a 8 premissas: 1) ser infinitamente grande; 2) possuir distribuição homogênea de homens e mulheres; 3) os casamentos ocorrem ao acaso, aleatoriamente; 4) todos os casais da população são igualmente férteis e geram o mesmo número de filhos; 5) não existir sobreposição de gerações na população - todos os indivíduos devem ter a mesma idade ao casar; 6) não haver miscigenação da população original - a população não recebe, nem emite, fluxo gênico capaz de alterar sua composição genética inicial; 7) os genes da população não sofrem mutação e 8) todos os indivíduos são igualmente viáveis, não existindo fatores que aumentem

ou diminuam a sobrevivência daqueles que apresentem determinado genótipo (BEIGUELMAN, 1995).

PU *et al.* (1998) examinaram amostras de sangue de 500 chineses não relacionados, com o intuito de constatar a frequência alélica de nove STR (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317 e D7S820). O DNA foi extraído pelo método orgânico, sendo submetido à PCR e analisado por seqüenciador automático, sendo observado um total de 80 alelos. As frequências alélicas encontradas não mostraram divergências no equilíbrio de Hardy Weiberg.

GAROFANO *et al.* (1998) verificaram alguns dos loci investigados pelos autores anteriores e incluíram alguns loci complementares (HUMTH01, D21S11, D18S51, HUMVWFA31, HUMFIBRA, D8S1179, HUMTPOX, HUMCSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 e D3S1358) numa população de 223 italianos caucasianos não relacionados. O DNA foi amplificado pela PCR, a eletroforese foi realizada com gel de poliacrilamida a 5% no sistema automático ABI 377 da Perkin Elmer®. Todos os loci apresentaram equilíbrio de Hardy-Wienberg. Os resultados comprovaram que esses loci possuem valor discriminatório para a identificação humana em italianos.

Estudando 4 STR: D18S51; D19S253; D21S11 e SE33 em uma população de caucasianos brasileiros não relacionados, OZAKI (1999) verificou a distribuição e frequência de seus alelos e suas taxas de heterozigose. O autor observou que os aspectos avaliados apresentam valores significativos para o

estabelecimento de vínculo genético familiar. Também constatou que os microssatélites D21S11 e SE33 apresentaram as melhores taxas de heterozigose sendo, portanto, mais seguros no estudo do vínculo genético familiar de brasileiros.

CLAYTON *et al.* (1995) reportam um caso ocorrido em Waco (Texas) em 19 de abril de 1993 que, devido às suas particularidades - incêndio e concentração de armamentos - colocou à prova as técnicas identificação. O programa de identificação pelo DNA foi utilizado em parte como exercício para futuras investigações, pois inquiriu-se a respeito do recente desenvolvimento das STR quadruplex. Dos 61 corpos, 26 tiveram identificação positiva, comprovando a utilidade e a potencialidade da amplificação de lócus de STR pela PCR. A metodologia multiplex (duplex, triplex, quadruplex etc.) caracteriza-se pela utilização de diferentes lócus, que apresentem regiões distintas de amplificação, reagindo conjuntamente na mesma PCR e, por conseguinte, apresentando amplificações simultâneas na mesma análise de eletroforese. Esse procedimento traz um ganho de eficiência às análises forenses.

Segundo PASTORE *et al.* (1996), as freqüências alélicas apresentam discrepâncias nos grupos étnicos: caucasianos, africanos, orientais e hispânicos. Os autores estudaram as diferenças existentes entre dois grupos de caucasianos (americanos e europeus do sul da Itália) pela análise das freqüências alélicas de um lócus de HLA-DQA1, seis de VNTR, onze de STR analisados individualmente, e outros nove lócus de STR analisados em 3 triplex. Os resultados apontaram

similaridades entre as duas populações; os dados obtidos sobre as STR sugerem a possibilidade de utilização de frequências alélicas gerais para os grandes grupos étnicos listados, sem a necessidade de tipagem de subpopulações.

Estudando 350 trios de paternidade (mãe, filho e suposto pai) na população brasileira, PENA (1999) padronizou o emprego de um sistema multiplex com 10 STR localizadas em cromossomos distintos possibilitando que, em uma única ciclagem de PCR, ocorram dez reações simultâneas. A análise da eletroforese foi feita no seqüenciador automático ALF-Express da Pharmacia® (ALF = *Automatic Laser Fluorescent*), também em corrida única, pois todos os *primers* utilizaram o mesmo marcador fluorescente. O autor comprovou que esse multiplex possui capacidade de exclusão e índices de paternidade similares ao do multiplex de segunda geração desenvolvidos pelo Serviço Forense do Reino Unido e do Powerplex comercial disponível pela Promega®. Os loci utilizados foram: D16S2622 com região de amplificação alélica compreendida entre 68 e 96bp; D1S1612 entre 82 e 138bp; D2S1353 entre 126 e 168bp; D3S2387 entre 172 e 212bp; D4S2431 entre 221 e 265bp; D18S1270 entre 270 e 300bp; D5S2501 entre 306 e 330bp; D15S657 entre 332 e 368bp; D10S1237 entre 388 e 436bp e INFANAR-ALU do cromossomo 21 com intervalo de amplificação alélica abrangendo 456-484bp.

CIPOLLARO *et al.* (1999) comentam as características de conservação de 13 esqueletos descobertos há 250 anos atrás em Pompéia que haviam estado enterrados desde o ano 62d.C. Esse material foi minuciosamente estudado a partir

de então, e foram realizadas análises de DNA para fazer a diagnose do sexo, além de um STR do cromossomo 12 ter sido avaliado, com o objetivo de estabelecer o possível parentesco entre os indivíduos. O autores lembram que uma das dificuldade de se trabalhar com material arqueológico diz respeito à confiabilidade do DNA extraído, ou seja, se realmente é antigo ou é apenas fruto de uma contaminação recente. Essa contaminação pode ocorrer no laboratório ou mesmo no sítio arqueológico. Assim, é recomendável que as escavações sejam implementadas com acurácia, com o emprego de instrumentos e recursos condizentes. Contudo, provas de autenticidade somente podem ser obtidas por meio de experimentos independentes.

Em 1999, SCHULTES *et al.* adaptaram as análises de DNA de material arqueológico a um sistema de multiplex de 4 STR do cromossomo Y (DYS19,DYS390 e DYS389I/II). Os autores ressaltam que aquela foi a primeira vez em que se obteve amplificação de locus do cromossomo Y a partir de ossos com mais de 3.000 anos de idade.

A atuação da equipe de antropologistas do laboratório central de identificação do exército americano, com sede no Havaí - U.S.Army Central Identification Laboratory, Hawaii (CILHI), que rotineiramente faz uso de técnicas arqueológicas no resgate de corpos de membros das forças armadas foi descrita por HOSHOWER (1998). O autor relata uma missão realizada no sul da Ásia, e cita os desafios normalmente encontrados em áreas de conflito nesse tipo de trabalho: o combate em si, as interferências que os equipamentos de combate

podem provocar nos sítios de escavação, a natureza quase sempre adversa, os fatores emocionais, os problemas de orçamento para as missões e ainda os problemas políticos. Essas condições não convencionais fazem com que, muitas vezes, seja necessário flexibilizar os protocolos científicos, buscando uma harmonia entre a teoria e a prática a fim de recuperar o máximo de dados.

A associação entre os métodos arqueológicos e os recursos de análises de DNA para a solução de casos de identificação também foi utilizada por CORACH *et al.* (1997) em um enterramento comum que continha 340 esqueletos de vítimas da ditadura Argentina (1976-1983). Um pequeno número de pessoas foi identificado pelos métodos tradicionais, pois havia documentação *ante-mortem*. Para os demais, foi empregada a análise de matrilineagens de DNA mitocondrial, sendo também testadas as STR do cromossomo Y (DYS19, DYS385, DYS389 I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393). Os testes das STR Y apresentaram potencial na complementação dos dados da identificação de pessoas desaparecidas.

A aproximação entre arqueólogos e bioquímicos é decorrente de interesses comuns em avaliações evolutivas, que abordam tanto investigações de linhagens do DNA mitocondrial (matrilineagem) como estudos filogenéticos do cromossomo Y (patrilineagens). Estes últimos baseiam-se na teoria de que todos os haplótipos de cromossomo Y existentes hoje derivam de um primordial haplótipo ancestral, que estaria presente nos primeiros *Homo sapiens*. À medida que os homens migraram para novas regiões os haplótipos foram sendo alterados

por mutações, o que gerou novos haplótipos, ou a constituição de haplogrupos, cada grupo se comportando como uma linhagem evolutiva independente (PENA *et al.*, 2000).

Nesse mesmo artigo, Pena *et al.* (2000) discorrem sobre a formação da população brasileira e a complexa miscigenação da qual somos produto. Comentam a dificuldade para estabelecer geneticamente quanto de cada grupo que formou nosso povo (ameríndios, europeus e africanos) existe em nós. Assim, estudaram brasileiros brancos e encontraram que a grande maioria das linhagens paternas é proveniente da Europa (haplogrupo 2); já com relação às linhagens maternas, cerca de 60% são de origem ameríndia ou africana.

Em sua edição de setembro último, a revista "Newsweek" destaca, em reportagem especial sobre a redefinição da raça na América, matéria assinada por CAMPO-FLORES *et al.* (2000). Nela os autores expõem a dificuldade de se enquadrar as pessoas em grupos etnicamente estanques. Apesar de não possuir a consistência de informações de um trabalho científico, a matéria traz-nos subsídios para reflexão sobre uma área da identificação humana, que é a da determinação do grupo étnico ou da raça, como preferem alguns.

Em estudo multicêntrico, KNIJFF *et al.* (1997) avaliaram a distribuição e a frequência de STR do cromossomo Y (DYS19, DYS381I/II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393) em populações de 9 regiões geográficas (Austrália, Pacífico, Ásia Sul Oriental, Ásia Norte Oriental, Ártico, Ameríndios, Europa, Índia e África).

As distribuições dos alelos nos locos de nosso interesse (DYS390, DYS391 e DYS393) serão pormenorizadas a seguir. Esse trabalho contemplou mais de 4.000 homens, distribuídos em 48 populações distintas. Os autores estimaram o número de gerações possíveis de serem resgatadas pelo estudo da descendência dos haplótipos do cromossomo Y, chegaram a media de 1956 gerações ou 49.000 anos, assumindo 25 anos para cada geração.

Trabalhando com 223 homens da cidade de Barcelona, GENE *et al.* (1999) investigaram a frequência dos haplótipos de 8 STR do cromossomo Y (DYS19, DYS388, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393). Encontraram 137 tipos diferentes de alelos; o mais comum mostrou-se presente em 13% da amostra, enquanto 108 alelos foram únicos. A capacidade de discriminação foi de 61,5%, e a diversidade genética foi de 0,978, o que sugere que a análise combinada do polimorfismo de STR do cromossomo Y apresenta alta eficiência de diagnóstico.

Estudando 5 regiões polimórficas do cromossomo Y (DYS19, DYS389 I+II, DYS390 e DYS393) em uma população de 102 indivíduos não relacionados da Alemanha ocidental, JUNGE & MADEA (1999) verificaram as frequências alélicas dessas STR e observaram 5 alelos para o DYS19, 3 alelos para o DY389 I, 7 alelos para o DYS389 II, 6 alelos para o DYS390 (alelos 21, 22, 23, 24, 25 e 26) e 6 alelos para o DYS393 (alelos 11, 12, 13, 14, 15 e 16). Constataram 56 haplótipos diferentes, dados estes similares aos já relatados para outras populações européias.

GUSMÃO *et al.* (1999) otimizaram um pentaplex com microsatélites do cromossomo Y (DYS19, DY389 I e II, DYS390 e DYS393), avaliando-os sob duas plataformas distintas (ABI 377® e ALF®). O locus DYS393 apresentou produtos inespecíficos quando da análise de material degradado, podendo exibir também amplificação para indivíduos femininos em condições de baixa estridência. Os autores comentam que a aplicação das STR Y ocorre principalmente nas investigações de manchas orgânicas relacionadas a crimes sexuais.

Analisando 7 loci de STR do cromossomo Y (DYS19, DY389 I e II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393) em 5 populações diferentes da península Ibérica, GONZÁLEZ-NEIRA *et al.* (2000) encontram diversidade dos haplótipos variando de 0,96 para os indivíduos do País Basco a 0,99 para os indivíduos das regiões de Valência e da Andaluzia. Para os indivíduos do norte de Portugal, as STR DYS390, DYS391 e DYS393 apresentaram, respectivamente, os alelos 24, 10 e 13 com maior frequência. Foram também constatadas diferenças significativas entre os bascos e as outras populações ibéricas.

A distribuição alélica de 3 STR Y (DYS19, DYS390 e DYS393) foi observada em uma população de 257 indivíduos por GRAW & SEITZ (2000). O poder de exclusão (PE) foi mensurado individualmente e de forma combinada, apresentando individualmente $PE=0,74$ para o DYS390 e $PE=0,47$ para o DYS393; o ajuste para as 3 STR ofereceu $PE=0,93$. O PE é calculado pela fórmula: $PE = 1 - \sum (P_i)^2$; o PE combinado é calculado pela fórmula: $\bar{A} = 1 - (1 - PE_1)(1 - PE_2)(1 - PE_n)$ (HIRATA, 2000).

A relação de parentesco pode ser determinada por cálculos estatísticos, índice de paternidade e probabilidade de paternidade. Para o índice de paternidade (PI), a relação de semelhança é expressa em duas probabilidades. Compara a probabilidade de que um homem tendo o fenótipo do provável pai seja o pai biológico do examinando e a probabilidade de que outro homem aleatório (homem qualquer) seja o pai biológico; essa situação é expressa pela fórmula $PI = X/Y$. X = a probabilidade de que o homem com o fenótipo do provável pai (homem avaliado) possa produzir um esperma que contenha o gene paterno obrigatório; X é a frequência do gameta, que é de 1.0 para homozigotos e de 0.5 para heterozigotos. E Y = a probabilidade de que outro homem qualquer (aleatório) possa produzir um esperma que contenha o gene paterno obrigatório; Y é a frequência alélica de um grupo populacional ou racial relevante. Quando sistemas genéticos múltiplos são utilizados, o PI deve ser calculado independentemente para cada sistema avaliado; esses valores individuais do PI são denominados índices de sistemas (SI). Se os sistemas genéticos empregados são independentemente herdados, o sistema individual PI (SIs) pode ser trabalhado para derivar um índice de paternidade combinado pela multiplicação de todos os valores individuais dos PI, SI. O valor combinado de paternidade (CPI) deve ser apresentado no laudo final de identificação (HIRATA, 2000).

Ainda conforme Hirata (2000), a probabilidade de paternidade (W), expressa em porcentagem, requer o valor da probabilidade prévia (Pr) na fórmula $W = (Pr \cdot CPI) / [(Pr \cdot CPI) + (1 - Pr)]$, onde a probabilidade de paternidade é um

número designado com valor de 0 a 1, sendo o valor da probabilidade prévia normalmente adotado como 0,5. Exemplificando um caso com CPI de 19,0 e $Pr=0,5$, a probabilidade de paternidade seria igual a $W = (0,5) (19) / [(0,5) (19) + (-0,5)]$; $W=9,5/10$; $W=0,95$ ou 95%.

HIDDING & SCHMITT (2000) compararam a frequência alélica de 9 STR do cromossomo Y em duas populações distintas: alemães e chineses. O DNA foi obtido pelo método de Chelex®, e na PCR foi utilizada tecnologia multiplex; os produtos foram analisados no sistema ALF®. O perfil genético da população alemã estudada não mostrou diferenças significativas em relação à maioria das populações européias. O poder de exclusão variou entre 0,44 para o DYS393 a 0,94 para o DYS385. A diversidade dos haplótipos foi de 86,66% para os alemães, e de 98% para os chineses.

Sites com informações gerais sobre STR - incluindo informações sobre STR do cromossomo Y - estão disponíveis na *internet* em vários endereços, como o do *National Center for Biotechnology Information* dos Estados Unidos, que nos dá acesso ao *GenBank*, *Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase*, *Y-STR Single locus Information*, ou em locais com informações específicas de cada locus, como *links* da página da Universidade de Leiden (Holanda).

Este último endereço eletrônico conta também com dados das frequências alélicas de 9 populações distintas, dados estes que se reportam ao trabalho de KNIJFF *et al.* (1997). Por exemplo, o locus DYS390 é apresentado

com 10 alelos e os correspondentes pares de base para cada alelo são assim descritos: alelo 18=191bp; alelo 19=195bp; alelo 20=199bp; alelo 21=203bp; alelo 22=207bp; alelo 23=211bp; alelo 24=215bp; alelo 25=219bp; alelo 26=223bp e alelo 27=227bp. Maiores detalhes são apresentados nas tabelas que se seguem:

TABELA 1 - Informação da frequência alélica do locus DYS390. em diferentes populações

DYS390	Amostra	A 18	A 19	A 20	A 21	A 22	A 23	A 24	A 25	A 26	A 27
	Homens	191bp	195bp	199bp	203bp	207bp	211bp	215bp	219bp	223bp	227bp
N. Guin/ Austrália	134	0,0	0,0	10,4	0,7	2,2	26,1	46,4	14,2	0,0	0,0
Pacific	10	0,0	10,0	50,0	10,0	0,0	10,0	20,0	0,0	0,0	0,0
SE Ásia	81	0,0	0,0	0,0	6,2	4,9	47,0	29,6	12,3	0,0	0,0
NE Ásia	189	0,0	0,0	0,0	0,0	14,3	20,6	25,5	33,3	5,8	0,5
Ártico	62	0,0	0,0	0,0	0,0	4,8	6,5	85,5	3,2	0,0	0,0
Ameríndio	101	0,0	0,0	0,0	15,8	19,8	26,7	29,8	7,9	0,0	0,0
Indiano	25	0,0	0,0	0,0	8,0	8,0	20,0	12,0	36,0	16,0	0,0
Africano	147	0,7	0,0	0,7	53,1	10,2	13,6	12,9	8,8	0,0	0,0
Europeus	1046	0,0	0,0	0,2	3,3	13,4	28,1	37,7	14,1	2,9	0,3

Legenda:

A18 / 191bp = corresponde ao alelo 18, que apresenta amplificação de 191 pares de base
A19 / 195bp = corresponde ao alelo 19, que apresenta amplificação de 195 pares de base
A20 / 203bp = corresponde ao alelo 20, que apresenta amplificação de 199 pares de base
A21 / 203bp = corresponde ao alelo 21, que apresenta amplificação de 203 pares de base
A22 / 207bp = corresponde ao alelo 22, que apresenta amplificação de 207 pares de base
A23 / 211bp = corresponde ao alelo 23, que apresenta amplificação de 211 pares de base
A24 / 215bp = corresponde ao alelo 24, que apresenta amplificação de 215 pares de base
A25 / 219bp = corresponde ao alelo 25, que apresenta amplificação de 219 pares de base
A26 / 223bp = corresponde ao alelo 26, que apresenta amplificação de 223 pares de base
A27 / 227bp = corresponde ao alelo 27, que apresenta amplificação de 227 pares de base

Fonte: "Links" com informações sobre os loci de STR] da Universidade de Lieden, adaptado do trabalho de KNIJFF *et al.* (1997).

TABELA 2 - Informação da frequência alélica do locus DYS391 em diferentes populações

DYS391	Amostra	A8	A9	A10	A11	A12	A13
	Homens	275bp	279bp	283bp	287bp	291bp	295bp
N. Guin/ Austrália	86	0,0	4,7	82,5	12,8	0,0	0,0
Pacific	10	0,0	10,0	80,0	10,0	0,0	0,0
SE Ásia	56	0,0	3,6	69,6	25,0	1,8	0,0
NE Ásia	40	0,0	15,0	67,5	17,5	0,0	0,0
Ártico	62	0,0	0,0	80,6	19,4	0,0	0,0
Ameríndio	101	0,0	4,0	64,3	29,7	2,0	0,0
Indiano	25	0,0	4,0	64,0	32,0	0,0	0,0
Africano	31	3,2	12,9	45,2	35,5	3,2	0,0
Europeus	561	0,0	2,3	55,2	40,3	2,0	0,2

legenda:

A8 / 275bp = corresponde ao alelo 8, que apresenta amplificação de 275 pares de base

A9 / 279bp = corresponde ao alelo 9, que apresenta amplificação de 279 pares de base

A10 / 283bp = corresponde ao alelo 10. que apresenta amplificação de 283 pares de base

A11 / 287bp = corresponde ao alelo 11. que apresenta amplificação de 287 pares de base

A12 / 291bp = corresponde ao alelo 12. que apresenta amplificação de 291 pares de base

A13 / 295bp = corresponde ao alelo 13. que apresenta amplificação de 295 pares de base

Fonte: ["Links" com informações sobre os loci de STR] da Universidade de Lieden, adaptado do trabalho de KNIJFF *et al.* (1997).

TABELA 3 - Informação da frequência alélica do locus DYS393 em diferentes populações

DYS393	Amostra	A11	A12	A13	A14	A15
	Homens	115bp	119bp	123bp	127bp	131bp
N. Guin/ Austrália	86	0,0	1,2	77,9	18,6	2,3
Pacific	10	0,0	0,0	20,0	80,0	0,0
SE Ásia	56	1,8	46,4	26,8	19,6	5,4
NE Ásia	40	0,0	22,5	62,5	15,0	0,0
Ártico	62	0,0	0,0	48,4	51,6	0,0
Ameríndio	67	0,0	14,9	56,7	25,4	3,0
Indiano	25	0,0	28,0	8,0	56,0	8,0
Africano	31	0,0	6,5	41,9	35,5	16,1
Europeus	608	0,8	14,3	70,1	11,8	3,0

Legenda:

A11 / 115bp = corresponde ao alelo 11, que apresenta amplificação de 115 pares de base

A12 / 119bp = corresponde ao alelo 12, que apresenta amplificação de 119 pares de base

A13 / 123bp = corresponde ao alelo 13. que apresenta amplificação de 123 pares de base

A14 / 127bp = corresponde ao alelo 14. que apresenta amplificação de 127 pares de base

A15 / 131bp = corresponde ao alelo 15. que apresenta amplificação de 131 pares de base

Fonte: ["Links" com informações sobre os loci de STR] da Universidade de Lieden, adaptado do trabalho de KNIJFF *et al.* (1997).

Os estudos de locus de STR, particularmente do cromossomo Y, podem ser aplicados em testes de paternidade, investigações evolutivas e antropológicas e avançam para a área de identificação humana. Entretanto, para sua aplicação na rotina forense, faz-se necessário o estabelecimento de parâmetros populacionais prévios que embasarão a determinação das variações alélicas dos diferentes locus para a população estudada, dados essenciais para sua utilização na prática pericial.

2.3 INCORPORAÇÃO DOS ESTUDOS GENÉTICOS À ODONTOLOGIA LEGAL

Na prática forense, as estruturas dentárias têm sido priorizadas para análises genéticas porque a cavidade pulpar - arcabouço formado pelas paredes de esmalte, dentina e cimento - pode propiciar um meio estável para o DNA. Frequentemente, esse uso se dá em concomitância aos métodos comparativos convencionais - médicos, odontológicos e antropológicos -, com o intuito de dar maior respaldo e confiabilidade aos processos de identificação.

No tópico anterior citamos estudos populacionais de frequências alélicas que, usualmente, têm como material de análise o sangue. Entretanto, alguns trabalhos referem-se de maneira complementar aos dentes, como o de

HANAOKA & MINAGUCH (1998) que, além de 131 amostras de sangue trabalharam com 20 dentes, extraíndo o DNA de ambos os materiais pelo método orgânico (proteínase K e fenol clorofórmio), e usando 10ng de DNA para realizar a amplificação pela PCR e a análise das amostras.

Inicialmente, os estudos relacionando dentes e aspectos genéticos refletiam uma preocupação em relação à determinação do sexo em virtude da possibilidade de marcação do cromossomo Y contido em polpas dentárias. Esse procedimento era estabelecido com o auxílio da microscopia de fluorescência. Tais trabalhos relatavam a utilização de dentes sob condições variadas, cariados, ou armazenados sem cuidados específicos - que permaneciam expostos à temperatura ambiente – com períodos entre extração dos elementos e a obtenção do DNA que variavam de a 4 anos (SENO & ISHIZU, 1973; WHITTAKER *et al.*, 1975; DANGE *et al.*, 1978).

Evoluindo nessa linha de pesquisa, YOKOI *et al.* (1989) analisaram amostras de manchas de sangue, tecidos ósseos e polpas dentais, para estimar a pertinência desses materiais aos seres humanos e ao seu sexo, por meio de sondas de DNA (BLUR8 e pHY10). O método de extração foi o orgânico, havendo um lapso de tempo entre a extração dental e a obtenção do DNA de 0 a 34 dias. Em todas amostras femininas a sonda pHY10 - concebida a partir do cromossomo Y - teve resultados negativos. Entretanto, a sonda de identificação humana (BLUR8) demonstrou ser 3 A 5 vezes a mais sensível.

Em estudo utilizando polpas dentárias de terceiros molares de 21 homens e 24 mulheres, PILLAY & KRAMER (1997) amplificaram as regiões ZFX e ZFY pela PCR, visualizado-as em gel de agarose 2%. A acurácia alcançada foi de 100%, demonstrando que essa metodologia de DNA é uma alternativa aos estudos antropológicos e histológicos para a determinação dos sexos.

Pesquisas apontam que uma proteína encontrada no esmalte dental e denominada amelogenina ou AMEL apresenta distinções entre os sexos quanto ao tamanho e ao padrão da seqüência de nucleotídeos. De fato, o gene que codifica a amelogenina feminina está localizado no cromossomo X, enquanto a amelogenina masculina é encontrada no cromossomo Y; as mulheres apresentam alelos homozigotos e genes idênticos, e os homens apresentam dois genes diferentes, alelos heterozigotos (SLAVKIN, 1997).

AKANE (1998) sugere que as reações voltadas à determinação do sexo utilizem simultaneamente os *primers* para ambos os sexos (duplex) pois, na hipótese de utilização exclusiva de um locus do cromossomo Y, sua não amplificação não caracteriza, obrigatoriamente, o sexo feminino. O autor menciona ainda a possibilidade de empregar a técnica de *nested* PCR quando da baixa sensibilidade de amplificação do gene da amelogenina.

Reportando a dificuldade de extrair DNA tendo como substrato somente os tecidos duros dentários, SIVAGAMI *et al.* (2000) propõem a aplicação de ultrassom aos tubos numa fase intermediária da extração orgânica. Os autores

utilizaram nitrogênio líquido para pulverizar as estruturas dentárias, obtendo sucesso no diagnóstico do sexo com o gene AMEL.

Comentando a particular resistência dos dentes quando submetidos ao fogo ou expostos ao meio ambiente, HAERTING *et al.* descrevem um ensaio com 257 dentes, de cujos doadores eram conhecidos a idade e o grupo sanguíneo. Com a utilização do método de Gustafson para estimativa da idade, obtiveram margem de erro de 4,6 anos. Já os resultados da determinação dos antígenos A, B e O foram concordantes em mais de 85% dos exames.

A influência do meio ambiente na concentração, integridade e recuperação do DNA extraído de polpas dentárias foi mensurada por SCHWARTZ *et al.* (1991). Os autores variaram o pH (3, 7 e 10), a temperatura (4°C, 25°C, 37°C e incinerando o dente), a umidade (20, 66 e 98%), as condições do solo em que foi feito o enterramento dos dentes (areia, terra de vaso, terra de jardim, submersão em água e enterrados ao relento) e os tempos de enterramento (de uma semana a seis meses). Constataram que esses fatores não são determinantes para a obtenção de DNA de alto peso molecular a partir de polpas dentárias.

Para POTSCH *et al.* (1992), a polpa dental é um dos poucos materiais orgânicos disponíveis para análise do DNA em alguns casos especiais como acidentes aéreos, corpos carbonizados ou putrefatos. Os autores estudaram uma população composta de três grupos de dentes. O primeiro grupo era formado por

30 dentes obtidos de extrações dentárias, guardados e avaliados por períodos de 6 semanas a 4 anos; um controle positivo foi realizado com gazes contendo sangue do transoperatório. No segundo grupo, 10 dentes foram extraídos de fragmentos mandibulares armazenados por 15 anos. O último grupo, de 8 dentes, foi obtido de cadáveres recentes. Em todos os casos os autores trabalharam com as polpas dentais, obtendo cotas de DNA entre 6-50ug, sendo possível, com o auxílio da PCR e das sondas VNTR, avaliar o perfil genético e o sexo dos indivíduos.

HANAOKA *et al.* (1995) avaliaram a extração de DNA em 50 dentes (polpas e tecidos duros) por lócus de VNTR. O DNA obtido das polpas dentárias variou de 3 a 40µg, e não foi encontrada correlação entre o período de estocagem dos dentes e a quantidade de DNA. Os autores investigaram a eficiência da extração de DNA a partir de tecidos duros dentais em diferentes concentrações de solução descalcificante. O DNA obtido das polpas dentárias foi de alto peso molecular, sendo susceptível às análise por sondas multilócus ou por PCR; já o material obtido dos tecidos duros dentais só apresentou análise satisfatória pela PCR.

YAMAMOTO (1996) reporta dois estudos. Um descreve a estimativa da idade por meio da análise dos aminoácidos contidos na dentina. O outro contempla a extração de DNA a partir de polpas dentárias com o auxílio de sondas específicas para o cromossomo Y, para a estimativa do sexo; ainda nesse estudo

o autor verificou a efetividade da metodologia de PCR mesmo quando da utilização de material degradado.

Confirmando essa propriedade de conservação das estruturas dentárias em relação ao DNA, DRANCOURT *et al.* (1998) demonstraram ser possível que polpas dentárias sirvam de substrato para extração e análise do DNA. E comprovam de forma irrefutável essa assertiva citando epidemias que ocorreram no passado – há cerca de 400 anos atrás - e que, até então, não contavam com a confirmação de sua história clínica.

O ponto de partida de toda análise forense do DNA é uma boa extração, pois o manejo dos dentes apresenta algumas particularidades, como descrevem SMITH *et al.* (1993). Entre outras recomendações, os autores sugerem que se radiografe todo o material previamente às análises moleculares, e que se preserve a coroa para eventual confrontação documental, propondo um corte horizontal na junção amelo-dentinária com remoção da polpa, ou mesmo o aproveitamento de todo o remanescente dental. Em estudo comparativo, constataram haver um ganho significativo na extração do DNA quando há pulverização de todo remanescente dental.

SWEET & HILDEBRAND (1998) descrevem metodologia de pulverização criogênica dos elementos dentários. Em um estudo com 20 dentes obtiveram média de 18,4µg de DNA por grama de dente seco pelo método

orgânico de extração, destacando que a pulverização diminui os riscos de contaminação.

Ressaltando a importância das informações dentais em processos de identificação, YAMAGUCHI *et al.* (1997) citam dois casos em que esses dados foram de fundamental importância. No primeiro, a solução se deu por análise radiográfica comparativa. No segundo, embora a pessoa a ser identificada possuísse trabalhos odontológicos, e portasse características passíveis de individualização, as investigações policiais não conseguiram resgatar documentalmente tais informações; nesse caso, os autores optaram por conduzir análises bioquímicas em que os dentes eram o material de estudo. Procederam à estimativa da idade e à determinação do grupo sanguíneo, mas a análise que possibilitou a identificação de maneira inconteste foi o seqüenciamento do mtDNA e seu confronto com o de supostos aparentados, sobremaneira o da mãe hipotética do indivíduo.

Em 1995, SWEET & SWEET publicaram trabalho em que relatam um caso de carbonização no qual, por meio de polpas de dentes molares inclusos, comparadas a outras evidências biológicas encontradas no local do crime, foi possível, pela análise de regiões polimórficas do DNA (VNTR), confirmar que a vítima estivera no veículo do suspeito, embasando assim a acusação.

Descrevendo uma identificação por meio de comparação de STR de dentes e esfregaços de exame de Papanicolau, SWEET *et al.* (1999) comentam

que, apesar de os dentes apresentarem trabalhos odontológicos representativos, não havia documentação para confronto. Assim, dois dentes foram selecionados e pulverizados pelo método criogênico, sendo o DNA extraído pelo método orgânico. Muitos laboratórios citológicos armazenam as lâminas de diagnóstico de seus pacientes e, assim, o exame de Papanicolau apresenta-se como uma opção quando da impossibilidade de utilizar os registros médicos e odontológicos tradicionais.

Até aqui demos destaque aos trabalhos que se utilizaram de sondas ou de STR para análise do DNA dental, ou seja, descrevemos trabalhos que empregaram DNA genômico. Mas o mtDNA apresenta-se como outra efetiva opção de análise. O mtDNA é de origem extracelular, e possui milhares de cópias em uma única célula; é uma herança materna, recebemos esse material genético de nossas mães, o que faz com que tenhamos identidade com nossos irmãos e parentes ligados pela linhagem materna. O mtDNA é circular e tem grande resistência à digestão enzimática; já foi totalmente seqüenciado e sua região hipervariável está determinada. Outra característica relevante é a sua propriedade monoclonal, ou seja, todo o mtDNA do indivíduo apresenta a mesma seqüência (JOBIM *et al.*, 1999).

GINTHER *et al.* (1992) avaliaram o mtDNA extraído de dentes pelo método orgânico e seu posterior seqüenciamento. Confirmaram sua aplicabilidade em casuísticas como aquela descrita por YAMADA *et al.* (1997), que relatam um caso de carbonização em que o mtDNA foi extraído pelo método Chelex®, ou

aquela relatada por BOLES *et al.* (1995), que realizaram identificação pelo seqüenciamento do mtDNA a partir de elementos dentários de 12 esqueletos.

Além das polpas e demais estruturas dentárias, a saliva também serve de substrato biológico à obtenção do DNA. Essa utilização ocorre em virtude dos avanços tecnológicos, que permitem que os limites de detecção do DNA sejam diminuídos permanentemente. Por outro lado, cada vez mais a saliva torna-se material eletivo nas extrações de DNA em casos de investigação de paternidade e criminais. Se compararmos o método de punção sangüínea ao de coleta de saliva com a ajuda de um algodão estéril, constataremos as vantagens que o segundo traz aos examinandos: é um método não invasivo, indolor, não traumático, de fácil colaboração por parte das crianças, além de evitar-se os riscos de possíveis contaminações que podem ocorrer com o sangue. No aspecto criminal, rotineiramente se obtêm evidências contendo saliva: mordanças, manchas em roupa, marcas de mordida na pele, selos etc. (NICOLÁS & CANELA, 1999).

Para avaliar a fidedignidade da extração de DNA de diferentes materiais biológicos, WALSH *et al.* (1992) coletaram saliva total, manchas salivares e sangue dos mesmos indivíduos; o confronto dos resultados comprovou que a saliva humana é um material adequado às análises forenses. Nesse estudo os autores sugerem o seguinte modelo de extração para saliva: centrifugação do material coletado por 1 minuto, suspensão do *pellet* em tampão de lise conjuntamente com proteinase K, incubação *overnight* a 56°C, finalizando a extração com fenol/clorofórmio (método orgânico).

SWEET *et al.* (1996) utilizaram método diverso, o Chelex®, com o mesmo intuito. Obtiveram DNA salivar a partir de simulações de marcas de mordida em pele humana; o DNA foi avaliado por dois loci de STR.

Outro aspecto a ser considerado na obtenção do DNA de manchas orgânicas diz respeito às influências do meio ambiente e do suporte em que se encontram (McNALLY *et al.*, 1989). Tanto que a equipe de DNA do Instituto de Criminalística da Polícia Civil do Estado de São Paulo, por meio da Resolução SSP-194, de 2 de junho de 1999 (São Paulo, 1999), apresenta-nos parâmetros de conduta para a coleta, o acondicionamento, a preservação e o encaminhamento de material biológico para identificação humana, incluindo o manejo de dentes e saliva. Alguns itens merecem destaque, assim transcrevemos os seguintes trechos da citada resolução:

Art. 3 § 1 Ficam impedidos de proceder às análises de laboratório os Peritos que efetuaram a coleta de material em local.

...

Art. 4 § 1 Não havendo condições imediatas de confronto pela ausência de material padrão para comparação, mas sendo o caso de interesse judiciário para futura identificação, as amostras que, após análise por Perito especialista em identificação humana, revelarem-se adequadas, serão devidamente selecionadas, etiquetadas e preservadas, pelo prazo de 90 (noventa) dias, para futuro exame.

Art.5º. é competência exclusiva de médico legista a coleta de material biológico para fins de identificação de pessoas vivas ou cadáveres, nos termos desta Portaria.

As demais recomendações versam sobre a coleta e o manuseio usuais, e buscam minimizar as possibilidades de contaminação e degradação das amostras por meio do emprego de barreiras físicas, da utilização de material

estéril e/ou descartável, do acondicionamento em locais apropriados, da secagem de amostras úmidas, da limpeza dos ossos e dos dentes, da coleta em duplicata para contraprova etc.

Como vimos, os avanços científicos apresentados pela biologia molecular a partir da década de 80 contaram, em alguns momentos de seu transcurso, com a colaboração da odontologia legal para o estabelecimento de novos modelos à prática da identificação humana, seja no estabelecimento de diferentes formas de extração do DNA a partir de dentes (polpa dentária e tecidos duros) ou de saliva, seja compondo equipes multiprofissionais de trabalho ou ainda na formulação de problemas comuns concernentes à identificação humana.

3. Proposição

São objetivos do presente trabalho:

1. Estabelecer formas de coleta, armazenamento e preparo dos materiais biológicos sangue, saliva e dentes para as extrações de DNA.
2. Otimizar a extração de DNA em amostras de dentes.
3. Otimizar a extração de DNA em amostras de saliva.
4. Otimizar a PCR utilizando os *primers* para os loci DYS390, DYS391 e DYS393.
5. Avaliar, em uma amostra de 100 indivíduos brasileiros, a frequência alélica nos loci DYS390, DYS391 e DYS393.
6. Avaliar a independência dos materiais biológicos a serem empregados em análises forenses.

4. Material e Métodos

4.1 CASUÍSTICA

Foi analisado um total de 110 indivíduos subdivididos em três grupos. O GRUPO 1 era composto por 100 indivíduos do sexo masculino, não relacionados, com idades variando de 01 a 82 anos; as amostras de sangue total (ANEXO 2) foram colhidas em colaboração com o Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O GRUPO 2 era constituído por 05 indivíduos do sexo masculino, também não relacionados, e de idades variadas; de cada um deles foram obtidas duas amostras: saliva e dentes (ANEXO 3); esse material foi colhido junto à Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia da Universidade de São Paulo (FUNDECTO). O GRUPO 3 era formado por 05 voluntárias (ANEXO 4), das quais foram obtidas amostras de saliva total. Em todas as situações houve a concordância dos integrantes após anuência aos termos de consentimento (ANEXOS 5 e 6).

4.2 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

A infra-estrutura física utilizada não faz parte de um único laboratório, mas constitui-se em um conjunto de alguns dos recursos de que dispõem três laboratórios que, de forma prestimosa, viabilizaram a presente pesquisa. São eles: o Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP); o Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFUSP); Laboratório de Biologia Molecular do Curso de Pós Graduação em Ciências, Área de Odontologia Legal e Deontologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas FOP/UNICAMP.

Da gama de recursos disponíveis nesses laboratórios utilizamos: micropipetas da Gilson®; equipamento agitador de tubos; aparelho para “banho-maria”; microcentrífugas de modelos variados; espectrofotômetro; termocicladores da MJ Research® modelo PTC 100; fontes de energia para eletroforese; sistemas de eletroforese horizontal para gel de agarose; sistema vertical para gel de poliacrilamida da Gibco-BRL®; e seqüenciador de DNA automático ALFexpress® da Amersham Pharmacia Biotech, com utilização dos programas de corrida de gel “ALFwin Instrument Control Version 2.00 15” e de interpretação desses resultados “Allele Locator”, ambos da própria Amersham Pharmacia Biotech®. Aparelho

transluminador e sistema fotográfico modelo DS 34 da Polaroid®. Os materiais descartáveis empregados foram: tubos de microcentrífuga de 1,5; 0,5; 0,2ml e ponteiros de 0,5 a 10µl; 10 a 200µl e 100 a 1.000µl; papel especial “Kimwipes EX-L® – Delicate Task Wipers”, para secagem das placas de corrida do gel.

Já o suporte econômico para a aquisição dos reagentes necessários proveio de nosso Departamento de origem, Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e novamente do Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Os reagentes tiveram procedência variada: a Taq DNA polimerase e os dNPTs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) foram adquiridos tanto da Unisciense® do Brasil quanto da Gibco BRL® Life Technologies. Também da Gibco BRL® Life Technologies foram adquiridos: proteinase K (20mg/ml) Lot. MAV403; fenol; BE, brometo de Etídio Lot. KH6901; tampão para PCR e MgCl₂ 50 mM. Da SIGMA® obtivemos Tris ultra puro (Trizma®) Lot.87H5411; EDTA Lot. 28H008115; cloreto de sódio Lot. 28H0088; lauril-sulfato de sódio Lot. 87H0671; acetato de sódio Lot. 87H0105; sílica S-5631 Lot. 58H0154 e triton X-100. O clorofórmio P.A. foi obtido da Dinâmica Lot. 2676. O álcool isoamílico e o tiocianato de guanidina, Lot. 1398A43 da Amresco®. A agarose, Seakem, GTG, procedente da FMC Bio Products®, Lot. AG0468 e o tampão tris-EDTA-acetato, da Boehringer Mannheim

Corp.® Lot. 1666690. O DEXTRAN azul 2000® foi adquirido da Amersham Pharmacia Biotech®.

As regiões hipervariáveis selecionadas foram 3 STR do cromossomo Y: DYS390 (região de amplificação 191–227 bp), DYS391 (região de amplificação 271-299 bp) e DYS393 (região de amplificação 108-136 bp), sendo os *primers* sintetizados pela Synthegen, Houston, Texas (www.synthegen.com) segundo parâmetros encontrados na literatura. Em cada par de “*primers*”, uma foi marcada com fluorescência (Cy5) para possibilitar o processo de leitura da corrida do gel pelo equipamento de seqüenciamento automático com leitura do laser (ALFexpress® da Amersham Pharmacia Biotech).

DYS390 A

Seqüência: 5' 1TA TAT TTT ACA CAT TTT TGG GCC 3'

(modificada pelo componente Cy5, n° Catalogo 1402 – Anexo 7)

DYS390 B

Seqüência: 5' TGACAG TAA AAT GAA CAC ATT GC 3'

DYS391 A

Seqüência: 5' 1CT ATT CAT TCA ATC ATA CAC CCA 3'

(modificada pelo componente Cy5, n° Catalogo 1402 - Anexo 7)

DYS391 B

Seqüência: 5' GAT TCT TTG TGG TGG GTC TG 3'

DYS393 A

Seqüência: 5' 1GT GGT CTT CTA CTT GTG TCA ATA C 3'

(modificada pelo componente Cy5, n° Catalogo 1402 - Anexo 7)

DYS393 B

Seqüência: 5' AAC TCA AGT CCA AAA AAT GAG G 3'

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS:

As amostras do GRUPO 1 foram colhidas em tubos contendo EDTA como anticoagulante e, incontinenti, foi iniciado o processo de extração do DNA. No GRUPO 2, a saliva e os dentes ficaram armazenados em frascos plásticos estéreis sob temperatura de -20°C ; as amostras de saliva foram colhidas com gases estéreis antes do ato cirúrgico. As amostras do GRUPO 3 foram colhidas junto às voluntárias e armazenadas em frascos plásticos estéreis, permanecendo também em freezer à temperatura de -20°C .

4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DO DNA

Como as amostras de sangue foram utilizadas de maneira imediata, não necessitaram de cuidados prévios especiais.

Já com relação às amostras de saliva (femininas e masculinas), tivemos o cuidado de armazená-las sob temperatura de -20°C até serem processadas as extrações do DNA, momento em que foram removidas do freezer e deixadas à temperatura ambiente até seu descongelamento. A seguir - nas amostras do sexo

feminino (GRUPO 3) -, foi transferido 1ml de material para tubos eppendorf e – nas amostras do sexo do GRUPO 2 -, cortou-se um pequeno pedaço da gaze embebida de saliva, dando-se início ao processo de obtenção do DNA.

Os dentes, previamente ao seu armazenamento no freezer, foram submetidos a um processo de limpeza físico-química, raspagem com curetas periodontais e lavagens com álcool 70% e hipoclorito de sódio. Posteriormente, os elementos foram pulverizados segundo o método de SWEET & HILDEBRAND (1998), adaptado com uso de um gral e pistilo de porcelana e estocagens manuais. Para total pulverização dos dentes foram necessárias de 3 a 4 imersões em nitrogênio líquido mantendo as batidas do pistilo constantes, o rendimento médio alcançado foi de 1,0g de pó por dente pulverizado; nas extrações foi empregado 0,25g desse material pulverizado.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES MATERIAIS BIOLÓGICOS

Para as amostras de sangue, o protocolo utilizado foi o do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico, do Curso de Pós-graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, descrito por SALAZAR *et al.* (1998) (ANEXO 8). Para

a saliva, utilizamos o método orgânico descrito por HOCHMEISTER *et al.* (1998) que, após ensaios, sofreu algumas alterações (ANEXO 9). Para os dentes empregamos o protocolo de BOOM *et al.* (1990) adaptado por MELTON (2000) (ANEXO 10).

4.6 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

A otimização definida para as reações de PCR foi estabelecida para os *primers* selecionados. Esses *primers* foram diluídos para uso na proporção de 1,0 μ l de *primer* para 100 μ l de água. A solução de magnésio foi utilizada a 25mM e o mix de dNTP a 10mM de cada nucleotídeo; o volume final de todas as reações foi de 25,0 μ l. A ciclagem foi a mesma para os três *primers* utilizados no estudo das frequências alélicas.

Tabela 4 – Tipos e quantidades de reagentes utilizados na PCR

Reagentes	Quantidade
H ₂ O	15,5µl
Tampão	2,5µl
DNTP	1,0µl
MgCl ₂	1,0µl
Primer 1	1,0µl
Primer 2	1,0µl
Taq	1,0µl
DNA	2,0µl
Volume final	25,0µl

Tabela 5: Ciclagem padrão utilizada nas PCRs dos *primers* marcados

Programa	
Hot-start	98° 3'
Denaturação	94° 1'
Anelamento	56° 1'
Extensão	72° 2'
Extensão final	72° 10'
Resfriamento	4° oo
	35 ciclos

4.7 CONFEÇÃO E ANÁLISE DOS GÉIS

Uma vez realizada a amplificação do DNA seu produto apresenta-se em quantidade relativamente grande, e a leitura pode ser feita por processo de eletroforese em géis de agarose de concentração variada (ANEXO 11), ou em géis de poliacrilamida, que podem ser corados com prata (ANEXOS 12 e 13), existindo também a possibilidade do uso de *primers* marcados; nestes casos, o gel de poliacrilamida deverá ser interpretado em equipamentos específicos, como o ALF-Express da Pharmacia® (ALF = *Automatic Laser Fluorescent*) (ANEXO 14).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a determinação do tamanho molecular dos fragmentos observados utilizamos os programas do sistema ALFexpress®: o de corrida de gel “ALFwin Instrument Control Version 2.00”, e o de interpretação desses resultados “Allele Locator”, ambos da própria Amersham Pharmacia Biotech®. Foi utilizado como padrão de comparação o marcador de tamanho molecular de DNA de 50bp (0-500).

O poder de exclusão individual de cada locus, e o poder de exclusão dos três STRs combinados foram calculados segundo parâmetros de GRAW & SEITZ (2000) e HIRATA (2000).

5 Resultados

A avaliação eletroforética dos produtos de amplificação do locus DYS390 em 100 indivíduos brasileiros leucodérmicos do sexo masculino, não relacionados é apresentada no GRÁFICO 1. Resultados individuais podem ser observados nos QUADROS 2, 3 e 4 constantes nos ANEXOS 15, 16 e 17 respectivamente.

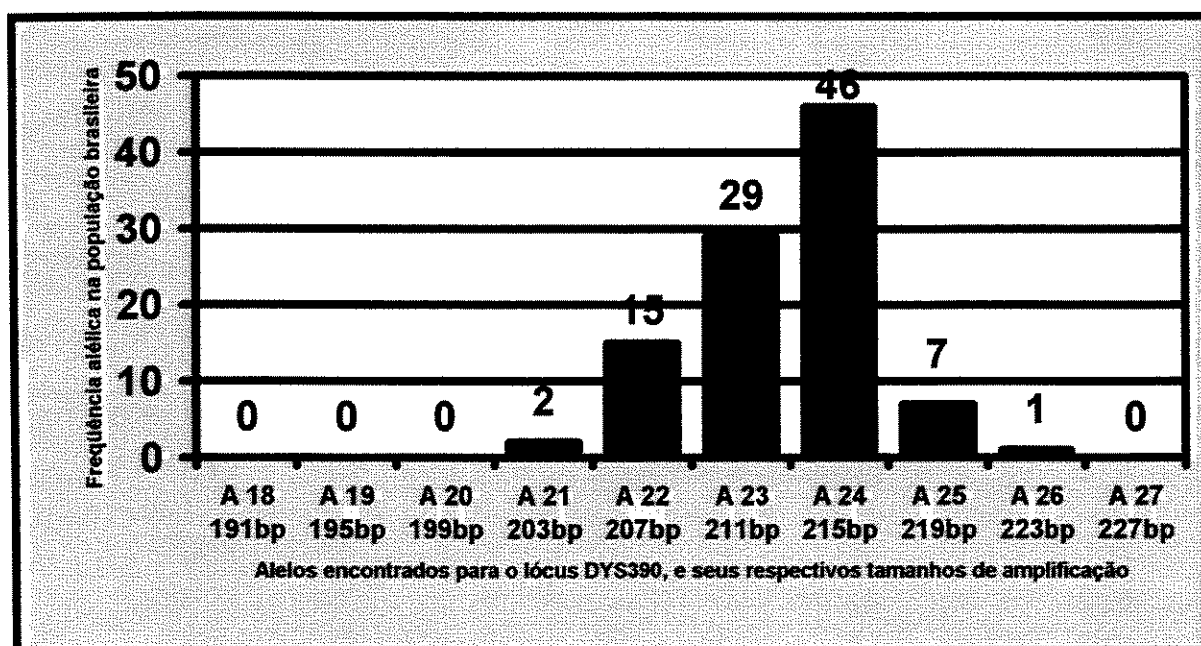


GRÁFICO 1 - Distribuição de frequência dos alelos do locus DYS390 em 100 indivíduos brasileiros leucodérmicos do sexo masculinos, não relacionados.

Notas:

1. A identificação dos alelos segue a nomenclatura proposta em ["Links" com informações sobre os locus de STRs] da Universidade de Lieden, adaptada do trabalho de KNIJFF *et al.* (1997).
2. O tamanho do fragmento amplificado foi determinado pelo programa "Allele Locator", tendo também como parâmetro o marcador de tamanho molecular de DNA de 50bp.
3. O número de alelos observados corresponde à suas porcentagem, pois a amostragem foi de 100 indivíduos.

A avaliação eletroforética dos produtos de amplificação do locus DYS391 em 100 indivíduos brasileiros leucodérmicos do sexo masculino não relacionados é apresentada no GRÁFICO 2. Resultados individuais podem ser observados nos QUADROS 5, 6 e 7 constantes nos ANEXOS 18, 19 e 20 respectivamente.

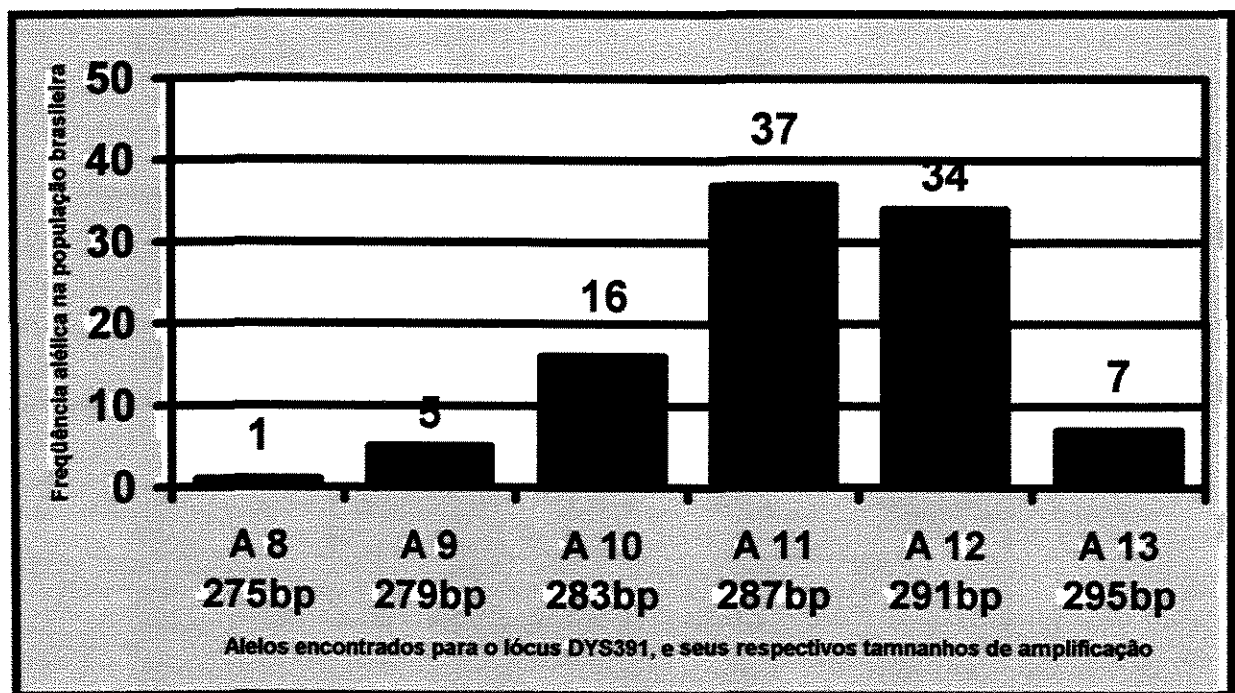


GRÁFICO 2 - Distribuição de frequência dos alelos do locus DYS391 em 100 indivíduos brasileiros leucodérmicos do sexo masculino, não relacionados.

Notas:

1. A identificação dos alelos segue a nomenclatura proposta em ["Links" com informações sobre os loci de STRs] da Universidade de Lieden, adaptada do trabalho de KNIJFF *et al.* (1997).
2. O tamanho do fragmento amplificado foi determinado pelo programa "Allele Locator", tendo também como parâmetro o marcador de tamanho molecular de DNA de 50bp.
3. O número de alelos observados corresponde à sua porcentagem, pois a amostragem foi de 100 indivíduos.

Já a avaliação eletroforética dos produtos de amplificação do locus DYS393 em 100 indivíduos brasileiros leucodérmicos do sexo masculino, não relacionados é apresentada no GRÁFICO 3. Resultados individuais podem ser observados nos QUADROS 8, 9 e 10 constantes nos ANEXOS 21, 22 e 23 respectivamente.

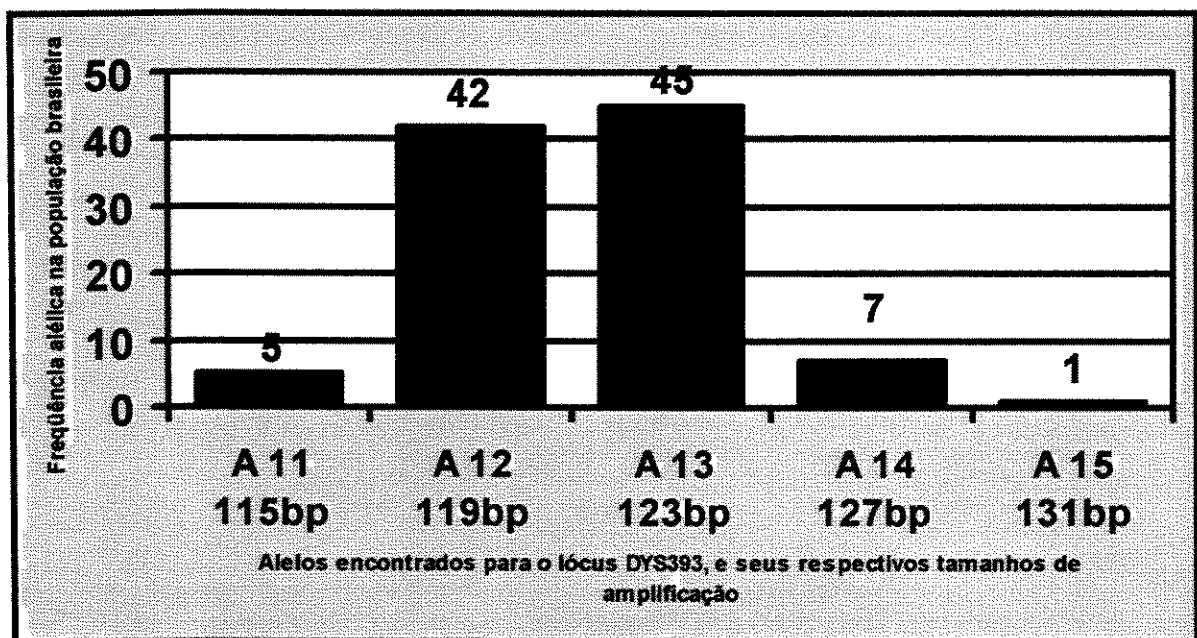


GRÁFICO 3 - Distribuição de frequência dos alelos do loco DYS393 em 100 indivíduos brasileiros leucodérmicos do sexo masculino, não relacionados.

Notas:

1. A identificação dos alelos segue a nomenclatura proposta em ["Links" com informações sobre os locus de STRs] da Universidade de Lieden, adaptada do trabalho de KNIJFF *et al.* (1997).
2. O tamanho do fragmento amplificado foi determinado pelo programa "Allele Locator", tendo também como parâmetro o marcador de tamanho molecular de DNA de 50bp.
3. O número de alelos observados corresponde à suas porcentagem, pois a amostragem foi de 100 indivíduos.

O poder de exclusão individual obtido foi de 0,6764 para o locus DYS390; de 0,5988 para o locus DYS391, e de 0,6136 par o locus DYS393. O poder de exclusão (PE) combinado obtido foi de 0,9498.

Na TABELA 6 apresentamos os resultados das análises conjuntas dos fragmentos amplificados do locus DYS393. Note-se que no GRUPO 2 – formado por 05 indivíduos do sexo masculino analisados a partir de dois materiais biológicos diferentes (saliva e dente) -, os alelos amplificados foram concordantes, independentemente do substrato orgânico utilizado. Maiores detalhes poderão ser observados no QUADRO 11 do ANEXO 24.

TABELA 6 - Resultado da análise conjunta dos fragmentos amplificados do locus DYS393 utilizando-se DNAs de dente e saliva de mesmos indivíduos.

Alelos	115	119	123	127	131
Amostra					
S1					X
D1					X
S2		X			
D2		X			
S3				X	
D3				X	
S4				X	
D4				X	
S5		X			
D5		X			

O GRUPO 3, como esperado, não apresentou qualquer amplificação.

6 Discussão

A população estudada no presente trabalho era constituída de 105 indivíduos do sexo masculino, não relacionados, com idades variando de 01 a 82 anos (GRUPOS 1 e 2), e de 05 pessoas do sexo feminino (GRUPO 3), também não relacionadas e com idades variando entre 18 e 25 anos. Os três grupos eram formados por indivíduos leucodérmicos, classificados a partir da observação de suas características fenotípicas e do relato dos próprios participantes quanto à sua ascendência. A eleição de uma amostra populacional de características étnicas semelhantes prendeu-se a dois fatores: as vantagens de se trabalhar com grupos fechados, e os relatos sobre a existência de discrepâncias na frequência alélica entre diferentes grupos étnicos (PASTORE *et al.*, 1996; MOURA-NETO & BUDOWLE, 1997).

Entretanto, a determinação do grupo étnico da amostra a ser estudada pode estar sujeita a erros inerentes ao sistema de escolha por questionários, e pela leitura que o observador faz, a partir de imagens preconcebidas (CAMPO-FLORES *et al.*, 2000). PENA *et al.* (2000) ressaltam, ainda, que como nós, brasileiros, somos fruto de uma complexa miscigenação, também é complexo proceder a um enquadramento étnico populacional.

Assim, acreditamos que outras investigações – que busquem verificar as frequências alélicas dos demais grupos étnicos de brasileiros ainda não estudados (negros, orientais e indígenas) - devem ser futuramente implementadas. Após esses estudos, e se os resultados encontrados não forem discrepantes entre si, talvez possamos - nos casos de identificação forense que não nos permitam precisar a origem étnica do examinando - levar em consideração a população brasileira como um todo, e não fragmentada em classificações de grupos étnicos, raças ou cor da pele, posto que semelhanças fenotípicas (como a cor da pele) podem apresentar genótipos distintos (HARTL & CLARK, 1997). Dessa forma estabeleceríamos referenciais gerais, caracterizando a nossa etnia de maneira ampla, como um grupo populacional que possui características físicas e culturais comuns, em maior consonância com a prática pericial.

Embasando esse posicionamento, JUNGE & MADEA (1999) analisaram 5 STR do cromossomo Y, e comprovaram não haver diferenças significativas em diferentes populações européias. HIDDING & SCHMITT (2000) também comprovaram que a população alemã não apresentava diferenças significativas em relação à maioria das populações européias. Até mesmos os *sites* que disponibilizam dados sobre STR Y fazem-no na forma de diferentes populações, e não de diferentes grupos étnicos. E essas foram as informações que utilizamos para confrontar com a nossa amostra, que é representativa da população brasileira.

Utilizamos um grupo controle negativo, composto por mulheres (GRUPO 3), para constatar reação ou não do DNA extraído desses indivíduos para as STR utilizadas, pois sendo essas STR obtidas a partir do cromossomo Y, teoricamente só apresentariam amplificação de DNA pela PCR os indivíduos do sexo masculino. Contudo, GUSMÃO *et al.* (1999) postulam que, que em condições de baixa estrigência, existe a possibilidade de que indivíduos do sexo feminino apresentem amplificação para os microssatélites do cromossomo Y. Na presente casuística não foi constatada qualquer reação positiva para os 3 locos analisados, apontando para uma otimização adequada da PCR.

Ao final do tópico **STRs E ESTUDOS POPULACIONAIS**, da Revista da Literatura, citamos estudos que enfatizam a fundamental importância que a verificação dos padrões alélicos nas diferentes populações tem, quando do emprego dos recursos das análises de DNA para o estabelecimento da identidade, posto que existem variações tanto étnicas quanto populacionais (PASTORE *et al.*, 1996; KNIJFF *et al.*, 1997; GONZALEZ-NEIRA *et al.*, 2000; UNIVERSIDADE DE LEIDEN, 2000). Assim, a simples utilização de *kits* de identificação, como o GenePrint® da Promega® - desenvolvido com base em pesquisas realizadas com a população norte-americana -, pode levar a incorreções nas estimativas quando de sua aplicação a outras populações.

Os inúmeros estudos populacionais de frequências alélicas fornecem dados que subsidiam a identificação humana, mas investigações voltadas especificamente à população brasileira ainda são recentes (MOURA-NETO &

BUDOWLE, 1997; PENA, 1999; OZAKI, 1999). Desta forma, quanto mais loci forem observados na população brasileira, maiores recursos teremos à disposição para nossas análises, até porque o número de loci mínimos exigidos para excluir uma paternidade ou estabelecer uma identificação tem tido um crescimento em seus padrões. Cabe lembrar que os dados do presente estudo, frequência alélica das STR DYS390, DYS391 e DYS393 ainda são inéditos no Brasil

Estabelecendo um paralelo com os estudos antropológicos de identificação humana (estimativa do sexo, idade, estatura cor da pele etc.), os estudos populacionais de frequências alélicas apresentam a mesma importância e objetivos dos trabalhos antropométricos, que verificaram os métodos desenvolvidos em amostras de populações diversas da brasileira buscando estabelecer comparações e definir padrões a partir de amostragens nacionais. Isto porque, em ambas as situações, é temerária a incorporação incondicional de metodologias sem a avaliação das possíveis discrepâncias étnicas e populacionais.

É incontestável a importância do domínio das técnicas de extração de DNA de dentes e saliva para a odontologia legal. Essa importância consubstancia-se nos casos mais críticos de identificação humana, como aqueles em que os tecidos orgânicos já se apresentam degradados devido às causas da morte (carbonização), ao tempo transcorrido após o óbito ou à influência de fatores exógenos (SCHWARTZ *et al.*, 1991; POTTSCH *et al.*, 1992; DRANCOURT *et al.*, 1998). Outra situação não menos problemática, e na qual o odontologista também

pode colaborar é aquela que apresenta evidências que envolvam manchas de saliva, principalmente em decorrência de lesões causadas por marcas de mordida (NICOLAS & CANELA, 1999).

No presente estudo, o DNA foi analisado a partir de 3 materiais biológicos diferentes (sangue, saliva e dentes), e para cada um deles empregamos técnicas distintas, como recomenda a literatura (SALAZAR *et al.*, 1998; HOCHMEISTER *et al.*, 1998; BOOM *et al.*, 1990; MELTON, 2000). Pois, como ALVES (2000) demonstrou, a efetividade de métodos de extração de DNA varia em função do material analisado. No mencionado estudo, o autor avaliou, em tecido ósseo (carbonizados e esqueletizados), os métodos orgânico, DNAzol® e Chelex 100®, utilizando oito STR; os melhores resultados foram apresentados pelo método orgânico.

Diferentemente das extrações de DNA de sangue, cujos protocolos já tinham uma rotina de utilização - e portanto não apresentavam dificuldades de obtenção - SALAZAR *et al.* (1998), as extrações de DNA a partir de saliva e de dentes necessitaram de vários ensaios até a obtenção de protocolos adequados.

A metodologia proposta por HOCHMEISTER *et al.* (1998) para a obtenção de DNA de saliva é bastante versátil, tendo sido empregada tanto para saliva total como para *swab* de algodão e gaze. No entanto, em um estudo realizado com marcas de mordida, houve a necessidade de implementar pequenas adaptações para a otimização da técnica.

Já a obtenção de DNA de dentes foi a mais trabalhosa: num primeiro momento procuramos seguir a metodologia empregada para saliva (método orgânico) que, contudo, não apresentou resultados satisfatórios. Assim é que somente após emprego do protocolo de extração de DNA para ossos e dentes proposto por MELTON (2000) o objetivo foi atingido.

Apesar de ser possível quantificar o DNA extraído (OZAKI, 1999), tal procedimento não é imprescindível para as análises forenses, sendo inclusive considerado desnecessário por alguns devido porque a prática forense usualmente trabalha com ínfimas quantidades de material e, por conseguinte, o DNA obtido nas extrações é precioso demais para ser utilizado numa etapa de checagem intermediária. Além disso, devido às variações intrínsecas dos métodos, pode existir a necessidade de repetições das PCRs, das análises eletroforéticas e, eventualmente - se houver disponibilidade de material -, das próprias extrações. No nosso caso, em algumas amostras (ANEXOS 25 e 26), realizamos novas análises eletroforéticas. Assim, da disponibilidade desse recurso, optamos por não empregá-lo.

Concomitantemente ao aprendizado das técnicas de extração, implementamos os testes de otimização das PCRs. Inicialmente os produtos foram analisados em géis de agarose; posteriormente, as análises passaram a ser feitas em géis de poliacrilamida a 8%, corados com prata. O emprego dessas metodologias (PCR e análises de géis) teve como objetivo o treinamento com os equipamentos e seus protocolos - similares àqueles usados no sistema

ALFexpress®, sistema utilizado na resolução de nosso objetivo precípua, qual seja, constatar a frequência alélica de 3 STR do cromossomo Y em indivíduos brasileiros.

O DNA utilizado nos ajustes dos *primers* teve procedência tanto sangüínea como salivar. Com a otimização dos procedimentos com *primers* marcados com fluorescência (DYS390, DYS391 e DYS393), passamos efetivamente à verificação de suas frequências na população brasileira estudada. É relevante destacar que a otimização obtida na PCR possibilitou, para essas STR, as mesmas concentrações de reagentes e a mesma ciclagem para reação da PCR.

Um outro aspecto interessante está evidenciado nos gráficos 1, 2 e 3, nos quais se verifica que os loci estudados apresentam regiões de amplificações distintas: o DYS393, de 115 a 131bp; o DYS390, de 191 a 227bp e o DYS391, de 275 a 295bp, com potencial de desenvolvimento de um sistema multiplex (triplex), como sugerem os trabalhos desenvolvidos por CLAYTON., 1995; PENA, 1999 e GUSMÃO *et al.*, (1999), este último já otimizando um pentaplex só com loci do cromossomo Y.

Como o cromossomo Y não tem cromossomo homólogo - sendo portanto todos homozigoto -, cada indivíduo apresentou apenas um alelo por STR estudada (ANEXOS de 15 a 26). Há que se considerar ainda a herança

haplotípica, pela qual o indivíduo herda em bloco diferentes alelos de STR do mesmo cromossomo (JOBIM *et al.*, 1999).

As representações tabulares da avaliação eletroforética feita pelo programa Allele Locator® para o locus DYS390 (ANEXOS 15, 16 e 17 – QUADROS 2, 3 e 4) apresentaram fragmentos de DNA que representam os alelos de tamanhos variando entre 202,3 e 223,7bp. Como o programa possibilita realizar correções para uniformizar a leitura dos alelos com base na migração dos DNAs que são simultaneamente utilizados como referência, tais dados de nomenclatura dos alelos são previamente definidos. Adotamos os dados apresentados nos *sites* da Universidade de Leiden e no *Y-STR Single Locus Information*, além do trabalho de KNIJFF *et al.* (1997). Numa primeira análise, 15 das 100 amostras não apresentaram amplificação constatável ou apresentaram amplificações inespecíficas, problema que foi solucionado após novas análises.

Apesar de haver estudos descrevendo presença de 10 alelos diferentes para o locus DYS 390 (TABELA 1), no presente trabalho, assim como nos relatos de JUNGE & MADEA (1999) sobre a população indiana, esse locus apresentou apenas 6 alelos - alelos 21, 22, 23, 24, 25 e 26 - (GRÁFICO 1). Ainda, na população por nós estudada, o alelo 24 foi o de maior frequência, como ocorre em europeus, ameríndios e povos do ártico.

A comparação de nossos resultados (GRÁFICO 1) com aqueles de outras populações (TABELA 1) demonstra haver, para a STR DYS390, similitude da freqüência alélica entre a população brasileira e européia

Já os QUADROS 5, 6 e 7 – ANEXOS18, 19 e 20 apresentam representações tabulares da avaliação eletroforética dos produtos amplificados do locus DYS391. O tamanho dos fragmentos que identificam os alelos variou entre 276,2 e 295,7bp. Os parâmetros adotados também foram encontrados nos *sites* anteriormente citados. Os estudos mencionados nesses *sites* - com 9 diferentes populações - reportam a possibilidade da presença de 6 alelos para esse locus (alelos 8, 9, 10, 11, 12 e 13), o que está em consonância com os resultados por nós encontrados (TABELA 2 e GRÁFICO 2). Entretanto, em nenhum dos outros estudos populacionais houve a presença simultânea de todos os 6 alelos previstos. Também esse locus, em uma primeira análise, apresentou problemas de amplificação em sete das 100 amostras, o que foi sanado em novas análises.

Outra informação relevante é que, nas 9 populações constantes da TABELA 2, o alelo mais freqüente foi o alelo 10 e, na amostra de brasileiros por nós estudada, a maior freqüência foi do alelo 11, o que pode ser um indicativo da distinção populacional.

Ainda numa análise comparativa, notamos a unicidade da freqüência encontrada, ou seja, não encontramos afinidade entre a freqüência alélica do locus DYS391 da população brasileira e aquela das demais populações. Como

exemplo podemos citar o segundo alelo mais freqüentemente encontrado na amostra de brasileiros - alelo 12, com 34% -, que, nas populações de europeus e ameríndios teve freqüência de apenas 2%, em africanos apresentou freqüência de 3,2% e esteve ausente em outras cinco populações.

Os QUADROS 8, 9 e 10 – ANEXOS 21, 22 e 23 representam, de forma tabular, a corrida eletroforética dos produtos amplificados do locus DYS393. O tamanho dos fragmentos que identificam os alelos variou entre 116,3 e 129,3bp, e o programa Allele Locator® permite correções para padronização da leitura dos alelos. Os parâmetros utilizados foram os mesmos adotados nas STRs anteriores. Apenas cinco, das 100 amostras estudadas, inicialmente não apresentaram amplificação ou tiveram produtos inespecíficos, mas tais problemas foram posteriormente resolvidos com novas análises.

JUNGE & MADEA (1999) encontraram 6 alelos para essa STR (alelos 11, 12, 13, 14, 15 e 16). Todavia, estudos com 9 populações distintas, bem como os nossos achados, indicaram apenas 5 alelos; não constatamos o alelo 16 (TABELA 3 e GRÁFICO 3). A presença simultânea dos 5 alelos nas amostras só esteve presente nas populações do Sudeste da Ásia (amostra de 56 indivíduos), em europeus (amostra de 608 indivíduos) e nos brasileiros (amostra de 100 indivíduos) por nós avaliados.

Sessenta por cento de 10 populações observadas, incluindo a de brasileiros, apresentaram maior freqüência do alelo 13, contudo, mais uma vez,

não encontramos semelhanças suficientes que indicassem a desnecessidade de verificar, previamente à aplicação forense, a frequência alélica dos loci a serem empregados.

Essas informações, específicas da população de indivíduos brasileiros, são importantíssimas para a validação dos métodos que empregam análises de STRs em processos de identificação. Tomemos como exemplo a STR do locus DYS390 que, em nossa amostra apresentou frequências de 2% e 1% para os alelos 21 e 25, respectivamente, e de 29% e 46% para os alelos 23 e 24. Em um caso de identificação, a constatação da presença dos alelos 21 ou 25 é mais significativa pois, teoricamente, haverá maior probabilidade de que, ao acaso, encontremos indivíduos que possuam os alelos 23 ou 24 do que indivíduos que apresentem os alelos 21 ou 25. Obviamente, a identificação não se faz a partir da análise de uma única STR, mas sim da somatória de várias STRs; atualmente empregam 16 ou mais STRs.

O PE individual por nós encontrado para o locus DYS390 foi de 0,6764; para o locus DYS391 de 0,5988; e para o locus DYS393 de 0,6136. Esses resultados mostraram maior diversidade genética do que aquela relatada em *Y-STR SINGLE LOCUS INFORMATION* (2000), que apresenta 0,61, 0,49 e 0,34 para os loci DYS390, DYS391 e DYS393, respectivamente. O PE combinado das três STRs estudadas foi de 95%, o que não nos possibilita uma identificação irrefutável - até porque não era esse o nosso objetivo precípuo -, mas sugere fortes indícios de individualização. Essa constatação pode ser somada aos

achados de OZAKI (1999), que estudou outras STRs verificando as frequências alélicas para a população brasileira.

A análise acima diz respeito aos resultados intra-amostra mas, se estendermos essa comparação a outras população, ainda assim constataremos a relevância desse estudo. Mantendo os olhos no locus DYS390, o alelo de maior frequência para a população brasileira foi o 24, com 46%; já para a população de africanos o alelo mais frequente foi o 21, com 53,1% - que, nos brasileiros, mostrou frequência de 2%. Ainda, a população do Pacífico teve o alelo 20 como o de maior frequência em 50% da amostra, alelo este que não foi sequer diagnosticado em nossa amostra.

Com base nas informações até aqui relatadas, cremos agora não ser apenas um indicativo - como falamos no início deste capítulo -, mas sim um imperativo que estudos complementares acerca de frequências alélicas nos demais grupos étnicos brasileiros sejam realizados. Também é necessário estender o espectro dos loci de STRs estudados, para determinar aqueles que podem ser aplicados indistintamente à população brasileira.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg é um dado importante a ser verificado quando do estudo gênico de populações. Para BEIGUELMAN (2000), entretanto, existem premissas necessárias à sua aplicabilidade nas quais o cromossomo Y não se enquadra.

Um dos objetivos do presente trabalho - além de dominar os métodos de extração do DNA, particularmente para dentes e saliva -, foi demonstrar que, independentemente do material orgânico do qual se obtém o DNA, é possível proceder a todas as análises com sucesso. Confirmamos essa premissa quando verificamos igualdade entre os alelos obtidos de saliva e de dentes de cinco indivíduos diferentes (TABELA 6).

Apesar da louvável iniciativa da equipe de DNA do Instituto de Criminalística da Polícia Civil do Estado de São Paulo - que apresenta parâmetros de conduta nessa seara ainda árida de informações e condutas uniformes -, causa-nos estranheza o artigo 5º da Resolução SSP 194 (SÃO PAULO, 1999), que reserva a atuação nessa área aos médicos legistas pois, como já comentamos, não há impedimentos legais para que cirurgiões-dentistas também executem a coleta e a análise de materiais biológicos para identificação humana.

Na realidade, almejamos uma cooperação multiprofissional nesses trabalhos, cujo fim último é prestar esclarecimentos técnicos à justiça. Assim, a assimilação dos procedimentos de análise de DNA pelos odontologistas (métodos de extração, diferentes formas de análises eletroforética, manuseio de equipamentos e reagente etc.), é condição imprescindível para que esse intercâmbio se efetive, possibilitando a formação de equipes multiprofissionais versadas nas ciências forenses relacionadas à identificação humana.

Um último aspecto a definir é que os estudos voltados à tecnologia molecular, como a incorporação das análises das STRs do cromossomo Y, mais do que a possibilidade de estabelecer o sexo dos indivíduos - até por que para esse fim existem STRs específicas como os da amelogenina e protocolos próprios a serem empregados (AKANE, 1998) -, descortinam a possibilidade de solucionar a totalidade do problema. Ou seja, o diagnóstico do sexo é um problema importante a ser resolvido no contexto da identificação humana, mas é parte e, como tal, torna-se menor quando nos deparamos com a possibilidade de individualizar o examinado pelo estudo da frequência dos seus alelos de STRs.

7. Conclusões

Considerando as condições de realização do presente estudo, permitimo-nos concluir que:

1. As rotinas de coleta, armazenamento a baixas temperaturas e preparo prévio às extrações empregadas para os materiais biológicos estudados mostraram-se eficientes. Vale ressaltar o preparo dos dentes, com protocolos de limpeza e pulverização.
2. A extração de DNA a partir de tecido dentário foi otimizada com a utilização de sílica, de acordo com a metodologia descrita por MELTON (2000).
3. Também a extração de DNA salivar em diversas condições (saliva total e *swab* de algodão e gaze) foi otimizada, conforme o método orgânico proposto por HOCHMEISTER *et al.* (1998).
4. Houve plena otimização dos *primers* fluorescentes empregados, possibilitando o emprego de concentrações iguais dos reagentes nas PCRs e a padronização da ciclagem.
5. Foi constatada a frequência alélica dos loci DYS390, DYS391 e DYS393. Os resultados obtidos são específicos da população de indivíduos brasileiros

leucodérmicos, e fornecem parâmetros para a caracterização do vínculo genético-familiar para a nossa população.

6. Houve igualdade entre os alelos do locus DYS393 obtidos dos dentes e da saliva de mesmos indivíduos, comprovando a independência do material biológico do qual se obtém o DNA para análises forenses.

Referências Bibliográficas

1. AKANE, A. Sex determination by PCR analysis of the X–Y amelogenin gene.
In: LINCOLN, P.J.; THOMSON, J. **Forensic profiling protocols**. Totowa: Humana Press, 1998. cap.21, p.245-49.
2. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEIWS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, 1294p.
3. ALVES, H.B. **Avaliação de três métodos de extração de DNA de tecido ósseo para identificação humana “post mortem” através da análise de marcadores do DNA**. Dissertação (Mestrado em Farmácia, Área de Análises Clínicas e Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2000. 58p.
4. AMOEDO, O. Study of the teeth after death from a medicolegal standpoint. **Dental Digest.**, v.9, p.604-608, 1903.
5. BÄR, W. KRATZER, A.; MÄCHLER, M.; SCHMID, W. Postmortem stability of DNA **Forensic Sci. Int.**, v.39, p.59-70, 1988.
6. BECKMAN, J.S.; WEBER, J.L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, V.12, P.627-31, 1992.
7. BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. p.179-202.
8. BERNSTEIN, M.L. The application of photography in forensic dentistry. **Dent. Clin. North Am.**, v.27, n.2, p.151-170, Jan. 1983.

9. BOLES, T.C.; SNOW, C.C.; STOVER, E. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. **J. Forensic Sci.**, v.40, n.3, p.349-355, May 1995.
10. BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapide and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, n.3, p.495-503, Mar. 1990.
11. BRASIL. Leis, decretos etc. Lei nº 5081, de 24 de agosto de 1966. **Regula o Exercício da Odontologia.**
12. CAMPO-FLORES, A.; SMITH, V.E.; BRESLAU, K.; SAMUELS, A.; CLEMETSON, L. The new face of race. **Newsweek**, v.86, n.12, p.32-35, Sept. 2000.
13. CIPOLLARO, M.; BERNARDO, G.; FORTE, A.; GALANO, G.; MASI, L.; GALDERISI, U.; GUARINO, F.; ANGELINI, F.; CASCINO, A. Histological analysis and ancient DNA amplification of bone remains found in Caius Iulius Polybius house in Pompeii. **Croat. Med. J.**, v.40, n.3, p.392-97, Jun. 1999.
14. CLARK, D.H. An analysis of the value of forensic odontology in ten mass disasters. **Int. Dent. J.**, v.44, n.3, p.241-50, Jun. 1994.
15. CLAYTON, T.M.; WHITAKER, J.P.; MAGUIRE, C.N. Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. **Forensic Sci. Int.**, v.76, p.7-15, 1995.
16. COLEPICCOLO, P. **Tecnologia de PCR: aplicações na área médica.** São Paulo: Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo, 1999. 38p.

17. CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA (CFO). **Resolução CFO-185/1993.**
18. CORACH, D.; SALA, A.; PENACINO, G.; IANNUCCI, N.; BERNARDIZ, P.; DORETTI, M.; FONDEBRIDER, L.; GINARTE, A.; INCHAURREGUI, A.; SOMIGLIANA, C.; TURNER, S.; HAGELBERG, E. Additional approaches to DNA typing of skeletal remains: The search for 'missing' persons killed during the last dictatorship in Argentina. **Electrophoresis**, v.18, n.9, p.1608-12, 1997.
19. DANGE, A. H., MALVANKAR, A.G, MADIWALE, M.S. Determination of sex origin of the teeth. **Arch. Kriminol.**, v.162, p.115-119, 1978.
20. DRANCOURT, M.; ABOUDHARAM, G.; SIGNOLI, M.; DUTOIR, O.; RAOULT, D. Detection of 400 year old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: Na approach to the diagnosis of ancient septicemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.12637-40, 1998.
21. ENDRIS, R. Odontological contribution to the of identification camp physician Josef Mengele. **Arch. Kriminol.**, v.176, n.5-6, p.129-141, 1985.
22. FARAH, S.B. **DNA segredos e mistérios.** São Paulo: Sarvier, 2000, 276p.
23. FELIZ, E.C. **Contribuição para o estudo da presença do tiocianato de potássio na saliva humana com finalidade odontolegal pelo método espectrofotométrico.** Dissertação (Mestrado em Deontologia e Odontologia Legal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 1999. 77p.
24. FERRI, M. A simple method for permanent identification of porcelain veneered crowns and fixed partial dentures. **J. Prosthet Dent.**, v.70, n.5, p.480, Nov. 1993.

25. GAROFANO, L.; PIZZAMIGLIO, M.; VECCHIO, C.; LAGO, G.; FLORIS, T.; D'ERRICO, D.; BREMBILLA, G.; ROMANO, A.; BUDOWLE, B. Italian population data on thirteen short tandem repeat loci: HUMTH01, D21S11, D18S51, HUMVWFA31, HUMFIBRA, D8S1179, HUMTPOX, HUMCSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, D3S1358. **Forensic Sci. Int.**, v.97, p.53-60, 1998.
26. GENE, M.; BORREGO, N.; XIFRO, A.; PIQUE, E.; HUGUET, E. Short communication: Haplotype frequencies of eight Y chromosome STR loci in Barcelona (North-East Spain). **Int. J. Legal Med.**, v.112, n.6, p.403-405, 1999.
27. GENEPRINT® POWERPLEXTM 2.1 System. **Technical manual promega®**. Madison, 1999. 44p.
28. GINTHER, C.; ISSEL-TARVER, L.; KING, M.C. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. **Nat. Genet.**, v.2, n.2, p.135-138, 1992.
29. GLOSSARY OF COMMONLY USED TERMS. <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/glossary.htm> [último acesso 12/2000]
30. GONZÁLEZ-NEIRA, A.; GUSMÃO, L.; BRIÓN, M.; LAREU, M.V.; AMORIM, A.; CARRACEDO, A. Distribution of Y-chromosome STR defined haploypes in Iberia. **Forensic Sci. Int.**, v.110, p.117-126, 2000.
31. GRAW, M.; SEITZ, T. Y chromosomal short tandem repeat (STR) loci in a representative group of males living in South Württemberg: a database for application in forensic medicine. **Forensic Sci. Int.**, v.113, p.43-46, 2000.

32. GUSMÃO, L.; GONZÁLEZ-NEIRA, A.; PESTONI, C.; BRIÓN, M.; LAREU, M.V.; CARRACEDO, A. Robustness of the Y STRs DYS19, DY389 I and II, DYS390 and DYS393: optimization of a PCR pentaplex. **Forensic Sci. Int.**, v.106, p.163-172, 1999.
33. HAERTING, A.; CRAINIC, K.; DURIGON, M. Identification médico-légale par le système dentarie. **Presse Med.**, v.14, n.9, p.543-545, 1985.
34. HANAOKA, Y.; INOUE, M.; TSAI, T.H.; MINAGUCH, K. Fundamental and pratical study for DNA analysis using tooth as a source of DNA. **Japanese Journal of Legal Medicine**, v.49, n.1, p.1-10, 1995.
35. HANAOKA, Y.; MINAGUCH, K. D4S43 Locus DNA typing in the Japanese population and application to teeth with degraded DNA. **J. Forensic Sci.**, v.43, n.2, p.406-409, 1998.
36. HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. 3ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. p.1-36.
37. HENKE, L.; FIMMERS, R.; JOSEPHI, E.; CLEEF, S.; DÜLMER, M.; HENKE, J. Usefulness of conventional blood groups, DNA minisatellites, and short tandem repeat polymorphisms in paternity testing: a comparasion. **Forensic Sci. Int.**, v.103, p.133-142, 1999.
38. HIDDING, M; SCHMITT, C. Haplotype frequencies and population data of nine Y-chromosomal STR polymorphisms in a German and Chinese population. **Forensic Sci. Int.**, v.113, p.47-53, 2000.
39. HIRATA, M. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo) **Comunicação pessoal**, 2000.

40. HOCHMEISTER, M.N.; RUDIN, O.; AMBACH, E. PCR analysis from cigaret butts, postage stamps, envelope sealing flaps, and other saliva-stained material. *In*: LINCOLN, P.J.; THOMSON, J. **Forensic DNA profiling protocols**. Totowa: Humana Press, 1998. p.27-32.
41. HOSHOWER, L.M. Forensic archeology and the need for flexible excavation strategies: a case study. **J. Forensic Sci.**, v.43, n.1, p.53-56. 1998.
42. INMAN, K.; RUDIM, N. **An introcuction to forensic DNA analysis**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1997, 256p.
43. JOBIM, L.F.; JOBIM, M.R.; BRENNER, C. Identificação humana pelo DNA. *In*: GALANTE FILHO, H.; FIGINI, A.L.; REIS, A.B.; JOBIM, L.F.; SILVA M. **Identificação humana**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1999. p.239-303.
44. JUNGE, A.; MADEA, B. Population studies of the Y-chromosome specific polymorphisms DYS19, DY389 I+II, DYS390 and DYS393 in a Western German population (Bonn area) **Forensic Sci. Int.**, v.101, p.195-201, 1999.
45. KEISER-NIELSEN, S. Copenhagen Dental School Department of Forensic Dentistry - 25 years of activity. **Tandlaegebladet.**, v.93, n.18, p.712-714, Dec. 1989.
46. KESSLER, H.P.; PEMBLE, C.W. Forensic dental identification of casualties during Operation Desert Storm. **Mil. Med.**, v.158, n.6, p.359-362, Jun. 1993.
47. KLINTSCHAR, M.; RICCI, U.; HAMMADI, N.A.; REICHENPFADER, B.; EBNER, A.; UZIELLI, M.L.G. Genetic variation at the STR loci D12S391 and CSF1PO in four populations from Austria, Italy, Egypt and Yemen. **Forensic Sci. Int.**, v.97, p.37-45, 1998.

48. KNIJFF, P.; KAYSER, P.; CAGLIÁ, A.; CORACH, D.; FRETWELL, N.; GEHRIG, C.; GRAZIOSI, G.; HEIDORN, F.; HERRMANN, S.; HERZOG, B.; HIDDING, M.; HONDA, K.; JOBLING, M.A.; KRAWCZAK, M.; LEIM, K.; MEUSER, S.; MEYER, E. OESTERREICH, A.; PANDYA, A.; PARSON, W.; PICCININI, A.; PEREZ-LEZAUN, A.; PRINZ, M.; SCHMITT, C.; SCHNEIDER, P.M.; SZIBOR, R.; TEIFEL-GREDING, J.; WEICHHOLD, G.; ROEWER, L.; Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. **Int. J. Legal Med.**, v.110, p.134-140, 1997.
49. LORTON, L., LANGLEY, W.H. Design and use of a computer assisted postmortem identification system. **J. Forensic Sci.**, v.31, n.3, p.972-981, Jul.1986.
50. MARTIN HERAS, S.; VALENZUELA, A.; VILLANUEVA, E.; MARQUES, T.; EXPOSITO, N.; BOHOYO, J.M. Methods for identification of 28 burn victims following a 1996 bus accident in Spain. **J. Forensic Sci.**, v.44, n.2, p.428-431, Mar. 1999.
51. McNALLY, L.; SHALER, R.C.; BAIRD, M.; BALAZS, I.; KOBILINSKY, L.; FOREST, P. The effects of environment and substrata on deoxyribonucleic acid (DNA): The use of casework samples from New York City. **J. Forensic Sci.**, v.34, n.5, p.1070-1077, 1989. MELTON, T. **Mitotyping technologies** <http://www.mitotyping.com/index.html> [último acesso 12/2000]. MENEZES, L.M.B. **Concentração de flúor no osso como indicador de intoxicação aguda e sua importância pericial**. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de Odontologia Legal e Deontologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 88p.

54. MOURA-NETO, R.S.; BUDOWLE, B. Fixed bin population data for the VNTR Loci D1S7, D2S44, D4S139, D5S110, D10S28 and D14S13 in a population sample from Rio de Janeiro, Brazil. **J. Forensic Sci.**, v.42, n.5, p.926-928, 1997.
55. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [último acesso em 12/2000].
56. NICOLÁS, P.S.; CANELA, P.R. Restos biológicos de interés forense. *In*: JARRETA, M.B.M. **La prueba del ADN en medicina forense**. Madrid: Masson, 1999. p.138-151.
57. OLIVEIRA, R.N.; ANZAI, E.K.; MESQUITA, R.A.; DARUGE, E.; NUNES, F.D. Metodologia de extração de DNA de dentes, e sua aplicação à odontologia Legal. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS, Águas de Lindóia, 2000, **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.14, p.82, set. 2000a. {Supl.]
58. OLIVEIRA, R.N.; RAMOS, D.; GOMES, E.M.; MALLET, R.G.A. Human identification from analyses of the frontal sinus. *In*: EUROPEAN INTERNATIONAL ORGANISATION OF FORENSIC ODONTO-STOMATOLOGY (IOFS) MILLENNIUM MEETING, Leuven, 2000. WILLEMS, G. **Forensic odontology**. Leuven: Leuven University Press, 2000b. p.194.
59. OLIVEIRA, R.N.; MALLET, R.G.; MELANI, R.F.H.; CARDOZO, H.F.; ANTUNES, J.L.F.; BATISTA, L.R.; MURAMATSU, M. Perspectiva do emprego da holografia como recurso auxiliar no estudo da estimativa da idade pela análise da cronologia de fechamento das suturas cranianas. **Odontologia e Sociedade**, v.2, n.1/2, p.8-11, 2000c.

60. OTTO, P.G.; OTTO, P.A.; FROTA-PESSOA, O. **Genética humana e clínica.** São Paulo: Roca, 1998. p.285-294.
61. OZAKI, A.N. **Determinação da frequência de genes de algumas regiões hipervariáveis do genoma humano para estudo do vínculo genético familiar em caucasianos brasileiros.** Dissertação (Mestrado em Farmácia, Área de Análises Clínicas e Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1999. 93p.
62. PASTORE, L.; VUTTARIELLO, E.; SARRANTONIO, C.; COTO, I.; ROVIELLO, S.; FORTUNATO, G.; SALVATORE, F.; SACCHETTI, L. Allele frequency distributions at several variable number of tandem repeat (VNTR) and short tandem repeat (STR) loci in a restricted Caucasian population from South Italy and their evaluation for paternity and forensic use. **Mol. Cell. Probes**, v.10, p.299-308, 1996.
63. PENA, S.D.J. Single-tube single-colour multiplex PCR amplification of ten polymorphic microsatellites (ALF10): a new powerful toll for DNA profiling. **Pure Appl. Chem.**, v.71, p.1683-90, 1999.
64. PENA, S.D.J.; CARVALHO-SILVA, D.R.; ALVES-SILVA, J.; PRADO, V.F.; SANTOS, F.R. Retrato molecular do Brasil. **Ciência Hoje**, v.27, n.159, p.16-25, 2000.
65. PILLAY, U; KRAMER, B. A simple method for the determination of sex from the pulp of freshly extracted human teeth utilizing the polymerase chain reaction. **J. Dent. Assoc. S.Afr.**, v.52, p.673-77, 1997.
66. POLESKY, H. **Application of classic genetic marker typing in disputed parentage cases.** (Apresentado no Seminário Integração Ciência/Direito da Investigação dos Vínculos Genéticos, 1994).

67. POTSCH, L., MEYER, U., ROTHSCCHILD, S., SCHNEIDER, P.M., RITTNER, C. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. **Int. J. Legal Med.**, v.105, n.3, p.139-143, 1992.
68. PU, C.E.; WU, F.C.; CHENG, C.L.; WU, K.C.; CHAO, C.H.; LI, J.M. DNA short tandem repeat profiling of Chinese population in Taiwan determined by using an automated sequencer **Forensic Sci. Int.**, v.97, p.47-51, 1998.
69. ROTHWELL, B.R., HAGLUND, W., MORTON Jr., T.M. Dental identification in serial homicides: the Green River Murders. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.119, n.3, p.373-379, Sep. 1989.
70. SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.**, v.44, n.8, p.1748-1750, 1998.
71. SÃO PAULO. Secretaria da Segurança Pública. Resolução SSP-194, de 02 de junho de 1999. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, 3 jun. 1999, Seção I, p. 104.
72. SCHWARTZ, T.R.; SCHWARTZ, E.A.; MIESZERSKI, L.; McNALLY, L.; KOBILINSKY, L. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. **J. Forensic Sci.**, v.36, n.4, p.979-990, 1991.
73. SENO, M.; ISHIZU, A. Sex identification of a human tooth. **Int. J. Forens. Dent.**, v.1, p.8-11, Jul. 1973.
74. SHORT TANDEM REPEAT DNA INTERNET DATABASE., <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/> [último acesso em 12/2000].

75. SCHULTES, T.; HUMMEL, S.; HERRMANN, B. Original investigation: Amplification of Y-chromosomal STRs from ancient skeletal material. **Human Genetics**, v.104, n.2, p. 164-166, 1999.
76. SIVAGAMI, A.V.; RAO, A.R.; VARSHNEY, U. A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian population. **Forensic Sci. Int.**, v.110, p.107-115, 2000.
77. SLAVKIN, H.C. Sex, enamel and forensic dentistry: a search for identity. **JADA.**, v.128, n.7, p.1021-125, July 1997.
78. SMITH, B.C.; FISHER, D.L.; WEEDN, V.W.; WARNOCK, G.R.; HOLLAND, M.M. A systematic approach to the sampling of dental DNA. **J. Forensic Sci.**, v.38, n.5, p.1194-1209, 1993.
79. SMITH, B.C.; HOLLAND, M.M.; SWETT, D.L.; DIZINNO, J.A. DNA and the Forensic Odontologist *In*: BOWERS, C.M.; BELL, G.L. **Manual of forensic odontology**. 3rd.ed. Ontario: Manticore Publisher, 1997. cap.10, p.283-298.
80. SIPHER, I.M. The dentist, the forensic pathologist, and the identification of human remains. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.85, n.6, p.1324-1329, Dec. 1972.
81. STEAGALL, W., SILVA, M. A importância da dentística na identificação pelos dentes no arco dental. **Revista Paulista de Odontologia**, v.18, n.5, p.23-34, set/out. 1996.
82. STRINOVIC, D., SKAVIC, J., KOSTOVIC, I., HENIGSBERG, N., JUDAS, M., CLARK, D. Identification of war victims in Croatia. **Med. Sci. Law.**, v.34, n.3, p.207-212, Jul. 1994.

83. SWEET, D.; LORENTE, M.; VELENSUELA, A.; LORENTE, J.A.; ALVAREZ, J.C. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. **Forensic Sci. Int.**, v.83, p.167-177, 1996.
84. SWETT, D.; HILDEBRAND, D. Recovery of DNA from human by cryogenic grinding. **J. Forensic Sci.**, v.43, n.6, p.1199-1202, 1998.
85. SWETT, D.; HILDEBRAND, D.; PHILLIPS, D.R.T. Identification of a skeleton using DNA from teeth and PAP smear. **J. Forensic Sci.**, v.44, n.3, p.630-633. 1999.
86. SWETT, D.; SWEET, C.H.W. DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene. **J. Forensic Sci.**, v.40, n.2, p.310-314. 1995.
87. UNIVERSIDADE DE LEIDEN, HOLANDA. ["Links" com informações sobre os locus de STR]. DYS390 <http://ruly70.medfac.leidenuniv.nl/~fldo/dys390.htm> o locus DYS391 <http://ruly70.medfac.leidenuniv.nl/~fldo/dys391.htm> e o locus DYS393 <http://ruly70.medfac.leidenuniv.nl/~fldo/dys393.htm>. - último acesso em 09/2000.
88. WALSH, D.J.; COREY, A.C.; COTTON, R.W.; FORMAN, L.; HERRIN, G.L.; WORD, C.J.; GARNER, D.D. Isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva. **J. Forensic Sci.**, v.37, n.2, p.387-395, 1992.
89. WHITTAKER, D.K.; LLEWELYN, D.R.; JONES, R.W. Sex determination from necrotic pulpal tissue. **Br. Dent. J.**, v.139, p.403-405, Nov. 1975
90. YAMADA, Y.; OHIRA, H.; TAKATORI, T.; NAGAO, M.; OHTANI, S. Sequencing mitochondrial DNA from tooth and application to forensic odontology. **The Journal of Forensic Stomatology**, v15, n.1, p.13-15, July 1997.

91. YAMAGUCHI, T.; YAMADA, Y.; OHTANI, S.; NAGAO, M.; TAKATORI, T.; OHIRA, H.; YAMAMOTO, I.; WATANABE, A. Two cases of personal identification from dental information. **Japanese Journal of Legal Medicine**, v.51, n.4, p.324-30, Aug. 1997.
92. YAMAMOTO, K. Molecular biological studies on teeth, and inquests. **Forensic Sci. Int.**, v.80, p.79-87, 1996.
93. YOKOI, T.; AOKI, Y.; SAGISAKA, K. Human identification and sex determination of dental pulp, bone marrow and blood stains with a recombinant DNA probe. **Z. Rechtsmed**, v.102, p.323-30, 1989.
94. Y-STR SINGLE LOCUS INFORMATION,
<http://ystr.charite.de/text/locus.html>, último acesso em 12/2000.

Y-STR Single locus Information

Locus	Repeated	Numbers of repeats	Nº alleles	Size range	Gene diversity	PCR primers sequence
DYS19	(GATA) _n	10-19	9	174-210	0.72	Primer A: C T A C T G A G T T C T G T T A T A G T Primer B: A T G G C C A T G T A G T G A G G A C A ⁶⁾ Primer A2: G T T A T A T A T A T A G T T T A G ³⁾ Primer B2: G T T A A G G A G A G T G T C A C T A ³⁾
DYS389I ¹⁾	(GATA) _n (GACA) _n	9-16	8	235-263	0.61	Primer A: C C A A C T C T C A T C T G T A T T A T C T A T Primer B: T C T T A T C T C C A C C C A C C A G A Primer 2B: T T A T C C C T G A G T A G T A G A A G A T ⁴⁾
DYS389II ¹⁾	(GATA) _n (GACA) _n	26-33	8	355-383	0.75	see DYS389I
DYS390	(GATA) _n (GACA) _n	18-27	9	191-227	0.61	Primer A: T A T A T T T A C A C A T T T T T G G G C C Primer B: T G A C A G T A A A A T G A A C A C A T T G C
DYS391	(GATA) _n	7-14	8	271-299	0.49	Primer A: C T A T T C A T C A A T C A T A C A C C C A Primer B: G A T T C T T T G T G G T G G G T C T G
DYS392	(A T T) _n	6-16	11	233-263	0.52	Primer A: T C A T T A A T C T A G C T T T T A A A A C A A Primer B: A G A C C C A G T T G A T G C A A T G T
DYS393	(GATA) _n	9-16	8	108-136	0.34	Primer A: G T G G T C T T C T A C T T G T G T C A A T A C Primer B: A A C T C A A G T C C A A A A A T G A G G
DYS385	(G A A A) _n	7-22	75	352-412	0.85	Primer A: A G C A T G G G T G A C A G A G C T A Primer B: G G G A T G C T A G G T A A A G C T G Primer 2B: C C A A T T A C A T A G T C C T C C T T T C ⁴⁾
YCAII ²⁾	(C A) _n	1-9	33	144 - 160	0.67	Primer A: T A T A T T A A A T A G A A G T A G T G A Primer B: T A T C G A T G T A A T G T T A T A T T A

¹⁾ a mostly monomorphic (GATA)₃ block has been included in the repeat counting (+ 3 repeats compared to the nomenclature given in Kayser et al. 1997, Int Legal Med 141-149) see also <http://ruly70.medfac.leidenuniv.nl/~fldo/>

²⁾ Matsumoto et al. published an ISFH compatible nomenclature with allele 3 = (CA)₁₆ = 148bp

³⁾ the modified PCR DYS19 fragments 2A/2B are 86bp shorter than the originally described A/B fragments (see Szibor et al. 2000, The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, in press)

⁴⁾ the modified PCR DYS385 fragments A/2B are 112 bp shorter than the originally A/B fragments (see Schneider et al. 1998, For Sci International 97: 61-70)

⁵⁾ the modified PCR DYS389II fragments A/2B are 94bp shorter than the originally described A/B fragments (see Schultes et al. 1999, Hum Genet 104:164-166)

⁶⁾ this C-insertion in Primer B improves the amplification of the locus DYS19 (M. Kayser, personal communication)

PCR protocols and further information:

Y-STR Websites: <http://ruly70.medfac.leidenuniv.nl/~fldo/>

<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/index.htm>

References: Kayser et al. Int J Legal Med 110: 125-133; 141-149

Schneider et al. 1998, For Sci International 97: 61-70

01	PCC	51	26	RB	20	51	JVQ	66	76	ACC	43
02	SAC	57	27	OJC	39	52	RAA	24	77	ACB	28
03	LM	09	28	PV	44	53	DFCS	03	78	PCP	37
04	VSV	01	29	RG	57	54	VDD	34	79	AHM	41
05	LCA	28	30	JMAC	22	55	RGV	26	80	RMM	24
06	LMQ	32	31	IDOM	25	56	EES	25	81	CML	34
07	YCS	01	32	MAL	37	57	AK	46	82	CZ	28
08	SMC	38	33	MAC	25	58	VPFP	30	83	SFO	23
09	MRM	19	34	HMCB	37	59	RCP	55	84	PCC	51
10	JAL	42	35	RSA	25	60	MSG	35	85	EDB	32
11	MS	26	36	SPA	51	61	MSP	27	86	RR	51
12	LTJ	33	37	LA	01	62	AGL	28	87	CGMB	42
13	HMS	33	38	AJM	34	63	JCC	26	88	MAB	24
14	CAC	37	39	JERL	31	64	VMA	25	89	DMS	22
15	GLMP	33	40	AMM	53	65	APL	37	90	ISM	46
16	RAM	52	41	LCO	23	66	ALM	39	91	IJC	38
17	MP	33	42	BL	44	67	RAD	27	92	MGC	29
18	DSL	33	43	MSM	19	68	JAF	66	93	GHBA	28
19	FMSF	38	44	ASM	38	69	APA	77	94	AJC	33
20	GSL	66	45	JNZ	39	70	ELL	38	95	RGD	35
21	FCR	31	46	EF	27	71	RAV	22	96	FMW	49
22	FJGR	22	47	JVA	82	72	WJM	36	97	DGP	01
23	JTPF	31	48	FBTN	42	73	FHLS	21	98	NEJP	53
24	RB	31	49	MJSO	39	74	HRA	52	99	JAS	80
25	CMG	36	50	VCS	44	75	ACL	29	100	ANS	24

Anexo 2 – iniciais e idades dos indivíduos do sexo masculino, amostra de SANGUE.

01	CRM	36
02	WMZ	39
03	PB	20
04	RMC	27
05	HCMO	33

Anexo 3 – iniciais e idades dos indivíduos do sexo masculino, amostra de SALIVA E DENTE .

01	JJ	22
02	SRFN	22
03	VBF	23
04	VLL	23
05	CST	23

Anexo 4 – iniciais e idades dos indivíduos do sexo feminino, amostra de SALIVA .

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisas em Odontologia Legal

Pelo presente eu, _____, RG _____, declaro ter sido esclarecido sobre a relevância social das pesquisas de identificação humana, sobremaneira as possibilidades advindas das técnicas genéticas, e consinto que meus dentes, ora com extração indicada, assim como, minha saliva seja utilizada em pesquisas científicas.

Fui esclarecido ainda que a pesquisa será somente laboratorial, (trabalharão somente fora da minha boca), sendo a avaliação da necessidade de extração feita por outros professores/profissionais, não envolvidos na presente pesquisa.

Foi-me ainda dadas garantias de que minha identidade será resguardada pelos pesquisadores durante todo o projeto sobretudo no momento da apresentação dos resultados, como também dada a liberdade de recusar-me a participação, sem que isso traga qualquer penalização a minha pessoa ou ao tratamento iniciado.

Por tudo exposto, concordo que meus órgãos dentais e minha saliva sejam utilizados para pesquisas.

Data: _____ / / Assinatura:

Anexo 5 – modelo de termo de consentimento empregado na obtenção de amostras de SALIVA. e DENTES.

AMOSTRA nº _____

Termo de consentimento pós-informado

Pelo presente eu, _____, RG _____, telefone _____ declaro ter sido esclarecido sobre a relevância social das pesquisas de identificação humana, sobremaneira as possibilidades advindas das técnicas genéticas, e consinto que minha sangue seja utilizada em pesquisas científicas.

Informo possuir _____ anos na presente data, ter nascido na cidade de _____ estado de _____, possuindo origem étnica Leucoderma (raça branca) não sendo de meu conhecimento possuir ancestrais pertencentes a outros grupos étnicos.

Declaro, outrossim, não ter sido submetido a transfusão de sangue nos últimos 4 meses ou transplante de medula óssea.

Foi-me ainda dadas garantias de que minha identidade será resguardada pelos pesquisadores durante todo o projeto sobretudo no momento da apresentação dos resultados, como também dada a liberdade de recusar-me a participação, sem que isso traga qualquer penalização a minha pessoa.

De acordo com o exposto, assino o termo.

São Paulo ____ / ____ / ____

Assinatura: _____

Anexo 6– modelo de termo de consentimento empregado na obtenção de amostras de SANGUE.

[Catalog Index](#) | [Fluorescent Labels](#) | [Cy5](#) | [Structural Data](#)

Chemical Structure

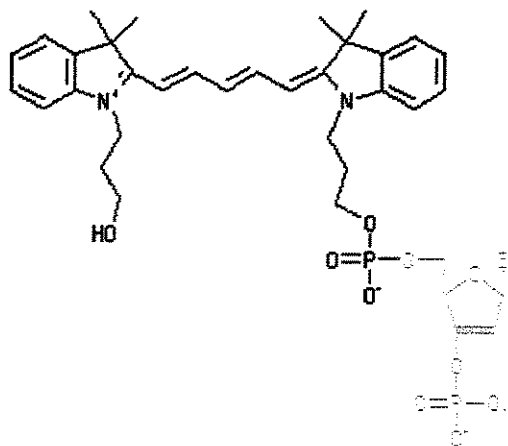
Cy5 (#1402)

Formula Weight

Form gm/mole

Amidite 534.62

► [Add Cy5 to my Favorites list.](#)



Please send comments or suggestions about this website to comments@synthegen.com
 Copyright © 1996-2001 by SYNTHIEGEN, LLC. All Rights Reserved.

Anexo 7 – endereço eletrônico da empresa que sintetizou os *primers* (DYS390, DYS391 e DYS393) e descrição do componente fluorescente adicionado aos mesmos.

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO PARA AMOSTRAS DE SANGUE

SALAZAR et al. (1998)

1. Em um tubo tipo eppendorff® separar 200µl de sangue total;
2. Adicionar ao sangue 200µl de NaI 6M, agitar vigorosamente;
3. Adicionar 400µl de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1);
4. Centrifugar 10.000rpm / 5 min.;
5. Utilizar a fase aquosa e adicionar 300µl de isopropanol gelado;
6. Centrifugar 10.000 rpm / 5 min.;
7. Lavar o "pellet" de DNA com 200µl de isopropanol a 37%;
8. Centrifugar 10.000rpm / 5 min.;
9. Ressuspender o "pellet" de DNA em 60µl de TE*;
10. Aquecer por 3 min. à 56°C.

Tampão TE*: 10µl de EDTA; 100µl de Tris HCl e 10ml de H₂O

Anexo 8 – Protocolo utilizado para extração de DNA a partir de amostras de SANGUE.

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO PARA AMOSTRAS DE SALIVA

(MÉTODO ORGÂNICO), HOCHMEISTER et al. (1998)

1. Coleta e extração inicial (1º dia)

- pipetar 1mL de saliva em um tubo eppendorf, ou uma fração da gaze ou “swab” de algodão contendo saliva;
- centrifugar a 10.000 rpm por 15min.;
- remover sobrenadante cuidadosamente e deixar o “pellet”;
- adicionar o tampão de saliva:
10mM TRIS pH 8,0; 10mM EDTA; 0,1 M NaCl e 2% SDS
- e adicionar 35µL de Proteinase K (20mG/mL);
- incubar “overnight” à 56° C sob agitação em velocidade 30 (“shaker”: 30);

2. Extração propriamente dita (2º dia)

- inativar proteinase k por 10min. a 95°C;
- acrescentar 700µL de fenol tamponado pH 8,0 ;
- deixar homogeinizando por 5min.;
- centrifugar 3000 rpm por 30 min.;
- transferir o sobrenadante para outro tubo;
- acrescentar fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1) na mesma quantidade do sobrenadante removido;
- centrifugar 3000 rpm por 3min.;

- remover sobrenadante para outro tubo;
- acrescentar álcool 100% e acetato de sódio;

álcool 100% : 2 a 3 vezes a mais que o sobrenadante ($\pm 800\mu\text{L}$)

acetato de sódio : 1/10 do sobrenadante ($\pm 60\mu\text{L}$)

- incubar “overnight” a - 20°C

3. Ressuspender (3º dia)

- centrifugar 15000 rpm por 10min.;
- remover o álcool cuidadosamente: usar a ponteira de 200 μL e depois a de 10 μL , para retirar o excesso de álcool;
- colocar 1ml de álcool 70%;
- centrifugar 15000 rpm por 10min.;
- remover o álcool cuidadosamente: usar a ponteira de 200 μL e depois a de 10 μL para retirar o excesso de álcool;
- secar o “pellet” deixando-o em forno aquecido previamente a 65°C por ± 30 min. até secar bem;
- ressuspender com 20 μL de T.E.;
- deixar 10min. em banho maria a 65°C;
- quantificar no espectrofotômetro.

Anexo 9 – Protocolo utilizado para extração de DNA a partir de amostras de SALIVA.

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO PARA AMOSTRAS DE DENTE (SÍLICA)

BOOM et al. (1990) adaptado por MELTON (2000)

1. A partir da sílica são preparados 3 componentes para se proceder a extração: sílica fracionada e os tampões de lise L2 e L6;
2. Com 0.25mg de dente pulverizado ou a quantidade de polpa obtida, adicionar 820 μ l de tampão L6 homogeneizando a solução, e incubar a 62°C. A cada 15min. realizar novas homogeneizações até completar 2 horas;
3. Centrifugar 3.000 rpm por 1min.;
4. Retirar 500 μ l de sobrenadante, transferindo-o para novo tubo;
5. Adicionar 500 μ l de L6 e 40 μ l de sílica fracionada homogeneizando bem;
6. Deixar por 15min. em repouso;
7. Centrifugar 2000 rpm por 30 seg.;
8. Remover o sobrenadante e lavar o “*pellet*” com: L2, Etanol 70% (duas vezes) e Acetona;
9. Para cada lavagem adiciona-se 1 ml de cada solução, homogeneizando e centrifugando a 10.000 rpm por 10seg. Descarta-se todo o líquido a cada passo.
10. Após a última lavagem com acetona, deixar o tubo aberto para secagem do “*pellet*” (56°C / 10min.);

11. Adicionar 65µl de água destilada e deionizada estéril, homogeneizar para ressuspender a sílica e deixar a 56°C por 10min.

12. Centrifugar 10.000 rpm por 1min. transferindo o sobrenadante para novo tubo. Deste sobrenadante é feita a quantificação do DNA.

Preparo dos componentes a partir da sílica:

L2

Adicione 20ml de Tris 0,1M pH 6,4 a 24g de Tiocinato de guanidina, aqueça para facilitar a dissolução (60-65°C). Adicione 1.5ml de sílica fracionada. Antes do uso agite bem para homogeneizar os componentes. Armazenado em temperatura ambiente e ao abrigo da luz sua estabilidade é de pelo menos 3 semanas.

L6

Adicione 20ml de Tris 0,1M pH 6,4 a 24g de Tiocinato de guanidina, aqueça para facilitar a dissolução (60-65°C). Adicione 4.4ml de EDTA 0,2M (ajustando o pH para 8,0 com NaOH), adicione também 0.5ml de Triton X-100, por último acrescente 1.5ml de sílica fracionada. Antes do uso agite bem para homogeneizar os componentes. Armazenado em temperatura ambiente e ao abrigo da luz sua estabilidade é de pelo menos 3 semanas.

Sílica fracionada

Junte 12g de sílica a 100ml de água estéril, agite bem e deixe sedimentar por 24 horas. Então remova 6ml do sobrenadante adicionando novamente água estéril até completar 100ml, agite bem para re suspender a sílica, deixe sedimentar novamente, agora somente por 5 horas, então remova 88ml do sobrenadante. Na solução remanescente acrescente 120µl de HCl (32% peso/vol.) ajustando o pH para 2. Pipete a sílica em tubos Eppendorf de 1.5ml armazenado-os em ambiente escuro à temperatura de 4°C, nestes condições sua vida útil é de cerca de 3 meses.

Anexo 10 – Protocolo utilizado para extração de DNA a partir de amostras de DENTES.

PROTOCOLO DO GEL DE AGAROSE 2%

1. pesar 1,5g de agarose, transferindo-a para um bécher;
2. adicionar 75ml de TAE (1x)
3. aquecer no aparelho de microondas por cerca de 2min.
4. acrescentar 3,5 μ l de brometo de etídio, homogeneizando bem;
5. verter o preparado na cuba eletroforética;
6. posicionar os pentes;
7. aguardar cerca de 1hora, até o gel apresentar um aspecto esbranquiçado;
8. remover os pentes, e os géis estão prontos para uso.

Anexo 11 – Protocolo de confecção do gel de agarose.

PROTOCOLO DO GEL DE POLIACRILAMIDA

1. em um tubo plástico com tampa rosqueável, colocar 24ml de água estéril;
2. acrescentar 2ml de TBE 10%;
3. 4ml de glicerol 50%;
4. 8ml de acrilamida 40%;
5. 400 μ l APS 10% ;
6. agitar por cerca de 1min homogeneizar os produtos;
7. acrescentar então 40 μ l de TEMED, agitar novamente por alguns min.
8. estando pronto o gel verte-lo entre as placas de vidro, posicionando-se o pente;
9. verificar possíveis vazamentos readequando o posicionamento dos grampos que mantêm as placas de vidro unidas;
10. após a presa inicial do gel mante-lo em caixa umidificada na geladeira até seu uso

Anexo 12 – Protocolo de confecção do gel de poliacrilamida.

PROTOCOLO DE REVELAÇÃO COM PRATA

1. separar as placas cuidadosamente, transferindo o gel de poliacrilamida para uma cuba contendo solução de álcool 10% e ácido acético 0,75%, manter a cuba em agitação e em ambiente escuro por 20 min.
2. dispensar esta solução e fazer uma rápida lavagem com água;
3. adicionar solução de prata (300ml de água para 0,60g de prata), manter a cuba em agitação e em ambiente escuro por 25 min.
4. dispensar esta solução, acrescentar água mantendo a cuba em agitação e em ambiente escuro por 2 min.
5. dispensar a água, acrescentando o revelador (9g de Hidróxido de sódio para 300ml de água e mais 900 μ l de formaldeído puro), mantendo a cuba em agitação e em ambiente escuro por 15 min.
6. dispensar a solução, acrescentar ácido acético 10% mantendo a cuba em agitação e em ambiente escuro por 15 min.
7. dispensar a solução e finalizar o processo de revelação com água mantendo a cuba em agitação e em ambiente escuro por 15 min.

Anexo 13 – Protocolo de revelação do gel de poliacrilamida, utilizado-se prata.

PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO DO SISTEMA ALFexpress®,

1. Lavagem das placas com água destilada (se possível morna), para retirada completa de qualquer resíduo de gel ou interferente (pó, fios de papel, etc.);
2. A limpeza deve ser feita em ambos os vidros, sempre tendo cuidado redobrado na região do laser;
3. A mesma atenção deve ser dada aos espaçadores e pentes;
4. Após a lavagem é retirado o excesso de água com papel toalha branco, tomando cuidado para não riscar a placa, e finalmente as placas são enxutas com papel “Kimwipes EX-L® - Delicate Task Wipers (Kimberly-Clark);
5. Após a montagem das placas, colocar os “clips” simultaneamente de ambos os lados para evitar a quebra dos espaçadores;
6. Fica a critério de cada pesquisador colocar o pente antes ou após o gel estar na placa, tendo o cuidado de limpar bem entre os dentes.

O gel de poliacrilamida empregado é composto da seguinte forma:

GEL DE POLIACRILAMIDA COM URÉIA

5,5 ml de GEL MIX 40%;

18,4g de uréia; 4,0ml de TBE 10x;

completar com água a'te obter um volume de 40ml;

80 μ l de TEMED; 160 μ l de Persulfato de amônia 10% (PA).

PROTOGEL 40% é preparado com a mistura de: 19g de acrilamida, mais 1g de bis-acrilamida, completando-se o volume para 50ml de água e acrescentando-se 0,5g de AMBERLIT para retirada de íons

Após o preparo do gel de poliacrilamida com uréia, carrega-se o gel entre as placas com auxilio de uma seringa de 20ml, tomando-se cuidado para evitar o aparecimento de bolhas, caso isso ocorra, com uma pinça plástica de ponta ativa em forma de gancho remove-se as bolhas, pois a permanencia de qualquer irregularidade no gel (bolhas) prejudicará a leitura do mesmo.

Com o gel já polimerizado, aproximadamente 2 horas, retificasse a região onde o laser passar, acima e abaixo dos espaçadores, retirando-se todo excesso de gel não polimerizado. Se o gel não for ser utilizado de pronto é recomendado umedecer papel toalha e vedar a parte exposta do mesmo.

No decurso da polimerização pode-se preparar os produtos da PCR a serem aplicados, adicionando-se 10,0µl de “Loading Dye” em cada amostra. O “Loading Dye” é um composto de 100ml de formamida acrescido de 0,5g de Dextran Blue2000®. Assim, temos um volume final de 35µl, 25µl do produto de PCR mais 10µl de “Loading Dye”, desse total são aplicados 10µl em cada casulo do gel. A cada 5 ou 6 amostras de produto aplicadas, intercalasse com a aplicação do marcador 50-500bp da Amersham Pharmacia Biotech®.

Finalizada a polimerização do gel, diluir o TBE 10x para 1/2x. São necessários 2 litros de tampão. Colocar 1 litro em cada compartimento carregasse os casulos do gel com os produtos de PCR e o marcador 50-500bp.(amplificações conhecidas) e pode-se iniciar a corrida eletroforética que será interpretada pelos programas específicos previamente instalados. O tampão TBE 10x é preparado da seguinte forma: 53g de ácido bórico; 108g de Tris HCl; 40ml de EDTA 0,5M pH 8,0; completar para 1 litro de água destilada agitando para que ocorra a homogeneização.

Anexo 14 – Protocolo para utilização do sistema ALFexpress®, e descrição da confecção do gel de poliacrilamida empregado.

Anexo 15 - Quadro 2: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS390 para 30 indivíduos brasileiros (parte I)

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
2	01	DYS390	DYS390	210,4	210,4	211
3	02	DYS390	DYS390	209,4	209,4	211
4	03	DYS390	DYS390	206,5	206,5	207
5	04	DYS390	DYS390	208,4	208,4	207
6	05	DYS390	DYS390	213,8	213,8	215
7	06	DYS390	DYS390	209,6	209,6	211
8	50-500	DYS390		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
9	07	DYS390	DYS390	212,3	212,3	211
10	08	DYS390	DYS390	214,9	214,9	215
11	09	DYS390	DYS390	212,2	212,2	211
12	10	DYS390	DYS390	208,5	208,5	207
13	11	DYS390	DYS390	216,4	216,4	215
14	12	DYS390	DYS390	212,0	212,0	211
15	50-500	DYS390		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
16	13	DYS390	DYS390	212,4	212,4	211
17	14	DYS390	DYS390	210,0	210,0	211
18	15	DYS390	DYS390	210,8	210,8	211
19	16	DYS390	DYS390	208,8	208,8	207
20	17	DYS390	DYS390	223,7	223,7	223
21	18	DYS390	DYS390	215,0	215,0	215
22	50-500	DYS390		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	

For research use only.

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
22	50-500	DYS390		#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
23	19	DYS390	DYS390	211,1	211,1	211
24	20	DYS390	DYS390	214,2	214,2	215
25	21	DYS390	DYS390	213,3	213,3	215
26	22	DYS390	DYS390	210,4	210,4	211
27	23	DYS390	DYS390	206,3	206,3	207
28	24	DYS390	DYS390	212,7	212,7	211
29	50-500	DYS390		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
31	26	DYS390	DYS390	216,4	216,4	215
35	30	DYS390	DYS390	211,4	211,4	211
36	50-500	DYS390		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
37	31	DYS390	DYS390	215,2	215,2	215
38	32	DYS390	DYS390	214,2	214,2	215
39	33	DYS390	DYS390	215,7	215,7	215
40	34	DYS390	DYS390	220,3	220,3	219

Anexo 16 – Quadro 3: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS390 para 27 indivíduos brasileiros (parte II)

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
2	35	Y390	DYS390	215,6	215,6	215
3	36		DYS390	214,9	214,9	215
4	37		DYS390	218,6	218,6	219
6	39		DYS390	214,8	214,8	215
7	40		DYS390	207,2	207,2	207
8	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
9	41		DYS390	212,0	212,0	211
10	42		DYS390	216,0	216,0	215
11	43		DYS390	216,9	216,9	215
12	44		DYS390	215,5	215,5	215
13	45		DYS390	211,7	211,7	211
14	46		DYS390	220,1	220,1	219
15	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
16	47		DYS390	215,6	215,6	215
17	48		DYS390	215,6	215,6	215
19	50		DYS390	215,9	215,9	215
20	51		DYS390	211,4	211,4	211
21	52		DYS390	215,5	215,5	215
22	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	

For research use only.

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
22	50-500			#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
24	54		DYS390	215,4	215,4	215
26	56		DYS390	215,6	215,6	215
27	57		DYS390	212,9	212,9	211
28	58		DYS390	217,5	217,5	219
29	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
30	59		DYS390	215,6	215,6	215
32	61		DYS390	214,9	214,9	215
33	62		DYS390	206,8	206,8	207
36	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
37	65		DYS390	215,9	215,9	215
38	66		DYS390	211,5	211,5	211
39	67		DYS390	207,5	207,5	207
40	68		DYS390	215,6	215,6	215

Anexo 17 – Quadro 4: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS390 para 28 indivíduos brasileiros (parte III)

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
2	69		DYS390	214,4	214,4	215
3	70		DYS390	207,2	207,2	207
4	71		DYS390	210,5	210,5	211
5	72		DYS390	209,1	209,1	211
7	74		DYS390	202,3	202,3	203
8	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
9	75		DYS390	214,2	214,2	215
10	76		DYS390	205,6	205,6	207
11	77		DYS390	205,4	205,4	207
12	78		DYS390	214,2	214,2	215
13	79		DYS390	213,5	213,5	215
14	80		DYS390	210,1	210,1	211
15	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
16	81		DYS390	203,1	203,1	203
17	82		DYS390	218,4	218,4	219
18	83		DYS390	209,7	209,7	211
20	85		DYS390	210,6	210,6	211
22	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
23	87		DYS390	215,5	215,5	215
24	88		DYS390	215,5	215,5	215
25	89		DYS390	212,0	212,0	211
26	90		DYS390	220,9	220,9	219
27	91		DYS390	220,6	220,6	219

For research use only.

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
28	92		DYS390	216,2	216,2	215
29	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
30	93		DYS390	205,3	205,3	207
31	94		DYS390	213,7	213,7	215
32	95		DYS390	209,5	209,5	211
33	96		DYS390	209,0	209,0	207
34	97		DYS390	205,2	205,2	207
35	98		DYS390	205,7	205,7	207
36	99		DYS390	210,2	210,2	211

Anexo 18 - Quadro 5: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS391 para 32 indivíduos brasileiros (parte I)

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
2	1	Y391	DYS391	284,3	284,3	283
3	2		DYS391	284,5	284,5	283
4	3		DYS391	285,2	285,2	287
5	4		DYS391	282,2	282,2	283
6	5		DYS391	284,9	284,9	283
7	6		DYS391	286,5	286,5	287
8	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
9	7		DYS391	289,0	289,0	291
10	8		DYS391	287,8	287,8	287
11	9		DYS391	280,1	280,1	279
12	10		DYS391	281,0	281,0	283
13	11		DYS391	282,6	282,6	283
14	12		DYS391	280,1	280,1	279
15	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
16	13		DYS391	286,8	286,8	287
17	14		DYS391	285,3	285,3	287
18	15		DYS391	281,2	281,2	283
19	16		DYS391	281,7	281,7	283
20	17		DYS391	289,6	289,6	291
21	18		DYS391	288,8	288,8	287
22	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	

For research use only.

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
22	50-500			#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
23	19		DYS391	283,9	283,9	283
24	20		DYS391	291,4	291,4	291
25	21		DYS391	288,7	288,7	287
26	22		DYS391	276,2	276,2	275
27	23		DYS391	282,4	282,4	283
28	24		DYS391	291,0	291,0	291
29	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
30	25		DYS391	290,7	290,7	291
31	26		DYS391	295,7	295,7	295
32	27		DYS391	277,6	277,6	279
34	29		DYS391	279,3	279,3	279
35	30		DYS391	283,8	283,8	283
36	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
38	32		DYS391	287,2	287,2	287
39	33		DYS391	281,4	281,4	283
40	34		DYS391	293,5	293,5	295

Anexo 19 - Quadro 6: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS391 para 30 indivíduos brasileiros (parte II)

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
3	36	DYS391	DYS391	287,8	287,8	287
4	37	DYS391	DYS391	288,3	288,3	287
5	38	DYS391	DYS391	292,8	292,8	291
6	39	DYS391	DYS391	293,0	293,0	291
7	40	DYS391	DYS391	288,6	288,6	287
8	50-500	DYS391		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
9	41	DYS391	DYS391	289,2	289,2	291
10	42	DYS391	DYS391	289,7	289,7	291
11	43	DYS391	DYS391	288,1	288,1	287
12	44	DYS391	DYS391	288,7	288,7	287
13	45	DYS391	DYS391	289,6	289,6	291
14	46	DYS391	DYS391	289,4	289,4	291
15	50-500	DYS391		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
16	47	DYS391	DYS391	294,9	294,9	295
17	48	DYS391	DYS391	285,2	285,2	287
18	49	DYS391	DYS391	292,3	292,3	291
19	50	DYS391	DYS391	296,3	296,3	295
20	51	DYS391	DYS391	290,1	290,1	291
21	52	DYS391	DYS391	289,6	289,6	291
22	50-500	DYS391		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	

For research use only.

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
22	50-500	DYS391		#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
24	54	DYS391	DYS391	292,4	292,4	291
25	55	DYS391	DYS391	292,1	292,1	291
27	57	DYS391	DYS391	287,3	287,3	287
28	58	DYS391	DYS391	287,4	287,4	287
29	50-500	DYS391		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
30	59	DYS391	DYS391	287,9	287,9	287
32	61	DYS391	DYS391	281,8	281,8	283
33	62	DYS391	DYS391	288,2	288,2	287
34	63	DYS391	DYS391	291,6	291,6	291
35	64	DYS391	DYS391	293,1	293,1	295
36	50-500	DYS391		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
37	65	DYS391	DYS391	288,2	288,2	287
38	66	DYS391	DYS391	286,4	286,4	287
39	67	DYS391	DYS391	286,0	286,0	287
40	68	DYS391	DYS391	291,2	291,2	291

Anexo 20 - Quadro 7: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS 391 para 31 indivíduos brasileiros (parte III)

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
2	69	Y391	DYS391	291,4	291,4	291
3	70		DYS391	283,3	283,3	283
4	71		DYS391	281,6	281,6	283
5	72		DYS391	279,7	279,7	279
6	73		DYS391	291,2	291,2	291
7	74		DYS391	288,0	288,0	287
8	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
9	75		DYS391	286,9	286,9	287
10	76		DYS391	291,6	291,6	291
11	77		DYS391	287,5	287,5	287
12	78		DYS391	288,1	288,1	287
13	79		DYS391	286,5	286,5	287
14	80		DYS391	284,9	284,9	283
15	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
16	81		DYS391	287,5	287,5	287
17	82		DYS391	288,3	288,3	287
18	83		DYS391	292,3	292,3	291
19	84		DYS391	291,8	291,8	291
20	85		DYS391	287,4	287,4	287
21	86		DYS391	287,1	287,1	287
22	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
23	87		DYS391	285,3	285,3	287
24	88		DYS391	291,0	291,0	291

For research use only.

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
25	89		DYS391	290,1	290,1	291
26	90		DYS391	290,7	290,7	291
27	91		DYS391	289,8	289,8	291
28	92		DYS391	289,9	289,9	291
29	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
30	93		DYS391	286,3	286,3	287
31	94		DYS391	290,1	290,1	291
32	95		DYS391	292,8	292,8	291
33	96		DYS391	291,0	291,0	291
34	97		DYS391	287,7	287,7	287
35	98		DYS391	290,7	290,7	291
37	100		DYS391	285,2	285,2	287

Anexo 21 - Quadro 8: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS 393 para 32 indivíduos brasileiros (parte I)

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
2	1	Y393	DYS393	125,6	125,6	127
3	2		DYS393	120,6	120,6	119
4	3		DYS393	121,2	121,2	123
6	5		DYS393	122,1	122,1	123
7	6		DYS393	118,6	118,6	119
8	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
9	7		DYS393	119,3	119,3	119
10	8		DYS393	123,0	123,0	123
11	9		DYS393	122,6	122,6	123
12	10		DYS393	117,9	117,9	119
13	11		DYS393	125,6	125,6	127
14	12		DYS393	117,9	117,9	119
15	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
16	13		DYS393	121,6	121,6	123
17	14		DYS393	121,7	121,7	123
18	15		DYS393	125,6	125,6	127
19	16		DYS393	123,3	123,3	123
20	17		DYS393	122,1	122,1	123
21	18		DYS393	118,9	118,9	119
22	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	

For research use only.

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
22	50-500			#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
23	19		DYS393	118,6	118,6	119
24	20		DYS393	118,2	118,2	119
25	21		DYS393	120,8	120,8	119
26	22		DYS393	121,2	121,2	123
27	23		DYS393	121,3	121,3	123
28	24		DYS393	121,6	121,6	123
29	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
30	25		DYS393	120,6	120,6	119
31	26		DYS393	120,2	120,2	119
32	27		DYS393	120,9	120,9	119
34	29		DYS393	117,0	117,0	115
35	30		DYS393	121,5	121,5	123
36	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
37	31		DYS393	121,9	121,9	123
38	32		DYS393	121,2	121,2	123
39	33		DYS393	121,6	121,6	123
40	34		DYS393	121,8	121,8	123

Anexo 22 - Quadro 9: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS 393 para 31 indivíduos brasileiros (parte II)

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
2	35	Y393	DYS393	120,1	120,1	119
3	36		DYS393	120,3	120,3	119
4	37		DYS393	120,9	120,9	119
5	38		DYS393	124,8	124,8	123
6	39		DYS393	121,5	121,5	123
7	40		DYS393	125,6	125,6	127
8	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
9	41		DYS393	116,5	116,5	115
10	42		DYS393	124,7	124,7	123
11	43		DYS393	120,3	120,3	119
12	44		DYS393	120,5	120,5	119
13	45		DYS393	120,7	120,7	119
14	46		DYS393	121,2	121,2	123
15	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
16	47		DYS393	120,9	120,9	119
17	48		DYS393	121,7	121,7	123
18	49		DYS393	122,2	122,2	123
19	50		DYS393	122,4	122,4	123
20	51		DYS393	122,3	122,3	123
21	52		DYS393	122,2	122,2	123
22	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	

For research use only.

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
22	50-500			#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
24	54		DYS393	122,1	122,1	123
25	55		DYS393	121,9	121,9	123
26	56		DYS393	117,7	117,7	119
27	57		DYS393	122,2	122,2	123
28	58		DYS393	122,8	122,8	123
29	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
30	59		DYS393	122,6	122,6	123
32	61		DYS393	120,7	120,7	119
33	62		DYS393	120,9	120,9	119
34	63		DYS393	121,9	121,9	123
35	64		DYS393	122,4	122,4	123
36	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
				#500,0	#500,0	
37	65		DYS393	122,1	122,1	123
38	66		DYS393	122,0	122,0	123
40	68		DYS393	122,0	122,0	123

Anexo 23 - Quadro 10: Resultados individuais da análise realizada do locus DYS 393 para 32 indivíduos brasileiros (parte III)



AlleleLocator

dys393~3.alx dys393-3.fmv

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
2	69	DYS393	DYS393	121,7	121,7	123
3	70	DYS393	DYS393	126,4	126,4	127
4	71	DYS393	DYS393	122,4	122,4	123
5	72	DYS393	DYS393	117,7	117,7	119
6	73	DYS393	DYS393	125,9	125,9	127
7	74	DYS393	DYS393	121,5	121,5	123
8	50-500	DYS393		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
9	75	DYS393	DYS393	121,7	121,7	123
10	76	DYS393	DYS393	118,6	118,6	119
11	77	DYS393	DYS393	121,8	121,8	123
12	78	DYS393	DYS393	116,8	116,8	115
13	79	DYS393	DYS393	119,7	119,7	119
14	80	DYS393	DYS393	120,7	120,7	119
15	50-500	DYS393		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
16	81	DYS393	DYS393	129,3	129,3	131
17	82	DYS393	DYS393	121,5	121,5	123
18	83	DYS393	DYS393	121,5	121,5	123
19	84	DYS393	DYS393	125,7	125,7	127
20	85	DYS393	DYS393	121,0	121,0	119
21	86	DYS393	DYS393	117,2	117,2	119
22	50-500	DYS393		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
23	87	DYS393	DYS393	121,2	121,2	123
24	88	DYS393	DYS393	118,0	118,0	119

For research use only.

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
25	89	DYS393	DYS393	116,5	116,5	115
26	90	DYS393	DYS393	120,3	120,3	119
27	91	DYS393	DYS393	120,8	120,8	119
28	92	DYS393	DYS393	120,3	120,3	119
29	50-500	DYS393		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
30	93	DYS393	DYS393	120,7	120,7	119
31	94	DYS393	DYS393	120,1	120,1	119
32	95	DYS393	DYS393	120,4	120,4	119
33	96	DYS393	DYS393	119,8	119,8	119
34	97	DYS393	DYS393	120,2	120,2	119
35	98	DYS393	DYS393	120,2	120,2	119
36	99	DYS393	DYS393	120,6	120,6	119
37	100	DYS393	DYS393	120,9	120,9	119

Anexo 24 - Quadro 11: Resultado das análises conjuntas dos fragmentos
amplificados do locus DYS393, utilizando-se DNAs de dente e saliva de mesmos
indivíduos

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
19	S1	DYS393	DYS393	129,0	129,0	131
20	S1*	DYS393	DYS393	129,0	129,0	131
21	D1	DYS393	DYS393	129,2	129,2	131
22	50-500	DYS393		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
23	S2	DYS393	DYS393	117,1	117,1	119
24	S2*	DYS393	DYS393	117,0	117,0	119
25	D2	DYS393	DYS393	117,3	117,3	119
26	S3	DYS393	DYS393	125,5	125,5	127
27	S3*	DYS393	DYS393	125,8	125,8	127
28	D3	DYS393	DYS393	125,4	125,4	127
29	50-500	DYS393		#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
30	S4	DYS393	DYS393	125,4	125,4	127
31	S4*	DYS393	DYS393	125,5	125,5	127
32	D4	DYS393	DYS393	125,5	125,5	127
33	S5	DYS393	DYS393	120,8	120,8	119
34	S5*	DYS393	DYS393	120,5	120,5	119
35	D5	DYS393	DYS393	120,6	120,6	119

For research use only.

Anexo 25 - Quadro 12: Resultados individuais da repetição da análise eletroforética dos locos DYS 390, DYS391 e DYS393 para 11, 3 e 3 indivíduos respectivamente (parte I)

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
3	31	dys391	DYS391	292,6	292,6	291
4	56	dys391	DYS391	288,6	288,6	287
5	60	dys391	DYS391	289,2	289,2	291
6	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
7	04	dys393	DYS393	#350,0	#350,0	
				117,8	117,8	119
10	60	dys393	DYS393	116,3	116,3	115
11	67	dys393	DYS393	124,3	124,3	123
12	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
13	25	dys390	DYS390	#350,0	#350,0	
				216,1	216,1	215
14	27	dys390	DYS390	216,6	216,6	215
16	29	dys390	DYS390	211,8	211,8	211
17	38	dys390	DYS390	215,5	215,5	215
18	49	dys390	DYS390	215,0	215,0	215
19	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
21	55	dys390	DYS390	#350,0	#350,0	
				213,7	213,7	215
23	63	dys390	DYS390	213,5	213,5	215
24	64	dys390	DYS390	214,6	214,6	215
25	73	dys390	DYS390	214,1	214,1	215
26	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	

For research use only.

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
26	50-500			#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
28	86	dys390	DYS390	213,2	213,2	215
29	100	dys390	DYS390	213,6	213,6	215

Anexo 26 - Quadro 13: Resultados individuais da repetição da análise eletroforética dos locos DYS 390, DYS391 e DYS393 para 4, 4 e 2 indivíduos respectivamente (parte II), há também a realização do primeiro teste com 3 amostras de saliva

Lane	Name	Comment	Locus	Peak Size	Corr Peak Size	Allele Size
16	28	DYS390	DYS390	216,1	216,1	215
17	53	DYS390	DYS390	212,8	212,8	211
18	60	DYS390	DYS390	211,9	211,9	211
19	84	DYS390	DYS390	214,9	214,9	215
20	28	DYS391	DYS391	286,9	286,9	287
21	35	DYS391	DYS391	295,3	295,3	295
22	53	DYS391	DYS391	286,6	286,6	287
23	99	DYS391	DYS391	295,0	295,0	295
24	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	
25	28	DYS393	DYS393	117,6	117,6	119
26	53	DYS393	DYS393	121,5	121,5	123
27	01-S	DYS393	DYS393	122,8	122,8	123
28	03-S	DYS393	DYS393	117,0	117,0	115
29	09-S	DYS393	DYS393	117,0	117,0	115
33	50-500			#50,0	#50,0	
				#100,0	#100,0	
				#150,0	#150,0	
				#200,0	#200,0	
				#250,0	#250,0	
				#300,0	#300,0	
				#350,0	#350,0	
				#400,0	#400,0	
				#450,0	#450,0	

For research use only.