RICARDO HENRIQUE ALVES DA SILVA

**ESTUDO DE FREQUÊNCIA ALÉLICA DE CINCO LOCI STR DO
CROMOSSOMO X NA POPULAÇÃO DO ESTADO DE SÃO
PAULO E SUA CONTRIBUIÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA**

São Paulo

2007

Ricardo Henrique Alves da Silva

**Estudo de frequência alélica de cinco loci STR do cromossomo X
na população do Estado de São Paulo e sua contribuição na
identificação humana**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo, para obter o
título de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Odontologia Social.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Nogueira de
Oliveira

São Paulo
2007

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Silva, Ricardo Henrique Alves da

Estudo de frequência alélica de cinco loci STR do cromossomo X na população do Estado de São Paulo e sua contribuição na identificação humana / Ricardo Henrique Alves da Silva; orientador Rogério Nogueira de Oliveira. -- São Paulo, 2007.

95p. : fig., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Odontologia Social) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Odontologia Legal – Identificação humana 2. Cromossomo X 3. DNA

CDD 614.1
BLACK D873

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, 12/06/2007

Assinatura:

E-mail: ricardohenrique@usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silva RHA. Estudo de frequência alélica de cinco loci STR do cromossomo X na população do Estado de São Paulo e sua contribuição na identificação humana [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, 12/06/2007.

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*“Se és capaz de manter a tua calma quando
Todo mundo ao redor já perdeu e te culpa;
De crer em ti quando estão todos duvidando,
E para esses, no entanto, achar uma desculpa;
Se és capaz de esperar sem te desesperares,
Ou enganado, não mentir ao mentiroso,
Ou, sendo odiado, sempre ao ódio te esquivares,
E não parecer bom demais, nem pretensioso;*

*Se és capaz de pensar - sem que a isso só te atires;
De sonhar – sem fazer dos sonhos os teus senhores;
Se encontrando a desgraça e o triunfo, conseguires
Tratar da mesma forma a esses dois impostores;
Se és capaz de sofrer a dor de ver mudadas
Em armadilhas as verdades que disseste,
E as coisas, por que deste a vida, esfaçalhadas,
E refazê-las com o bem pouco que te reste;*

*Se és capaz de arriscar numa única parada
Tudo quanto ganhaste em toda a tua vida,
E perder e, ao perder, sem nunca dizer nada,
Resignado, tornar ao ponto de partida;
De forçar coração, nervos, músculos, tudo
A dar seja o que for que neles ainda existe,
E a persistir assim quando, exaustos, contudo
Resta a vontade em ti que ainda ordena: “Persiste!”*

*Se és capaz de, entre a plebe, não te corromperes
E, entre reis, não perder a naturalidade,
E de amigos, quer bons, quer maus, te defenderes,
Se a todos podes ser de alguma utilidade,
E se és capaz de dar, segundo por segundo,
Ao minuto fatal todo o valor e brilho,
Tua é a terra com tudo o que existe no mundo
E o que é mais – tu serás um homem, ó meu filho!”*

(“Se”, Guilherme de Almeida)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a DEUS

Tu que és o brilho de toda a luz,
a luz de todo esplendor,
o esplendor de toda glória,
a glória de toda majestade,
a majestade de todo bem,
o bem de toda vida,
a vida de toda alma,
a alma de todo ser.

Sábio é o homem que Te escolhe por amigo!

Bem aventurado o homem que Te ama!

Feliz o homem que em Ti confia!

Obrigado, Meu Senhor e Meu Deus, por todas as oportunidades e por mais esta conquista!

Dedico este trabalho aos MEUS PAIS

Mãe e Pai, as palavras mais belas pronunciadas pelo ser humano! O que seria de mim sem vocês? Nada! Absolutamente nada! Vocês me deram a vida e tudo o que nela possuo!

A bondade presente em vocês, pai e mãe, surge de sua força interior e não por coisas que vêm de fora. Vocês são minha inspiração, nos bons e maus momentos! Sei que posso confiar e contar com vocês, SEMPRE!

Por todos os conselhos e incentivos, durante todos os momentos de minha vida! Vocês são os grandes responsáveis pelas minhas conquistas. Obrigado pelo amor e dedicação em prol de mais este sonho!

Dedico este trabalho a CARINA THAIS DE ALMEIDA

Teus olhos, meu fiel espelho; Tuas palavras, luz para os meus passos; Tuas mãos, minha segurança; Teus braços, o fim do meu cansaço; Tuas pegadas, setas para o meu caminho; Tua ausência, minha grande saudade; Teu sorriso, janela aberta do teu ser; Teu amor, minha certeza de felicidade.

Minha namorada e futura esposa, companheira de todos os momentos... Essa conquista, com todas as suas dificuldades, deve-se em grande parte a você! Já disse um grande músico, que para produzir uma bela obra de arte é preciso, primeiro, viver um grande amor! E você é o grande amor da minha vida!

Dedico esta conquista e todas as outras que virão ao sentimento que nos une e que congrega amor, companheirismo, alegria e esperança! Muito obrigado!

Dedico este trabalho ao PROF. DR. ROGÉRIO NOGUEIRA DE OLIVEIRA

Aristóteles disse, há muito tempo, que a felicidade reside na atividade, tanto física quanto mental. E reside em fazer coisas de que possa se orgulhar por fazer bem e, portanto, que tenha prazer em fazer!

Por isso, agradeço-lhe pela oportunidade concedida ao me aceitar como seu orientado neste curso de doutorado! Pela ética e dedicação com que me conduziu! Trabalhar com você foi uma experiência sem igual! Competência, paciência e dedicação estiveram sempre contigo no decorrer desse desafio. Saiba que conquistou mais do que um aluno... mas sim um amigo e admirador! Sempre que precisei estive disposto a ajudar e isso se reflete neste NOSSO trabalho! Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

*“Tudo tem seu tempo, há um momento oportuno,
para cada empreendimento debaixo do céu.
Tempo de nascer e tempo de morrer;
Tempo de plantar e tempo de colher a planta;
Tempo de matar e tempo de sarar;
Tempo de destruir e tempo de construir.
Tempo de chorar e tempo de rir;
Tempo de gemer e tempo de dançar;
Tempo de atirar pedras e tempo de ajuntá-las;
Tempo de abraçar e tempo de se separar.
Tempo de buscar e tempo de perder;
Tempo de guardar e tempo de jogar fora;
Tempo de rasgar e tempo de costurar;
Tempo de calar e tempo de falar.
Tempo de amar e tempo de odiar;
Tempo de guerra e tempo de paz.”*

(Eclesiastes 3,1-8)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, que me acolheu e me propiciou uma formação sem igual na pós-graduação.

Aos participantes da minha pesquisa, pela colaboração e receptividade, sem a qual este trabalho não teria sido concretizado.

A todos os professores do Departamento de Odontologia Social da FOU SP, em especial àqueles com os quais me envolvi profissionalmente, Prof. Dr. Moacyr da Silva, Prof. Dr. Rodolfo Melani, Prof. Dr. Dalton Ramos e Prof. Dr. Edgar Crosato, pelos ensinamentos ministrados e pela atenção dedicada a mim.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Social da FOU SP, pela contribuição em todos os momentos do curso de doutorado.

Aos amigos do doutorado e mestrado em Odontologia Social da FOU SP: Boing, Celso, Fausto, Gabriela bem como aos demais amigos ingressantes nos outros programas em 2005.

Ao Serviço de Documentação Odontológica da FOU SP, em especial a Sra. Vânia Funaro, pela atenção dispensada e dedicação em prol deste trabalho.

"Não viverei em vão, se puder salvar de partir-se um coração; Se eu puder aliviar uma vida sofrida, ou abrandar uma dor; Ou ajudar exangue passarinho a subir de novo ao ninho – Não viverei em vão."

Emily Dickinson

Ao Prof. Dr. Luis Marcelo Aranha Camargo, pelas oportunidades de pesquisa em Rondônia, pela amizade demonstrada e por sempre ajudar, em todos os momentos, fonte de inspiração e ombro amigo, apesar de toda a distância!

Ao Prof. Dr. Arsenio Sales Peres, pelas mãos de quem iniciei e fui incentivado a carreira acadêmica, obrigado pela atenção sempre dispensada a minha pessoa e pelas oportunidades que me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, a quem devo uma boa parte do meu ingresso neste doutorado, pela sua orientação e paciência na elaboração do projeto de pesquisa para participar do processo seletivo do doutorado na FOU SP, e pela colaboração sempre presente.

A Prof^a. Dr^a. Regina Maria Barreto Cicarelli, pela gentileza com que abriu as portas do Laboratório de Investigação de Paternidade da UNESP-Araraquara, possibilitando a execução dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Roberto de Magalhães Bastos, pela cordialidade e oportunidades, atendendo prontamente aos meus pedidos.

Ao Prof. Dr. Ernesto Piloto Gomes de Medeiros, pelas conversas, orientações e idéias, assim como na confiança depositada em meu trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Maria Fidela de Lima Navarro, por toda a dedicação nos momentos em que precisei de seus conselhos e orientações, meus sinceros agradecimentos.

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

Fernando Pessoa

Aos grandes amigos, presentes em todos os momentos, através de atos ou, ao menos, em palavras de conforto, dividindo angústias e sonhos, alegrias e desesperos, MUITO OBRIGADO: Juliano (Jaca), Thiago (Senil), Agnes, Gustavo (Bombom), Melina, Humberto (Sossego), Helena e Amauri, Renato (Índio), Aline, Luis Fernando, Glauco, Andrei, Léo, Cláudio Maurício, Haroldo e Patrícia, Juscelino, Débora, Mariana, Marina e Thiago (Camarão).

A Joyce (FCF/UNESP - Araraquara), inicialmente uma parceira profissional, hoje uma amiga com quem sei que posso contar sempre! Figura sem a qual esse trabalho teria demorado muito mais tempo para sair (se saísse)... Muito obrigado pela paciência e dom em ensinar! Você foi fundamental em todos os momentos dessa tese!

Ao Carlos e Daniel, com quem morei por pouco mais de um ano, em São Paulo, pela ajuda e pela amizade, espero, um dia, poder retribuir tudo o que fizeram por mim.

Aos pais da Carina, Sr. Júlio e D. Silvana, muito obrigado pelo apreço e carinho com que me tratam. Ao irmão da Carina, Julinho, pela paciência e bom-humor nas minhas estadias em Sorocaba. A Simone e ao Ulisses, tios da Carina, amigos, grandes incentivadores e companheiros nas “baladas” nos sábados bauruenses.

A Jamilly de Oliveira Musse e Carolina Góis, meu muito obrigado, pela amizade em todos os momentos do nosso curso de pós-graduação, pelos trabalhos desenvolvidos e pelos ensinamentos e “problemas” trocados.

"Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas."

Antoine Saint-Exupéry

À Universidade Paulista, pela oportunidade de trabalho e confiança depositada, em especial aos coordenadores dos cursos de graduação em que trabalho: Odontologia (Rubens Carneiro Valera), Fisioterapia (Vera Telles Nunes), Direito (Carlos Roberto Simioni), Enfermagem (Rosilene Reigotta) e Medicina Veterinária (Antônio Carlos Marconi Stipp). Bem como aos colegas de trabalho, professores e funcionários, e sem me esquecer, jamais, dos meus antigos e atuais alunos.

Aos que trabalham comigo, em projetos de pesquisa e atividades de extensão, obrigado pela parceria e colaboração.

Em especial a Suzana, César e Fernando, no, infelizmente extinto, Grupo de Pesquisa em Odontologia Legal, que rendeu ótimos frutos, sendo o principal deles a nossa amizade.

Aos orientados de iniciação científica da UNIP, Grasciele, Noeli, Déborah e Franciane, pela confiança depositada neste professor e pela paciência na “divisão” de horários.

A ex-diretora da FOB-USP, Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro e ao atual diretor da FOB-USP, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, bem como a Denise (Setor de Transportes da FOB-USP), pelas inúmeras caronas concedidas em viagens a São Paulo, minha eterna gratidão.

Aos motoristas da FOB-USP e PCAB, pela ajuda nas viagens a São Paulo, em especial ao Vespa, “Seu” Garcia e “Seu” Joaquim, com quem fiz a maioria da viagens, sendo exemplos de bom-humor e profissionalismo.

Aos funcionários e proprietárias do Laboratório Biocod, em Belo Horizonte (MG), pela oportunidade da realização do trabalho e pela cordialidade com que me receberam.

Ao Ademir (biblioteca da FOB-USP) pela ajuda com os meus comuts (que foram muitos), seu profissionalismo e dedicação também se refletem neste trabalho.

Aos professores das disciplinas de pós-graduação que cursei durante este doutorado, pelos ensinamentos que me proporcionaram crescimento pessoal e

profissional, meus mais sinceros agradecimentos, em especial a: Prof^a. Gilka Gattás (FM-USP), Prof^a. Rachel Stajn (FD-USP), Prof. Reinaldo Ayer (FM-USP), Prof^a. Alice Chasin (FCF-USP) e Prof. Paulo Otto (IB-USP).

A todos os demais que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho e com a minha formação, meus mais sinceros agradecimentos.

*"Há pessoas que nos falam e nem as escutamos;
Há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam;
Mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossa
vida e nos marcam para sempre."*

Cecília Meireles

Silva RHA. Estudo de frequência alélica de cinco loci STR do cromossomo X na população do Estado de São Paulo e sua contribuição na identificação humana [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

A identificação forense através da análise de ácidos nucleicos é realizada, freqüentemente, pelo estudo de regiões polimórficas do DNA, tais como os STRs, regiões que apresentam repetições consecutivas curtas. Para a utilização destes marcadores na identificação humana é necessário conhecer a distribuição de seus alelos na população a qual o indivíduo pertence, visto que essa varia entre diferentes populações. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo determinar a frequência alélica de cinco STRs do cromossomo X (DXS6854, DXS7424, DXS101, DXS6808 e DXS7132), a fim de avaliar a contribuição destes marcadores, através de cálculos estatísticos, na prática forense e em testes de paternidade. Foram coletadas amostras de esfregaço bucal, através de swab bucal, sendo depositado em cartão de coleta, e/ou sangue, através de punção digital depositada em cartão de coleta, em 243 sujeitos da pesquisa, sendo estes indivíduos não aparentados, residentes no Estado de São Paulo. A extração do DNA foi realizada a partir do Kit DNA IQ® (Promega), de acordo com as normas do fabricante e, na reação de PCR, utilizou-se um multiplex desenvolvido pela empresa BIOCOD (Belo Horizonte, MG), sendo a tipagem dos loci obtida através de corrida eletroforética, em gel de poliacrilamida desnaturante, no seqüenciador automático AlfExpress® (Amersham Biosciences). Os resultados foram analisados através dos programas PowerStats ver. 12 (Promega®) e Arlequin ver. 3.1. Como resultados

principais foram observados: a grande variabilidade de alelos presentes na população estudada para os STRs selecionados; que o Poder de Discriminação em mulheres variou de 0,658 (DXS6808) a 0,975 (DXS101), assim como em homens entre 0,451 (DXS6808) e 0,881 (DXS101); as chances de exclusão foram calculadas em duas situações, par pai/filha (MEC_D) e trio pai/mãe/filha (MEC_T), sendo os melhores resultados apresentados pelo DXS101; além de verificar que a diversidade haplotípica (nas amostras masculinas) foi de 0,9993, indicando uma Probabilidade de Coincidência menor que 0,0007. Sendo assim, é possível concluir que, com exceção do DXS6808, os demais loci STR permitem uma boa aplicação na prática forense, permitindo sua utilização para cálculo estatístico em análises de identificação humana e testes de parentesco.

Palavras-Chave: Identificação humana; Odontologia Legal; DNA; Cromossomo X.

Silva RHA. Study of allelic frequency of five X-Chromosome's loci STR on Sao Paulo State people and its role in human identification [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

The forensic identification through DNA analysis is, frequently, done by the study of DNA's polymorphic regions, such as STR, short tandem repeats. In order to use these markers in human identification, it's necessary to know the allelic distribution in the population in wich the person belongs. This research aimed to settle the allelic frequencies of five X-chromosome's STR (DXS6854, DXS7424, DXS101, DXS6808 e DXS7132) and analysis the contribution of these markers, through statistical parameters, in forensic activities and paternity tests. For this, samples of oral rub were collected by oral swab, being deposited on collect card, and/or blood by digital puncture, deposited on collect card, with 243 research subject, being not related, living at Sao Paulo State, Brazil. The DNA extraction was performed using Kit DNA IQ[®] (Promega), according to manufacturer rules and, at PCR, was used a multiplex developed by BIOCOD (Belo Horizonte, Minas Gerais State), being the loci typifying obtained by eletrophoretical procedure, on polyacrilamid gel, using AlfExpress[®] (Amersham Biosciences). The results were statistically analyzed by PowerStats ver. 12 (Promega[®]) and Arlequin ver. 3.1 programs. The principal results showed: the great allele variability in this population sample to the selected STRs; that Power of Discrimination in women varied from 0.658 (DXS6808) to 0.975 (DXS101), as well as in men between 0.451 (DXS6808) and 0.881 (DXS101); the mean exclusion chance were calculated at two conditions, pair father/daughter (MEC_D) and trios involving

daughters (MEC_T), being the best results performed by DXS101; and verify that haplotipical diversity (in men samples) was 0.9993, showing a Chance of Coincidence under 0.0007. In this way, it's possible to conclude that, with exception of DXS6808, the other STRs loci studied can be used at forensic practice, using for statistical math in human identification and kinship testing.

Keywords: Human identification; Forensic Dentistry; DNA; X-Chromosome.

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Identificação Humana.....	22
2.2 Odontologia Legal e o papel na identificação humana.....	24
2.3 Biologia molecular aplicada à identificação humana: atuação em Odontologia Legal.....	27
2.3.1 Aspectos históricos.....	28
2.3.2 Estrutura do DNA: breve relato.....	29
2.3.3 Técnicas de biologia molecular aplicada a Odontologia Legal.....	32
2.3.4 Os estudos de frequência e a importância na investigação forense.....	38
2.3.5 Cromossomo X.....	40
3 PROPOSIÇÃO.....	44
4 CASUÍSTICA - MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Aspectos Éticos.....	45
4.2 Casuística.....	45
4.3 Extração do DNA.....	46
4.4 Reações de PCR.....	47
4.4.1 Método Monoplex.....	50
4.4.2 Método Multiplex.....	50
4.5 Obtenção dos padrões internos da corrida....	52
4.6 Eletroforese e detecção dos produtos de PCR.....	54
4.7 Análise dos perfis alélicos.....	55
4.8 Análise estatística dos resultados.....	60
5 RESULTADOS.....	63
6 DISCUSSÃO.....	73

	p.
7 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO.....	95

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, a profissão odontológica foi construída no decorrer dos tempos, primeiramente exercida por sacerdotes e médicos para, a seguir, ser relegada às mãos de charlatões, até encontrar um segmento profissional que se dedicasse a ela (ALMEIDA; VENDÚSCULO; MESTRINER-JUNIOR, 2002).

O aparecimento da disciplina de Odontologia Legal ocorreu somente na edição da grade curricular estabelecida pelo Decreto 19.852 (CORRÊA, 1976), editado em 1931:

1º Ano – anatomia, fisiologia, histologia e microbiologia, metalurgia e química aplicadas.

2º Ano – clínica odontológica (1ª cadeira), higiene e odontologia legal, prótese dentária, técnica odontológica.

3º Ano - clínica odontológica (2ª cadeira), patologia e terapêutica aplicadas, prótese buco-facial, ortodontia e odontopediatria.

Desde então, esta especialidade não parou mais de se desenvolver, demonstrando, nos últimos tempos, uma notável maturidade científica e profissional, sendo a Antropologia Forense uma das áreas que melhor exemplifica esta evolução, passando das etapas de simples observações e chegando, atualmente, a sofisticados testes laboratoriais, incluindo exames genéticos.

A revolução causada com a descoberta, por Watson e Crick, em 1953, da estrutura em dupla hélice do DNA, componente responsável pelo patrimônio genético dos seres vivos, ocasionou mudanças importantes em praticamente todas as áreas da ciência, surgindo, a partir de então, técnicas capazes de caracterizar, no DNA, as particularidades de cada pessoa (SANTOS et al., 2004).

Desta forma, as técnicas de identificação estão bem estabelecidas com a utilização de regiões polimórficas do DNA, como um processo seguro, com alto poder de discriminação e alta confiabilidade, sendo aceitos como prova legal, em

casos judiciais, como inclusão e exclusão de paternidade, e na identificação humana (PARDINI et al., 2001; SILVA; OLIVEIRA, 2006).

Há um número variado de materiais biológicos para obtenção do DNA e realização de testes laboratoriais de identificação humana, como tecido ósseo, bulbo capilar, material de biópsia, saliva, sangue, entre outros. É possível obter DNA de praticamente todos os tecidos do corpo humano, variando apenas a quantidade de DNA que é possível extrair de cada um desses tecidos (RUDIN; INMAN, 2002).

A já consagrada importância da Odontologia Legal para a identificação humana, principalmente em casos onde pouco se resta para proceder esta identificação (incêndios, explosões, corpos em decomposição ou esqueletizados), forçou os cirurgiões-dentistas, ligados à investigação forense, a se familiarizarem com as novas tecnologias da biologia molecular, haja vista que o principal objetivo da análise forense de DNA é obter a identificação correta de um indivíduo com a menor probabilidade de erro, sendo recomendado o emprego de equipes multiprofissionais, somando-se conhecimentos e experiências diversificadas (REMUALDO; OLIVEIRA, 2005; SILVA et al., 2006; SYRJÄEN; SAINIO, 1990).

Nesse contexto, a colaboração da Odontologia Legal nos processos de identificação humana *post-mortem* tem valor irrefutável, desenvolvendo um papel fundamental na identificação daqueles indivíduos que não podem ser identificados visualmente ou por outros meios (CALABREZ; SALDANHA, 1997; GLASS, 2002; SWEET, 2001).

Entre as técnicas mais utilizadas atualmente para identificação forense, fazendo uso da biologia molecular, encontra-se a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), para amplificar regiões polimórficas como STRs do DNA genômico. Porém, é fundamental para os cálculos estatísticos que se conheça a distribuição

alélica dos STRs analisados, pois já está demonstrado que existem particularidades populacionais na distribuição dos alelos (TRACEY, 2001).

O que tem sido utilizado na prática, em rotina de paternidade, são frequências de populações estrangeiras, normalmente fornecidas juntamente com os kits de STR utilizados, o que, apesar da existência de diferenças populacionais no conjunto dos STRs analisados, acaba não comprometendo muito os resultados. Mas nos casos criminais, onde a quantidade de amostra é pequena e/ou está bastante degradada, a recuperação e/ou amplificação do DNA genômico fica prejudicada (SZIBOR et al., 2003), o que dificulta a amplificação de todo o conjunto de STRs comumente analisados, tornando imprescindível o conhecimento da distribuição de frequência dos alelos particulares daquela população.

No caso do Brasil, os dados genético-populacionais de STRs autossômicos e do cromossomo Y são disponíveis na literatura especializada (GOIS, 2006; OZAKI, 1999; PENA et al., 2000), mas em se tratando do cromossomo X, foco central deste estudo, não existem publicações divulgadas e disponíveis até o momento.

A obtenção das frequências de STRs do cromossomo X na população estudada pode assegurar o poder de discriminação, eliminando (ou minimizando), a índices cada vez menores, a probabilidade de falsa inclusão em casos de paternidade ou na identificação forense, sendo que a análise de marcadores do cromossomo X irá auxiliar, como mais uma evidência genética, na resolução de casos (investigação de paternidade e criminal), pois seus marcadores podem ser mais discriminativos, sendo necessário um número menor destes para auxiliar em tal identificação, pois, normalmente, em testes de identificação humana são utilizados os STRs autossômicos para os quais já existem alguns dados publicados para a população brasileira. Contudo, em situações de reconstrução (suposto pai não está

presente e analisam-se seus parentes) nem sempre tais marcadores são suficientes para solucionar o caso, sendo necessário que demais marcadores sejam também analisados (SZIBOR et al., 2003).

Também há, em vários países do mundo, bancos de dados, que são desenvolvidos e alimentados por laboratórios forenses e universidades, tais como o Banco Mundial do cromossomo Y (*Y-STR Haplotype Reference Database*), de acesso livre, e o sistema CODIS (*Combined DNA Index System*) do Laboratório do FBI (*Federal Bureau of Investigation*), nos Estados Unidos, cuja aplicação é em investigações criminais e não tem acesso livre, apenas mediante compra e incorporação do sistema (BUTLER, 2005).

Mais recentemente, foi anunciada a abertura de uma nova página na internet, a qual contém uma base de dados corrente sobre pesquisas no cromossomo X usado para propostas forenses, antropologia evolucionária e outras pesquisas genéticas (SZIBOR; HERING; EDELMANN, 2006).

O Brasil, com sua população de proporções continentais, altamente polimórfica, em virtude de sua miscigenação, necessita urgentemente participar dessas iniciativas que poderão, em médio prazo, auxiliar na identificação forense. Diante disso, o presente estudo propô-se a realizar uma análise da frequência alélica de cinco loci STR do cromossomo X, em população residente no Estado de São Paulo, a fim de viabilizar a sua aplicação em casos de investigação de paternidade e forenses, através da utilização de parâmetros estatísticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Identificação Humana

A Antropologia Forense é a aplicação prática ao Direito de um conjunto de conhecimentos da Antropologia Geral visando, principalmente, a questões relativas à identidade médico-legal e à identidade judiciária ou policial, definindo-se como identidade, o conjunto de caracteres próprios e exclusivos das pessoas, dos animais, das coisas e dos objetos, sendo a soma de sinais, marcas e caracteres positivos ou negativos que, no conjunto, individualizam o ser humano ou uma coisa, distinguindo-o dos demais (CROCE; CROCE-JUNIOR, 2004).

Há vários métodos aceitáveis de identificação humana, cada um com as suas limitações. Historicamente, as impressões digitais têm sido usadas para identificação, porém, em algumas situações tais como fogo e esqueletização, são facilmente destruídas; já a identificação através de exames genéticos é uma importante e confiável ferramenta, mas, assim como a datiloscopia, também tem a necessidade de um registro anterior ou algum descendente, e a análise antropológica pode prover informações úteis quanto à estatura, raça, gênero, mas não produz a identificação individual (GLASS, 2002).

Desta forma, a identificação humana post-mortem é uma das grandes áreas de estudo e pesquisa da Odontologia Legal e Medicina Legal, haja vista que as duas ciências trabalham com o mesmo material, o corpo humano, em várias condições (espotejados, dilacerados, carbonizados, macerados, putrefeitos, em esqueletização

e esqueletizados), buscando estabelecer a identidade humana (OLIVEIRA et al., 1998).

De acordo com Sweet (2001), devido ao fato de todos os seres humanos possuírem uma identidade em vida, a sociedade requer que esta identidade seja reconhecida após a morte, tanto para o conforto dos familiares da vítima quanto para a resolução de questões jurídicas. Além disso, a identificação humana constitui-se em um problema de importância jurídica, devido à necessidade de investigação, uma vez que as autoridades judiciárias visam à apuração da responsabilidade, mesmo em um caso de suicídio (MIYAJIMA; DARUGE; DARUGE-JUNIOR, 2001).

Os requisitos técnicos dos métodos de identificação, qualquer que seja o preconizado, para ser utilizado na prática, prevê cinco requisitos: unicidade (os elementos escolhidos para identificação devem permitir a distinção precisa e clara, entre o identificando e os demais); imutabilidade (as características consideradas não devem sofrer alteração com o passar do tempo); perenidade (os dados escolhidos para análise devem perdurar por toda a vida); praticabilidade (permitir àqueles que irão colher os dados de identificação, uma tomada segura e rápida, que não cause constrangimento ao identificando e permita um bom grau de segurança e confiabilidade); classificabilidade (deve permitir a comparação entre os dados, de forma sistemática e precisa, de maneira a apontar rapidamente o identificado em uma população) (DEL-CAMPO, 2006).

No entanto, é importante considerarmos que a identidade pode ser estudada nos seus aspectos subjetivos e objetivos. No subjetivo, estuda-se a noção que cada indivíduo tem de si mesmo, no tempo e no espaço, e a consciência do eu. Já a identidade objetiva é o conjunto de caracteres físicos, funcionais ou psíquicos,

normais ou patológicos, que individualizam determinada pessoa (OLIVEIRA et al., 1998; SOUZA-LIMA, 1996).

Ao se trabalhar com a identidade humana, é importante ressaltar a diferença entre reconhecimento e identificação, onde o primeiro pode ser entendido como uma identificação empírica, sem critérios científicos (através de visualização por parentes e/ou conhecidos). Já a identificação estabelece-se pelo uso de técnicas e métodos cientificamente comprovados (DEL-CAMPO, 2006; OLIVEIRA et al., 1998; SILVA; SALES-PERES, 2004).

Existem dois tipos de processos de identificação humana: o comparativo e o reconstutivo, sendo o primeiro baseado em registros anteriores ao óbito, permitindo a identificação personalista ou individual, possível de ser realizado através da utilização de registros médicos e prontuários odontológicos. Já no processo reconstutivo, não se têm dados anteriores à morte do indivíduo e procura-se realizar a identificação geral definindo-se, por exemplo, o gênero, a idade e a etnia (SASSOUNI, 1963).

2.2 Odontologia Legal e o papel na identificação humana

A competência legal do cirurgião-dentista para atuação em casos periciais vem da Lei 5081/66 (BRASIL, 1966), que regulamenta:

Art. 6º. Compete ao cirurgião-dentista:

I - praticar todos os atos pertinentes a Odontologia, decorrentes de conhecimentos adquiridos em curso regular ou em cursos de pós-graduação;
(...)

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

Além disso, a Resolução CFO 63/2005 regulamenta, através de seu artigo 64, as áreas de atuação do profissional especialista em Odontologia Legal (BRASIL, 2005):

Art. 28. As áreas de competência para atuação do especialista em Odontologia Legal incluem:

- a) Identificação humana;
- b) Perícia em foro civil, criminal e trabalhista;
- c) Perícia em área administrativa;
- d) Perícia, avaliação e planejamento em infortunistica;
- e) Tanatologia forense;
- f) Elaboração de: 1) autos, laudos e pareceres; 2) relatórios e atestados;
- g) Traumatologia odonto-legal;
- h) Balística forense;
- i) Perícia logística no vivo, no morto, íntegro ou em suas partes em fragmentos;
- j) Perícia em vestígios correlatos, inclusive de manchas ou líquidos oriundos da cavidade bucal ou nela presentes;
- l) Exames por imagem para fins periciais;
- m) Deontologia odontológica;
- n) Orientação odonto-legal para o exercício profissional;
- o) Exames por imagens para fins odonto- legais.

Conforme descreve Glass (2002), a Odontologia Legal é a aplicação da arte e ciência da Odontologia em questões jurídicas e, mais especificamente, a prática dessa especialidade lida com identificação humana a partir de registros dentários, identificação de marcas de mordida, traumatologia e erro profissional.

Na busca pela identidade humana, o profissional de Odontologia desempenha papel fundamental, descrito por Sweet (2001), ao ressaltar que, atualmente, existem três tipos de identificação onde se utilizam caracteres bucais, sendo que, dois deles têm sido usados por muitas décadas e configuram-se como responsabilidades primárias do odontologista. O primeiro é denominado de identificação dentária comparativa e envolve a comparação dos registros *ante-mortem* e *post-mortem*; o segundo, composto pela reconstrução do perfil dentário *post-mortem*, é usado em casos onde não há suspeita de quem pode ser a pessoa ou seus descendentes; e, o terceiro, trabalha na aplicação das modernas técnicas de perfil de DNA a fim de se estabelecer a identidade.

Sendo assim, a colaboração da Odontologia Legal na Antropologia Forense pode ser verificada através da identificação humana em restos corporais, tais como crânio, trabalhando através de comparação com registros dentários, fotos e prontuários (KEISER-NIELSEN; STROM, 1983; MIYAJIMA; DARUGE; DARUGE-JUNIOR, 2001), assim como em acidentes de massa, a fim de diferenciar as pessoas presentes no evento, exemplificados pelas seguintes situações: desastres naturais, tais como os tsunâmis ocorridos em 2004 (LAU; TAN; TAN, 2005; MORGAN et al., 2006), acidentes de ônibus seguidos de carbonização das vítimas (VALENZUELA et al., 2000; VALENZUELA et al., 2002), acidentes aéreos (FERREIRA, 1996; LUDES et al., 1994; NAMBIAR; JALIL; SINGH, 1997), incêndios (CAMPOBASSO; FALAMINGO; VINCI, 2003), acidentes ferroviários (DUMANCIC et al., 2001), acidentes militares e guerras (BRANNON; MORLANG, 2004).

Por isso Rothwell, Haglund e Morton-Junior (1989) esclarecem que a Odontologia Legal possui papel preponderante na identificação de remanescentes corpóreos, para certificação da identidade de pessoas falecidas. Idéia essa reforçada por Oliveira et al. (1998) ao afirmar que o campo de atuação do odontologista não se restringe ao exame dos vestígios dentários, mas estendem-se a várias áreas, tais como a antropologia, genética, bioquímica, balística forense, tanatologia e traumatologia forense, radiologia, prosopografia e mixagem de imagens.

Este complexo contexto da busca pela identidade humana requer o empenho de profissionais com experiências variadas, de maneira que a solução desses casos deve ser conduzida por uma equipe capaz de utilizar desde metodologias consagradas, como as fornecidas pela Antropologia Física, aos novos recursos da

biologia molecular (BILGE et al., 2003; ISCAN; OLIVEIRA, 2000; SALES-PERES et al., 2006; SILVA et al., 2006).

A Odontologia Legal estabelece-se, dessa maneira, como ciência importante e indispensável na resolução de problemas médico-legais e, em particular, na identificação post-mortem, sendo que muito do conhecimento necessário para tal prática é oriundo de pesquisas básicas, experiência clínica e avanços na Odontologia como um todo (WHITTAKER, 1982).

2.3 Biologia molecular aplicada à identificação humana: atuação em Odontologia Legal

Apesar do auxílio inestimável dos estudos antropométricos, sua aplicação não possibilita a individualização, ou seja, a nomeação exata do examinando. Neste aspecto, através da aplicação de recursos da biologia molecular é possível identificar uma pessoa mesmo sem informações *ante-mortem* de ordem física, tais 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 (PRETTY; SWEET, 2001).

Os testes de DNA realizados hoje são de alta confiabilidade, sendo aceitos como prova legal em casos judiciais, como inclusão e exclusão de paternidade, e na identificação humana (PARDINI et al., 2001), sendo possível obter DNA de praticamente todos os tecidos do corpo humano, variando apenas a quantidade de DNA que é possível extrair de cada um desses tecidos (BUTLER, 2005).

2.3.1 Aspectos históricos

Há bem pouco tempo a ciência da identificação de casos criminais pautava-se apenas nas análises sorológicas dos polimorfismos de proteínas e grupos sanguíneos e em alguns marcadores genéticos. O exame forense de amostras biológicas teve seu início no começo do século XX com a aplicação dos grupos sanguíneos ABO em evidências relacionadas a crimes ou à identificação de pessoas. Hoje, estes sistemas foram substituídos na maioria dos centros, sendo pouco utilizados (MYIAJIMA; DARUGE; DARUGE-JUNIOR, 2001).

As provas de identificação individual, utilizando os testes de grupos sanguíneos, ganharam valor legal nas cortes alemãs a partir de 1920, mas somente em 1935 foram aceitas legalmente nos Estados Unidos. Logo em seguida, no Brasil, tais exames passaram a ter valor legal, sendo a primeira ação de investigação de paternidade datada de 1948 (CALABREZ; SALDANHA, 1997).

Outra fase importante no desenvolvimento das ciências forenses voltadas à identificação humana veio com a publicação de Jeffreys, Wilson e Thein (1985), onde se testou sondas moleculares radioativas com a propriedade de reconhecer certas regiões altamente sensíveis do DNA (minissátelites do genoma humano) que produziam uma espécie de “impressão digital”.

Em 1986, Jeffreys empregou esta técnica para identificar o verdadeiro estuprador e assassino de duas vítimas, a partir do qual a Criminalística e a Medicina Legal ganharam novo fôlego e têm empregado a técnica da tipagem

molecular de DNA como potente arma no esclarecimento de diversos delitos e na identificação humana (LOMBARDI, 2007; MOURA-NETO, 1998).

No Brasil, os testes envolvendo DNA passaram a ser levados em conta pela Justiça somente na década de noventa, sendo ainda bastante questionados por alguns. Acrescido a este fato, existe o custo do exame, ainda elevado para boa parte da população e também pela escassez de institutos públicos preparados para execução rotineira dos exames com base no DNA (CALABREZ; SALDANHA, 1997).

No Estado de São Paulo, já está em vigor o Decreto 44.336, desde 15 de Outubro de 1999, assegurando a gratuidade para realização, por determinação judicial, de exames DNA, aos comprovadamente pobres, nas ações de investigação de paternidade (SÃO PAULO, 1999). Além disso, outras iniciativas podem ser observadas, como o Projeto Caminho de Volta que trabalha com a tecnologia da biologia molecular na busca de crianças desaparecidas (GATTAS et al., 2005).

2.3.2 Estrutura do DNA: breve relato

As informações genéticas estão armazenadas sob a forma de ácidos nucléicos. Estes, por sua vez, são polinucleotídeos, ou seja, macromoléculas formadas pelo encadeamento de unidades chamadas de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é constituído por uma base nitrogenada, uma molécula de açúcar (pentose) e um grupamento fosfato (PO_4^-). As bases nitrogenadas pirimidínicas são representadas pela citosina (C), timina (T) e uracila (U). As purínicas pela adenina (A) e guanina (G). As duas purinas estão presentes tanto no DNA quanto no RNA.

As pirimidinas no DNA estão representadas pela citosina e a timina e no RNA a uracila é encontrada no lugar da timina (FARAH, 1997).

Em relação ao açúcar, há dois tipos de pentose, na qual se distinguem os dois ácidos nucléicos: no DNA, o açúcar é a 2-desoxirribose e, no RNA é a ribose. Os ácidos nucléicos são formados por ligações fosfodiésteres entre o grupo fosfato do carbono 5 de um nucleotídeo e o carbono 3 do açúcar do nucleotídeo adjacente. Por convenção, as cadeias polinucleotídicas são representadas na orientação 5'–3'. Em geral o DNA é composto de duas cadeias polinucleotídicas pareadas, dispostas em direção contrária, denominadas de antiparalelas. Isso ocorre em função da especificidade da interação das bases nitrogenadas, onde a guanina pareia-se somente com a citosina, através da ligação de três pontes de hidrogênio e a adenina com a timina por duas ligações de ponte de hidrogênio (ALBERTS et al., 1997).

Sendo assim, o DNA é responsável pelo armazenamento de toda a informação genética, sendo encontrado nos cromossomos do núcleo (DNA genômico) e nas mitocôndrias (DNA mitocondrial), podendo ser extraído de amostras de sangue, esfregaço bucal, saliva, osso, dente, tecidos, órgãos, fios de cabelo, sêmen, urina, entre outros materiais biológicos (STRACHAN; READ, 2002).

Nas amostras forenses, o estudo do DNA é feito, geralmente, através da análise de regiões repetitivas, de uma determinada seqüência de bases, sendo as mais utilizadas os STRs (do inglês *short tandem repeat*), indicando regiões de repetições consecutivas curtas (FARAH, 1997).

Essas regiões STRs ou regiões microssatélites, apresentam, em média, uma seqüência de repetição de dois a nove pares de base, perfazendo loci menores que 300 pares de base, sendo abundantemente encontrados no genoma humano,

permitindo variabilidade de escolha nos testes de identificação forense (FARAH, 1997; WALKER; RAPLEY, 1999).

O DNA genômico é encontrado no núcleo de cada célula do corpo humano, e representa uma fonte de DNA para a maioria das aplicações forenses, haja vista que por meio da análise baseada na técnica PCR é possível comparar a amostra obtida com conhecidas amostras *ante-mortem* ou com o DNA paterno/materno (PRETTY; SWEET, 2001).

É nele que estão localizados os genes, depositários das informações genéticas responsáveis pelas atividades da célula. Cada gene, por sua vez, faz parte de uma estrutura denominada cromossomo e encontra-se em locais específicos conhecidos como loci genético (ALBERTS et al., 1997). Formas alternativas de um gene são denominadas de alelo. Se um mesmo alelo estiver presente em ambos os cromossomos de um par, o indivíduo é homozigoto, se forem diferentes, heterozigoto (JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999).

Os genes constituem apenas uma pequena fração de todo o DNA do genoma. Mesmo genes funcionais contêm regiões não codificantes (introns). Na verdade, boa parte do DNA não tem função conhecida e os segmentos cromossômicos mais usados na análise forense geralmente estão em regiões não funcionais (DUARTE, 2001). Embora já seja conhecido que algumas regiões não-codificantes têm funções de regulação genética, na atualidade observa-se que sua contribuição é muito mais significativa, especialmente para a evolução, sendo responsáveis por tantas diferenças adaptativas entre espécies quanto às alterações nas proteínas, consideradas a principal força por trás desse fenômeno (FURTADO, 2005).

Já o DNA mitocondrial é outro tipo de material que pode ser utilizado para identificar um corpo, sendo a principal vantagem o seu alto número de cópias por célula (de centenas a milhares de organelas). Em casos onde a amostra de DNA extraída é muito pequena ou degradada, tal como em tecidos esqueletizados, a probabilidade de obtenção de um perfil de DNA a partir do DNA mitocondrial é maior que qualquer marcador encontrado no DNA genômico (SWEET; DIZZINO, 1996).

No contexto da análise forense, o interesse pelo DNA mitocondrial surge pelas seguintes justificativas: contém regiões polimórficas que permitem sua individualização; descendentes recebem esse DNA apenas da mãe (permitindo traçar a linhagem materna de uma pessoa); é mais resistente à degradação que o DNA nuclear (PANETO, 2006). Complementarmente, Silva e Passos (2002), afirmam que a análise do DNA mitocondrial para fins forenses fica reservada para tecidos antigos como ossos, cabelos e dentes nos quais o DNA nuclear já não oferece mais condições de análise.

2.3.3 Técnicas de biologia molecular aplicada a Odontologia Legal

Observa-se uma grande variedade de informações no que se refere à aplicação da tecnologia do DNA em análises pela Odontologia Legal, exemplificadas pela utilização dos elementos dentários, da saliva e dos esfregaços bucais, como fonte de material genético.

A aplicação destas técnicas envolvendo o DNA, em Odontologia Legal, oferece uma nova ferramenta quando métodos usuais de identificação falham devido

aos efeitos do calor, traumatismos ou processos autolíticos (PÖTSCH, 1992), bem como em distorções e dificuldades na análise.

Sendo assim, com o avanço da biologia molecular, cada vez mais a análise do DNA em amostras forenses é utilizada nos processos de identificação humana (REMUALDO; OLIVEIRA, 2005).

Frente a essa riqueza de material, o uso da técnica baseada na PCR tem obtido cada vez mais importância para a análise pós-morte do DNA em casos forenses. De acordo com Farah (1997), a PCR é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando à produção de milhões de cópias desta sequência em um tubo de ensaio, primeiramente descrita por Kary Mullis, no final dos anos 80, e possibilitando uma nova estratégia na análise de genes por meio de um método simples e rápido.

Sweet (2001) descreve que o método utilizando PCR possibilita a discriminação de um indivíduo dos demais, com um alto nível de confiança, começando apenas com cerca de 1ng (nanograma), equivalente a uma parte em um bilhão de um grama, do DNA alvo.

Mais recentemente, verifica-se que menores quantidades de amostra podem ser utilizadas. Conforme relatam Asamura et al. (2006), ao realizarem a tipagem de alelos em oito loci do cromossomo X, com DNA altamente degradado, obtiveram sucesso a partir de 20 picogramas (pg). Valores numéricos da ordem de picogramas já vêm sendo estudados e comprovando sua efetividade na aplicação em amostras degradadas (DIXON et al., 2006; GILL et al., 2000).

Ao se tratar de amostras forenses, o estudo do DNA geralmente é feito através da análise de regiões de repetições consecutivas curtas (em inglês, *short tandem repeats*), ou simplesmente STR, os quais podem ser definidos como regiões

hipervariáveis do DNA que apresentam repetições consecutivas de fragmentos que possuem de dois a nove pares de bases (pb), sendo que os STRs de maior valor para a identificação humana são aqueles que apresentam maior polimorfismo (maior número de alelos), menor tamanho, maior frequência de heterozigotos (maior que 90%) e baixa frequência de mutações (GALANTE-FILHO et al., 1999).

E, para a realização da identificação humana é mais interessante a utilização de marcadores moleculares que apresentem grande variabilidade dentro da população, ou seja, alto grau de polimorfismo, possibilitando que a probabilidade de duas pessoas apresentarem um mesmo alelo torne-se menor.

Na abordagem forense, a caracterização da amostra biológica tem por objetivo limitar ou reduzir o número de indivíduos que poderiam ser a fonte do material em análise, sendo que o estudo e utilização da tecnologia do DNA podem permitir um poder discriminatório suficiente para atingir o limite necessário para a identificação humana (SILVA; PASSOS, 2002).

Pensando nisso, podemos verificar a aplicabilidade de amostras odontológicas em várias condições, sendo que a influência do meio ambiente na concentração, integridade e recuperação do DNA, extraído de polpas dentárias, foi mensurado por Schwartz et al. (1991), onde variou-se o pH (3,7 e 10,0), 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 a inumação dos dentes (areia, terra de vaso, terra de jardim, submersão em água e deixados ao relento), e os tempos de inumação (de uma semana a seis meses), sendo constatado que nenhum desses fatores são determinantes para obtenção de DNA de alto peso molecular a partir de polpas dentárias.

Tsuchimochi et al. (2002), testaram a resina Chelex[®] 100 para extrair DNA da polpa dentária para posterior aplicação do procedimento de PCR. Para isso, os dentes extraídos foram incinerados por 2 minutos nas temperaturas de 100°C, 200°C, 300°C, 400°C e 500°C, obtendo como resultado que todas as amostras até 300°C puderam ser amplificadas e classificadas, enquanto que acima de 400°C não foi produzido nenhum produto de PCR. Os autores concluíram que a extração de DNA utilizando esta resina, a partir da polpa dentária, é apropriada para a obtenção de uma amostra de DNA de qualidade superior para amplificação por PCR.

Nesse mesmo sentido, Remualdo (2004) avaliou a amplificação por PCR em elementos dentários submetidos a temperaturas de 200°C, 400°C, 500°C e 600°C durante 60 minutos, através de três diferentes métodos de extração de DNA, concluindo que o método de acetato de amônio/isopropanol possibilitou a amplificação de todas as amostras em todas as temperaturas, dando enorme credibilidade na utilização dos elementos dentários na investigação forense pelo DNA.

E, ainda para avaliar diferentes tecidos dentários como fontes de DNA em análises forenses, Malaver e Yunis (2003) realizaram um estudo onde utilizaram 20 dentes obtidos de corpos não identificados, enterrados em 1995 e exumados em 2000, obtendo 45 amostras (cinco de polpa, 20 de dentina e 20 de cimento). A polpa produziu os sinais mais fortes de amplificação por PCR, enquanto que os sinais da dentina e do cimento foram similares entre si.

Hanaoka et al. (1995) avaliaram a extração de DNA de 50 dentes (polpas e tecidos duros). 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 dentários em diferentes concentrações de solução descalcificante. O DNA obtido das polpas dentárias foi de alto peso molecular, sendo possível análise por sondas multilocus ou por PCR; já o material obtido de tecidos duros só apresentou análise satisfatória pela PCR.

Dentre os casos registrados na literatura em que os dentes foram utilizados, destaca-se o relatado por Sweet e Sweet (1995). Trata-se de um caso de identificação em que a vítima de homicídio fora incinerado, tendo todo o seu corpo carbonizado, reduzido a aproximadamente 25% do tamanho original, inviável, portanto, para a realização de exame de DNA pelos métodos convencionais. No entanto, um dente não erupcionado (terceiro molar) fora preservado e possibilitou a extração do DNA da polpa dentária (1,35µg).

Além do elemento dentário, outro objeto de estudo da Odontologia Legal relacionado à biologia molecular, é a análise da saliva humana e esfregaços bucais, que podem ser obtidos em casos de violência física, como abuso sexual, assassinatos, abuso infantil, onde freqüentemente são encontradas marcas de mordida na pele (MUSSE et al., 2007).

Koh et al. (2004) descrevem que a saliva é uma fonte de DNA muito útil pelo fato de ser coletada de maneira indolor e não-invasiva, podendo ser utilizada mesmo quando armazenadas nas mais diferentes condições. E a possibilidade de sua utilização em biologia molecular deve-se em virtude de ser composta em 99% de sua totalidade por água, possuindo leucócitos (25 a 650.000) e células epiteliais descamadas (6 a 600.000) (CATE, 1988).

A quantidade de saliva depositada sobre a pele é geralmente muito pequena em casos de marcas de mordida, sendo necessário usar métodos de coleta cujo resultado na recuperação seja o máximo de quantidade de saliva possível e que

minimize qualquer potencial de contaminação pelas células da pele da vítima (SWEET et al., 1997). No estudo de Anzai-Kanto et al. (2005), é descrito que ao verificar a reprodutibilidade de análise de DNA de saliva coletada sobre a pele, simulando casos que envolvam marcas de mordida em 20 amostras, a técnica do duplo swab demonstrou ser sensível e eficiente em casos criminais onde há a presença de saliva em marcas de mordida.

Nesse ínterim, em estudo de Sweet et al. (1997), usando situações simuladas de marcas de mordida em duas séries experimentais, três amostras de 40µL de saliva foram depositadas sobre a pele de 27 cadáveres (em 33 locais diferentes) e três amostras de 100µL de saliva foram depositados sobre a pele de cinco cadáveres (em 12 locais diferentes). A saliva foi coletada pela técnica do duplo swab em tempos de cinco minutos, 24 horas e 48 horas, sendo comprovado um decréscimo na concentração nas primeiras 24 horas e estabilidade entre 24 e 48 horas, mostrando sucesso na amplificação independente do tempo após o depósito da saliva, além de nenhum caso de contaminação.

Em outro estudo, Sweet e Shutler (1999) utilizaram a análise de DNA por PCR em uma marca de mordida localizada em um corpo que esteve submerso em um lago pelo período de 5,5 horas, antes de ser descoberto e, independentemente da condição em que o corpo foi conservado, foi recuperado DNA suficiente da área da mordida, que possibilitou uma contribuição genotípica na identificação do agressor.

Essa eficiência comprova-se pelo fato de a saliva, em contato com a pele intacta, se manter em condições estáveis e poder ser recuperada por pelo menos 60 horas após a sua deposição (SMITH et al., 1997).

Porém, nem sempre será possível recuperar DNA a partir de uma marca de mordida, haja vista que estará sujeita a uma série de modificações, tais como contaminação, degradação e putrefação, dependendo das circunstâncias as quais o corpo e/ou objeto forem submetidos (SWEET et al., 1997).

2.3.4 Os estudos de frequência e a importância na investigação forense

Outra ferramenta da biologia molecular aplicada à identificação humana e que pode ser utilizada quando se deseja, através de cálculos estatísticos, descrever quais os marcadores mais eficientes naquela determinada população, é o estudo dos alelos presentes e sua frequência, porém não possibilita predições de grupo étnico ou outras características mais detalhadas.

Conforme relata Szibor et al. (2003), devido ao seu alto poder de individualização e praticabilidade, a análise dos STRs tem se tornado uma rotina amplamente utilizada nas ciências forenses, porém a grande maioria dos estudos abordam apenas STRs localizados em autossomos e cromossomo Y, deixando o cromossomo X com um papel secundário na prática forense.

Os STRs demonstram uma distribuição ampla através do genoma e, para aplicações forenses, devem possuir numerosos alelos observados, alto nível de heterozigosidade e alto conteúdo de informação polimórfica (HAMMOND et al., 1994). Os STRs de maior valor para a identificação humana são aqueles que apresentam maior polimorfismo (maior número de alelos), menor tamanho, maior

freqüência de heterozigotos (maior que 90%) e baixa freqüência de mutações (GALANTE-FILHO et al., 1999).

Sabe-se que diferentes populações apresentam alelos em freqüências diferentes e algumas vezes únicos, por isso a necessidade do estudo de diferentes marcadores naquela população para saber quais são os alelos presentes e em que freqüência, a fim de se definir quais são os melhores marcadores a serem utilizados nestes casos. Assim, para que a identificação através de STRs possa ser rapidamente incorporada com efetiva confiabilidade à população brasileira, é de extrema importância a realização de estudos populacionais (OLIVEIRA et al., 2002; OZAKI, 1999) e, nestes estudos, a investigação deve ser realizada em indivíduos, sem nenhum grau de parentesco, a fim de possibilitar a determinação da freqüência alélica da população (LINCOLN; THOMSON, 1998).

Conforme relata Góis (2006), para a realização da identificação humana é mais interessante utilizar marcadores moleculares que apresentem grande variabilidade dentro da população, ou seja, alto grau de polimorfismo, de forma que a probabilidade de duas pessoas apresentarem um mesmo alelo torne-se menor.

Sendo assim, a realização de pesquisas para a obtenção de freqüências alélicas populacionais tornam-se extremamente importantes, possibilitando a divulgação desses dados, através da literatura científica e, também, por banco de dados (sistemas nos quais são armazenados perfis de DNA referentes a um conjunto de marcadores moleculares), podendo ser aplicados na investigação forense (GÓIS, 2006).

2.3.5 Cromossomo X

Sabe-se que as células humanas, com exceção dos gametas, apresentam o DNA distribuído em 23 pares de cromossomos no núcleo (22 pares autossômicos e um heterossômico, XY), sendo que cada par de cromossomos é constituído por um cromossomo de herança materna e outro de herança paterna (ALBERTS et al., 1997).

Nos testes de identificação humana, normalmente são utilizados marcadores genéticos contidos nos pares de cromossomos autossômicos (URQHART et al., 1994); assim, homens e mulheres apresentam sempre dois alelos para cada marcador. O cromossomo X tem muitas características que são únicas no genoma humano, pois as mulheres herdaram um cromossomo X do pai e um da mãe, mas os homens herdaram um único cromossomo X, o materno (ROSS et al., 2005). Em virtude dessa diferença de alelos entre marcadores tradicionais autossômicos e do cromossomo X para o sexo masculino, um menor número de marcadores podem ser utilizados para a determinação do vínculo biológico quando se utiliza o cromossomo X (SZIBOR et al., 2003).

Mais recentemente, muitos estudos têm sido realizados com STRs do cromossomo Y, devido às particularidades de grande parte dele não sofrer recombinação, apresentando herança haplotípica, tornando-se muito útil em testes de paternidade e estudos forenses, para a identificação de indivíduos do sexo masculino (GÓIS, 2006; JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999; JOBLING; PANDYA; TYLER-SMITH, 1997)

A utilização dos STRs do cromossomo X na prática forense parece ser restrita, mas pode ser de grande valor em casos de paternidade onde a criança em

questão é do gênero feminino (SHIN et al., 2005; WIEGAND et al., 2003; ZARRABEITIA et al., 2002) ou em casos complexos de análise de parentesco quando apenas parentes distantes estão disponíveis, haja vista a ausência de amostra biológica do suposto pai (SZIBOR et al., 2003; BINI et al., 2005), tendo como exemplos casos de estupro, onde a gravidez pode ser terminada em aborto, o teste de paternidade em feto feminino apenas pode incluir marcadores autossômicos e do cromossomo X, e em casos de incesto, no qual o pai abusa sexualmente de sua filha (SZIBOR et al., 2003),

Na Figura 2.1, apenas para ilustrar a aplicabilidade, através dos testes estatísticos, mesmo na ausência do pai, possibilitar a sua exclusão ou não, através dos marcadores do cromossomo X.

Figura 2.1 – Esquema ilustrativo da aplicação dos STRs do cromossomo X. (A) Possível exclusão de paternidade; (B) Possível inclusão de paternidade

Sendo assim, os testes de paternidade, uma análise de elevada acurácia dos perfis genéticos da mãe, criança e suposto pai, é baseado no fato de que a criança herda metade do seu DNA da mãe e metade do pai, de acordo com as Leis de Herança Genética de Mendel, porém, nos casos onde o suposto pai não está disponível, diversos membros da família deste suposto pai devem ser analisados, sempre que possível, possibilitando uma certeza quanto à exclusão de paternidade, mas não uma certeza na confirmação de paternidade (MIXICH; IOANA; MIXICH, 2004).

Muitos STRs do cromossomos X têm sido validados para utilização na prática forense, contudo há a necessidade de mais estudos sobre a frequência alélica e taxas de mutação para avaliar a extensão do polimorfismo em diferentes populações e estabelecer bases de dados úteis para aplicações forenses e estudos antropológicos (BINI et al., 2005).

E, conforme citado por Szibor et al. (2003), as recomendações da ISFH (*International Society of Forensic Haemogenetics*) para a aplicação forense de marcadores microsatélites, trinucleotídeos, tetranucleotídeos e pentanucleotídeos, há a necessidade de possuírem propriedades genético-populacionais apropriadas: equilíbrio de Hardy-Weinberg, alto nível de polimorfismo, desequilíbrio de ligação conhecido, entre outros. Nesse sentido, vários estudos populacionais em STRs do cromossomo X, têm sido realizados em diversas populações.

Em Taiwan, Chen e Pu (2004) realizaram estudos dos STRs DXS10011, DXS101, DXS6789, DXS7132, DXS8377 e DXS9895 em 92 mulheres e 181 homens, verificando a utilidade de todos os marcadores para testes de parentesco quando a pessoa em questão é do gênero feminino.

No estudo de Bini et al. (2005) realizou-se uma análise multiplex dos STRs DXS6789, HUMARA, DXS10011, DXS7423, HPRTB, DXS6807, DXS101, em uma amostra de 556 indivíduos na Itália e os resultados demonstraram a possibilidade de utilização destes marcadores do cromossomo X em análises de parentesco complexas. Já Wiegand et al. (2003), em outro estudo populacional, analisaram os STRs DXS6800, DXS101 e DXS8377 em amostra populacional da Alemanha e Áustria através da PCR multiplex, demonstrando que a eficiência em casos forenses obteve valores mais elevados para os marcadores DXS101 e DXS8377.

Poetsch et al. (2005) apresentaram dois sistemas pentaplex para STRs do cromossomo X, onde o primeiro é composto das regiões DXS9898, DXS6807, HPRTB, DXS101 e ARA, e o segundo é composto por DXS7133, DXS10011, DXS7424, DXS8377 e DXS8378, sendo ambos eficientes na utilização em casos de investigação de paternidade deficientes, comprovados por um Poder de Discriminação maior que 0,999999.

Shin et al. (2005) realizaram estudo populacional referente a 18 STRs (DXS6807, DXS8378, DXS9895, DXS9902, DXS6810, DXS7132, DXS981, DXS6800, DXS9898, DXS6789, DXS101, DXS6797, GATA172D05, GATA165B12, HPRTB, GATA31E08, DXS8377 e DXS7423) na população da Coreia, concluindo que quatro deles apresentaram mutações (GATA172D05, GATA31E08, DXS7132, HPRTB) e que os STRs do cromossomo X são altamente úteis para casos complexos ou com deficiências de informação. Outro estudo na Coreia realizado por Shin et al. (2004) objetivou analisar a eficiência na prática forense de cinco STRs do cromossomo X (HPRTB, DXS8377, GATA172D05, DXS101, HUMARA), concluindo que todos eles possuem alto nível de informação para aplicação forense.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como proposições:

1. Determinar a frequência alélica de cinco STRs do cromossomo X (DXS6854, DXS7424, DXS101, DXS7132 e DXS6808) em indivíduos da população brasileira, residentes no Estado de São Paulo;
2. Avaliar, na população estudada, a eficiência, através de parâmetros estatísticos, desses marcadores na prática forense e em testes de paternidade.

4 CASUÍSTICA - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa intitulado “Estudo de frequências alélicas de múltiplos loci STR do cromossomo X na população do Estado de São Paulo e sua contribuição na identificação humana” foi encaminhado ao Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), e aprovado em 7 de Julho de 2006, através do Protocolo 84/06 (Anexo A), de acordo com o estabelecido pela Resolução nº. 196/96 (BRASIL, 1996).

4.2 Casuística

Neste projeto foram analisadas amostras de n=243 sujeitos da pesquisa coletados por *swab* bucal, nos municípios de Bauru e São Paulo, Estado de São Paulo, e amostras sangüíneas coletados por punção digital, no município de Araraquara, Estado de São Paulo, em indivíduos maiores de idade, voluntários, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a Resolução nº. 196/96 (BRASIL, 1996), divididos em n=109 mulheres e n=134 homens.

As amostras sanguíneas foram coletadas em Araraquara, no Laboratório de Investigação de Paternidade, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (FCF-UNESP), realizada com cartão FTA Classic® (Whatman-Bioscience). As amostras de esfregaço bucal foram coletadas em Bauru, em voluntários, no campus da Universidade Paulista e, em São Paulo, na Faculdade de Odontologia da USP, sendo a coleta realizada com cartão para coleta de DNA MGM Assessoria Biológica® (Dialab Diagnósticos S/A). Ambos os métodos de coleta permitem a conservação da amostra sem a necessidade de refrigeração (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Coleta de DNA a partir de esfregaço bucal e deposição em cartão de coleta

4.3 Extração do DNA

Das amostras sanguíneas e de esfregaço bucal coletadas em papel, o DNA foi extraído utilizando-se 15 discos (sangue) e 20 discos (saliva) de 1,2mm de papel de filtro, cortados com o auxílio do *Harris Micro Punche*® e *Cutting Mat*® (Whatman-Bioscience) e depositados em microtubos de 1,5mL. Em seguida, procedeu-se à

extração com o Kit DNA IQ[®] (Promega), de acordo com as normas do fabricante. Assim, promoveu-se a lise celular por meio de uma solução composta por 250µL de *Lysis Buffer* e 2,5µL de 1M Dithiothreitol (DTT). O DNA foi “capturado” por 7µL de resina composta por partículas magnéticas, lavado por três vezes com 300µL de solução *Wash Buffer* e eluído em 100µL de *Elution Buffer*. Este kit permite a obtenção de pequenas quantidades de DNA, aproximadamente 100ng, ou menos, extremamente purificado, não havendo a necessidade de se fazer novas diluições para posterior utilização do DNA na reação de PCR (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Preparo dos discos para a extração de DNA (a), Kit DNA Iq (b), separação pela resina (c)

4.4 Reações de PCR

Neste trabalho, foram realizadas as amplificações de cinco STRs do cromossomo X, sendo três deles tetranucleotídeos (DXS6854, DXS6808 e DXS7132) e dois trinucleotídeos (DXS7424 e DXS101), cuja localização pode ser verificada através da Figura 4.3.

Figura 4.3 - Ideograma do Cromossomo X com a localização dos STRs utilizados na pesquisa

As informações referentes a estes STRs, tais como a localização, a sequência repetitiva, o número de acesso no *Genome Database* (www.gdb.org) e a variação de tamanho dos produtos de PCR, estão apresentadas na Tabela 4.1, e a sequência dos primers utilizados na amplificação (Tabela 4.2), também retirada do *Genome Database*, sendo o primer de orientação forward marcado pela *Integrated DNA Technologie* (IDT) com o fluorófilo Cianina (Cy5™).

Tabela 4.1 - Características dos cinco STRs do cromossomo X

STR	Localização	Número de Acesso (GDB)	Seq. Repetitiva (5'-3')	Tamanho dos fragmentos (pb)
DXS6854	Xq25-q26.1	386910	(ATTT) _n	93 - 125
DXS7424	Xq21.33-q22	577646	(TAA) _n	144 - 180
DXS101	Xq21.33-q22.3	207667	(CTT) _n (ATT) _n	179 - 230
DXS6808	Xq26.3	365487	(TCTA) _n	250 - 262
DXS7132	Xq11.1- q12	685605	(TCTA) _n	272-304

Tabela 4.2 - Sequência dos primers utilizados na amplificação dos cinco STRs do cromossomo X

STR	Orientação	Sequência (5' → 3')
DXS6854	Forward	AGCACTTCTCCTACAACCCTC
	Reverse	CAGCCTGGGCAGTAGAGACT
DXS7424	Forward	CTGCTTGAGTCCAGGAATTCAA
	Reverse	GAACACGCACATTTGAGAACATA
DXS101	Forward	ACTCTAAATCAGTCCAAATATCT
	Reverse	AAATCACTCCATGGCACATGTAT
DXS6808	Forward	ATCCTGATATCTGCCTTTAAATG
	Reverse	GGTATATAACAATTGTTGGTGCA
DXS7132	Forward	AGCCCATTTTCATAATAAATCC
	Reverse	AATCAGTGCTTTCTGTACTATTGG

Para a amplificação dos cinco STRs, foram utilizadas duas metodologias de trabalho: a primeira foi denominada de método Monoplex e, a segunda, método Multiplex, descritas a seguir.

4.4.1 Método Monoplex

Cada STR do cromossomo X foi amplificado separadamente, em microtubos de 0,2mL, utilizando-se 7,12 μ L de Água Livre de Nuclease (Promega), 1,0 μ L de Gold STAR 10X Buffer (Promega), 0,3 μ L de Primer Mix (primer Forward e Reverse a 0,3 μ M), 0,08 μ L de Platinum[®]Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1,5 μ L de DNA, perfazendo 10 μ L de volume total de reação. A amplificação foi realizada em termociclador gradiente MJ96G (Biocycler) conforme o ciclo descrito na Figura 4.4.

Figura 4.4 – Ciclo para amplificação em Sistema Monoplex

4.4.2 Método Multiplex

Neste método, quatro STRs (DXS6854, DXS7424, DXS6808 e DXS7132) foram amplificados em sistema multiplex, sendo que apenas o STR DXS101 foi realizado seguindo o sistema monoplex descrito anteriormente. As reações foram

realizadas em microtubos de 0,2mL, utilizando-se: 5,8µL de Água livre de nuclease (Promega), 1,0µL de Gold STAR 10X Buffer (Promega), 0,35µL de cada PrimerMix (DXS6854, DXS7424, DXS6808 e DXS7132), 0,3µL (1,5U) de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1,5 µL de DNA, perfazendo 10 µL de volume total. A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Perkin-Elmer), conforme ciclo descrito na Figura 4.5.

Figura 4.5 – Ciclo para amplificação em Sistema Multiplex

Após a reação de PCR, foi realizada a avaliação e quantificação dos fragmentos amplificados, através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% para os STRs em Método Monoplex, e gel de agarose 4% para os STRs pelo Método Multiplex, ambos em Cuba Horizon 58, Modelo 200 (Gibco), por 20 e 50 minutos, respectivamente, a 105 volts.

Na preparação das amostras para aplicação no gel, 5,0µL e 7,0µL do produto da PCR obtido pelo Método Monoplex e Multiplex, respectivamente, foram adicionados a 1,5µL de Tampão de Amostra.

A intensidade das bandas foi comparada com as do marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), após coloração com 2,0µL de Brometo de Etídio (Gibco-Life Technologies) e a imagem do gel foi visualizada e fotografada em aparelho Flúor-S Multimager (BioRad). Os produtos da amplificação foram mantidos a temperatura ambiente até o momento da corrida eletroforética em seqüenciador automático.

4.5 Obtenção dos padrões internos da corrida

Além dos cinco STRs do cromossomo X analisados, foram também amplificados, o STR D9S938 de um indivíduo homozigoto para o alelo de tamanho de 405pb, e o STR SY255 de um indivíduo masculino portador do alelo de tamanho de 126pb. Estes dois fragmentos de DNA foram utilizados como padrão interno da corrida, sendo, portanto, adicionados em todas as amostras preparadas para a eletroforese.

As informações referentes a estes STRs, como localização, número de acesso no Banco do Genoma e tamanho do fragmento amplificado estão apresentadas na Tabela 4.3 e a seqüência dos primers utilizados na amplificação na Tabela 4.4. Da mesma forma dos STRs, a seqüência dos primers foi retirada do Banco do Genoma e o primer de orientação forward foi marcado pela *Integrated DNA Technologie* (IDT) com o fluorófilo CY5.

Tabela 4.3 - Características dos padrões internos da corrida

STR	Localização	Nº Acesso GeneBank®	Tamanho do fragmento (pb)
D9S938	9pter - 9qter	686037	405 pb
SY255	Yq11.223	6014112	126 pb

Tabela 4.4 - Sequência dos primers utilizados na amplificação dos padrões internos da corrida

STR	Orientação	Sequência (5' → 3')
DXS938	Forward	GTAAGGGGTTGAGGTTTTGC
	Reverse	CACCACATTTCTGACATCCA
SRY255	Forward	GTTACAGGATTCGGCGTGAT
	Reverse	CTCGTCATGTGCAGCCAC

A amplificação destes STRs foi realizada, separadamente, em microtubos de 0,2mL, utilizando-se: 41,1µL de água livre de nuclease (Promega), 5,0µL de Gold STAR 10X Buffer (Promega), 1,0µL de Primer Mix (primer forward e reverse 0,2µmol), 0,4µL (2U) de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 2,5µL de DNA e 50µL de volume total. Ambos STRs foram amplificados em termociclador gradiente MJ96G (Biocycler) conforme o ciclo apresentado na Figura 4.6.

Figura 4.6 – Ciclo para amplificação dos padrões internos da corrida

4.6 Eletroforese e detecção dos produtos da PCR

Para serem aplicadas no gel de poliacrilamida, as amostras foram preparadas de formas diferentes, dependendo do método utilizado na amplificação. No caso do Método Monoplex, 1,0µL do produto de PCR de cada STR (totalizando 5µL) foi misturado com 7,5µL do Tampão de Amostra. Em relação ao Método Multiplex, 2,5µL do produto de PCR Multiplex e 1,5µL do produto de PCR do DXS101 (em Sistema Monoplex) foram misturados com 6µL do Tampão de Amostra.

Após preparação, as amostras foram desnaturadas a 95°C por três minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 6%, no Seqüenciador Automático ALF Express® (GE Healthcare) para obtenção dos perfis alélicos. Em toda corrida eram colocados a amostra controle (K562, Promega) e o *Ladder* (escada alélica preparada “*in house*” pelo Laboratório Biocod, Belo Horizonte, Minas Gerais). A corrida eletroforética foi realizada durante 2 horas e 40

minutos nas condições especificadas no equipamento (Voltagem: 600V, Corrente: 40mA, Potência: 15W, Temperatura: 45°C).

4.7 Análise dos perfis alélicos

A análise dos produtos de PCR para obtenção dos respectivos perfis alélicos foi feita com o auxílio do programa Allelelocator v. 3.1 (GE Healthcare), sendo os resultados confirmados visualmente em cada eletroferograma. Pelo fato da escada alélica (*ladder*) utilizada no processo estar padronizada em pares de base, os perfis dos indivíduos foram obtidos nesta mesma forma (Figura 4.7). Assim, após a leitura dos eletroferogramas (Figura 4.8 e Figura 4.9), os fragmentos em pares de base foram convertidos para seus respectivos alelos, de acordo com os dados da literatura, para posterior análise estatística.

Figura 4.7 – Eletroferograma indicando a escada alélica (ladder) preparado “*in-house*”, Laboratório Biocod, Belo Horizonte, Minas Gerais

Figura 4.8 – Eletroferograma de amostras masculinas, STRs do cromossomo X

Figura 4.9 – Eletroferograma de amostra feminina, STRs do cromossomo X

As fórmulas das estruturas de cada STR, apresentadas na seqüência do texto, indicam: F (seqüência do primer forward), R (seqüência do primer reverse), N (nucleotídeo), n (número de repetições do “motivo” - unidade de repetição). Sendo assim, a interpretação seria: F(20) – N14 – (ATT)₆ – N26 – R(19), indicariam um tamanho de fragmento, em pares de base, de $20 + 14 + (6 \times 3) + 26 + 19 = 97\text{pb}$.

No STR DXS6854 (QIULING; DEJIAN; HANLING, 2002), a estrutura é composta da seguinte forma: F(21) – N8 – (ATTT)_n – N16 – R(22) e a Tabela 4.5 indica os alelos e o tamanho dos fragmentos.

Tabela 4.5 – DXS6854: alelos e tamanho dos fragmentos

n	Alelo	Tamanho dos fragmentos (pb)
7	7	95
8	8	99
9	9	103
10	10	107
11	11	111
12	12	115
13	13	119
14	14	123

No STR DXS7424 (EDELMANN et al., 2002), a estrutura é composta por: F(22) – N37 – (TAA) n – N38 – R(23) e a Tabela 4.6 indica os alelos e o tamanho dos fragmentos.

Tabela 4.6 – DXS7424: alelos e tamanho dos fragmentos

n	Alelo	Tamanho dos fragmentos (pb)
8	8	144
9	9	147
10	10	150
11	11	153
12	12	156
13	13	159
14	14	162
15	15	165
16	16	168
17	17	171
18	18	174
19	19	177
20	20	180

No STR DXS101 (EDELHANN; SZIBOR, 2001), a estrutura é composta da seguinte forma: F(23) – N38 – (CTT) n_1 – (ATT) n_2 – N53 – R(23) e a Tabela 4.7 indica os alelos e o tamanho dos fragmentos.

Tabela 4.7 – DXS101: alelos e tamanho dos fragmentos

$n_1 + n_2$	Alelo	Tamanho dos fragmentos (pb)
14	14	179
15	15	182
16	16	185
17	17	188
18	18	191
19	19	194
20	20	197
21	21	200
22	22	203
23	23	206
24	24	209
25	25	212
26	26	215
27	27	218
28	28	221
29	29	224
30	30	227
31	31	230

No STR DXS7132 (SHIN et al., 2005), a estrutura é composta da seguinte forma: F(22) – N19 – (TCTA) n – N167 – R(24) e a Tabela 4.8 indica os alelos e o tamanho dos fragmentos.

Tabela 4.8 – DXS7132: alelos e tamanho dos fragmentos

n	Alelo	Tamanho dos fragmentos (pb)
10	10	272
11	11	276
12	12	280
13	13	284
14	14	288
15	15	292
16	16	296

No STR DXS6808 (GENOME DATABASE, 2007), a estrutura é composta da seguinte forma: F(23) – (TCTA) n – N164 – R(23) e a Tabela 4.9 indica os alelos e o tamanho dos fragmentos.

Tabela 4.9 – DXS6808: alelos e tamanho dos fragmentos

n	Alelo	Tamanho dos fragmentos (pb)
10	10	250
11	11	254
12	12	258
13	13	262
14	14	266
15	15	270

4.8 Análise estatística dos resultados

Após obtenção dos perfis alélicos, foram determinadas as frequências alélicas dos cinco marcadores, em homens e mulheres. A determinação dessas frequências foi realizada com o auxílio do programa PowerStats ver. 12 (Promega), pelo método da frequência relativa, ou seja, através do número de repetições do alelo observado nas amostras. Posteriormente, com os dados de frequência obtidos, foi realizado, com o programa Arlequin v. 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005), o “exact test” para avaliar se há diferença significativa entre a população feminina e masculina.

Além disso, também pelo método da contagem direta, determinou-se o número de haplótipos para o sexo masculino, sendo a diversidade haplotípica e gênica calculada de acordo com a fórmula descrita por Nei (1987) como $DH = (1 - \sum f_i^2) \cdot n / (n-1)$, onde f_i é a frequência do haplótipo e n é o número de indivíduos tipados. A capacidade de discriminação foi determinada através da divisão do número de haplótipos observados pelo número de indivíduos testados.

Para avaliar a divergência do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), foi realizado o “exact-test” de acordo com Guo e Thompson (1992). Diversos parâmetros estatísticos de interesse forense foram determinados, tais como: Heterozigose observada (HETobs), pelo método de contagem direta; Heterozigose Esperada (HETexp), como descrito por Nei (1987); Poder de Discriminação Feminino (PD^F) e Masculino (PD^M), como proposto por Desmarais et al. (1998) e Chance de Exclusão Significativa (MEC) para dois diferentes testes:

1) MEC_T : Chance de Exclusão Significativa para marcadores do cromossomo X, em trios envolvendo filhas, como descrito por Desmarais et al. (1998);

2) MEC_D: Chance de Exclusão Significativa para marcadores do cromossomo X, na ausência da mãe, existindo a dupla pai-fiha, como proposto por Desmarais et al. (1998).

Para os cálculos do HWE, HETobs, HETexp foram utilizados os dados de origem feminina, realizados com o auxílio do programa Arlequin v. 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). Em relação ao Poder de Discriminação Feminino e Masculino e aos MECs, estes foram calculados com os dados de frequência alélica obtida para a amostra total (*pool*), utilizando-se o programa Arlequin v. 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

Nos homens, por existir herança haplotípica, os haplótipos foram ordenados, a fim de verificar a frequência dos mesmos, assim como a diversidade haplotípica, ou seja, a probabilidade de selecionar dois indivíduos ao acaso na população e apresentarem o mesmo haplótipo, além do Poder de Discriminação Haplotípico, permitindo verificar, nestes marcadores, a diferenciação entre os homens na população masculina.

Foi realizado, também, o Poder de Exclusão, através do programa PowerStats ver. 12 (Promega), estabelecido por Brenner e Morris (1990) e a Probabilidade de Coincidência, complementar ao Poder de Discriminação, definido pela fórmula: $PC = 1 - PD$, onde PC (probabilidade de coincidência) e PD (poder de discriminação).

Por fim, foi realizado o cálculo do Poder de Discriminação combinado, ou seja, subtraído um de cada poder de discriminação com posterior multiplicação dos valores obtidos, para cada um dos STRs do cromossomo X analisados neste estudo. O cálculo foi realizado através do Microsoft Excel[®].

5 RESULTADOS

Os resultados foram agrupados de acordo com o STR analisado e os testes pertinentes ao mesmo. Dessa forma, a Tabela 5.1 indica a distribuição de frequência alélica do DXS6854, assim como os testes do Poder de Discriminação, Poder de Exclusão, Heterozigose observada, Heterozigose esperada, MEC_D (chance de exclusão significativa para marcadores do cromossomo X em duplas pai/filha), MEC_T (chance de exclusão significativa para marcadores do cromossomo X em trios envolvendo filha) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5.1 – Resultados do STR DXS6854, gênero masculino e feminino, Estado de São Paulo, 2007

	DXS6854 (masculino)	DXS6854 (feminino)
Alelo 7	-	0,005
Alelo 8	-	0,009
Alelo 9	0,075	0,073
Alelo 10	0,172	0,234
Alelo 11	0,112	0,110
Alelo 12	0,388	0,367
Alelo 13	0,179	0,138
Alelo 14	0,075	0,064
Poder de Discriminação (DESMARAIS et al, 1998)	0,769	0,916
Poder de Exclusão (Programa PowerStats ver. 12)	-	0,582
Heterozigose Observada (Programa Arlequin ver. 3.1)	-	0,789
Heterozigose Esperada (Programa Arlequin ver 3.1)	-	0,773
MEC_D	0,606	
MEC_T	0,739	
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (exact test) (Arlequin 3.1)	0,56970	

A Tabela 5.2 indica a distribuição de frequência alélica do STR DXS7424, assim como os testes do Poder de Discriminação, Poder de Exclusão, Heterozigose observada, Heterozigose esperada, MEC_D (chance de exclusão significativa para marcadores do cromossomo X em duplas pai/filha), MEC_T (chance de exclusão significativa para marcadores do cromossomo X em trios envolvendo filha) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5.2 – Resultados do STR DXS7424, gênero masculino e feminino, Estado de São Paulo, 2007

	DXS7424 (masculino)	DXS7424 (feminino)
Alelo 8	-	-
Alelo 9	-	0,005
Alelo 10	0,007	-
Alelo 11	0,015	0,009
Alelo 12	0,015	0,018
Alelo 13	0,067	0,032
Alelo 14	0,172	0,110
Alelo 15	0,388	0,197
Alelo 16	0,216	0,243
Alelo 17	0,097	0,298
Alelo 18	0,015	0,073
Alelo 19	-	0,014
Alelo 20	0,007	-
Poder de Discriminação (DESMARAIS et al, 1998)	0,788	0,924
Poder de Exclusão (Programa PowerStats ver. 12)	-	0,582
Heterozigose Observada (Programa Arlequin ver. 3.1)	-	0,781
Heterozigose Esperada (Programa Arlequin ver 3.1)	-	0,799
MEC_D		0,629
MEC_T		0,757
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (exact test) (Programa Arlequin ver. 3.1)		0,991

A Tabela 5.3 indica a distribuição de freqüência alélica do STR DXS101, assim como os testes do Poder de Discriminação, Poder de Exclusão, Heterozigose observada, Heterozigose esperada, MEC_D (chance de exclusão significativa para marcadores do cromossomo X em duplas pai/filha), MEC_T (chance de exclusão significativa para marcadores do cromossomo X em trios envolvendo filha) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5.3 – Resultados do STR DXS101, gênero masculino e feminino, Estado de São Paulo, 2007

	DXS101 (masculino)	DXS101 (feminino)
Alelo 14	-	0,005
Alelo 15	0,007	0,005
Alelo 16	0,015	0,005
Alelo 17	-	0,018
Alelo 18	0,015	0,046
Alelo 19	0,052	0,041
Alelo 20	0,022	0,046
Alelo 21	0,075	0,060
Alelo 22	0,015	0,041
Alelo 23	0,104	0,037
Alelo 24	0,187	0,174
Alelo 25	0,119	0,119
Alelo 26	0,187	0,234
Alelo 27	0,090	0,087
Alelo 28	0,090	0,041
Alelo 29	0,007	0,028
Alelo 30	0,007	0,014
Alelo 31	0,007	-
Poder de Discriminação (DESMARAIS et al, 1998)	0,881	0,975
Poder de Exclusão (Programa PowerStats ver. 12)	-	0,549
Heterozigose Observada (Programa Arlequin ver. 3.1)	-	0,772
Heterozigose Esperada (Programa Arlequin ver 3.1)	-	0,882
MEC_D		0,782
MEC_T		0,871
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (exact test) (Programa Arlequin ver. 3.1)		<0,00001

A Tabela 5.4 indica a distribuição de frequência alélica do STR DXS6808, assim como os testes do Poder de Discriminação, Poder de Exclusão, Heterozigose observada, Heterozigose esperada, MEC_D (chance de exclusão significativa para marcadores do cromossomo X em duplas pai/filha), MEC_T (chance de exclusão significativa para marcadores do cromossomo X em trios envolvendo filha) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5.4 – Resultados do STR DXS6808, gênero masculino e feminino, Estado de São Paulo, 2007

	DXS6808 (masculino)	DXS6808 (feminino)
Alelo 10	0,119	0,110
Alelo 11	0,701	0,720
Alelo 12	0,164	0,165
Alelo 13	0,007	0,005
Alelo 14	-	-
Alelo 15	0,007	-
Poder de Discriminação (DESMARAIS et al, 1998)	0,451	0,658
Poder de Exclusão (Programa PowerStats ver. 12)	-	0,108
Heterozigose Observada (Programa Arlequin ver. 3.1)	-	0,395
Heterozigose Esperada (Programa Arlequin ver 3.1)	-	0,444
MEC_D	0,271	
MEC_T	0,410	
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (exact test) (Programa Arlequin ver. 3.1)	0,430	

A Tabela 5.5 indica a distribuição de frequência alélica do STR DXS7132, assim como os testes do Poder de Discriminação, Poder de Exclusão, Heterozigose observada, Heterozigose esperada, MEC_D (chance de exclusão significativa para marcadores do cromossomo X em duplas pai/filha), MEC_T (chance de exclusão

significativa para marcadores do cromossomo X em trios envolvendo filha) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5.5 – Resultados do STR DXS7132, gênero masculino e feminino, Estado de São Paulo, 2007

	DXS7132 (masculino)	DXS7132 (feminino)
Alelo 10	-	0,009
Alelo 11	0,015	0,009
Alelo 12	0,104	0,101
Alelo 13	0,306	0,239
Alelo 14	0,366	0,349
Alelo 15	0,179	0,261
Alelo 16	0,030	0,032
Poder de Discriminação (DESMARAIS et al, 1998)	0,740	0,888
Poder de Exclusão (Programa PowerStats ver. 12)	-	0,457
Heterozigose Observada (Programa Arlequin ver. 3.1)	-	0,716
Heterozigose Esperada (Programa Arlequin ver 3.1)	-	0,746
MEC _D	0,556	
MEC _T	0,695	
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (exact test) (Programa Arlequin ver. 3.1)	0,811	

A Tabela 5.6 demonstra a frequência alélica do *pool* (amostras masculinas e femininas) dos cinco STRs do cromossomo X analisados neste estudo, haja vista ser preconizado que, quando não há diferença estatisticamente significativa entre os gêneros, deve-se realizar a frequência alélica pelo pool de alelos, fato este comprovado através de testes no programa Arlequin v. 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

Tabela 5.6 – Frequência alélica do pool, Estado de São Paulo, 2007

Alelo	DXS6854	DXS7424	DXS101	DXS6808	DXS7132
7	0,003				
8	0,006	0,003			
9	0,074				
10	0,210	0,009		0,114	0,006
11	0,111	0,017		0,713	0,011
12	0,375	0,026		0,165	0,102
13	0,153	0,094		0,006	0,264
14	0,068	0,188	0,003		0,355
15		0,298	0,006	0,003	0,230
16		0,267	0,009		0,031
17		0,082	0,011		
18		0,014	0,034		
19			0,045		
20		0,003	0,037		
21			0,065		
22			0,031		
23			0,063		
24			0,179		
25			0,119		
26			0,216		
27			0,088		
28			0,060		
29			0,020		
30			0,011		
31			0,003		

A Tabela 5.7 demonstra os haplótipos encontrados em indivíduos do gênero masculino, indicando a diversidade haplotípica (0,999326675), ou seja, a probabilidade de selecionar dois indivíduos ao acaso na população e apresentarem o mesmo haplótipo é de 0,000673325, denominada de probabilidade de coincidência. Assim como o Poder de Discriminação Haplotípico (0,955223881) indicando que, ao analisar estes marcadores, eles irão diferenciar os homens em aproximadamente 95,5% da população masculina.

Tabela 5.7 – Tabela de haplótipos (gênero masculino), Estado de São Paulo, 2007

Haplótipo	n	freqüência	DXS6854	DXS7424	DXS101	DXS6808	DXS7132
H1	1	0,0075	9	13	21	11	13
H2	1	0,0075	9	13	28	11	12
H3	1	0,0075	9	14	19	12	13
H4	1	0,0075	9	14	26	11	12
H5	1	0,0075	9	15	21	12	14
H6	1	0,0075	9	15	23	12	12
H7	1	0,0075	9	15	25	11	13
H8	1	0,0075	9	16	22	11	15
H9	1	0,0075	9	16	26	11	14
H10	1	0,0075	9	17	25	11	15
H11	1	0,0075	10	12	23	11	11
H12	1	0,0075	10	14	24	11	12
H13	1	0,0075	10	14	25	11	13
H14	1	0,0075	10	14	26	10	12
H15	1	0,0075	10	14	27	10	13
H16	1	0,0075	10	15	23	11	13
H17	1	0,0075	10	15	24	11	15
H18	1	0,0075	10	15	26	11	14
H19	1	0,0075	10	15	26	11	15
H20	1	0,0075	10	15	27	11	13
H21	1	0,0075	10	15	27	11	14
H22	1	0,0075	10	15	28	11	15
H23	1	0,0075	10	16	16	11	13
H24	1	0,0075	10	16	24	11	12
H25	1	0,0075	10	16	24	12	13
H26	1	0,0075	10	16	26	11	13
H27	1	0,0075	10	16	26	11	14
H28	1	0,0075	10	16	27	10	13
H29	1	0,0075	10	17	23	11	14
H30	1	0,0075	10	17	23	12	13
H31	1	0,0075	10	17	25	11	15
H32	1	0,0075	10	17	25	13	14
H33	1	0,0075	10	17	26	10	14
H34	1	0,0075	11	11	23	11	14
H35	1	0,0075	11	13	25	11	13
H36	1	0,0075	11	14	24	11	15
H37	1	0,0075	11	14	26	11	16
H38	1	0,0075	11	15	21	15	15
H39	1	0,0075	11	15	23	11	15
H40	1	0,0075	11	15	24	11	13
H41	1	0,0075	11	15	26	11	13
H42	1	0,0075	11	15	27	11	15
H43	1	0,0075	11	16	19	11	14
H44	1	0,0075	11	16	26	11	13
H45	1	0,0075	11	16	27	11	13
H46	1	0,0075	11	16	28	12	14
H47	1	0,0075	11	17	23	11	13
H48	1	0,0075	11	17	25	11	14

continua

continuação

Haplótipo	n	freqüência	DXS6854	DXS7424	DXS101	DXS6808	DXS7132
H49	1	0,0075	12	10	27	10	14
H50	1	0,0075	12	12	26	12	15
H51	1	0,0075	12	13	20	11	13
H52	1	0,0075	12	13	24	11	14
H53	1	0,0075	12	13	30	11	14
H54	1	0,0075	12	13	31	11	14
H55	1	0,0075	12	14	21	12	15
H56	1	0,0075	12	14	23	11	14
H57	1	0,0075	12	14	24	11	13
H58	1	0,0075	12	14	25	11	13
H59	1	0,0075	12	14	25	12	13
H60	1	0,0075	12	14	26	10	12
H61	1	0,0075	12	14	26	11	16
H62	1	0,0075	12	14	26	12	13
H63	2	0,0149	12	14	27	11	14
H64	1	0,0075	12	14	28	11	12
H65	1	0,0075	12	15	16	10	12
H66	1	0,0075	12	15	20	12	14
H67	1	0,0075	12	15	21	10	15
H68	1	0,0075	12	15	21	11	12
H69	1	0,0075	12	15	21	12	16
H70	1	0,0075	12	15	22	10	14
H71	1	0,0075	12	15	23	11	13
H72	1	0,0075	12	15	24	11	12
H73	1	0,0075	12	15	24	11	13
H74	1	0,0075	12	15	24	11	14
H75	1	0,0075	12	15	24	11	15
H76	1	0,0075	12	15	24	12	13
H77	1	0,0075	12	15	25	11	13
H78	2	0,0149	12	15	25	11	14
H79	1	0,0075	12	15	26	10	15
H80	1	0,0075	12	15	26	11	13
H81	2	0,0149	12	15	26	11	14
H82	1	0,0075	12	15	28	11	13
H83	1	0,0075	12	15	28	11	14
H84	1	0,0075	12	15	28	11	15
H85	1	0,0075	12	15	29	12	13
H86	2	0,0149	12	16	19	11	14
H87	1	0,0075	12	16	19	11	15
H88	1	0,0075	12	16	21	11	14
H89	1	0,0075	12	16	23	11	15
H90	1	0,0075	12	16	24	11	12
H91	1	0,0075	12	16	24	11	15
H92	1	0,0075	12	16	28	10	15
H93	1	0,0075	12	17	24	11	15
H94	1	0,0075	12	17	25	11	14
H95	1	0,0075	12	17	28	11	12
H96	1	0,0075	12	18	25	10	14
H97	1	0,0075	13	13	24	12	14

continua

conclusão

Haplótipo	n	freqüência	DXS6854	DXS7424	DXS101	DXS6808	DXS7132
H98	1	0,0075	13	13	27	10	13
H99	1	0,0075	13	14	18	11	14
H100	2	0,0149	13	14	28	11	14
H101	1	0,0075	13	15	21	11	13
H102	1	0,0075	13	15	23	11	12
H103	1	0,0075	13	15	24	11	13
H104	1	0,0075	13	15	24	11	14
H105	1	0,0075	13	15	24	12	13
H106	1	0,0075	13	15	25	11	13
H107	1	0,0075	13	15	26	11	13
H108	2	0,0149	13	15	26	11	14
H109	1	0,0075	13	16	15	11	15
H110	1	0,0075	13	16	20	11	14
H111	1	0,0075	13	16	21	10	13
H112	1	0,0075	13	16	23	12	14
H113	1	0,0075	13	16	24	11	15
H114	1	0,0075	13	16	26	11	14
H115	1	0,0075	13	16	26	12	13
H116	1	0,0075	13	17	18	10	13
H117	1	0,0075	13	17	25	12	14
H118	1	0,0075	13	18	19	10	14
H119	1	0,0075	14	11	27	11	14
H120	1	0,0075	14	14	27	11	14
H121	1	0,0075	14	15	23	11	15
H122	1	0,0075	14	15	24	11	11
H123	1	0,0075	14	15	24	11	13
H124	1	0,0075	14	15	26	11	14
H125	1	0,0075	14	15	28	11	13
H126	1	0,0075	14	16	24	11	14
H127	1	0,0075	14	16	24	12	14
H128	1	0,0075	14	20	19	12	15

A Tabela 5.8 demonstra o cálculo do Poder de Discriminação Combinado, ou seja, se fosse utilizado o conjunto dos cinco STRs do cromossomo X analisados neste estudo, para um teste de investigação de paternidade ou identificação humana, o poder de diferenciar um indivíduo do gênero masculino seria 99,92% e do gênero feminino 99,99%.

Tabela 5.8 – Poder de Discriminação do conjunto dos cinco STRs, Estado de São Paulo, 2007

	Masculino	Feminino
Poder de Discriminação Combinado (DESMARAIS et al, 1998)	0,999168	0,999994

6 DISCUSSÃO

Conforme relata Góis (2006), o Brasil é formado por uma combinação de indivíduos provenientes de diferentes regiões do globo, por isso a importância da realização de estudos de frequência das populações para a determinação de sua aplicação em investigação forense.

Trata-se de um produto de um processo de miscigenação entre europeus (especialmente portugueses), africanos e indígenas, devendo ser ressaltado que a contribuição de cada um desses grupos étnicos foi diferente em distintas regiões geográficas brasileiras.

De acordo com Szibor et al. (2003), o *Genome Database* lista um total de 26 trinucleotídeos e 90 tetranucleotídeos STRs do cromossomo X, porém, somente 18 tetranucleotídeos e três trinucleotídeos STRs aparecem como sendo comuns na prática forense. Dentre as regiões utilizadas nesse trabalho, apenas o DXS7132, DXS101 e DXS7424 aparecem na listagem acima referida, como uso em prática forense.

Optou-se pela análise dos cinco STRs do cromossomo X: DXS6854, DXS7424, DXS101, DXS6808, DXS7132 pelo fato de o Laboratório Biocod, em Belo Horizonte, Minas Gerais, possuir uma escada alélica desenvolvida *in-house*, após a retirada do mercado do único kit comercial para o cromossomo X, o Mentype® Argus X-UL (Biotype), cujos STRs eram DXS8378, DXS7132, HPRTB, DXS7423 e Amelogenina, respaldado por alguns estudos populacionais europeus e já utilizado em casos forenses (OGUZTURUN et al., 2005, CERRI et al., 2005, BARBARO; CORMACI; BARBARO, 2005).

Além disso, a opção de caracterização, neste trabalho, apenas pelo gênero e não pela cor de pele, deve-se a alguns fatores: a não existência (até o momento), de estudos genéticos comprovando que determinadas regiões do genoma definam a cor de pele; a exigência, em pesquisas de cor de pele, envolver critérios subjetivos como a auto-referência; e, ainda, a elevada miscigenação brasileira, historicamente conhecida.

No trabalho de Góis (2006), um estudo de frequência alélica de 12 microssatélites do cromossomo Y, foi realizada estratificação por grupos étnicos, sendo verificado que, apesar de algumas diferenças encontradas entre os grupos, não permitem a afirmação de que a população esteja dividida, não sendo necessário, em casos forenses e de investigação de paternidade, diferenciação entre os grupos étnicos, permitindo um ganho na amplitude da análise.

Os STRs são uma rica fonte de marcadores altamente polimórficos no genoma humano, relativamente pequenos em tamanho e podem ser estudados através do uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), caracterizando-se como ferramentas extremamente úteis para a identificação pessoal e testes de paternidade (OKAMOTO et al., 2003).

Neste sentido, Agrawal et al. (2004) afirmam que dois seres humanos selecionados aleatoriamente são cerca de 99,9% idênticos geneticamente, enquanto que o 0,1% remanescente confere ao elemento a individualidade de todo ser humano. Nesta fração de DNA, que é uma importante ferramenta para o estudo da diversidade humana, estão incluídos os STRs.

A tipificação dos marcadores do cromossomo X tem aumentado, tornando-se um assunto de testes de parentesco, especialmente em certas deficiências que podem ser resolvidas sem o uso de marcadores autossômicos ou cromossomo Y,

contudo, esta aplicação somente interessa a uma porção minoritária destes testes e, conseqüentemente, há poucos cientistas pesquisando sobre o tema (SZIBOR; HERING; EDELMANN, 2006), fato verificado pela ausência de estudos divulgados de frequência alélica do cromossomo X na população brasileira até o presente momento.

Sendo assim, de acordo com Santos¹ (2007), no caso de um suposto pai falecido e o filho questionado ser do sexo feminino, é possível analisar marcadores ligados ao cromossomo X entre parentes diretos do suposto pai, porém o emprego de polimorfismos ligados ao cromossomo X ainda é incipiente, em todos os lugares do mundo, e não existe, ainda, kits comerciais para este fim (informação verbal).

Dentre as propriedades relacionadas por Szibor et al. (2003) para a aplicação forense de marcadores do cromossomo X, encontra-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Conforme relata Beiguelman (1996), existem oito condições para a obtenção do equilíbrio de Hardy-Weinberg: (1) a população é infinita; (2) existe o mesmo número de homens e mulheres na população; (3) a população está em panmixia, ou seja, todos se casam aleatoriamente, não existindo casamentos preferenciais por causa de seu genótipo, fenótipo, estratificação social ou consangüinidade; (4) todos os casais da população são igualmente férteis e geram o mesmo número de filhos; (5) não há sobreposição de gerações na população; (6) os genes da população não sofrem mutações; (7) a população não está sob pressão de seleção natural, pois todos os indivíduos são igualmente viáveis; e (8) a população não recebe nem emite um fluxo gênico capaz de alterar sua composição gênica original, porque ela não sofre miscigenação com uma população imigrante (com

¹ Informação fornecida por Santos SEB, na conferência "Marcadores genéticos uniparentais: existe (ou não) a necessidade de criar bancos de dados regionais?", em São Paulo, 2007, durante o Users Meeting de HID 2007, Applied Biosystems.

freqüências gênicas diferentes) nem há emigração diferencial (saída de grupos de indivíduos com freqüência gênica distinta do resto da população). E, apesar de nenhuma população humana obedecer a estas oito premissas, a prática tem demonstrado que, em numerosas populações humanas, os genótipos se distribuem de acordo com a Lei de Hardy-Weinberg.

No teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg, todos os STRs estudados, com exceção do DXS101, não apresentaram nenhum desvio, indicando $p > 0,05$ no teste exato de Fisher. O valor apresentado pelo DXS101 ($p < 0,00001$) pode indicar que está ocorrendo mutação ou ligação (um alelo está sendo doado de forma mais favorável que outro alelo). Neste sentido, Wierdl, Dominska e Petes (1997) relatam uma forte associação entre o número de repetições e a taxa de mutação, porém Edelman e Szibor (2001) afirmam que mutações ainda não foram observadas no locus DXS101.

Em estudo de Bini et al. (2005), composto por 556 indivíduos das regiões norte e central da Itália, o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg resultou em significativamente fora do equilíbrio para o locus DXS101, sendo este o único relato encontrado na literatura.

O outro requisito analisado para a viabilidade na aplicação forense é o Poder de Discriminação, em homens e mulheres, a fim de verificar a probabilidade de que, ao escolher aleatoriamente uma amostra, ela possa ser identificada em relação às demais (DESMARAIS et al., 1998). No presente trabalho, os valores do Poder de Discriminação, para os homens apresentaram-se como intermediários em quatro loci STR (DXS6854, DXS7424, DXS101 e DXS7132) e baixo no locus DXS6808. Já nas mulheres, os mesmos quatro loci STRs apresentaram um elevado Poder de

Discriminação, variando de 88% (DXS7132) a 98% (DXS101), mas também apresentando um baixo Poder de Discriminação no DXS6808.

O locus com maior Poder de Discriminação, tanto em homens quanto em mulheres, foi o DXS101, semelhante aos resultados de Edelman e Szibor (2001) que relatam possuir este STR um alto nível de polimorfismo, resultante de 18 alelos (alelo 14 a 32), sendo que em nosso estudo foram encontrados os mesmos alelos, com exceção do alelo 32, indicando ser o DXS101 um marcador altamente informativo, devendo ser preferencialmente empregado para testes de parentesco.

Além disso, ao analisarmos os haplótipos masculinos, haja vista que diferentes STRs de um mesmo cromossomo são transmitidos em bloco pelo homem, observa-se a existência de uma elevada diversidade haplotípica (acima de 99,9%), o que conduz à uma probabilidade de coincidência, ou seja, a verificação de um mesmo haplótipo na população, excelente (menor que 0,07%).

Com relação à análise de cada loco separadamente, podemos observar uma variação quanto ao número de alelos apresentados, suas freqüências e parâmetros utilizados conforme o relatado na literatura.

O locus DXS6854 variou entre alelo 7 e 14 (em mulheres) e entre alelo 9 e 14 (para homens). Em trabalho realizado por Qiuling, Dejian e Hanling (2002), foi encontrado apenas um alelo além dos descritos (15), em estudo populacional na China. O Poder de Discriminação encontrado em nosso estudo (homens: 0,769; mulheres: 0,916) em comparação ao estudo chinês (homens: 0,701; mulheres: 0,863), reforça a capacidade de identificação forense e o uso em testes de paternidade.

O locus DXS7424 variou, em nosso estudo, do alelo 8 ao 20, sendo que Edelman et al. (2002) verificaram alelos entre 9 e 20. O Poder de Discriminação

encontrado em nosso estudo (homens: 0,788; mulheres: 0,924) foi menor do que no estudo de Edelmann et al. (2002) (homens: 0,975; mulheres: 0,982).

Ainda sobre o locus DXS7424, Edelmann et al. (2001), em estudo de frequência alélica da população alemã, verificou Poder de Discriminação em mulheres de 0,928 e, em homens, de 0,794. Em outro estudo com a população alemã, Poetsch et al. (2005) notaram valores semelhantes para o Poder de Discriminação, 0,918 (mulheres) e 0,781 (homens). Em estudo realizado por Lee et al. (2004), em população coreana, o Poder de Discriminação encontrado foi 0,722 (homens) e 0,871 (mulheres), com Poder de Exclusão de 0,536. Os nossos dados demonstram um Poder de Exclusão de 0,582. Em população italiana, os resultados para o mesmo parâmetro indicaram, de acordo com estudo de Robino et al. (2006), 0,752 (homens) e 0,901 (mulheres).

Esses números vêm corroborar com o fato de que o uso das frequências de populações estrangeiras, normalmente fornecidas juntamente com os kits de STR utilizados acaba não comprometendo os resultados; mas em casos criminais, cuja quantidade de amostra é pequena e/ou apresenta-se bastante degradada, torna-se imprescindível o conhecimento da distribuição de frequência dos alelos particulares daquela população.

No locus DXS101, um dos mais informativos para utilização na prática forense, os dados de Pereira et al. (2006), realizados com a população do norte de Portugal indicam Poder de Discriminação semelhante (homens: 0,888 e mulheres: 0,976) ao nosso estudo, sendo a distribuição de frequências do pool muito semelhantes, haja vista que os alelos mais frequentes, em ambas as populações, são 24, 25 e 26. Esses alelos aparecem como os mais frequentes em outros estudos

realizados, em diversas populações (BINI et al., 2005; CHEN; PU, 2004; TONI et al., 2003; ZARRABEITIA et al., 2002).

O locus DXS7132 apresenta bons índices do Poder de Discriminação, podendo ser utilizado na prática forense. Estes dados são respaldados por estudos em outras populações reforçando essa característica (PEPINSKI et al., 2005; ROBINO et al., 2006; SHIN et al., 2005; YU; ZHANG; LI, 2005; ZALÁN et al., 2007).

Diferentemente das quatro outras regiões analisadas neste estudo, o locus DXS6808 apresenta uma fraca contribuição à investigação forense, haja vista seu baixo Poder de Discriminação (em ambos os gêneros), sendo encontrados apenas cinco diferentes alelos na população estudada, com um deles presente em mais de 70% da população.

O Poder de Exclusão, apesar de não ser realizado em uma grande quantidade de estudos disponíveis na literatura científica, também permite uma grande utilização em testes de paternidade, haja vista que o índice demonstra a capacidade de excluir um suposto pai a partir dos dados de uma filha (BRENNER; MORRIS, 1990).

Em nosso estudo, o Poder de Exclusão para os loci DXS6854, DXS7424, DXS101, DXS6808 e DXS7132 foram, respectivamente, 0,582, 0,582, 0,549, 0,108 e 0,457, realizados através do Programa PowerStats®. Neste sentido, o trabalho de Chen e Pu (2004) realizaram o mesmo cálculo, encontrando na população de Taiwan os valores de 0,594 e 0,469, para os loci DXS101 e DXS7132, respectivamente. E, na população coreana, utilizando do mesmo cálculo, Shin et al. (2005) obtiveram um Poder de Exclusão de 0,475 (para o DXS7132) e 0,664 (para o DXS101).

Complementarmente, foram realizados, conforme proposto por Desmarais et al. (1998), o MEC_T (Chance de Exclusão Significativa para marcadores do cromossomo X em trios envolvendo filhas) e o MEC_D (Chance de Exclusão Significativa para marcadores do cromossomo X na dupla pai-filha, ausência da mãe).

O MEC_D apontou, em nosso estudo, os seguintes resultados: DXS6854 (0,606), DXS7424 (0,629), DXS101 (0,782), DXS6808 (0,271) e DXS7132 (0,556) e no MEC_T, os seguintes resultados: DXS6854 (0,739), DXS7424 (0,757), DXS101 (0,871), DXS6808 (0,410) e DXS7132 (0,695).

Neste sentido, referente ao STR DXS101, observamos que Bini et al. (2005) apontam um MEC_D com valor de 0,780 e MEC_T 0,870 para amostras de população italiana. Já Zarrabeitia et al. (2002) encontraram o valor de 0,770 (MEC_D) e 0,862 (MEC_T) em região norte da Espanha. Em coreanos, Shin et al. (2004) encontraram o valor de 0,662 (MEC_D) e 0,790 (MEC_T). Na população portuguesa, o valor encontrado por Pereira et al. (2006) foi 0,787 (MEC_D) e 0,875 (MEC_T).

Quanto ao DXS7424, o valor encontrado para o MEC_D, em estudo realizado por Edelmann et al. (2001), na população alemã, foi 0,639 e o valor para o MEC_T 0,764. Já na população coreana, em estudo de Lee et al. (2004), os valores encontrados foram 0,536 (MEC_D) e 0,667 (MEC_T). E, em população italiana, os valores obtidos foram 0,578 (MEC_D) e 0,711 (MEC_T), de acordo com Robino et al. (2006).

No DXS7132, o valor do MEC_D foi 0,558 e o MEC_T foi 0,692, em população do noroeste italiano (ROBINO et al., 2006). Já na população polonesa, os valores obtidos foram 0,522 (MEC_D) e 0,664 (MEC_T) (PEPINSKI et al., 2005). E, na população portuguesa, 0,553 (MEC_D) e 0,693 (MEC_T), segundo Pereira et al. (2006).

Todos esses indicativos demonstram propriedades que permitem a utilização dos STRs do cromossomo X na prática forense, através de identificação humana e testes de parentesco, haja vista os valores próximos de estudos já validados internacionalmente.

Ainda há o fato de, em homens, a herança ser haplotípica, ou seja, ser transmitida em bloco, sem alterações, o que permite a avaliação da diversidade haplotípica (em nosso estudo de 99,93%), permitindo concluir que a possibilidade de, aleatoriamente, selecionar dois indivíduos de mesmo haplótipo ser menor que 0,07%. E, conforme salientam Szibor, Hering e Edelman (2006), em homens, os marcadores do cromossomo X aparecem em um estado de homozigose e, assim, a tipificação dos marcadores agrupa-se automaticamente, fornecendo haplótipos.

No trabalho de Verzeletti et al. (2007), realizado com a população de Brescia (norte da Itália), avaliando-se os dados haplotípicos para DXS8378, HPRTB, DXS7423 e DXS7132, foi verificada uma diversidade haplotípica de 97,52%.

Essas peculiaridades fazem pensar que, em breve, os marcadores do cromossomo X estarão sendo freqüentemente empregados, haja vista que, conforme Szibor et al. (2003) afirmam, a proporção de crianças nascidas fora de um casamento está constantemente crescendo na sociedade atual e, como exemplo, citam que “perfazem 25% de todos os nascimentos na Alemanha”.

Neste sentido, de acordo com dados do Instituto de Medicina Social e de Criminologia (IMESC, 2007), do Governo do Estado de São Paulo e associado à Secretaria da Justiça e Defesa da Cidadania, desde 18 de Janeiro de 2000, as perícias de investigação de paternidade são realizadas por vínculo genético (DNA) e, no ano de 2006, foram realizados um total de 9.299 atendimentos neste setor.

Conforme é notório, quando o suposto pai está ausente, é solicitado ao Magistrado a convocação de parentes do suposto pai, porém, de acordo com Cicarelli², muitas vezes o laudo é inconclusivo, devido ao fato de o número de pessoas e/ou descendentes não ser suficiente na utilização de marcadores autossômicos (informação pessoal), denotando, mais uma vez, a importância do uso dos marcadores do cromossomo X na prática de identificação e paternidade.

Em virtude dessa diferença de alelos entre marcadores tradicionais autossômicos e do cromossomo X para o sexo masculino, um menor número de marcadores podem ser utilizados para a determinação do vínculo biológico quando se utiliza o cromossomo X (SZIBOR et al., 2003), sendo a vantagem principal do uso de um menor número de marcadores respaldada por uma aplicação em amostras com menor quantidade ou mais degradada, assim como a diminuição dos custos nos processamento das amostras.

²Cicarelli RMB. Procedimentos quando o pai está ausente e a criança é do gênero feminino.[mensagem pessoal]. Mensagem recebida por ricardohenrique@usp.br em 07 abr. 2007.

7 CONCLUSÕES

É possível concluir, frente aos dados apresentados, que:

1. A frequência alélica dos cinco STRs do cromossomo X (DXS6854, DXS7424, DXS101, DXS7132 e DXS6808) apresentam-se de forma bastante diversa nos indivíduos da população brasileira, residentes no Estado de São Paulo;
2. Na população estudada, é possível a utilização desses marcadores na prática forense e em testes de paternidade, com exceção do DXS6808, haja vista as características apresentadas frente aos parâmetros estatísticos analisados.

REFERÊNCIAS³

Agrawal S, Khan F, Talwar S, Nityanand S. Short tandem repeat technology has diverse applications: individual identification, phylogenetic reconstruction and chimerism based post haematopoietic stem cell transplantation graft monitoring. *Indian J Med Sci* 2004;58:297-304.

Alberts B, Bray D, Leiws J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.

Almeida EC de S, Vendúscolo DMS, Mestriner-Junior W. A conformação da odontologia enquanto profissão: uma revisão bibliográfica. *Rev Bras Odontol* 2002; 59(6):370-3.

Anzai-Kanto E, Hirata MH, Hirata RDC, Nunes FD, Melani RFH, Oliveira RN. DNA extraction from human saliva deposite don skin and its use in forensic identification procedures. *Braz Oral Res* 2005;19(3):216-22.

Asamura H, Sakai H, Kobayashi K, Ota M, Fukushima H. MiniX-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis. *Int J Legal Med* 2006;120:174-81.

Barbaro A, Cormaci P, Barbaro A. X-STR typing for an identification casework. In: 21st Congress International Society for Forensic Genetics, Ponta Delgada, Azores, 2005;63.

Beiguelman B. *Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações*. 2ª. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 1996.

Bilge Y, Kedici PS, Alakoc YD, Ülküer KL, Ilkyaz YY. The identification of a dismembered human body: a multidisciplinary approach. *Forensic Sci Int* 2003;137:141-6.

Bini C, Ceccardi S, Ferri G, Pelotti S, Alù M, Roncaglia E, et al. Development of a heptaplex PCR system to analyse X-chromosome STR loci from five Italian population samples: a collaborative study. *Forensic Sci Int* 2005;153(2-3):231-6.

³ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Brannon RB, Morlang WM. The USS Iowa disaster: success of the forensic dental team. *J Forensic Sci* 2004;49(5):1067-8.

Brasil. Conselho Federal de Odontologia. Resolução nº. 63, de 30 de Junho de 2005. Consolidação das normas para procedimentos nos conselhos de Odontologia. Disponível em: URL: <http://www.cfo.org.br> [20 mar 2007].

Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de Outubro de 1996. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Disponível em: URL: <http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/Reso196.doc> [10 fev 2007].

Brasil. Lei 5.081, de 24 de Agosto de 1966. Regulamenta o exercício da Odontologia no Brasil. Diário Oficial da União, Brasília (DF) 1966.

Brenner C, Morris J. Paternity index calculation in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. In: *Proceedings for the International Symposium of Human Identification*. Madison: Promega Corporation, 1990:21-53.

Butler JM. *Forensic DNA typing*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2005.

Calabrez MCT, Saldanha PH. A pesquisa de DNA em odontologia forense. In: Silva M. *Compêndio de odontologia legal*. Rio de Janeiro: Editora Medsi; 1997. cap.14, p. 167-221.

Campobasso CP, Falamingo R, Vinci F. Investigation of Italy's deadliest building collapse: forensic aspects of a mass disaster. *J Forensic Sci* 2003;48(3):635-9.

Cate T. *Oral histology: development, structure and function*. Saint Louis: Mosby; 1988.

Cerri N, Verzeletti A, Gasparini F, Bandera B, De Ferrari F. Population data for 4 X-chromosomal STR loci in a population sample from Brescia (northern Italy). In: *21st Congress International Society for Forensic Genetics*, , Ponta Delgada, Azores, 2005;81.

Chen M, Pu C. Population data on the X chromosome short tandem repeat loci DXS10011, DXS101, DXS6879, DXS7132, DXS8377 and DXS 9895 in Taiwan. *Forensic Sci Int* 2004;146:65-7.

Côrrea R. Regulamentação da odontologia. Curitiba: Instituto Paranaense de Estudos Superiores; 1976. p. 7-39.

Croce D, Croce-Júnior D. Manual de medicina legal. 5ª ed. São Paulo: Saraiva; 2004. cap.2, p. 264-397.

Del-Campo ERA. Medicina legal. 2ª ed. São Paulo: Saraiva; 2006. cap.3, p. 57-99.

Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, Perreault C, Busque L. Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). J Forensic Sci 1998;43:1046–9.

Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD, et al. Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs - results of a collaborative European (EDNAP) exercise. Forensic Sci Int 2006;164(1):33-44.

Duarte FAM. A avaliação do DNA como prova forense. Ribeirão Preto: Fundec; 2001.

Dumancic J, Kaic Z, Njemirovskij V, Brkic H, Zecevic D. Dental identification after two mass disasters in Croatia. Croat Med J 2001;42:657-62.

Edelmann J, Szibor R. DXS101: a highly polymorphic X-linked STR. Int J Legal Med 2001;114:301-4.

Edelmann J, Hering S, Michael M, Lessig R, Deichsel D, Meiser-Sundhausen G. 16 X-chromosome STR loci frequency data from a german population. Forensic Sci Int 2001;124:215-8.

Edelmann J, Hering S, Kuhlisch E, Szibor R. Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome. Forensic Sci Int 2002;125(2-3):217-22.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evolut Bioinf Online 2005;1:47-50.

Farah SB. DNA: segredos & mistérios. São Paulo: Sarvier; 1997.

Ferreira RA. Reconhecendo pela boca. Rev Assoc Paul Cir Dent 1996;50(6):464-73.

Furtado F. Do lixo ao luxo: DNA tido como irrelevante pode ser mais importante para a evolução do que se pensava. Ciênc Hoje On-Line. 2005 Out 31. Disponível em: URL: <http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3564> [3 maio 2007].

Galante-Filho H, Figini AL, Reis AB, Jobim LF, Silva M. Identificação humana. Porto Alegre: Sagra Luzzatto; 1999.

Gattas GJF, Figaro-Garcia C, Fridman C, Battistella LR, Massad E, Neumann MM, et al. Projeto Caminho de Volta: busca de crianças desaparecidas no Estado de São Paulo. Rev Cult Extensão USP 2005. Disponível em: URL: <http://www.usp.br/prc/revista/> [10 fev 2007].

Genome Database. Disponível em: URL: <http://www.gdb.org> [12 mar 2007].

Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. Forensic Sci Int 2000;112:17-40.

Glass RT. Body identification by forensic dental means. Gen Dent 2002;50(1):34-8.

Góis CC. Estudo de frequências alélicas de 12 microssatélites do cromossomo Y na população brasileira de Araraquara e da região da grande São Paulo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 1992;48:361-72.

Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. Am J Hum Genet 1994;55:175-89.

Hanaoka Y, Inoue M, Tsai TH, Minaguchi K. Fundamental and practical study for DNA analysis using tooth as a source of DNA. Japan J Legal Med 1995;49(1):1-10.

Imesc. Instituto de Medicina Social e Criminologia de São Paulo. Perícias de investigação de paternidade (2006): atendimentos e laudos expedidos. 2007 Jan 10. Disponível em: URL: <http://www.imesc.sp.gov.br> [24 abr 2007].

Iscan MY, Olivera HE. Forensic anthropology in Latin America. *Forensic Sci Int* 2000;109:15-30.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatélites" regions in human DNA. *Nature* 1985;314:67-73.

Jobim LF, Jobim MR, Brenner C. Identificação humana pelo DNA. In: Galante-Filho H, Figini AL, Reis AB, Jobim LF, Silva M. Identificação humana. Porto Alegre: Sagra Luzzatto; 1999. cap.11, p. 239-303.

Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med* 1997;110:118-24.

Keiser-Nielsen S, Strom F. The odontological identification of Eva Braun Hitler. *Forensic Sci Int* 1983;21:59-64.

Koh D, Ng DPK, Choo SGL, Ng V, Fu Q. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clin Chim Acta* 2004;343:191-4.

Lau G, Tan WF, Tan PH. After the Indian Ocean tsunami: Singapore's contribution to the international disaster victim identification effort in Thailand. *Ann Acad Med* 2005;34(5):341-51.

Lee HY, Park MJ, Jeong CK, Lee SY, Yoo J, Chung U, et al. Genetic characteristics and population study of 4 x-chromosomal STRs in Koreans: evidence for a null allele at DXS9898. *Int J Legal Med* 2004;118:355-60.

Lincoln PJ, Thomson J. *Methods in molecular biology: forensic DNA profiling protocols*. Totowa: Humana Press; 1998.

Lombardi R. O DNA a serviço da investigação policial. *Rev Ciênc Criminal* 2007;1(8):12-4.

Ludes B, Tracqui A, Pfitzinger H, Kintz P, Levy F, Disteldorf M, et al. Medico-legal investigations of the airbus A320 crash upon Mount Ste-Odile, France. *J Forensic Sci* 1994;39:1147-52.

Malaver PC, Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Forensic Sci* 2003;44(3):306-9.

Mixich F, Ioana M, Mixich VA. Paternity analysis in special fatherless cases without direct testing of alleged father. *Forensic Sci Int* 2004;146S:159-61.

Miyajima F, Daruge E, Daruge-Júnior E. A importância da odontologia na identificação humana: relato de um caso pericial. *Arq Odontol* 2001;37(2):133-42.

Morgan OW, Sribanditmongkol P, Perera C, Sulasmi Y, Alphen DV, Sondorp E. Mass fatality management following the South Asian tsunami disaster: case studies in Thailand, Indonesia, and Sri Lanka. *PLoS Med* 2006;3(6):809-15.

Moura-Neto RS. Análise forense. *Rev Panorama Justiça* 1998;9:38.

Musse JO, Marques JAM, Silva RHA, Oliveira RN. Aplicação do DNA na análise de marcas de mordidas. In: Marques JAM, Galvão LCC, Silva M. Marcas de mordidas. Feira de Santana: UEFS; 2007. cap.10, p.169-91.

Nambiar P, Jalil N, Singh B. The dental identification of victims of an aircraft accident in Malaysia. *Int Dent J* 1997;47(1):9-15.

Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press; 1987.

Oguzturun C, Thacker CR, Ballard D, Syndercombe D. Population study of four X chromosomal STR loci in the UK population. In: 21st Congress International Society for Forensic Genetics, Ponta Delgada, Azores, 2005;153.

Okamoto O, Yamamoto Y, Inagaki S, Yoshitome K, Ishikawa T, Imabayashi K, et al. Analysis of short tandem repeat (STR) polymorphisms by the PowerPlex 16 System and capillary electrophoresis: application to forensic practice. *Acta Med Okayama* 2003;57(2):59-71.

Oliveira RN, Daruge E, Galvão LCC, Tumang AJ. Contribuição da odontologia legal para a identificação "post-mortem". *Rev Bras Odontol* 1998;55(2):117-22.

Oliveira RN, Nunes FD, Anzai EK, Daruge E, Mesquita RA, Ozaki AN, et al. Population studies of the Y-chromosome of loci DYS390, DYS391 and DYS393 in brazilian subjects and its use in human identification. *J Forensic Odontostomatol* 2002;20(1):6-9.

Ozaki AN. Determinação da frequência de genes de algumas regiões hipervariáveis do genoma humano para estudo do vínculo genético familiar em caucasianos brasileiros [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 1999.

Paneto GG. Utilização do DNA mitocondrial no contexto forense brasileiro [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP; 2006.

Pardini VC, Ferreira ACS, Gomes KB, Rodríguez SLB. Uso do DNA proveniente de polpa dentária para identificação humana: relato de caso e técnica. *Rev CROMG* 2001;7(1):33-5.

Pena SDJ, Carvalho-Silva DR, Alves-Silva J, Prado VF, Santos FR. Retrato molecular do Brasil. *Ciênc Hoje* 2000; 27(159):16-25.

Pepinski W, Skawronska M, Niemcunowicz-Janica A, Koc-Zorawska E, Janica J, Soltyszewski I. Polymorphism of four X-chromosomal STRs in a polish population sample. *Forensic Sci Int* 2005;151:93-5.

Pereira R, Gomes I, Amorim A, Gusmão L. Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in northern Portugal. *Int J Legal Med*. No prelo 2007;121:3.

Poetsch M, Petersmann H, Repenning A, Lignitz E. Development of two pentaplex systems with X-chormosomal STR loci and their allele frequencies in a northeast German population. *Forensic Sci Int* 2005;155:71-6.

Pötsch L, Meyer U, Rothschild S, Schneider PM, Rittner C. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *Int J Leg Med* 1992;105:139-43.

Pretty IA, Sweet D. A look at forensic dentistry – part 1: the role of teeth in the determination of human identity. *Br Dent J* 2001;190(7):359-66.

Qiuling MU, Dejian LU, Hanling LU. Polymorphism of DXS6854 locus in Guandong Han population. *China Acad J* 2002;17:22-3.

Remualdo VR. Avaliação de três métodos de extração de DNA de dentes humanos submetidos ao calor [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2004.

Remualdo VR, Oliveira RN. Potencial de análise forense do DNA de diferentes amostras biológicas. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2005;59(6):421-4.

Robino C, Giolitti A, Gino S, Torre C. Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 12 x-chromosomal STR loci in a northwestern italian population sample. *Int J Legal Med* 2006;120:315-8.

Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 2005;434:325-37.

Rothwell BR, Haglund W, Morton-Junior TH. Dental identification in serial homicides: the Green River murders. *J Am Dent Assoc* 1989;119(3): 373-9.

Rudin N, Inman K. An introduction to forensic DNA analysis. 2ª ed. Florida: CRC Press; 2002.

Sales-Peres A, Silva RHA, Lopes-Junior C, Carvalho SPM. Forensic tanatology: biological and legal aspects. *Braz J Oral Sci* 2006;5(19):1198-202.

Santos CF, Sakai VT, Machado MAAM, Schippers DN, Greene AS. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J Appl Oral Sci* 2004;12(1):1-11.

São Paulo. Decreto nº 44.336, de 15 de outubro de 1999. Regulamenta a Lei nº 9.934, de 16 de abril de 1998, que assegura a gratuidade para realização, por determinação judicial, de exames DNA, aos comprovadamente pobres, nas ações de investigação de paternidade e dá providências correlatas. *Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo (SP)* 1999.

Sassouni V. Dentofacial radiography in forensic dentistry. *J Dent Res* 1963;42(1):274-302.

Schwartz TR, Schwartz EZ, Mieszerski L, McNally L, Kobilinsky L. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci* 1991;36(4):979-90.

Shin K, Kwon B, Lee S, Yoo J, Park MJ, Chung U, et al. Five highly informative X-chromosomal STRs in Koreans. *Int J Legal Med* 2004;118:37-40.

Shin SH, Yu JS, Park SW, Min GS, Chung KW. Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. *Forensic Sci Int* 2005;147:35-41.

Silva LAF, Passos NS. DNA forense: coleta de amostras biológicas em locais de crime para estudo do DNA. Maceió: UFAL; 2002.

Silva RHA, Musse JO, Melani RFH, Oliveira RN. Human bite mark identification and DNA technology in forensic dentistry. *Braz J Oral Sci* 2006;5:1193-7.

Silva RHA, Oliveira RN. Odontologia legal e a busca pela identidade humana. 2006 Dez 01. Disponível em: URL: <http://www.jornaldosite.com.br> [20 dez 2006].

Silva RHA, Sales-Peres A, coordenadores. Odontologia Legal: manual-resumo, compêndio de grandes obras medicina legal e odontologia Legal. Bauru; 2004. [Apostila do curso preparatório para concursos em Odontologia Legal].

Smith BC, Holland MM, Sweet D, DiZinno JA. DNA and the forensic odontologist. In: Bowers CM, Bell GL. *Manual of forensic odontology*. 3rd ed. Colorado Springs: American Society of Forensic Odontology; 1997. cap.12, p. 283-98.

Souza-Lima J. A vida e obra de Luiz Lustosa Silva (considerado o “criador” da Odontologia Legal). Rio de Janeiro: Conselho Federal de Odontologia; 1996.

Strachan T, Read A. Genética molecular humana. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.

Sweet D. Why a dentist for identification? *Dent Clin North Am* 2001;45(2):237-51.

Sweet D, Dizzino JA. Personal identification through dental evidence – tooth fragments to DNA. *J Calif Dent Assoc* 1996;24(5):35-42.

Sweet D, Shutler GG. Analysis of salivary DNA evidence from a bite mark on a body submerged in water. *J Forensic Sci* 1999;44(5):1069-72.

Sweet D, Sweet CHW. DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene. *J Forensic Sci* 1995;40:310-4.

Sweet D, Lorente M, Lorente JA, Valenzuela A, Villanueva E. An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *J Forensic Sci* 1997;42:320-2.

Syrjäen SM, Sainio P. Forensic dentistry: recent development towards an independent discipline in modern dentistry. *Proc Finn Dent Soc* 1990;86(3-4):157-70.

Szibor R, Hering S, Edelmann J. A new website compiling forensic chromosome X research is now online. *Int J Legal Med* 2006;120:252-4.

Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D. Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med* 2003;117:67-74.

Toni C, Presciuttini S, Spinetti I, Domenici R. Population data of four X-chromosome markers in Tuscany, and their use in a deficiency paternity case. *Forensic Sci Int* 2003;137:215-6.

Tracey M. Short tandem repeat based identification of individuals and parents. *Croat Med J* 2001;42(3):233-8.

Tsuchimochi T, Iwasa M, Maeno Y, Koyama H, Inoue H, Isobe I, et al. Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with y-chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats. *Am J Forensic Med* 2002;23(3):268-71.

Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in short tandem repeat sequences: a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med* 1994;107:13-20.

Valenzuela A, Marques T, Exposito N, Martín-de-las-Heras S, García G. Comparative study of efficiency of dental methods for identification of burn victims in two bus accidents in Spain. *Am J Forensic Med Pathol* 2002;23(4):390-3.

Valenzuela A, Martin-de-las-Heras S, Marques T, Exposito N, Bohoyo JM. The application of dental methods of identification to human burn victims in a mass disaster. *Int J Legal Med* 2000;113:236-9.

Verzeletti A, Cerri N, Gasparini F, De-Ferrari F. X-chromosome polymorphism on DXS8378, DXS7132, HPRTB and DXS7423 loci in 130 individuals from Brescia (northern Italy). *Leg Med* 2007;9(3):158-60.

Walker MR, Rapley R. *Guia de rotas na tecnologia do gene*. São Paulo: Atheneu; 1999.

Whittaker DK. Research in forensic odontology. *Ann R Coll Surg Engl* 1982;64:175-9.

Wiegand P, Berger B, Edelmann J, Parson W. Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs. *Int J Legal Med* 2003;117:62-5.

Wierdl M, Dominska M, Petes TC. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of microsatellite. *Genetics* 1997;146:769-79.

Yu B, Zhang H, Li S. X-chromosome STRs polymorphisms of han ethnic group from northwest China. *Forensic Sci Int* 2005;153:269-71.

Zalán A, Völgyi A, Jung M, Peterman O, Pamjav H. Hungarian population data of four X-linked markers: DXS8378, DXS7132, HPRTB, and DXS7423. *Int J Legal Med* 2007;121(1): 74-7.

Zarrabeitia MT, Amigo T, Sañudo C, Zarrabeitia A, Gonzáles-Lamuño D, Riancho JA. A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome. *Forensic Sci Int* 2002;129:85-9.

ANEXO

ANEXO A – Ofício de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO Protocolo 84/06

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa "Estudo de frequências alélicas de múltiplos Loci STR do cromossomo X na população do estado de São Paulo e sua contribuição na identificação humana", de responsabilidade do Pesquisador Ricardo Henrique Alves da Silva, sob orientação do Professor Doutor Rogério Nogueira de Oliveira.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 07 de julho de 2006

Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP

*“Mande notícias do mundo de lá
Diz quem fica
Me dê um abraço
Venha me apertar
Tô chegando
Coisa que gosto é poder partir
Sem ter planos
Melhor ainda é poder voltar quando quero
Todos os dias é um vai-e-vem
A vida se repete na estação
Tem gente que chega prá ficar
Tem gente que vai e quer voltar
Tem gente que vai e quer ficar
Tem gente que veio só olhar
Tem gente a sorrir e a chorar
E assim, chegar e partir
São só dois lados
Da mesma viagem
O trem que chega
É o mesmo trem da partida
A hora do encontro é também despedida
A plataforma dessa estação
É a vida desse meu lugar
É a vida desse meu lugar
É a vida”*

**(Encontros e Despedidas – Intérprete: Maria Rita
Letra: Milton Nascimento / Fernando Brant)**