CAROLINA COSTA GÓIS

**ESTUDO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE 12 MICROSSATÉLITES
DO CROMOSSOMO Y NA POPULAÇÃO BRASILEIRA DE
ARARAQUARA E DA REGIÃO DA GRANDE SÃO PAULO**

**São Paulo
2006**

Carolina Costa Góis

**Estudo de frequências alélicas de 12 microssatélites do cromossomo Y na
população brasileira de Araraquara e da região da Grande São Paulo**

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

Área de Concentração: Odontologia Social

Orientador: Prof. Dr. Rogério Nogueira de
Oliveira

São Paulo
2006

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

Góis, Carolina Costa

Estudo de frequências alélicas de 12 microssatélites do cromossomo Y na população brasileira de Araraquara e da região da grande São Paulo / Carolina Costa Góis; orientador Rogério Nogueira de Oliveira. -- São Paulo, 2006.

84p. : tab., fig., 30 cm.

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

1. Odontologia forense 2. Antropologia forense 3. Frequência do gene

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, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

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.

São Paulo, 14/09/2006

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: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Rogério Nogueira de Oliveira pela orientação e confiança e pela contribuição a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Prof Tit Mario Hiroyuki Hirata pela atenção e pelos ensinamentos durante o período em que realizei estágio em seu laboratório, que permitiu meu primeiro contato com a área forense, bem como durante o mestrado.

À Prof^a Tit Regina Maria Barretto Cicarelli pela colaboração e por ter aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais que, com seu apoio e carinho, possibilitaram que eu chegasse até aqui.

Ao Daniel pela paciência, compreensão e pelo estímulo durante estes anos.

À minha irmã Renata por ter sempre me apoiado e incentivado em todas as minhas decisões.

À Evelyn pelo incentivo e ajuda para realização do mestrado e, principalmente, pela amizade.

A Amanda, Jamilly e Vanessa por todo apoio e pela agradável convivência.

A Joyce, Greici, Gabi e Adriana pela cooperação no desenvolvimento deste projeto e assistência durante os períodos em que estive em Araraquara.

Aos amigos e familiares por todo o apoio.

Aos professores e funcionários do Departamento de Odontologia Social pelos ensinamentos e disponibilidade em ajudar a qualquer momento.

À FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

“Época triste é a nossa em que é mais difícil quebrar
um preconceito do que um átomo”.

Albert Einstein

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.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo a determinação da frequência alélica de 12 microssatélites do cromossomo Y na população de Araraquara e da Grande São Paulo, tendo em vista a necessidade de ampliação dos dados referentes a estes marcadores devido a sua crescente aplicação em diferentes áreas, entre elas a forense na qual a utilização destes microssatélites torna-se muitas vezes a única ferramenta disponível para resolução de casos. Para isto foram tipados 200 indivíduos, que não apresentavam relação de parentesco, divididos em quatro grupos de acordo com autotipificação de cor (branco, preto, pardo ou oriental). Foram coletadas destes indivíduos amostras de sangue ou saliva a partir das quais foi feita extração do DNA utilizando diferentes protocolos de acordo com o tipo de amostra, seguida da amplificação dos 12 locos do cromossomo Y através do PowerPlex® Y System (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 6%, no seqüenciador ABI377 (Applied Biosystems) para obtenção dos perfis de cada loco. Os quais foram analisados com a utilização do software GeneScan ver. 2.1 (Applied Biosystems). Foi realizado o cálculo das frequências alélicas e diversidade gênica de cada loco, assim como da diversidade haplotípica e capacidade de discriminação para cada grupo e para a amostra total. A comparação entre os resultados obtidos demonstrou que a variação dentro de cada grupo é maior que a variação entre os grupos. Os resultados obtidos foram enviados ao banco de dados mundial do cromossomo Y (Y-STR Haplotype Reference Database).

Palavras-Chave: cromossomo Y, microsatélite, forense, identificação humana

Góis CC. Allelic frequency study of 12 Y microsatellite in the brazilian population of Araraquara and Grande São Paulo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the allelic frequency of 12 microsatellites of the Y chromosome in Grande São Paulo and Araraquara population, in face of the amplification necessity of these markers data due to the increasing application of these markers on different fields, including the forensic on which the use of them is sometimes the only way to solve crime cases. For this purpose it was typed 200 unrelated individuals divided according to self report in four groups based on color skin (white, black, mulatto or yellow). Blood or buccal swab samples were collected and submitted to DNA extraction with different protocols according to the kind of sample. Subsequent amplification of 12 Y-STR was proceeded using the *PowerPlex® Y System* (Promega) following the manufacture's protocol. The amplification products were submitted to electrophoresis in 6% polyacrilamid gel on ABI377 sequencer (Applied Biosystems) to obtain the profile of each locus. The results were analyzed with GeneScan ver. 2.1 software (Applied Biosystems). The allelic frequency and gene diversity of each locus as well as the haplotypic diversity and discrimination capacity was calculated for each group and for total sample. The comparison among the results showed that the variation inside the groups is higher than between groups. The haplotypes observed on this sample were sent to Y-STR Haplotype Reference Database.

Keywords: Y chromosome, Y-STR, forensic, human identification

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A	Base nitrogenada adenina
C	Base nitrogenada citosina
CODIS	Combined DNA Index System
DG	Diversidade gênica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FBI	Federal Bureau of Investigation
G	Base nitrogenada guanina
IAA	Índice de Ancestralidade Africana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Instituto de Criminalística
ILS 600	Internal Lane Standard 600
Mb	Megabase - equivalente a 1 milhão de nucleotídeos
NRV	<i>Non Recombining Y</i> (Região não recombinante do cromossomo Y)
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição)
STR	<i>Short Tandem Repeats</i> (Repetições consecutivas curtas)
SWGDAM	<i>Scientific Working Group on DNA Analysis Methods</i>
T	Base nitrogenada timina
TRIS	Tris-hidroximetil aminometano
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeats</i> (Repetições consecutivas de número variável)

LISTA DE SÍMBOLOS

pH	potencial hidrogeniônico
%	porcentagem
®	marca registrada
°C	grau Celsius
™	trade mark
mm	milímetro
mL	mililitro
μL	microlitro
μg	micrograma
g	grama
χ^2	Qui-quadrado

SUMARIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Identificação humana	14
2.2 Estrutura do DNA	15
2.3 Polimorfismos genéticos	17
2.4 Análise do DNA	23
2.5 Bancos de dados	25
2.6 Cromossomo Y	27
2.7 Aplicações dos microssatélites do cromossomo Y	32
2.8 Grupos étnicos	36
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Materiais utilizados	40
4.1.1 material descartável	40
4.1.2 equipamentos	40
4.1.3 reagentes	41
4.2 Coleta das amostras	41
4.3 Extração do DNA	42
4.3.1 amostras coletadas em cartão FTA	42
4.3.2 amostras de sangue líquido	44
4.4 Amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR)	44
4.5 Eletroforese: ABI 377	47
4.6 Análise estatística dos resultados	48
4.7 Vestígios	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Vestígios	59
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	75
ANEXO	84

1 INTRODUÇÃO

O ácido desoxirribonucleico (DNA) tem sido uma ferramenta importante nos casos forenses devido a sua eficácia na identificação humana. Nestes casos são empregados marcadores polimórficos de DNA, como os microssatélites, que apresentam ampla distribuição por todo genoma (BENNETT, 2000). Os marcadores são analisados através de diferentes metodologias, sendo a mais comum a amplificação através da PCR seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida.

A aplicação dos microssatélites em casos forenses, no entanto, requer a realização de estudos populacionais prévios para determinação do tipo de herança, da taxa de mutação e frequência de seus alelos (variáveis) na população (LINCOLN; THOMSON, 1998). Estas características são relevantes, pois em muitos casos forenses é necessário fazer a comparação do DNA de determinado indivíduo com o de supostos parentes e nestes casos a identificação é possível quando a região estudada apresenta herança mendeliana, ou seja, o conjunto diplóide de cromossomos de cada indivíduo é proveniente da união de um conjunto haplóide de cromossomos materno com paterno na fertilização.

Além disso, as taxas de mutação devem estar dentro de uma determinada faixa, pois taxas muito elevadas resultam no surgimento de muitas alterações no genoma dos descendentes em relação ao parental dificultando a comparação, enquanto taxas muito baixas não permitem a geração de polimorfismos, reduzindo a variação mesmo entre indivíduos que não apresentam relação de parentesco.

A frequência na qual cada alelo de um microssatélite se encontra na população deve ser calculada a fim de que ao se encontrar determinado alelo em duas amostras diferentes seja possível determinar a probabilidade deste evento ser decorrente do acaso. Esta probabilidade

será alta quando o alelo estiver presente em grande frequência na população e baixa quando se tratar de alelos mais raros.

O número de alelos que determinado microssatélite apresenta juntamente com a frequência na qual estes alelos são encontrados irá determinar o grau de polimorfismo do marcador, sendo interessante que nos estudos de identificação sejam utilizados marcadores altamente polimórficos.

Existem relatos sobre a ocorrência de variações nas frequências alélicas entre diferentes populações (GUSMÃO; ALVES; AMORIM, 2001), por este motivo é importante a realização de estudos para que nos cálculos estatísticos da análise de amostra de um indivíduo pertencente a determinada população seja utilizado dados provenientes desta permitindo, assim, um maior índice de confiabilidade nos resultados.

Outro motivo pelo qual é necessário o estudo da frequência dos alelos é que muitas vezes o DNA encontra-se degradado, não permitindo a análise do conjunto de marcadores geralmente empregado nos casos de identificação, sendo necessário o conhecimento de quais são os mais informativos naquela população para que, com a tipagem apenas destes, seja possível a correta interpretação dos resultados.

Atualmente são empregados nos casos forenses marcadores presentes tanto nos cromossomos autossômicos, como nos sexuais e no mitocondrial, dependendo das particularidades do caso. Os microssatélites do cromossomo Y têm sido aplicados em investigações de crimes sexuais, quando o material do agressor encontra-se misturado ao da vítima (PRINZ; SANSONE, 2001; BETZ et al., 2001) e de parentesco, quando o suposto pai não está disponível para o exame, mas existem outros parentes da linhagem paterna (KAYSER et al., 1997b).

Estes marcadores por apresentarem herança paterna podem ser utilizados também em outros tipos de estudo, como na determinação do sexo, quando ocorre falha na tipagem do

gene amelogenina, em genética de populações e evolução humana (HENKE et al., 2001; KAYSER et al., 1997a; PENA et al., 2000).

Assim, tendo em vista a amplitude de aplicações e a necessidade de avaliações prévias dos marcadores do cromossomo Y nas diferentes populações, este trabalho tem como objetivo a análise de 12 destes marcadores na população da Grande São Paulo e Araraquara.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Identificação humana

A identificação de indivíduos apresenta importância legal e humanitária, ela é realizada, por exemplo, em casos de homicídios, bem como quando são encontrados vestígios de pessoas que estavam desaparecidas ou que sejam suspeitas de terem cometido um crime; nestes casos é necessária, primeiramente, a correta identificação para que possa ser realizada a investigação (GRUBER; KAMEYAMA, 2001).

Simas-Alves (1965) definiu identidade como o conjunto de caracteres físicos, funcionais e psíquicos, normais ou patológicos que individualizam uma pessoa, enquanto identificação é o processo utilizado para reunir os atributos que a identificam.

Segundo Sassouni (1963) existem dois tipos de processos de identificação humana: o reconstrutivo e o comparativo. No primeiro não se têm dados anteriores a respeito do indivíduo e procura-se realizar a identificação geral definindo-se, por exemplo, o sexo, a idade e a etnia, já o processo comparativo é baseado em registros anteriores e permite a identificação personalista ou individual, podendo ser realizado através da utilização de registros médicos e prontuários odontológicos.

A identificação humana pode ser realizada por diversos métodos, dependendo do estado de conservação do corpo. Nos casos em que o corpo está bem preservado pode ser realizada pelo reconhecimento facial ou de características que individualizem a pessoa, como tatuagens ou cicatrizes (SPIEGEL, 1998), pode ser feita também através da impressão digital ou denteição (WOOD, 2006), desde que existam registros prévios destas características.

Nos casos em que o organismo se encontra reduzido ao esqueleto pode ser realizada a análise somatométrica, na qual é possível a determinação de características gerais do indivíduo, entre elas o sexo, a idade e a altura, assim como características que o individualizem, como traumas, anomalias e deformações congênicas dos ossos (ISCAN, 2001).

No entanto, quando o corpo está em um estado de decomposição muito avançado ou o esqueleto está incompleto, de modo que não seja possível a utilização dos métodos citados acima, faz-se necessário o emprego de ferramentas de biologia molecular (PRIMORAC; SCHANFIELD; PRIMORAC, 2000). Atualmente tem sido amplamente empregada a análise do DNA, por apresentar alta taxa de sucesso nas identificações.

2.2 Estrutura do DNA

O DNA (Figura 2.1) é o componente celular responsável pela transmissão das informações genéticas ao longo das gerações. A estrutura desta molécula foi proposta por Watson e Crick (1953). Estes pesquisadores, a partir de resultados obtidos em estudos do DNA, sugeriram que ele é formado por duas cadeias complementares dispostas em hélice em torno de um eixo imaginário, cada uma destas cadeias é um polímeros cuja unidade constitutiva são os nucleotídeos (polinucleotídeos). Os nucleotídeos são compostos por uma pentose (desoxirribose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada que pode ser púrica: adenina (A) e guanina (G) ou pirimídica: citosina (C) e timina (T). Na cadeia de DNA os nucleotídeos são unidos por ligações fosfodiéster covalentes entre o carbono 5' da desoxirribose de um nucleotídeo e o carbono 3' da desoxirribose do nucleotídeo seguinte. As

duas cadeias formadoras da molécula são unidas por pontes de hidrogênio entre nucleotídeos complementares (A e T ou C e G).

Figura 2.1 - Molécula de DNA; representado a esquerda os nucleotídeos e suas ligações e à direita a estrutura em dupla hélice

O DNA está presente em praticamente todas as células do corpo humano, no interior das mitocôndrias e do núcleo. No núcleo o DNA se encontra arranjado em cromossomos, sendo que nas células somáticas esses cromossomos ocorrem aos pares (23 pares de cromossomos - 22 autossômicos e 1 sexual) e por isso essas células são chamadas diplóides.

Estas moléculas têm a capacidade de se replicarem, permitindo que, após as divisões celulares, as células filhas apresentem cópias da molécula presente na célula original. Na formação das células germinativas são geradas, a partir de uma célula diplóide, quatro células haplóides, ou seja, constituídas por 23 cromossomos únicos. A separação dos pares de cromossomos entre as células filhas durante a divisão celular acontece de forma aleatória. Na

fertilização ocorre a união da célula germinativa feminina com a masculina restaurando o conjunto diplóide de cromossomos.

Assim, podemos dizer que as características genéticas de um indivíduo são o resultado de uma mistura de DNA paterno e materno, que são transmitidos para os descendentes através das células germinativas, nas quais a probabilidade de encontro de um ou outro cromossomo do par presente no indivíduo parental é idêntica.

2.3 Polimorfismos genéticos

A variabilidade genética entre os indivíduos é gerada pela sequência de bases presente em seu DNA, que apesar de serem apenas 4, podem se combinar formando milhões de sequências diferentes. As diferenças observadas entre a geração parental e os descendentes ocorre devido a mistura do material paterno e materno na fertilização, além de mutações e recombinações entre cromossomos durante as divisões celulares.

Nos processos de identificação, nos quais utiliza-se a análise do material genético, as sequências do DNA estudadas são aquelas que apresentam grande variação entre os indivíduos, permitindo, assim, a sua individualização. As regiões codificadoras dos genes não são recomendadas por não apresentarem grande variabilidade, visto que alterações nestas regiões podem gerar um produto defeituoso, que pode inviabilizar a sobrevivência do indivíduo ou impossibilitar sua reprodução, não sendo, portanto, transmitida para outras gerações.

As alterações em regiões não codificadoras, ao contrário, têm menor possibilidade de gerar consequências desfavoráveis para o indivíduo podendo, portanto, ser transmitida ao

longo das gerações. Assim, por sofrerem menor pressão de seleção, as seqüências localizadas fora das regiões codificadoras dos genes apresentam maior variabilidade entre os indivíduos e são recomendadas para os casos de identificação humana.

Para cada loco de DNA existe, porém, um número limitado de variações (alelos) possíveis, portanto, devem ser empregadas nestes estudos diversas regiões, cuja análise em conjunto permitirá a determinação da identidade do indivíduo.

Nas amostras forenses, o estudo do DNA é feito, geralmente, através da análise de regiões repetitivas (BUDIMLIJA et al., 2003; CRAINIC et al., 2002). Estas regiões são constituídas por repetições consecutivas de uma determinada seqüência de bases (Figura 2.2) e podem ser classificadas como minissatélites ou regiões de repetições consecutivas de número variável (*Variable Number of Tandem Repeats* - VNTR) e microsatélites ou regiões de repetições consecutivas curtas (*Small Tandem Repeats* - STR).

Apesar de não existir uma unanimidade sobre o tamanho de cada uma destas seqüências, o International Human Genome Sequencing Consortium (2001) sugere que sejam denominadas minissatélites as seqüências repetitivas que apresentam de treze a quinhentos pares de bases, enquanto os microsatélites correspondam às regiões do DNA que apresentam repetições consecutivas de fragmentos que possuem menos de treze pares de bases. Acredita-se que as regiões de DNA repetitivo ocorrem, freqüentemente, na seqüência genômica, compreendendo cerca de 15% do genoma humano (BENNETT, 2000).

ATCTGAC AGAT AGATAGATAGATAGATCTGCTACTG

Figura 2.2 – Representação das bases nitrogenadas de uma fita de DNA que apresenta repetições consecutivas de uma seqüência de quatro bases, em evidência, tratando-se, portanto, de um microsatélite

O primeiro estudo de detecção de regiões hipervariáveis do genoma, que permitiu a aplicação destas regiões (no caso minissatélites) na área forense, foi publicado por Jeffreys, Wilson e Thein (1985). Os autores utilizaram uma sonda que continha sequência de bases complementar a unidade de repetição presente em minissatélites, para detectar polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP).

Para a análise de RFLP, o material genético é digerido com uma enzima de restrição e submetido à eletroforese em gel de agarose. Em seguida, é transferido para uma membrana, onde é feita a hibridação com uma sonda marcada, possibilitando a detecção dos fragmentos que contêm sequência complementar a da sonda. Esta técnica permite a detecção simultânea de muitas regiões hipervariáveis, as quais diferem de um indivíduo para outro devido a variações, geradas por mutação, no número de sítios de restrição da enzima, fornecendo assim uma espécie de “impressão digital” do DNA (DNA “*fingerprint*”) (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985).

No entanto, há estimativas de que 20% das investigações forenses que utilizam o RFLP em suas análises não chegam a um bom termo; e essas porcentagens de insucesso são maiores quando o DNA é recolhido de tecido cadavérico (SMITH et al., 1997).

Uma outra metodologia para estudos de regiões hipervariáveis é a amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), que foi concebida por Mullis em 1983, e descrita posteriormente (MULLIS; FALOONA, 1987). Na PCR, o material genético é submetido a ciclos de temperatura na presença de iniciadores (oligonucleotídeos complementares a sequência de DNA adjacente àquela que se deseja estudar), nucleotídeos (unidade constitutiva da molécula) e uma enzima (polimerase), resultando na síntese de milhares de cópias de uma determinada região do DNA como, por exemplo, um microsatélite.

A PCR é considerada mais apropriada que o estudo de RFLP citado acima, porque pode amplificar, de modo eficiente e rápido, quantidades mínimas desta molécula. O fato da PCR não requerer grandes quantidades de DNA é importante, pois as amostras antes de serem coletadas sofrem a ação de inúmeros fatores, entre eles estão diversas condições ambientais, tais como variação de temperatura e umidade, contaminantes microbianos e químicos e exposição ao solo e outras substâncias naturais, como água salgada. Estes fatores, assim como o armazenamento inadequado da amostra após a coleta, afetam a quantidade e a qualidade do DNA, mesmo sendo esta uma das moléculas mais estáveis do organismo (LINCOLN; THOMSON, 1998).

Nos casos de identificação humana tem sido dada preferência à aplicação dos microsatélites em relação aos minissatélites, devido aos primeiros apresentarem tamanho menor (de 100 a 300 pb), o que lhes proporciona maior taxa de sucesso com amostras degradadas, pois como já foi demonstrado: quanto maior o produto, maior a probabilidade de ele estar fragmentado e, portanto, não ser detectado (SCHULTES; HUMMEL; HERRMANN, 1999). Outros fatores que levaram a escolha deste marcador são a sua abundância e ampla distribuição no genoma e a possibilidade de amplificação destas regiões através da PCR, permitindo que sejam obtidas informações, mesmo a partir de pequenas quantidades de amostra, comum nos casos forenses (BENNETT, 2000). Assim, passou-se a empregar nos casos forenses a análise de microsatélites através da PCR.

Acredita-se que o surgimento dos microsatélites, assim como das variações apresentadas por estes marcadores, estejam relacionados a falhas durante a replicação, que causam o aumento ou diminuição do número de unidades de repetição. Estas falhas ocorrem devido a um processo conhecido como “escorregão” da polimerase (*polymerase slippage*), que é a enzima que promove a duplicação do DNA através da adição de nucleotídeos complementares as fitas da molécula original previamente separadas (Figura 2.3). As falhas

neste processo ocorrem devido à adição ou perda de uma ou mais unidades de repetição pela polimerase, devido à formação de alças durante a replicação na fita de DNA que está sendo sintetizada ou na fita molde, respectivamente, sendo que quando estas alterações ocorrem nas células germinativas são transmitidas aos descendentes (BENNETT, 2000).

Figura 2.3 – Esquema do surgimento de polimorfismos durante a replicação do DNA. Em (a) replicação normal de uma fita de DNA contendo repetição do trinucleotídeo GTC; em (b) formação de uma alça na cadeia em formação do DNA resultando no aumento do tamanho da sequência repetitiva pela adição de uma unidade de repetição extra na molécula sintetizada; em (c) formação de alça na fita molde gerando o encurtamento da molécula nova devido a adição de uma unidade repetitiva a menos (STRACHAN; READ, 1999)

Outro tipo de marcador presente no genoma humano que pode ser utilizado na identificação de indivíduos são os polimorfismos de substituição de bases – SNP (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*), no entanto, Pestoni et al. (1998) e Gusmão, Alves e Amorim (2001) sugerem que os microssatélites são mais informativos em estudos da variação dentro de populações devido ao seu alto grau de polimorfismo.

Os microssatélites 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 (JOBIM; JOBIM; BRENNER, 1999).

O grau de polimorfismo de uma região do DNA está relacionado ao número de alelos que esta região apresenta. Assim, um loco que apresente dois ou mais alelos com frequência maior que 1% é denominado polimórfico, sendo a frequência dos alelos correspondente à proporção em que estes se encontram na população.

Populações, que se encontram em regiões diferentes ou possuem origem distinta, apresentam alelos em frequências diferentes ou mesmo alelos que não são compartilhados entre os grupos, como foi demonstrado por Gusmão, Alves e Amorim (2001), que ao estudarem quatro microssatélites do cromossomo Y em três populações (norte de Portugal, Moçambique e Macau) observaram que eles apresentavam um padrão de variação complexo, no qual locos que eram extremamente polimórficos em uma população, apresentavam-se quase monomórficos em outras.

Assim, quando se deseja identificar um indivíduo proveniente de determinada população é necessário o estudo de diferentes marcadores, para saber quais são os alelos presentes naquela população e em que frequência eles ocorrem, a fim de se definir quais são os melhores marcadores a serem utilizados em cada situação.

Para 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, de forma que a probabilidade de duas pessoas apresentarem um mesmo alelo torna-se menor.

Portanto, para que a identificação através de marcadores moleculares possa ser incorporada com efetiva confiabilidade a uma determinada população é imprescindível que

sejam realizados estudos populacionais, como aqueles realizados por Ozaki (1999), Moura-Neto e Budowle (1997) e Oliveira et al. (2002), nos quais foi determinada a frequência alélica de microssatélites em diferentes amostras da população brasileira. É importante ressaltar que a execução destes estudos deve ser precedida da verificação do tipo de herança e taxa de mutação dos marcadores que devem obedecer a certos critérios, como citado anteriormente para que estes possam ser empregados na identificação de indivíduos (LINCOLN; THOMSON, 1998).

Neste tipo de estudo, recomenda-se que sejam investigados, para cada sistema de microssatélites, no mínimo 100 indivíduos, que não tenham parentesco, para determinação da frequência alélica na população (LINCOLN; THOMSON, 1998).

A tipagem de amostras para identificação, freqüentemente, é realizada através da amplificação de mais de um loco de microssatélite ao mesmo tempo (multiplex), como neste trabalho no qual é feita a PCR de 12 locos simultaneamente. A diferenciação entre os locos é possível através da utilização de sistemas capazes de detectar diferentes comprimentos de onda emitidos por marcadores fluorescentes acoplados na extremidade de um dos *primers* de cada par (PRIMORAC; SCHANFIELD; PRIMORAC, 2000).

2.4 Análise do DNA

Quando um corpo é encontrado e existem suspeitas de sua identidade pode ser feita a comparação do DNA obtido na amostra com o de supostos parentes ou mesmo com o DNA obtido a partir de objetos pessoais do desaparecido. Nestas situações realiza-se, por exemplo, a comparação entre o DNA presente em amostra coletada do indivíduo e amostra obtida em

materiais que se sabe terem sido utilizadas por ele antes de seu desaparecimento, como escovas de dente ou de cabelo (BUDOWLE; BIEBER; EISENBERG, 2005).

O processo de identificação empregado nos casos citados é o comparativo, no entanto, como pode ser observado pelos exemplos descritos acima, o DNA difere de outras ferramentas utilizadas em processos comparativos como a identificação pela impressão digital ou arcos dentários por não necessitar de registros anteriores ao óbito, o que facilita o seu emprego.

O DNA pode ser empregado também em processos reconstitutivos, sendo que nestes apresenta grande limitação em relação a outros métodos, como a antropometria. Para realização deste tipo de identificação estão sendo estudados marcadores genéticos que apresentam associação com algumas características fenotípicas, entre elas, características faciais, pigmentação da pele e estatura (WALSH, 2004), bem como a relação entre a estrutura do material genético e a idade (TAKASAKI, 2003).

Um exemplo de situação na qual é necessário o emprego da análise do DNA são os grandes desastres, que abrangem tanto eventos não intencionais, os quais podem ser naturais, como o caso do tsunami ocorrido em dezembro de 2004, ou acidentais, como incêndios e acidentes de avião, até eventos intencionais, entre os quais estão incluídos os ataques terroristas como o praticado em setembro de 2001 contra os Estados Unidos (BUDOWLE; BIEBER; EISENBERG, 2005). Nestes casos a identificação através do DNA é imprescindível já que muitas vezes não é possível nem mesmo determinar se diferentes amostras encontradas são relativas a uma mesma pessoa, devido à fragmentação dos corpos (BUDIMLIJA et al., 2003; MUKAIDA et al., 2000).

Outra hipótese de utilização deste tipo de análise são os casos nos quais são encontrados, em cenas de crimes, utensílios ou alimentos com os quais o agressor pode ter entrado em contato, nestas circunstâncias faz-se a análise do material para verificar se são

encontradas nele amostras que possam ser utilizadas na identificação de suspeitos, como saliva, sangue, suor, etc (SWEET; HILDEBRAND, 1999; OZ et al., 1999).

A utilização da tipagem de DNA na área forense iniciou no Reino Unido quando Alec Jeffreys usou a análise do DNA em um episódio de disputa familiar em um caso de imigração (JEFFREYS; BROOKFIELD; SEMENOFF, 1985), a partir de então essa área começou a se expandir com a publicação de trabalhos, como os de Gill, Jeffreys e Werrett (1985) e Giusti et al. (1986), que demonstravam que o DNA poderia ser obtido a partir de diferentes amostras, como manchas de sangue e sêmen.

Hoje em dia já foi demonstrada a possibilidade de fazer a análise do DNA por vestígios deixados em praticamente qualquer material: papel (SZIBOR et al., 2000), cigarro (HOCHMEISTER et al., 1991), alimentos (SWEET; HILDEBRAND, 1999; OZ et al., 1999), sob a unha (WIEGAND et al., 1993) ou na pele de vítimas (WIEGAND; KLEIBER, 1997; ANZAI-KANTO et al., 2005) e em objetos manuseados pelo agressor (OORSCHOT; JONES, 1997), como armas e instrumentos utilizados para estrangulamento (SZIBOR et al., 2000).

2.5 Bancos de dados

Os bancos de dados de DNA são sistemas nos quais são armazenados perfis de DNA referentes a um conjunto de marcadores moleculares. Estes bancos constituem uma importante ferramenta, que pode ser aplicada em diversos tipos de casos forenses, sendo que o conjunto de indivíduos que serão tipados será diferente dependendo do tipo de aplicação que se queira dar ao banco. Uma destas aplicações são os casos de identificação de criminosos.

Nos Estados Unidos, por exemplo, foi desenvolvido pelo FBI o *Combined DNA Index System* (CODIS), um banco de dados para ajudar a solucionar e a prevenir futuros crimes pela rápida identificação de reincidentes. O CODIS permite a troca e comparação de perfis de DNA nacional e internacionalmente. Para facilitar o intercâmbio de informações entre diferentes laboratórios foi padronizada a tipagem de 13 marcadores: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11. Atualmente apresenta ainda a tipagem de regiões hipervariáveis do DNA mitocondrial (MILLER; BROWN; BUDOWLE, 2003).

Além da solução de crimes, o CODIS permite a identificação de restos de pessoas desaparecidas, contendo, portanto, não só os registros de DNA obtidos de criminosos e de evidências de crimes que não foram solucionados, mas também de pessoas desaparecidas e parentes próximos. Há ainda informações sobre frequência alélica populacional para aplicação estatística.

Outros bancos de dados de DNA com o intuito de localizar pessoas desaparecidas foram criados, entre eles, o banco referente ao projeto Caminho de Volta, criado por professores da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e relacionado à solução de casos de desaparecimentos de menores de 18 anos de idade. Este projeto tem como objetivo, além da análise de vínculo genético entre os indivíduos que forem localizados e os parentes de desaparecidos, o apoio à família e o levantamento de dados que permitam a adoção de medidas de prevenção e de políticas públicas nessa área (GATTÁS et al., 2005).

Os bancos de dados podem ser criados também para fornecer informações de estudos populacionais de marcadores moleculares, como o banco de dados mundial do cromossomo Y (<http://ystr.charite.de>), criado na Alemanha, no qual estão disponíveis informações sobre estudos de microssatélites do cromossomo Y em populações de diversos países (ROEWER et al., 2001). O estudo deste cromossomo apresenta grande importância devido a sua crescente

aplicação em diversas áreas, entre elas, a solução de casos forenses, como será discutido adiante.

2.6 Cromossomo Y

Atualmente tem sido dada importância ao estudo de outros microssatélites além daqueles presentes nos cromossomos autossômicos, entre os quais estão os microssatélites do cromossomo Y.

O cromossomo Y apresenta aproximadamente 60 Mb de comprimento, dos quais menos de 3 Mb correspondem a regiões que apresentam homologia com o cromossomo X. Essas regiões são denominadas regiões pseudo-autossômicas e são encontradas nas extremidades do braço curto (PAR1- 2,6Mb) e do braço longo (PAR2- 0,34Mb) do cromossomo Y (VOGT et al., 1997).

Os marcadores moleculares de interesse nos estudos de patrilinearidade estão presentes na região do cromossomo Y, que não apresenta homologia com o cromossomo X, chamada NRY (do inglês, *Non Recombining Y*), pois nestes estudos devem ser analisados os marcadores que estão presentes apenas no cromossomo Y e que são transmitidos de pai para filho ao longo das gerações, em conjunto (haplótipo), ou seja, sem sofrer recombinação.

O primeiro microssatélite descrito no cromossomo Y foi o DYS19 e até a primeira metade da década de 90 apenas três microssatélites de dinucleotídeos do cromossomo Y (YCAI, YCAII, YCAIII), um trinucleotídeo (27H39 ou DYS19) e um pentanucleotídeo (DXYS156Y) haviam sido descritos, sendo que apenas o DYS19 era utilizado na rotina forense (KAYSER et al., 1997b).

Atualmente, já foram publicados aproximadamente 50 marcadores repetitivos do cromossomo Y, que compreendem di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, sendo que, embora a maioria apresente apenas um produto após a amplificação por PCR, alguns apresentam dois ou mais produtos, como é o caso dos locos DYS385, YCAI, YCAII e YCAIII (REDD et al., 2002).

Entretanto, alguns dos microssatélites descritos não são recomendados para análise forense, entre eles: o DYS384, por não ser Y-específico, ocorrendo amplificação em homens e mulheres; o DYS395, que é sinônimo do DYS393; o DYS394, que descreve uma pequena repetição TA constante na sequência do DYS19 e os marcadores DYS288, DYS388, YCAI e DXYS156Y devido ao baixo poder de individualização. O loco DXYS156, apesar de também não ser Y-específico, pode ser diferenciado do produto feminino devido à diferença de comprimento entre os dois. (KAYSER et al., 1997b).

O Y-STR Haplotype Reference Database (<http://ystr.charite.de>) estabeleceu a utilização de um haplótipo mínimo para determinação da frequência de microssatélites do cromossomo Y, este haplótipo mínimo foi recomendado por Pascali, Dobosz e Brinkmann (1999), para ser utilizado nos casos de identificação humana e compreende um conjunto de nove STR (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385a/b). Posteriormente, foi recomendada pelo *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SWGDAM) a adição de mais dois microssatélites (DYS438 e DYS439) ao haplótipo mínimo, formando assim o haplótipo estendido. Neste projeto foram analisados, além do haplótipo estendido, o microssatélite DYS437.

Muitos estudos estão sendo realizados com microssatélites do cromossomo Y devido a algumas particularidades apresentadas por este cromossomo, como o fato de a maior parte dele não sofrer recombinação, apresentando herança haplotípica, ou seja, diferentes STR de um mesmo cromossomo são transmitidos em blocos (haplótipos) (JOBIM; JOBIM;

BRENNER, 1999). Desta forma, eles passam intactos de uma geração para outra, ocorrendo mudanças apenas quando sofrem mutações (JOBLING; TYLER-SMITH, 2003).

Jobling e Tyler-Smith (2003) afirmam que o cromossomo Y é mais suscetível que os outros cromossomos a deriva gênica, a qual acelera a diferenciação entre grupos de cromossomos em diferentes populações, sendo útil na investigação de eventos passados.

Estas características tornam o esse cromossomo um candidato aos estudos evolutivos para determinação da origem de populações, além de ser uma poderosa ferramenta de exclusão em testes de paternidade e estudos forenses, para identificação de indivíduos do sexo masculino, principalmente em casos nos quais material genético feminino e masculino são encontrados misturados, como ocorre nos casos de crimes sexuais (JOBLING; PANDYA; TYLER-SMITH, 1997; SIBILLE et al., 2002; CERRI et al., 2003).

A taxa de mutação varia entre os microssatélites do cromossomo Y, esta variação entre os locos não está relacionada à localização ou a heterogeneidade da sequência da região repetitiva, nem de sua flanqueadora (adjacente), mas foi observada relação entre o tamanho do maior bloco de repetições e a diversidade do loco, sendo que locos com maior tamanho médio apresentam maior diversidade (CARVALHO-SILVA et al., 1999).

Cooper et al. (1996) sugerem que a maior parte das mutações que ocorrem em microssatélites do cromossomo Y envolve aumento ou diminuição de uma unidade de repetição e encontraram evidências que corroboram a idéia de que os microssatélites tendem a aumentar de comprimento ao longo do tempo, pois os haplótipos que parecem ser ancestrais (por apresentarem maior frequência) apresentam menor comprimento. Os autores sugerem também que ocorre em alguns haplótipos homoplasia, ou seja, surgimento de haplótipos idênticos em populações distintas de forma independente.

Em um estudo comparando a frequência de microssatélites (tri a hexanucleotídeos) no cromossomo Y em relação a cromossomos autossômicos, Ayub et al. (2000) encontraram

valores semelhantes entre eles, mesmo não ocorrendo recombinação no primeiro. Este fato já era esperado se considerado que os microssatélites surgem por erros na replicação.

A seguir serão relatados alguns estudos relativos a frequência de microssatélites do cromossomo Y em diferentes populações. Kayser et al. (1997b) estudaram 13 YSTR em uma amostra de 3825 homens não aparentados, de 48 diferentes grupos populacionais, procedentes dos cinco continentes. Os microssatélites utilizados foram os tetranucleotídeos: DYS19, DYS385, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS393, os trinucleotídeos DYS388, DYS392, os dinucleotídeo DYS288, YCAI, YCAII, YCAIII e o pentanucleotídeo DXYS156Y. Os autores demonstraram que com um conjunto de sete marcadores (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DX391, DYS392, DYS393) é possível discriminar a maior parte dos indivíduos.

Na população do Rio de Janeiro foram realizados dois estudos de microssatélites do cromossomo Y, o primeiro, realizado em 2002 por Costa, Silva e Moura-Neto, abrangia sete marcadores (DYS19, DYS388, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392) e em uma amostra de 109 indivíduos foram observados 97 haplótipos diferentes, sendo que apenas 10 destes eram compartilhados por mais de um indivíduo.

No segundo estudo, realizado por Góes et al. (2005), foram analisados 17 marcadores (DYS19, DYS385I/II, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS460, DYS461, GATA C4, GATA H4 e GATA A10) em uma amostra de 126 indivíduos e cada indivíduo apresentava um haplótipo próprio sendo, portanto, a diversidade haplotípica de 100%.

Ao realizar a comparação da diversidade haplotípica em populações de Portugal com a observada neste segundo estudo pode-se verificar que aquelas apresentavam valores menores, o que pode ser explicado pela presença de linhagens não européias na população estudada por Góes et al. (2005). Os dados obtidos foram comparados ainda com o de populações da

Espanha e América do Sul e demonstrou que existe maior variação dentro das populações do que entre elas (GÓES et al., 2005).

Cainé et al. (2005) estudaram 8 microssatélites do cromossomo Y (DYS19, DYS385, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393) em uma amostra (109 indivíduos) da população de Santa Catarina, e demonstraram que este haplótipo é altamente polimórfico e discriminatório para esta população. Os resultados obtidos foram comparados aos encontrados em estudos da população de Portugal, já que grande parte da população de Santa Catarina é de origem portuguesa, principalmente do arquipélago de Açores, não tendo sido encontradas diferenças significativas entre as diversidades gênicas destas populações.

Grattapaglia et al. (2005) realizaram o estudo do haplótipo mínimo do cromossomo Y (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385I/II) na população brasileira e demonstraram que os locos DYS385a/b e DYS389II apresentam diversidade gênica de 70% e 90,5%, respectivamente, sendo os mais informativos, enquanto os locos menos informativos para a população brasileira são DYS389I, DYS391 e DYS393. A diversidade haplotípica observada foi de 99,8% e o poder de discriminação individual (relação entre o número de haplótipos observados e o número de indivíduos estudados) foi de 87%. Não foi encontrada diferença significativa entre as cinco regiões brasileiras. Este trabalho corroborou a hipótese de casamentos preferenciais entre homens europeus e mulheres africanas ou ameríndias, pois o haplótipo mais observado foi o mesmo que o de estudos da população européia, no entanto, este haplótipo não foi encontrado em estudo da população africana.

Pascali, Dobosz e Brinkmann (1999) acreditam que os estudos de microssatélites do cromossomo Y, nos quais são tipados geralmente pequeno número de microssatélites (menos de 3) em uma grande amostra da população, apresentam baixo poder discriminatório para serem utilizados em casos forenses. Os autores sugerem a realização da tipagem do maior

número possível de microssatélites mesmo que para isso seja necessária a diminuição do tamanho da amostra.

No entanto, vale ressaltar que Cooper et al. (1996) demonstraram que o estudo de amostras muito pequenas, com tamanho menor que 30, pode mascarar o resultado, já que muitos haplótipos não serão observados.

2.7 Aplicações dos microssatélites do cromossomo Y

Os microssatélites do cromossomo Y são, freqüentemente, empregados em análises de amostras contendo misturas de DNA de indivíduos do sexo feminino e masculino, geralmente, provenientes de casos de violência sexual, sendo importantes nos casos em que o material masculino encontra-se em pequena proporção, pois o DNA masculino só é detectado e interpretado corretamente através de microssatélites autossômicos quando presente em proporção maior que 5% e em muitos casos a proporção de material masculino em relação ao feminino é inferior a este valor (PARSON et al., 2001).

Este fato foi corroborado por Cerri et al. (2003) que analisaram amostras de DNA forense contendo mistura de material genético feminino/masculino obtidos de casos de violência sexual e demonstraram que quando existe DNA masculino em quantidade razoável é possível realizar a identificação utilizando apenas microssatélites autossômicos, no entanto, quando o material masculino misturado ao feminino está em pequena quantidade é necessário realizar a análise pelo estudo de microssatélites do Y. Outros estudos também demonstraram a eficiência da análise destes marcadores em misturas de amostras quando o componente

masculino encontra-se em menor quantidade ou quando há dois ou mais contribuintes do sexo masculino (PRINZ; SANSONE, 2001; BETZ et al., 2001).

Um trabalho publicado por Dettlaff-Kakol e Pawlowski (2002) demonstrou outro exemplo de aplicação destes marcadores na solução de casos de violência sexual, ocorridos na Polônia, nos quais não havia suspeito, sabia-se apenas que todos os crimes haviam sido praticados por um mesmo indivíduo. Foram registrados atos de violência sexual a 14 mulheres, sendo que um resultou em homicídio, não foram obtidas muitas informações a respeito do agressor, apenas a faixa etária na qual ele se encaixava e a região onde vivia. Decidiu-se, então, coletar amostras de indivíduos que se enquadrassem neste perfil. Foram coletadas amostras de 420 homens, as quais foram tipadas e comparadas com as aquelas coletadas de vítimas. A partir dos resultados obtidos foi possível identificar um homem que foi acusado de ser o responsável pelos crimes.

A utilização de microssatélites do cromossomo Y torna-se necessária também na investigação de casos nos quais é encontrada mistura sangue-sangue, sangue-saliva ou sêmen de agressor que apresenta azoospermia, visto que para realização da análise de marcadores autossômicos é necessário fazer a separação do material da vítima e do agressor para que seja possível a correta identificação, já que ambos apresentam os mesmos locos e seria difícil determinar quais são os alelos referentes a cada um deles. Esta separação é possível devido a características do espermatozóide que permitem o seu isolamento em relação a outros tipos de células, no entanto, quando a amostra do agressor não apresenta espermatozoides este tipo de análise torna-se inviável, sendo necessária a aplicação da análise de microssatélites do cromossomo Y, pois assim é possível analisar apenas o DNA do agressor (SIBILLE et al., 2002).

Outra aplicação dos microssatélites do cromossomo Y é ilustrada no trabalho de Corach et al. (1997), no qual eles foram empregados na identificação de esqueletos

encontrados em valas comuns, esta identificação é possível quando existe suspeita de que dois ou mais indivíduos, do sexo masculino, encontrados tenham relação de parentesco ou quando há algum possível parente vivo. Os autores demonstraram a possibilidade de identificação de corpos, que neste caso eram provenientes de um enterramento comum que continha 340 esqueletos de vítimas da ditadura Argentina (1976-1983), através da análise de microssatélites do cromossomo Y (DYS19, DYS385, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393).

Os microssatélites do cromossomo Y podem ser empregados também nos testes de paternidade, nos quais o filho é do sexo masculino e o suposto pai não está disponível, mas existam outros indivíduos da mesma linhagem paterna, que apresentam, portanto, mesmo haplótipo do suposto pai, disponíveis para realização do teste (KAYSER et al., 1997b; ROLF et al., 2001).

A determinação do sexo é comumente realizada através da tipagem do gene da amelogenina, que está presente em ambos cromossomos sexuais, porém, com tamanhos diferentes, o que permite determinar se a amostra é proveniente de um indivíduo do sexo masculino, caso sejam observadas duas bandas ou do sexo feminino, caso seja homozigoto. Entretanto, esta tipagem pode falhar em alguns casos, não permitindo a detecção do cromossomo Y, devido, por exemplo, a uma deleção na região do cromossomo onde está localizado este gene, como foi observado por Thangaraj, Reddy e Singh (2002), por este motivo é necessário, muitas vezes, que sejam empregados microssatélites do cromossomo Y nos estudos de determinação do sexo (HENKE et al., 2001).

Os microssatélites do cromossomo Y são úteis também nos estudos de genética de populações, por permitir a comparação entre grupos populacionais próximos, devido a sua taxa de mutação relativamente alta, além de auxiliar no estudo da evolução humana quando estudado em conjunto com mutações pontuais do cromossomo Y (KAYSER et al., 1997a).

Um exemplo de estudo evolutivo é a pesquisa do cromossomo Y de brasileiros brancos para determinação da origem da população brasileira realizada por Pena et al. (2000), a partir da qual foi inferida a predominância de patrilinhagens européias (principalmente portuguesa) na população brasileira e pequena contribuição africana e ameríndia. No entanto, a variabilidade encontrada foi alta, tendo sido sugerido pelos autores que este resultado seja decorrente da grande diversidade dos ibéricos, conseqüente das muitas invasões e imigrações ocorridas na região.

Outro exemplo é o estudo realizado por Rodriguez-Delfin, Santos e Zago (1997), que estudaram seis locos polimórficos do cromossomo Y (uma mutação pontual no loco DYS199, uma inserção *Alu* –YAP- no DYS287, os tetranucleotídeos DYS19, DYS390 e DYS393 e o trinucleotídeo DYS392) em uma amostra de 140 indivíduos brasileiros pertencentes a quatro populações: negros (39), brancos (41), japoneses (14) e ameríndios (46) e demonstraram que os cromossomos destas populações podem ser agrupados nas seguintes linhagens: uma presente em todos os grupos, uma encontrada predominantemente entre negros, mas observada também em alguns brancos e japoneses e uma terceira encontrada apenas entre ameríndios, estes resultados concordam com a hipótese de que a primeira linhagem seja a mais ancestral e a última a mais recente. Este trabalho sugere também que ao menos duas linhagens de cromossomo Y tenham contribuído para o povoamento da América.

Os microssatélites do cromossomo Y podem ser utilizados para análise de DNA de material arqueológico, como descrito no estudo realizado por Schultes, Hummel e Herrmann (1999), no qual foi feita a tipagem de quatro microssatélites do cromossomo Y (DYS19, DYS389I/II e DYS390) de materiais biológicos (ossos e dente) com idade variando de 250 a 3.000 anos. A determinação da frequência haplotípica de materiais arqueológicos é importante para o desenvolvimento dos estudos evolutivos e de genética de populações.

2.8 Grupos étnicos

Existem relatos sobre a existência de discrepâncias na frequência alélica de marcadores moleculares entre diferentes grupos populacionais (PASTORE et al., 1996). Alguns estudos de microssatélites do cromossomo Y em populações européias demonstraram não haver diferenças significativas entre estas populações como, por exemplo, os trabalhos de Junge e Madea (1999), Hidding e Schmitt (2000) e Pestoni et al. (1998). Nos dois primeiros foram estudadas populações da Alemanha: Bonn e Colônia, respectivamente, e comparadas com estudos da população européia, enquanto Pestoni et al. (1998) compararam três populações da Espanha (Galiza, Catalunha e País Basco).

Hidding e Schmitt (2000) compararam também a população alemã com a chinesa e demonstraram haver diferenças entre as frequências haplotípicas destas duas populações. Outros estudos também sugerem a existência de variações tanto étnicas quanto populacionais demonstrando assim a importância da determinação das frequências alélicas nas diferentes populações (PASTORE et al., 1996; KNIJFF et al., 1997; KAYSER et al., 1997a; GONZALEZ-NEIRA et al., 2000; HENKE et al., 2001).

Foram realizados estudos comparativos de microssatélites do cromossomo Y entre diferentes populações, como a análise de 7 locos (DYS19, DY389 I e II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393) em 225 indivíduos de 5 populações da Península Ibérica, realizada por González-Neira et al. (2000), na qual a diversidade haplotípica encontrada variou de 0,96 a 0,99. Foram constatadas diferenças significativas entre os bascos e as outras populações ibéricas e também entre a população de Valença (Espanha) e a do Norte de Portugal.

Kayser et al. (1997a) analisaram 7 microssatélites do cromossomo Y em amostras biológicas de 474 indivíduos do sexo masculino de nove populações diferentes, provenientes

dos cinco continentes e encontraram 301 haplótipos, que possibilitaram a individualização de 63% da amostra, sendo que a capacidade discriminatória dentro de cada grupo variou de 0.35 a 0.94. A capacidade discriminatória das 70 amostras coletadas de indivíduos alemães, por exemplo, que era de 90% com a utilização dos 7 locos foi para 100% com o acréscimo de dois locos permitindo a completa individualização dos sujeitos da pesquisa pela obtenção de 70 haplótipos diferentes. Este estudo demonstra que os microssatélites do cromossomo Y podem ser muito úteis nas pesquisas genealógicas e forenses.

Todos os estudos relatados acima agrupam os indivíduos de acordo com a população a qual pertencem, no entanto, existem pesquisas que comparam indivíduos de uma mesma população de acordo com o grupo étnico, ou seja, grupos populacionais que têm características físicas ou culturais diferentes, com a finalidade de determinar a origem da população. Estes estudos, entretanto, devem ser considerados com certo cuidado, visto que a classificação dos indivíduos em grupos leva em conta características que podem não representar a sua origem.

Em um estudo de marcadores informativos de ancestralidade em uma amostra de 173 indivíduos da população de Minas Gerais classificados como brancos, pretos ou pardos, por exemplo, foi demonstrado que existe uma alta variabilidade do índice de ancestralidade africana (IAA) dentro de cada uma destes grupos, no entanto, pouca variação entre eles, tendo sido encontrado o maior valor para um indivíduo pardo e não negro, enquanto um dos menores valores foi encontrado em um negro. Foi feito o estudo, então, de indivíduos brancos de quatro regiões do Brasil, no qual foi observado que ao se considerar indivíduos com mais de 10% de IAA como afrodescendentes, pode se estimar que aproximadamente 77% dos indivíduos que se autodeclaram brancos apresentam afrodescendência (PENA; BORTOLINI, 2004).

O agrupamento de indivíduos de acordo com características fenotípicas ou sociais é extremamente complicado devido ao alto nível de miscigenação apresentado pela maior parte das populações, tendo sido demonstrado por diversos pesquisadores, entre eles, Lewontin (1972), Barbujani et al. (1997) e Góes et al. (2005), que são mais comuns as diferenças intra-do que inter-populacionais.

Lewontin em um estudo no qual testou a validade do conceito de "raça" dentro da nossa espécie demonstrou, utilizando polimorfismos genéticos clássicos (grupos sanguíneos, proteínas séricas e isozimas), que a maior parte da variação (85.4%) era encontrada entre indivíduos de uma mesma população, enquanto a variação entre populações dentro de uma mesma raça (8.3%) e entre as "raças" (6.3%) apresentavam valores significativamente menores.

Barbujani et al. (1997) analisando a diversidade de 109 marcadores moleculares (microssatélites e RFLP) em indivíduos provenientes de 16 populações distribuídas por quatro continentes encontrou proporções de variação entre os indivíduos de uma mesma população (83.6 – 84.5%), de populações diferentes dentro de um mesmo continente (4 – 5%) e de diferentes continentes (8 – 11.7%), semelhantes àquelas obtidas por Lewontin (1972).

Em um estudo de microssatélites do cromossomo Y, comparando indivíduos caucasianos provenientes de populações do norte de Portugal e Espanha com caucasianos residentes no Rio de Janeiro, verificou-se também maior variação molecular dentro das populações (99.61%) do que entre elas (0.39%) (GÓES et al., 2005). Estes estudos sugerem o equívoco da utilização do termo "raça" em nossa espécie.

3 PROPOSIÇÃO

- a. Determinar as frequências alélicas de um conjunto de 12 microssatélites do cromossomo Y (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439) e as variações genéticas (diversidade haplotípica / gênica e capacidade de discriminação) destes marcadores em indivíduos da Grande São Paulo e da cidade de Araraquara, divididos em quatro grupos;
- b. Verificar se existe diferença significativa nos resultados obtidos entre os indivíduos dos diferentes grupos, a fim de constatar se existe a necessidade de utilização de valores de frequência alélica diferentes, de acordo com o grupo ao qual pertence o indivíduo que se está analisando.
- c. Adicionar os dados referentes a esta população em um banco de dados mundial do cromossomo Y (Y-STR Haplotype Reference Database), ampliando assim a divulgação dos resultados obtidos.
- d. Analisar amostras forenses (ossos e sangue) de casos selecionados pelo Instituto de Criminalística do Estado de São Paulo, que se encontram ainda sem solução.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

4.1.1 material descartável

Tubos de polipropileno 0.2mL e 1.5mL e ponteiros 0.5 a 10 μ L, 10 a 200 μ L e 100 a 1000 μ L da Axygen Scientific (Union City, CA, USA); tubos de coleta de sangue Vacutainer BD Diagnostics Systems (Sparks, MD, USA); Sterile Foam Tipped Applicators, FTA Micro Card e 1.2 mm Harris Micro Punch da Whatman (Newton Center, MA, USA).

4.1.2 equipamentos

Pipetadores de 0.5 a 10 μ L, 10 a 100 μ L, 20 a 200 μ L e 100 a 1000 μ L da Gilson (Middleton, WI, EUA); centrífuga Eppendorf da Eppendorf AG (Hamburg, Germany); aparelho para banho-maria da Quimis (Diadema, SP, BR); termociclador MJ Research modelo PTC 200 da Bio-rad (Hercules, CA, EUA); seqüenciador automático ABI PRISM 377 e o software GeneScan ver. 2.1 da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA).

4.1.3 reagentes

FTA Reagent da Whatman (Newton Center, MA, USA); proteinase K, PlatinumTaq DNA Polimerase da Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA); EDTA (ácido etileno diamino tetracético), Tris-HCl, Amberlite XAD-4 e TEMED (teramethylethylenediamine) da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA); fenol da USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA); clorofórmio e isopropanol da Merck (Darmstadt, Germany); uréia, DNA Rehydration Solution, DNA IQ e PowerPlex® Y System da Promega (Madison, WI, USA); AmpliTaq Gold DNA Polimerase da Applied Biosystems (Foster City, CA USA); ácido bórico e persulfato de amônio (APS) 10% da LGCBio (Cotia, SP, BR); GenomicPrep™ Blood DNA Isolation da GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK); Long Ranger Gel Solution da Cambrex (New Jersey, USA).

4.2 Coleta das amostras

Para realização deste trabalho foram coletadas amostras de sangue ou saliva de 200 indivíduos do sexo masculino residentes na cidade de Araraquara ou na região da Grande São Paulo os quais, após serem informados a respeito dos objetivos deste estudo e dos procedimentos que seriam realizados, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) concordando assim em participar desta pesquisa e se autodeclararam, de acordo com os padrões do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), como brancos (65), pretos (40), pardos (50) ou amarelos (45).

As amostras de sangue foram coletadas em cartões FTA ou em tubos de vidro (Vacutainer), neste caso foram coletados 5mL de sangue, enquanto as amostras de saliva foram coletadas através da raspagem da mucosa bucal com *swab* (Sterile Foam Tipped Applicators) e aplicadas em cartões FTA.

Para a coleta das amostras de saliva não foi utilizado nenhum procedimento de higienização bucal prévio, devido a estudos de nosso laboratório terem demonstrado que estes não são necessários (GÓIS; KANTO; OLIVEIRA, 2005).

4.3 Extração do DNA

Até o momento da extração do DNA os cartões FTA contendo as amostras foram mantidos a temperatura ambiente, enquanto as amostras de sangue líquido foram armazenadas a 4°C.

A extração do DNA foi realizada com diferentes técnicas de acordo com o tipo de amostra.

4.3.1 amostras coletadas em cartões FTA

Os cartões FTA são papéis filtro impregnados com uma mistura de compostos químicos que servem para lisar as células, prevenir o crescimento de bactérias e proteger o

DNA (SMITH; BURGOYNE, 2004). Em contato com o cartão do FTA as membranas celulares são lisadas, os ácidos nucleicos (DNA e RNA) são imobilizados e estabilizados e bactérias e vírus são inativados, assim o DNA permanece imobilizado nos cartões enquanto inibidores e contaminantes são lavados através da utilização do FTA Reagent.

As amostras biológicas podem ser transportadas nestes cartões de modo simples (por correio ou pelos próprios indivíduos) e armazenadas de forma prática, pois além de ocupar pouco espaço o armazenamento pode ser feito à temperatura ambiente por mais de 14 anos (SMITH; BURGOYNE, 2004). A capacidade de arquivar amostras biológicas para análises subsequentes de ácidos nucleicos é essencial em diversos tipos de estudo e em casos de amostras forenses.

A extração do DNA do material armazenado nos cartões foi realizada a partir de fragmentos destes. Para isso foram retirados um ou três discos de 1.2mm dos cartões FTA, contendo amostra de sangue ou saliva, respectivamente, com auxílio do Harris Micro Punch de 1.2mm, os fragmentos foram colocados em microtubos de 0.2mL onde foram adicionados 200µL de FTA Reagent.

Após 15 minutos de incubação o reagente foi removido e foram adicionados 200µL de TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 0.1mM, pH 8.0), que permaneceu em contato com os discos por cinco minutos, sendo então removido. Este passo foi repetido uma vez, tendo sido feita, portanto, a lavagem do material com TE duas vezes por cinco minutos cada. Após a remoção do TE os tubos foram deixados em estufa a 37°C de 1 a 2 horas para secar.

Durante o período de incubação com FTA Reagent ou TE os tubos foram mantidos em temperatura ambiente e agitados através de movimentos de inversão periodicamente.

4.3.2 amostras de sangue líquido

A extração foi feita seguindo-se o protocolo do kit GenomicPrep™ Blood DNA Isolation. A extração do DNA de sangue líquido foi realizada com o kit GenomicPrep™ Blood DNA Isolation a partir de 300µL de amostra que foram submetidos à lise celular com 900µL de RBC Lysis Solution e 300µL de Cell Lysis solution, responsáveis pela lise da membrana celular das células vermelhas e brancas, respectivamente. Foi feita então a precipitação das proteínas com 100µL da solução Protein Precipitation Solution e, em seguida, o sobrenadante contendo o DNA foi submetido à precipitação com isopropanol absoluto. Por fim, o pellet de DNA foi eluído em 100µL de DNA Rehydration Solution, incubado por 24h a temperatura ambiente e, após incubação, armazenado a 4°C. A quantidade de DNA obtida pela técnica, segundo informações contidas no protocolo do kit GenomicPrep™ Blood DNA Isolation, pode ser de 0.1µg se o rendimento for de 100%.

Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de agarose 0.8% do DNA extraído das amostras sangüíneas líquidas para verificação de sua integridade.

4.4 Amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Neste trabalho foi realizada a amplificação de 12 microssatélites do cromossomo Y: dez tetranucleotídeos - DYS19, DYS385a/b, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS393, DYS437, DYS439 - um trinucleotídeo - DYS392 - e um pentanucleotídeo - DYS438.

Na tabela 4.1 são apresentadas informações a respeito da localização e da sequência repetitiva relativas a estes microssatélites e na figura 4.1 podem ser observados os alelos destes microssatélites disponíveis no kit PowerPlex® Y System.

Tabela 4.1- Localização e composição da sequência repetitiva dos microssatélites estudados neste trabalho

Microssatélite	Localização	Seq. Repetitiva (5'-3')
DYS392	Yq	(TAT) _n
DYS19	Yp	(TAGA) ₃ TAGG(TAGA) _n
DYS437	Yq	(TCTA) _n (TCTG) ₁₋₃ (TCTA) ₄
DYS385a/b	Yq	(AAGG) ₆₋₇ (GAAA) _n
DYS390	Yq	(TCTA) ₂ (TCTG) _n (TCTA) _n (TCTG) _n (TCTA) _n TCA(TCTA) ₂
DYS393	Yp	AGAT
DYS439	Yq	GATA
DYS389I	Yq	(TCTG) ₃ (TCTA) _n
DYS389II	Yq	(TCTG) _n (TCTA) _n N ₂₈ (TCTG) ₃ (TCTA) _n
DYS391	Yq	(TCTG) ₃ (TCTA) _n
DYS438	Yq	(TTTTC) ₁ (TTTTA) ₀₋₁ (TTTTC) _n

Yq: braço longo do cromossomo Y; Yp: braço curto do cromossomo Y

Para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados o kit PowerPlex® Y System (Promega) e as enzimas Platinum*Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e Ampli*Taq* Gold DNA Polimerase (Applied Biosystems), sendo que a segunda era utilizada apenas para aquelas amostras nas quais ocorria falhas na amplificação de um ou mais microssatélites.

Figura 4.1 – Escada alélica do PowerPlex® Y System. A: alelos marcados com fluoresceína. B: alelos marcados com JOE. C: alelos marcados com TMR

As reações de PCR foram realizadas a partir dos fragmentos tirados do cartão FTA (1 no caso da amostra de sangue e 3 para amostra de saliva) submetidos previamente à extração ou de 2.5µL da solução de DNA extraído das amostras de sangue líquido, na presença de: tampão Gold STAR 1X e PowerPlex® Y Primer Pair Mix 1X, ambos do kit PowerPlex® Y System e 0.5U de *Taq* polimerase. O volume das reações foi ajustado com água *milliQ* esterilizada para atingir volume final de 12.5µL.

Para a amplificação as amostras foram submetidas ao seguinte ciclo de temperaturas: desnaturação inicial de 95°C por 11 minutos e 96°C por 2 minutos; 10 ciclos de: 94°C por 1 minuto (desnaturação), 60°C por 1 minuto (hibridação) e 70°C por 1,5 minuto (extensão); 20 ciclos de: 90°C por 1 minuto (desnaturação), 58°C por 1 minuto (hibridação) e 70°C por 1,5

minuto (extensão); seguido de extensão final por 30 minutos a 60°C após o qual a reação foi interrompida por esfriamento a 4°C.

4.5 Eletroforese: ABI 377

Os produtos da amplificação foram mantidos a -20°C até o momento da corrida eletroforética.

Antes da aplicação das amostras amplificadas no gel foi feito o preparo dos reagentes de pós-amplificação do kit PowerPlex® Y System. Para isso foram adicionados ao produto da PCR o Internal Lane Standard (ILS) 600 (um padrão de peso molecular até 600pb) e o Blue Dextran Loading Solution (um tampão contendo formamida, um desnaturante de DNA) na seguinte proporção: 1.0µL do produto da PCR ou com 1.0µL do PowerPlex Y Allelic Ladder Mix, 0.5µL de ILS 600 e 1.5 µL de Blue Dextran Loading Solution.

O produto da amplificação foi submetido à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida desnaturante a 6%, no sequenciador ABI377 para obtenção dos perfis de cada loco.

Para a preparação do gel foram misturados em um agitador magnético por 10 minutos os seguintes reagentes: 20mL de água destilada; 14.5g de Uréia a qual apresenta ação desnaturante; 0.4g de Amberlite XAD-4, que atua minimizando a presença de substâncias contaminantes; 4mL de Long Ranger Gel Solution, que determina as dimensões dos orifícios do gel por onde os fragmentos de DNA irão migrar.

Em seguida, foi adicionado 4mL de TBE (10X), um tampão de corrida que proporciona a passagem da corrente pelo gel e foi feita a deaeração da mistura por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200µL de Persulfato de Amônio 10%, o

promotor da polimerização do gel e 28µL de TEMED, que age como catalisador da reação de polimerização.

A análise dos alelos amplificados foi realizada com a utilização do software GeneScan ver. 2.1.

4.6 Análise estatística dos resultados

A determinação do número de haplótipos e da frequência alélica ou genotípica (no caso do loco DYS385) foi realizada através da contagem direta. Foram calculadas também a diversidade gênica (DG) e haplotípica e a capacidade de discriminação.

Para o cálculo da diversidade gênica e haplotípica foi empregada a fórmula descrita por Nei (1987): $DG = (1 - \sum f_i^2) \cdot n / n-1$, onde f_i é a frequência do alelo/haplótipo i 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.

Todos os cálculos foram realizados para os 12 locos tipados, tanto para a amostra total como para as amostras de cada grupo separadamente. Sendo que o número de haplótipos e a diversidade haplotípica foram calculados também para o conjunto dos 11 microssatélites do haplótipo estendido (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385a/b, DYS438 e DYS439) e dos 9 microssatélites do haplótipo mínimo (haplótipo estendido exceto DYS438 e DYS439).

Foi realizado ainda o cálculo do F_{st} para verificar se existe uma subdivisão da população estudada de acordo com a cor da pele dos indivíduos.

Cada um dos perfis obtidos foi enviado ao banco de dados mundial do cromossomo Y (Y-STR Haplotype Reference Database - <http://ystr.charite.de>). Um banco de dados de

microsatélites do cromossomo, no qual são encontradas informações a respeito destes marcadores e estão inseridos o haplótipo mínimo de 37.884 indivíduos provenientes de 316 populações distribuídas por todo o globo. Recentemente passou a ser inserido no banco o haplótipo estendido (haplótipo mínimo + DYS438 e DYS439) já tendo sido incluído um conjunto de 13.085 haplótipos de 90 populações (34 % dos haplótipos do banco).

Foi realizada a comparação dos haplótipos obtidos com aqueles presentes no banco de dados mundial para determinar se os haplótipos encontrados na população da Grande São Paulo e Araraquara eram únicos ou se já haviam sido observados em outras populações (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Imagem da ferramenta de busca de haplótipos de acordo com a população ou região geográfica do banco mundial do cromossomo Y (<http://www.yhrd.org/index.html>)

4.7 Vestígios

Foram analisados também neste trabalho vestígios biológicos fornecidos pelo Instituto de Criminalística de São Paulo. Estes vestígios compreendem amostras de ossos e sangue relacionadas a cinco casos que não puderam ser solucionados pelo Instituto de Criminalística (IC).

A extração do DNA das amostras de ossos (fêmur ou costela) foi realizada de acordo com metodologia padronizada pelo Laboratório de Investigação de Paternidade da UNESP-Araraquara (CICARELLI; ALVARENGA; CARVALHO, 2003). Os ossos foram pulverizadas com o auxílio de nitrogênio líquido e 0.2-0.3g de material foi deixado em banho-maria a 56°C durante 48 horas na presença de EDTA 0.5M, pH 8.0, e proteinase K (500µg/mL) durante a incubação os tubos foram agitados periodicamente, em seguida foi feita a extração com fenol / clorofórmio e sistema DNA IQ.

O DNA das amostras de sangue foi extraído com o sistema GenomicPrepTM Blood DNA Isolation como descrito anteriormente.

Para a amplificação do material pela PCR foi utilizado o PowerPlex[®] Y System e o produto foi submetido à corrida eletroforética nas mesmas condições citadas acima para as demais amostras.

5 RESULTADOS

Os haplótipos obtidos para cada grupo estão descritos no APÊNDICE B.

Foram observados 192 haplótipos diferentes na amostra total, sendo que destes 174 eram únicos e 8 foram observados em duas amostras. Destes oito três eram compartilhados por indivíduos pertencentes a grupos diferentes: o H85 e H100 entre pardos e pretos e o H36 entre branco e pardo. Em busca no banco mundial do cromossomo Y o haplótipo H36 foi encontrado também em populações européias e o H85 em população do Rio de Janeiro de origem européia.

Ao fazer a análise das amostras de acordo com o grupo foram observados 62 haplótipos entre os indivíduos brancos (n=65), 40 entre os pretos (n=40), 44 entre os amarelos (n=45) e 49 entre os pardos (n=50), sendo que nenhum foi observado em mais de duas amostras.

A diversidade haplotípica encontrada foi alta nos quatro grupos, assim como na população total, como pode se verificar na Tabela 5.1, tendo sido 100% em pretos já que entre estes não foram observados haplótipos repetidos.

Tabela 5.1 – Diversidade haplotípica observada

Haplotipo	Brancos	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Total	0.9986	1.0	0.9990	0.9992	0.9997
Estendido	0.9976	1.0	0.9990	0.9992	0.9994
Mínimo	0.9933	1.0	0.9980	0.9992	0.9983

Foram calculados também o número de haplótipos e a diversidade haplotípica para a amostra total e para cada grupo considerando apenas o haplótipo estendido ou o haplótipo mínimo. Na amostra total foram observados 179 haplótipos diferentes na análise do haplótipo estendido (171 únicos, 9 em dois indivíduos e 1 em três indivíduos) e 164 do haplótipo mínimo (164 únicos, 12 em dois indivíduos, 2 em três indivíduos e 1 em seis indivíduos). As diversidades haplotípicas para o haplótipo estendido e mínimo foram, respectivamente, 0.9994 e 0.9983.

Para os grupos de indivíduos pardos e pretos não foram observadas alterações nos resultados, assim como para o grupo de amarelos com relação ao haplótipo estendido. No entanto, duas amostras deste último grupo, nas quais haviam sido observados haplótipos diferentes na análise dos doze microssatélites e do haplótipo estendido, não puderam ser distinguidas na análise do haplótipo mínimo, tendo sido encontrados nestes, portanto, 43 haplótipos diferentes e diversidade haplotípica de 0.9980. No caso das amostras de indivíduos brancos foram observados 61 haplótipos diferentes na análise do haplótipo estendido, sendo 58 únicos, 2 encontrados em duas amostras e 1 encontrado em três amostras e a diversidade haplotípica de 0.9976, já na análise do haplótipo mínimo foram observados 58 haplótipos, 55 únicos, 1 observado em duas amostras, 1 observado em três amostras e 1 observado em cinco amostras, tendo sido de 0.9933 a diversidade haplotípica.

O haplótipo mínimo mais comum na amostra total, assim como no grupo dos indivíduos brancos ($n=5$), está representado na Tabela 5.2. Este haplótipo foi observado também em uma amostra do grupo de indivíduos classificados como pretos e corresponde ao haplótipo mais comum no banco mundial do cromossomo Y entre populações européias.

Tabela 5.2 – Haplótipo mínimo mais comum observado entre indivíduos brancos

DYS391	DYS389I	DYS389II	DYS19	DYS392	DYS393	DYS390	DYS385	<i>n</i>
11	13	29	14	13	13	24	11-14	6

Os poderes de discriminação obtidos para cada grupo e na amostra total, tanto para o haplótipo completo (12 microssatélites), como para os haplótipos estendido e mínimo estão descritos na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Poder de discriminação

Haplótipo	Branco	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Total	0.9538	1	0.9778	0.98	0.96
Estendido	0.9385	1	0.9778	0.98	0.945
Mínimo	0.8923	1	0.9556	0.98	0.895

As frequências dos alelos de cada loco para a população total e para cada grupo separadamente está apresentada nas tabelas 5.4 a 5.14.

Tabela 5.4 - Frequência alélica do loco DYS391 de acordo com o grupo

	Branco	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Alelo	Frequência				
9	0.077	0.075		0.060	0.055
10	0.477	0.525	0.822	0.500	0.570
11	0.431	0.400	0.178	0.380	0.355
12	0.015			0.06	0.02

Tabela 5.5 - Frequência alélica do loco DYS389I de acordo com o grupo

	Brancos	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Alelo	Frequência				
11			0.044		0.010
12	0.262	0.175	0.178	0.220	0.215
13	0.585	0.625	0.333	0.520	0.520
14	0.138	0.200	0.422	0.240	0.240
15	0.015		0.022	0.02	0.015

Tabela 5.6 - Frequência alélica do loco DYS439 de acordo com o grupo

	Brancos	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Alelo	Frequência				
9		0.025			0.005
10	0.077	0.100	0.044	0.080	0.075
11	0.385	0.425	0.178	0.300	0.325
12	0.431	0.325	0.533	0.540	0.460
13	0.092	0.125	0.200	0.080	0.120
14	0.015		0.044		0.015

Tabela 5.7 - Frequência alélica do loco DYS389II de acordo com o grupo

	Brancos	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Alelo	Frequência				
27	0.062		0.067		0.035
28	0.123	0.100	0.156	0.100	0.120
29	0.431	0.175	0.244	0.440	0.340
30	0.262	0.350	0.356	0.340	0.320
31	0.092	0.275	0.111	0.080	0.130
32	0.031	0.100	0.067	0.040	0.055

Tabela 5.8 - Frequência alélica do loco DYS438 de acordo com o grupo

	Brancos	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Alelo	Frequência				
8				0.020	0.005
9	0.062		0.044	0.040	0.040
10	0.323	0.375	0.689	0.380	0.430
11	0.138	0.375	0.156	0.160	0.195
12	0.446	0.250		0.400	0.295
13	0.031		0.111		0.035

Tabela 5.9 - Frequência alélica do loco DYS437 de acordo com o grupo

	Brancos	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Alelo	Frequência				
14	0.462	0.700	0.867	0.400	0.585
15	0.400	0.225	0.133	0.460	0.320
16	0.123	0.050		0.120	0.080
17	0.015	0.025		0.020	0.015

Tabela 5.10 - Frequência alélica do loco DYS19 de acordo com o grupo

	Brancos	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Alelo	Frequência				
13	0.154	0.150	0.089	0.120	0.130
14	0.492	0.200	0.133	0.540	0.365
15	0.262	0.475	0.333	0.260	0.320
16	0.092	0.100	0.156	0.040	0.095
17		0.075	0.289	0.040	0.090

Tabela 5.11 - Frequência alélica do loco DYS392 de acordo com o grupo

	Brancos	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Alelo	Frequência				
10		0.025		0.020	0.010
11	0.385	0.650	0.578	0.420	0.490
12	0.108	0.100		0.080	0.075
13	0.431	0.200	0.200	0.360	0.315
14	0.062	0.025	0.200	0.100	0.095
15	0.015		0.022		0.010
16				0.020	0.005

Tabela 5.12 - Frequência alélica do loco DYS393 de acordo com o grupo

	Brancos	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Alelo	Frequência				
10				0.020	0.005
12	0.077	0.075	0.200	0.200	0.135
13	0.723	0.675	0.667	0.540	0.655
14	0.138	0.225	0.111	0.220	0.170
15	0.062	0.025	0.022	0.020	0.035

Tabela 5.13 - Frequência alélica do loco DYS390 de acordo com o grupo

	Branços	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
Alelo	Frequência				
21	0.015	0.475		0.100	0.125
22	0.031	0.050	0.200	0.140	0.100
23	0.246	0.150	0.178	0.240	0.210
24	0.615	0.300	0.200	0.420	0.410
25	0.092	0.025	0.378	0.100	0.145
26			0.044		0.010

Na Tabela 5.15 estão representadas a diversidade gênica por loco e a diversidade gênica média, o loco que apresentou a maior diversidade gênica foi o DYS385. Pode-se verificar que em alguns locos foi encontrada grande variação entre os grupos, como o DYS437 no qual a diversidade variou de 0.2359 (amarelos) a 0.6261 (pardos), enquanto em outros, como o DYS439, a diferença observada foi menor.

A comparação realizada entre os grupos demonstrou que a variação dentro das populações (94.35%) foi maior do que a obtida entre as populações (5.65%).

Os haplótipos encontrados foram inseridos no banco de dados mundial do cromossomo Y.

Tabela 5.14 - Frequência alélica do loco DYS385 de acordo com o grupo

Haplótipo	Branços	Pretos	Amarelos	Pardos	Total
9-15	-	-	0.022	-	0.005
10-13	-	-	-	0.020	0.005
10-14	0.015	0.025	-	-	0.010
10-18	-	-	0.022	-	0.005
10-19	-	-	0.067	-	0.015
10-20	-	-	0.067	-	0.015
10-22	-	-	0.022	-	0.005
11-11	0.031	0.050	-	0.040	0.030
11-12	0.015	-	0.022	0.020	0.015
11-13	0.015	-	0.022	-	0.010
11-14	0.385	0.150	-	0.280	0.225
11-15	0.015	0.025	-	0.020	0.015
11-16	0.015	-	-	0.040	0.015
11-19	-	-	0.022	-	0.005
12-13	0.015	0.025	0.022	-	0.015
12-14	0.046	-	-	0.080	0.035
12-15	0.031	-	-	-	0.010
12-19	-	-	0.022	-	0.005
13-13	0.031	0.075	-	0.020	0.030
13-14	0.108	0.100	0.089	0.080	0.095
13-15	-	0.025	0.067	0.040	0.030
13-16	0.015	-	0.022	0.020	0.015
13-17	0.031	-	0.178	0.040	0.060
13-18	0.015	-	-	0.020	0.010
13-19	-	-	0.067	0.020	0.020
13-20	-	-	0.022	-	0.005
14-14	0.015	-	-	0.020	0.010
14-15	0.015	0.025	-	0.040	0.020
14-16	-	-	0.022	0.020	0.010
14-17	0.015	-	0.067	0.020	0.025
14-18	-	-	0.044	-	0.010
14-19	-	-	0.089	-	0.020
14-20	-	-	0.022	-	0.005
14-21	0.015	-	-	-	0.005
15-15	0.031	0.025	-	-	0.015
15-16	0.046	0.050	-	0.040	0.035
16-16	-	0.050	-	-	0.010
16-17	-	0.125	-	0.060	0.040
16-18	0.046	-	-	0.020	0.020
16-19	0.000	0.025	-	-	0.005
16-20	-	0.025	-	-	0.005
17-17	0.031	0.075	-	-	0.025
17-18	-	0.075	-	-	0.015
18-18	-	0.025	-	0.020	0.010
19-19	-	0.025	-	-	0.005
24-24	-	-	-	0.020	0.005

Tabela 5.15 – Diversidade gênica de cada loco estudado e diversidade gênica média por grupo e na população total

	Branços	Pardos	Amarelos	Negros	Total
DYS391	0.5896	0.6106	0.2993	0.5731	0.5484
DYS389I	0.5788	0.6359	0.6923	0.5526	0.6286
DYS439	0.6616	0.6180	0.6549	0.7051	0.6658
DYS389II	0.7284	0.6865	0.7855	0.7705	0.7502
DYS438	0.6834	0.6816	0.4977	0.6731	0.6907
DYS437	0.6208	0.6261	0.2359	0.4679	0.5515
DYS19	0.6674	0.6359	0.7728	0.7141	0.7340
DYS392	0.6604	0.6906	0.5987	0.5397	0.6490
DYS393	0.4555	0.6318	0.5137	0.5000	0.5252
DYS390	0.5602	0.7412	0.7604	0.6756	0.7448
DYS385	0.8385	0.9086	0.9434	0.9449	0.9285
DG média	0.6404	0.6788	0.6141	0.6470	0.6742

DG: Diversidade gênica

Foi feita uma busca dos haplótipos obtidos neste trabalho no banco de dados a fim de verificar se esses foram observados em outras populações (Figura 5.1). Dos 195 haplótipos obtidos 85 foram encontrados em outras populações: 36 dos 62 haplótipos do grupo dos indivíduos brancos; 23 dos 49 haplótipos de pardos; 19 dos 40 haplótipos de pretos e 7 dos 44 haplótipos de amarelos.

A maior parte dos haplótipos foram encontrados em populações européias ou em populações americanas de origem européia, com exceção daqueles obtidos para o grupo de indivíduos amarelos, os quais coincidiram apenas com populações asiáticas (Japão) ou européias de origem asiática (China) e para o grupo dos indivíduos pretos dos quais 50% apresentou coincidência com haplótipos encontrados em populações da África ou populações de origem africana residentes na Europa ou América.

Figura 5.1 - Site do banco mundial do cromossomo Y mostrando resultado obtido em pesquisa de haplótipo no banco. O mapa apresenta as regiões que possuem informações populacionais no banco (pontos azuis) e em vermelho a região onde foi encontrado o haplótipo buscado

5.1 Vestígios

Os haplótipos referentes às amostras de ossos e sangue (provenientes de supostos parentes dos suspeitos) do Instituto de Criminalística estão descritas na tabela 5.16. Foram obtidos os haplótipos completos das amostras de sangue, no entanto, devido a falhas na amplificação não foi possível realizar a tipagem dos doze microssatélites para as amostras de ossos, tendo sido obtidos apenas de 3 a 5 microssatélites por amostra.

Uma possível causa da falha na amplificação são problemas na extração do DNA, visto que além da dificuldade de extração a partir deste tipo de amostra o estado de conservação da mesma pode ter causado a degradação do material genético impossibilitando a sua amplificação.

Tabela 5.16 – Haplótipos dos vestígios encaminhados pelo Instituto de Criminalística amplificados com o PowerPlex®Y System

Loco	Amostra							
	S1	O1	S2	O2	S3	O3	S4	O4
DYS391	11	11	11	/	10	10	10	10
DYS389I	13	/	13	/	14	12	12	/
DYS439	12	/	12	11	12	/	12	10
DYS389II	29	/	29	/	30	/	29	/
DYS438	12	10	12	11	12	/	10	9
DYS437	15	/	15	/	15	/	16	/
DYS19	14	/	14	/	14	/	14	/
DYS392	13	/	13	/	13	/	11	/
DYS393	13	9	13	10	13	/	13	16
DYS390	24	/	24	/	24	23	23	/
DYS385	11/14	/	11/14	12	11/14	/	14/14	9

S: amostra de sangue; O: amostra de osso

6 DISCUSSÃO

O Brasil é um país formado por uma combinação de indivíduos provenientes de diferentes regiões do globo e até o presente podem ser observadas variações fenotípicas entre seus descendentes, portanto, apesar de alguns trabalhos terem demonstrado que as variações dentro dos grupos populacionais é maior do que entre eles, é importante a realização de estudo para determinação do grau de variação entre indivíduos de diferentes grupos para aplicação em estudos forenses e mesmo outros estudos de genética de populações, para verificar se podem existir fatores, como as condições sociais, que estariam gerando uma barreira, mesmo que de forma frágil, ao fluxo gênico entre estes grupos.

Tendo em vista este fato decidiu-se realizar este estudo no qual é feita a comparação dos grupos de indivíduos brancos, amarelos, pretos e pardos residentes no Estado de São Paulo. É importante ressaltar que a classificação dos indivíduos foi feita de acordo com a característica cor da pele, não devendo, portanto, ser considerada como uma divisão em grupos étnicos. Foram feitas, entretanto, comparações com populações das quais é mais provável que estes grupos apresentem descendência, entre elas populações de origem asiática e africana.

Observando os resultados podemos verificar que a diversidade haplotípica na amostra total ou quando são analisados os quatro grupos separadamente é elevada, apresentando valores maiores que 99%. Estes valores são semelhantes aos encontrados em outros estudos das populações brasileira (GRATTAPAGLIA et al., 2005; COSTA; SILVA; MOURA-NETO, 2002; CAINE et al., 2005; GOES et al., 2005), européia (GONZALEZ-NEIRA et al., 2000; KAYSER et al., 1997a) oriental (UCHIHI et al., 2003) e africana (ROSA et al., 2006). A mesma proporção é mantida quando são analisados apenas os microssatélites dos

haplótipos estendido ou mínimo. Considerando que este parâmetro indica a probabilidade de que dois indivíduos desta amostra escolhidos ao acaso apresentem haplótipos diferentes, os resultados obtidos indicam que a utilização apenas dos nove microssatélites do haplótipo mínimo seriam suficientes para diferenciar dois indivíduos da amostra com probabilidade maior que 99%.

Considerando os dados obtidos como representativos da população da Grande São Paulo e Araraquara podemos inferir que a probabilidade de que dois indivíduos destas populações, do sexo masculino, que não tenham relação de parentesco apresentem mesmo haplótipo é menor que 0.01.

Como citado anteriormente, os valores obtidos para a tipagem dos haplótipos estendido e mínimo são relevantes nos casos de análises de amostras forenses que se encontram degradadas, quando não é possível a amplificação dos doze microssatélites do conjunto. Estes resultados demonstram que o emprego dos microssatélites do haplótipo mínimo poderia ser suficiente nos casos forenses em que seja necessária a comparação de amostras, no entanto, quando possível é recomendável a utilização de um maior número de marcadores.

Outro parâmetro analisado foi o poder de discriminação, o qual equivale a relação entre o número de haplótipos diferentes observados e o número de indivíduos da amostra, ele corresponde à probabilidade de que ao se escolher uma amostra aleatoriamente esta possa ser identificada, ou seja, a probabilidade de diferenciação dessa em relação às demais.

O poder de discriminação obtido também apresentou valores elevados (acima de 95%) em todos os grupos quando analisado o haplótipo referente aos 12 microssatélites, assim como nos grupos de indivíduos amarelos, pardos e pretos quando analisados o haplótipo estendido ou o mínimo, no entanto, no grupo de brancos o poder de discriminação referente ao haplótipo estendido ou ao haplótipo mínimo apresentaram valores mais baixos, 93.8% e

89.2%, respectivamente. Estes valores, no entanto, são mais elevados do que aqueles obtidos em outras populações classificadas como brancas da Europa (GONZALEZ-NEIRA et al., 2000) nas quais o poder de discriminação varia de 0.69 a 0.87 e do Brasil (GRATTAPAGLIA et al., 2005; COSTA; SILVA; MOURA-NETO, 2002) com poder de discriminação de 0.87 e 0.89, respectivamente.

Com relação à análise de cada loco separadamente podemos observar que a riqueza alélica (número de alelos observados) de alguns microssatélites apresentou variação entre os grupos. Nos locos DYS391 e DYS437 houve variação de 2 a 4 alelos, no DYS389I e DYS438 variação de 3 a 5 e o DYS392 variou de 4 a 6. Além disso, alguns alelos foram exclusivos de determinado grupo: o alelo 9 do DYS439 entre os indivíduos classificados como pretos; o alelo 11 do DYS389I e o 26 do DYS390 entre os amarelos, sendo que o segundo foi encontrado em populações do Japão (UCHIHI et al., 2003); e entre os pardos os alelos 10 do DYS393, 8 do DYS438, observado também em populações da África (ROSA et al., 2006) e o 16 do DYS392, encontrado em outros estudos da população brasileira (GRATTAPAGLIA et al., 2005).

No entanto, apesar de terem sido encontrados alelos exclusivos para determinados grupos na amostra analisada neste estudo não podemos sugerir que estes sejam utilizados como marcadores populacionais, visto que em outros estudos eles foram observados em indivíduos de origem diferente, como os alelos 11 do DYS389I e 26 do DYS390 que foram observados em indivíduos classificados como brancos em outros estudos da população brasileira (GRATTAPAGLIA et al., 2005; CAINE et al., 2005); o 8 do DYS438 observado em amostras de origem africana (ROSA et al., 2006) e asiática (UCHIHI et al., 2003) e o 16 do DYS392 em populações asiáticas (UCHIHI et al., 2003).

As frequências alélicas de alguns locos também apresentaram variação entre os grupos, principalmente em relação aos amarelos, tendo sido encontrada diferença

significativa, quando realizado o teste do χ^2 , entre os grupos branco:preto e pardo:preto (DYS390), amarelo:branco (DYS391, DYS389I, DYS437, DYS438, DYS19, DYS390), amarelo:preto (DYS437, DYS438, DYS19, DYS390) e amarelo:preto (DYS438, DYS390), o que refletiu em diferenças na diversidade gênica entre os grupos, que representa a probabilidade de duas amostras escolhidas ao acaso apresentarem alelos diferentes para um determinado loco (semelhante a diversidade haplotípica).

Os locos que apresentaram maior intervalo de variação foram o DYS391 e o DYS437, ambos devido a valores reduzidos de diversidade gênica entre os indivíduos do grupo amarelo, 0.3 e 0.24, respectivamente, porém os valores encontrados para este grupo estão de acordo com aqueles encontrados no trabalho de Uchihi et al.(2003) no qual foram estudadas duas populações do Japão.

As diferenças na diversidade gênica entre os grupos, no entanto, não foram significativas quando comparado o conjunto de microssatélites através do teste do χ^2 . A diversidade gênica média também não apresentou variação significativa entre os grupos, oscilando de 0.61 a 0.68.

O cálculo da diversidade encontrada dentro de populações e entre estas foi realizado por meio da estatística F_{st} , que descreve a proporção de variância dentro de uma espécie devida à subdivisão populacional e é inversamente proporcional ao fluxo gênico. Assim, valores baixos de F_{st} indicam que a maior parte da diversidade ocorre entre indivíduos da mesma população, sendo considerado que valores abaixo de 0.05 correspondem a pouca diferenciação dentro da população, entre 0.05 e 0.15 diferenciação moderada, entre 0.15 e 0.25 grande diferenciação e valores acima de 0.25 diferenciação genética muito elevada (BALLOUX; MOULIN, 2002).

O valor encontrado neste trabalho 0.0565 indica, portanto há uma diferenciação moderada entre os quatro grupos, mas a diversidade entre os indivíduos ocorre principalmente

dentro destes grupos, sendo que apenas 5.65% da diversidade poderia ser utilizada para diferenciar as populações.

Através da busca de haplótipos no banco de dados mundial do cromossomo Y verificou-se que dos haplótipos obtidos neste trabalho menos da metade foi observada em outras populações do globo, sendo que o grupo de indivíduos classificados como amarelos foi o que apresentou menor proporção de coincidências. Este resultado pode ser explicado pela escassez de dados referentes a populações de origem asiática no banco mundial. Além disso, os haplótipos coincidentes eram todos relacionados a populações de origem asiática, o que sugere uma tendência desse grupo a optar por relacionamentos com indivíduos de mesma origem.

Entre os haplótipos de indivíduos brancos e pardos a prevalência de coincidências com populações de origem européia corrobora com resultados obtidos por Pena et al. (2000) que indicavam que a maior parte das patrilinhagens brasileira são de origem européia enquanto as matrinhagens predominantes variam entre ameríndias, africanas e européias de acordo com a região.

7 CONCLUSÕES

Os dados estatísticos obtidos a partir dos resultados da tipagem do haplótipo composto por 12 microssatélites do cromossomo Y (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439) em amostra de 200 indivíduos da Grande São Paulo e da cidade de Araraquara demonstram a eficácia da utilização deste conjunto de marcadores na identificação humana.

A divisão da amostra em quatro grupos (branco, preto, amarelo e pardo) de acordo com a autodeclaração dos sujeitos da pesquisa revelou algumas diferenças entre os resultados obtidos para cada grupo, as quais, no entanto, não são suficientes para se considerar que a população esteja dividida, não havendo, assim, a necessidade de utilização em casos forenses de valores de frequência alélica diferentes de acordo com o grupo ao qual pertence o indivíduo que se está analisando.

Os haplótipos obtidos neste estudo foram adicionados ao banco de dados mundial do cromossomo Y (Y-STR Haplotype Reference Database).

Apesar de não ter sido possível a tipagem dos 12 microssatélites do cromossomo Y nas amostras de ossos dos casos selecionados pelo Instituto de Criminalística do Estado de São Paulo foi possível verificar a partir dos alelos obtidos que as amostras de sangue utilizadas como referência não pertencem a pessoas da mesma patrilinhagem dos indivíduos dos quais se obteve as amostras de ossos.

REFERÊNCIAS¹

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

Ayub Q, Mohyuddin A, Qamar R, Mazhar K, Zerjal T, Mehdi SQ, et al. Identification and characterisation of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(2):e8.

Balloux F, Moulin NL. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol* 2002;11:155-65.

Barbujani G, Magagni A, Minch E, Cavalli-Sforza LL. An apportionment of human DNA diversity. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:4516-9.

Bennett P. Demystified...Microsatellites. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000;53:177-83.

Betz A, Bäßler G, Dietl G, Steil X, Weyermann G, Pflug W. DYS STR analysis with epithelial cells in a rape case. *Forensic Sci Int* 2001;118:126-30.

Budimlija ZM, Prinz MK, Zelson-Mundorff A, Wiersema J, Bartelink E, MacKinnon G, et al. World Trade Center human identification project: experiences with individual body identification cases. *Croat Med J* 2003;44(3):259-63.

Budowle B, Bieber FR, Eisenberg AJ. Forensic aspects of mass disasters: Strategic considerations for DNA-based human identification. *Leg Med* 2005;7:230-43.

Cainé L, Corte-Real F, Vieira DN, Carvalho M, Serra A, Lopes V, et al. Allele frequencies and haplotypes of 8 Y-chromosomal STRs in the Santa Catarina population of southern Brazil. *Forensic Sci Int* 2005;148:75-9.

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Hutz MH, Salzano FM, Pena SDJ. Divergent human Y-chromosome microsatellite evolution rates. *J Mol Evol* 1999;49:204-14.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Cerri N, Ricci U, Sani I, Verzeletti A, De Ferrari F. Mixed stains from sexual assault cases: autosomal or Y-chromosome short tandem repeats? *Croat Med J* 2003;44(3):289-92.

Cicarelli RMB, Alvarenga VLS, Carvalho DB. A Simplified methodology for DNA extraction of bones in forensic cases [resumo DNA-TP-12]. *Forensic Sci Int* 2003;136(1):37.

Cooper G, Amos W, Hoffman D, Rubinsztein DC. Network analysis of human Y microsatellite haplotypes. *Hum Mol Genet* 1996;5(11):1759-66.

Corach D, Sala A, Penacino G, Iannucci N, Bernardiz P, Doretto M, et al. Additional approaches to DNA typing of skeletal remains: The search for 'missing' persons killed during the last dictatorship in Argentina. *Electrophoresis* 1997;18(9):1608-12.

Costa AN, Silva R, Moura-Neto RS. Y-chromosome variation in a Rio de Janeiro, Brazil, population sample. *Forensic Sci Int* 2002;126:254-7.

Crainic K, Paraire F, Leterreux M, Durigon M, de Mazancourt P. Skeletal remains presumed submerged in water for three years identified using PCR-STR analysis. *J Forensic Sci* 2002;47(5):1025-7.

Dettlaff-Kakol A, Pawlowski R. First Polish DNA "manhunt" – an application of Y-chromosome STRs. *Int J Legal Med* 2002;116:289-91.

Gattás 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. *Revista de Cultura e Extensão* 2005.

Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature* 1985;18:577-9.

Giusti A, Baird M, Pasquale S, Balazs I, Glassberg J. Application of deoxyribonucleic acid (DNA) polymorphisms to the analysis of DNA recovered from sperm. *J Forensic Sci* 1986;31(2):409-17.

Góes ACS, Carvalho EFC, Gomes I, Silva DA, Gil EHF, António Amorim A, et al. Population and mutation analysis of 17 Y-STR loci from Rio de Janeiro (Brazil). *Int J Legal Med* 2005;119:70-6.

- Góis CC, Kanto EA, Oliveira RN. Análise qualitativa do DNA salivar, extraído de swabs bucais e saliva total, após a exposição a possíveis inibidores. [resumo Pc113]. Braz Oral Res 2005;19 Suppl:217.
- González-Neira A, Gusmão L, Brión M, Lareu MV, Amorim A, Carracedo A. Distribution of Y-chromosome STR defined haplotypes in Iberia. Forensic Sci Int 2000;110:117-26.
- Grattapaglia D, Kalupniek S, Guimarães CS, Ribeiro MA, Diener PS, Soares CN. Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. Forensic Sci Int 2005;149:99-107.
- Gruber J, Kameyama MM. O papel da Radiologia em Odontologia Legal. Pesquisa Odontol Bras 2001;15(3):263-8.
- Gusmão L, Alves C, Amorim A. Molecular characterisation of four human Y-specific microsatellites (DYS434, DYS437, DYS438, DYS439) for population and forensic studies. Ann Hum Genet 2001;65:285-91.
- Henke J, Henke L, Chatthopadhyay P, Kayser M, Dülmer M, Cleef S, et al. Application of Y-chromosomal STR haplotypes to forensic genetics. Croat Med J 2001;42:292-7.
- Hidding M, Schmitt C. Haplotype frequencies and population data of nine Y-chromosomal STR polymorphisms in a German and Chinese population. Forensic Sci Int 2000;113:47-53.
- Hochmeister MN, Budowle B, Jung J, Borer UV, Comey CT, Dirnhofer R. PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts. Int J Legal Med 1991;104(4):229-33.
- International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001;409:860-921.
- Iscan MY. Global forensic anthropology in the 21st century. Forensic Sci Int 2001;117:1-6.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 1985;314:67-73.
- Jeffreys AJ, Brookfield JFY, Semenov R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature 1985;317:818-9.

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. 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.

Jobling MA, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature* 2003;418:598-612.

Junge A, Madea B. Population studies of the Y-chromosome specific polymorphisms DYS19, DY389 I+II, DYS390 and DYS393 in a Western German population (Bonn area) *Forensic Sci Int* 1999;101:195-201.

Kayser M, de Knijff P, Dieltjes P, Krawczak M, Nagy M, Zerjal T, et al. Applications of microsatellite-based Y chromosome haplotyping. *Electrophoresis* 1997a;18(9):1602-7.

Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, et al. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med* 1997b;110:125-33.

Knijff P, Kayser P, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, et al. Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int J Legal Med* 1997;110:134-4

Lewontin RC. The apportionment of human diversity. *Evol Biol* 1972;6:381-98.

Lincoln PJ, Thomson J. *Methods in molecular biology - Forensic DNA profiling protocols*. 1998 Humana Press. Totowa N J.

Miller KWP, Brown BL, Budowle B. The Combined DNA Index System. In: *Progress in forensic genetics 9, Nineteenth International ISFH Congress* 2003;1239:617-20.

Moura-Neto RS, Budowle B. Fixed bin population data for the VNTR Loci D1S7, D2S44, D4S139, D5S110, D10S28 and D14S13 in a population sample from Rio de Janeiro, Brazil. *J Forensic Sci* 1997;42(5):926-8.

Mukaida M, Kimura H, Takada Y, Masuda T, Nakata Y. The personal identification of many samples recovered from under the sea. *Forensic Sci Int* 2000;113(1-3):79-85.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.

Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York: USA; 1987.

Oliveira RN, Melani RFH, Antunes JLF, Freitas ER, Galvão LCC. Perda dentária post mortem em processos de identificação humana. *Odontologia e Sociedade* 1999;1(1/2):35-8.

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.

Oorschot RAH, Jones MK. DNA fingerprints from fingerprints. *Nature* 1997;387:767.

Oz C, Levi JA, Novoselski Y, Volkov N, Motro U. Forensic identification of a rapist using unusual evidence. *J Forensic Sci* 1999;44(4):860-2.

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.

Parson W, Niederstätter H, Köchl S, Steinlechner M, Berger B. When autosomal short tandem repeats fail: optimized primer and reaction design for Y-chromosome short tandem repeat analysis in forensic casework. *Croat Med J* 2001;42:285-7.

Pascali VL, Dobosz M, Brinkmann B. Coordinating Y-chromosomal STR research for the Courts [editorial]. *Int J Legal Med* 1999;112(1):1.

Pastore L, Vuttariello E, Sarrantonio C, Coto I, Roviello S, Fortunato G, et al. Allele frequency distributions at several variable number of tandem repeat (VNTR) and short tandem repeat (STR) loci in a restricted Caucasian population from South Italy and their evaluation for paternity and forensic use. *Mol Cell Probes* 1996;10:299-308.

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

Pena SDJ, Bortolini MC. Pode a genética definir quem deve se beneficiar das cotas universitárias e demais ações afirmativas? *Estudos Avançados* 2004;18(50):31-50.

Pestoni C, Cal ML, Lareu MV, Rodríguez-Calvo MS, Carracedo A. Y chromosome STR haplotypes: genetic and sequencing data of the Galician population (NW Spain). *Int J Legal Med* 1998;112:15-21

Primorac D, Schanfield MS, Primorac D. Application of forensic DNA testing in the legal system. *Croat Med J* 2000;41(1):32-46.

Prinz M, Sansone M. Y Chromosome-specific short tandem repeats in forensic casework. *Croat Med J* 2001;42:288-91.

Redd AJ, Agellon AB, Kearney VA, Contreras VA, Karafet T, Park H, et al. Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome. *Forensic Sci Int* 2002;130(2-3):97-111.

Rodriguez-Delfin L, Santos SEB, Zago MA. Diversity of the human Y chromosome of South American Amerindians: a comparison with Blacks, Whites, and Japanese from Brazil. *Ann Hum Genet* 1997;61:439-48.

Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, Nagy M, Alves C, Amorim A, et al. Online referente database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. *Forensic Sci Int* 2001;118:106-13.

Rolf B, Keil W, Brinkmann B, Roewer L, Fimmers R. Paternity testing using Y-STR haplotypes: assigning a probability for paternity in cases of mutations. *Int J Legal Med* 2001;115(1):12-5.

Rosa A, Ornelas C, Brehm A, Villems R. Population data on 11 Y-chromosome STRs from Guine-Bissau. *Forensic Sci Int* 2006;157(2-3):210-7.

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

Schultes T, Hummel S, Herrmann B. Original investigation: Amplification of Y-chromosomal STRs from ancient skeletal material. *Hum Genet* 1999;104(2):164-6.

Sibille I, Duverneuil C, Grandmaison GL, Guerrouache K, Teissière F, Durigon M, et al. Y-STR DNA amplification as biological evidence in sexually assaulted female victims with no cytological detection of spermatozoa. *Forensic Sci Int* 2002;125(2-3):212-6.

Simas-Alves, ES. *Medicina legal e deontologia*. Curitiba; 1965.

Smith BC, Holland MM, Swett DL, Dizinno JA. DNA and the Forensic Odontologist In: Bowers CM, Bell GL. Manual of forensic odontology. 3rd.ed. Ontario: Manticore Publisher, 1997. cap.10, p.283-98.

Smith LM, Burgoyne LA. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA[®] data basing paper. BMC Ecol 2004;4(1):4.

Spiegel AD. Dr. John Frederick May and the identification of John Wilkes Booth's body. J Community Health 1998;23(5):383-405.

Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics II 2^aed. New York and London: Garland Science; 1999.

Sweet D, Hildebrand D. Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: a case report. Int J Legal Med 1999;112:201-3.

Szibor R, Michael M, Plate I, Krause D. Efficiency of forensic mtDNA analysis: Case examples demonstrating the identification of traces. Forensic Sci Int 2000;113:71-8.

Takasaki T, Tsuji A, Ikeda N, Ohishi M. Age estimation in dental pulp based on human telomere shortening. Int J Legal Med 2003;117:232-4.

Thangaraj K, Reddy AG, Singh L. Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? Int J Legal Med 2002;116:121-3.

Uchihi R, Yamamoto T, Usuda K, Yoshimoto T, Tanaka M, Tokunaga S, et al. Haplotype analysis with 14 Y-STR loci using 2 multiplex amplification and typing systems in 2 regional populations in Japan. Int J Legal Med 2003;117(1):34-8.

Vogt PH, Affara N, Davey P, Hammer M, Jobling MA, Lau YF, et al. Report of the third International Workshop on Y Chromosome Mapping. Cytogenet Cell Genet 1997;79(1-2):1-20.

Walsh SJ. Recent advances in forensic genetics. Expert Rev Mol Diagn 2004;4(1):31-40.

Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribonucleic acid. Nature 1953;171:737-8.

Wiegand P, Bajanowski T, Brinkmann B, DNA typing of debris from fingernails, Int J Legal Med 1993;106:81-4.

Wiegand P, Kleiber M. DNA typing of epithelial cells after strangulation. Int J Legal Med 1997;110:181-3.

Wood RE. Forensic aspects of maxillofacial radiology. Forensic Sci Int 2006;159:47-55.

Y-STR Haplotype Reference Database. Disponível em: URL:
http://ystr.charite.de/index_gr.html [data acesso 2006 Jun. 15].

Estudo de frequências alélicas de 12 microssatélites do cromossomo Y na população brasileira de Araraquara e da região da Grande São Paulo.

Nesta pesquisa serão estudadas regiões do DNA que apresentam transmissão hereditária, ou seja, são passadas de pai para filho, mas que não estão relacionadas a nenhuma característica física ou doença, sendo utilizadas exclusivamente para a identificação de indivíduos.

O objetivo deste estudo é a determinação das diferenças apresentadas por indivíduos não aparentados da população brasileira com relação a estas regiões, que são utilizadas para identificação humana.

Para isto será coletada amostra de saliva através de swab bucal ou sangue, que serão analisadas em laboratório, não sendo previstos, portanto riscos aos sujeitos da pesquisa, podendo haver apenas algum desconforto durante a coleta da saliva ou sangue.

Não haverá benefício direto, mas os resultados desta pesquisa poderão ser utilizados para cálculo estatístico em análises de identificação humana, principalmente em casos forenses.

A identidade dos sujeitos da pesquisa será resguardada pelos pesquisadores durante todo o projeto, sobretudo no momento da apresentação dos resultados, como também será dada a liberdade deste recusar-se a participar e retirar o consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalização.

A pesquisadora responsável, Carolina Costa Góis, poderá ser encontrada no departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia da USP, avenida Lineu Prestes 2227, ou no telefone 3091- 7877 para prestar esclarecimentos a qualquer momento durante o andamento da pesquisa. Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo).

Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária neste estudo, assinando este termo em duas vias.

Local e data: _____

Nome: _____ RG: _____

Endereço: _____ telefone: _____

assinatura do sujeito da pesquisa
ou de seu representante legal

assinatura do pesquisador

APÊNDICE B – Distribuição dos haplótipos do cromossomo Y observados em quatro grupos populacionais de Araraquara e da região da Grande São Paulo

	DYS391	DYS389I	DYS439	DYS389II	DYS438	DYS437	DYS19	DYS392	DYS393	DYS390	DYS385	<i>n</i>			
Haplótipos												B	Pr	A	Pa
H1	9	13	11	29	10	14	13	11	13	24	13-13	1			
H2	9	13	11	29	10	14	13	11	13	24	13-14	1			
H3	9	13	11	32	11	14	15	10	13	21	16-19		1		
H4	9	13	11	30	10	14	13	11	14	24	16-17				1
H5	9	14	10	30	10	14	13	11	13	24	13-14	1			
H6	9	14	10	30	10	14	13	12	13	24	13-14		1		
H7	9	14	10	30	10	14	13	11	13	24	14-15				1
H8	9	14	11	30	10	14	13	11	13	24	13-14		1		
H9	9	14	12	31	9	14	15	11	12	24	13-16	1			
H10	9	15	10	30	10	14	13	11	13	24	13-14				1
H11	9	15	12	31	9	15	13	14	13	25	12-14	1			
H12	10	11	12	27	11	15	14	14	12	23	14-19			1	
H13	10	11	13	27	11	15	14	14	12	23	14-19			1	
H14	10	12	9	28	10	15	15	12	14	23	14-15		1		
H15	10	12	10	28	10	16	14	11	13	23	14-15	1			
H16	10	12	10	30	10	17	17	12	12	22	12-13		1		
H17	10	12	10	28	8	16	16	11	13	22	11-14				1
H18	10	12	10	30	10	17	17	12	12	22	13-13				1
H19	10	12	11	27	10	16	14	11	13	23	13-14	1			
H20	10	12	11	28	10	16	16	11	14	23	13-14	1			
H21	10	12	11	27	10	14	17	13	12	25	14-18			1	

continua

continuação

H22	10	12	11	28	10	16	14	11	13	22	13-14	1
H23	10	12	11	28	10	16	14	11	13	22	13-15	1
H24	10	12	11	29	10	15	15	11	14	22	14-15	1
H25	10	12	11	29	10	16	14	11	12	22	13-16	1
H26	10	12	11	29	10	16	15	11	14	22	13-14	1
H27	10	12	12	27	9	16	15	11	12	24	13-17	1
H28	10	12	12	27	12	15	14	13	13	24	11-14	1
H29	10	12	12	28	9	16	15	11	12	23	14-17	1
H30	10	12	12	28	10	16	14	11	13	23	14-14	1
H31	10	12	12	29	12	15	14	13	13	25	11-14	1
H32	10	12	12	30	10	15	15	11	13	23	12-14	1
H33	10	12	12	28	12	14	14	13	13	24	10-14	1
H34	10	12	12	28	11	15	16	14	12	24	13-17	1
H35	10	12	12	29	10	14	15	14	14	24	12-13	1
H36	10	12	12	29	11	14	14	14	13	23	13-18	1
H37	10	12	13	29	10	14	13	11	13	23	17-17	1
H38	10	12	13	29	11	14	13	15	13	24	15-15	1
H39	10	12	14	28	11	16	15	11	14	22	12-15	1
H40	10	13	11	29	10	14	15	12	15	23	15-16	1
H41	10	13	11	29	12	14	15	13	13	24	12-14	1
H42	10	13	11	30	10	14	14	11	12	23	13-17	1
H43	10	13	11	30	10	15	15	12	14	24	15-16	1
H44	10	13	11	30	10	15	15	12	15	24	15-16	1
H45	10	13	11	30	12	15	13	11	13	24	11-14	1
H46	10	13	11	29	10	14	14	11	12	23	13-13	1
H47	10	13	11	29	10	16	15	11	14	21	13-15	1
H48	10	13	11	30	10	14	13	11	14	23	16-16	1

continua

continuação

H49	10	13	11	30	10	14	15	11	13	21	13-14	1
H50	10	13	11	30	11	14	15	11	13	21	17-17	1
H51	10	13	11	30	11	14	17	11	15	21	19-19	1
H52	10	13	11	31	10	14	15	11	13	21	16-17	1
H53	10	13	11	31	11	14	15	11	12	21	17-17	1
H54	10	13	11	31	11	14	15	11	13	21	13-14	1
H55	10	13	11	31	11	14	16	11	14	21	16-17	1
H56	10	13	11	32	10	14	15	11	13	24	11-11	1
H57	10	13	11	29	10	14	15	14	13	22	11-13	1
H58	10	13	11	29	10	14	16	11	12	25	14-16	1
H59	10	13	11	29	10	14	17	11	12	25	14-17	1
H60	10	13	11	29	10	14	14	11	12	23	13-19	1
H61	10	13	11	29	10	15	15	11	14	21	13-15	1
H62	10	13	11	30	10	14	14	11	12	25	13-17	1
H63	10	13	11	30	10	15	15	11	14	24	12-14	1
H64	10	13	11	31	10	14	14	11	12	23	24-24	1
H65	10	13	12	29	11	14	14	14	13	24	13-14	1
H66	10	13	12	29	12	14	14	13	13	24	11-14	1
H67	10	13	12	29	12	14	15	13	13	24	11-14	1
H68	10	13	12	29	12	15	14	13	13	25	11-16	1
H69	10	13	12	29	12	17	14	13	13	23	11-13	1
H70	10	13	12	30	10	14	14	11	12	23	13-18	1
H71	10	13	12	30	12	15	14	13	13	24	11-14	1
H72	10	13	12	31	10	14	13	11	13	24	16-18	1
H73	10	13	12	31	10	14	13	11	13	24	17-17	1
H74	10	13	12	30	11	14	16	11	14	21	17-18	1
H75	10	13	12	30	11	14	17	11	14	21	16-20	1

continua

continuação

H76	10	13	12	31	11	14	15	11	13	21	17-17	1
H77	10	13	12	31	12	14	15	11	13	21	15-16	1
H78	10	13	12	31	12	14	15	11	13	21	16-16	1
H79	10	13	12	28	13	14	16	13	13	23	10-19	1
H80	10	13	12	29	13	14	15	13	13	22	10-22	1
H81	10	13	12	30	10	14	15	11	13	25	10-20	1
H82	10	13	12	30	10	14	15	11	13	25	14-17	1
H83	10	13	12	30	10	14	16	11	13	25	13-17	1
H84	10	13	12	30	10	14	17	11	13	26	14-20	1
H85	10	13	12	30	11	15	14	11	13	23	13-17	1
H86	10	13	12	28	9	15	15	11	13	24	13-17	1
H87	10	13	12	29	10	14	15	12	15	23	15-16	1
H88	10	13	12	29	12	15	14	13	13	23	11-14	1
H89	10	13	12	29	12	15	14	13	13	24	11-15	1
H90	10	13	12	29	12	15	15	13	13	24	11-14	1
H91	10	13	12	30	10	14	13	11	13	23	16-18	1
H92	10	13	12	30	11	14	15	11	14	21	14-16	1
H93	10	13	12	30	11	14	17	11	14	21	18-18	1
H94	10	13	13	31	10	16	15	11	14	22	13-13	1
H95	10	13	13	29	10	14	13	11	14	24	13-14	1
H96	10	13	13	29	10	15	13	11	14	23	13-14	1
H97	10	13	13	30	11	14	15	11	13	25	13-17	1
H98	10	13	14	30	10	14	17	11	13	26	13-20	1
H99	10	14	10	30	10	14	14	14	13	23	11-12	1
H100	10	14	11	32	10	14	16	12	15	23	15-15	1
H101	10	14	11	32	11	14	15	11	13	21	16-18	1
H102	10	14	11	30	10	14	17	11	15	22	11-19	1

continua

continuação

H103	10	14	11	30	10	14	17	13	13	24	14-19	1
H104	10	14	12	30	12	15	14	13	13	24	11-14	1
H105	10	14	12	30	10	14	13	14	13	24	15-16	1
H106	10	14	12	28	10	14	16	11	12	22	13-15	1
H107	10	14	12	29	9	14	15	13	13	22	10-18	1
H108	10	14	12	29	9	14	15	13	13	22	10-19	1
H109	10	14	12	30	13	14	15	13	13	22	10-20	1
H110	10	14	12	30	13	14	16	13	13	22	10-20	1
H111	10	14	12	31	10	14	15	11	13	25	13-17	1
H112	10	14	12	31	10	14	17	11	13	24	14-17	1
H113	10	14	12	31	10	14	17	11	13	25	13-16	1
H114	10	14	12	31	10	14	17	11	13	25	13-17	1
H115	10	14	12	32	10	14	17	11	13	25	14-18	1
H116	10	14	12	31	10	15	15	12	14	23	14-17	1
H117	10	14	12	31	11	14	14	14	13	23	11-11	1
H118	10	14	13	32	10	16	15	11	14	22	13-13	1
H119	10	14	13	30	10	14	13	11	14	24	13-15	2
H120	10	14	13	30	10	14	16	11	13	25	9-15	1
H121	10	14	14	30	13	14	15	15	13	22	10-19	1
H122	10	15	13	32	10	14	17	11	13	25	13-17	1
H123	11	12	10	29	10	14	13	11	13	24	17-18	1
H124	11	12	11	27	12	15	14	13	13	24	11-14	1
H125	11	12	11	28	11	15	14	13	13	24	13-14	1
H126	11	12	11	28	12	15	14	13	13	24	13-14	1
H127	11	12	11	28	13	14	14	13	13	24	11-14	1
H128	11	12	11	30	11	14	16	11	13	25	11-14	1
H129	11	12	11	28	10	14	17	13	12	25	13-19	1

continua

continuação

H130	11	12	11	28	11	14	14	11	13	24	14-19	1
H131	11	12	12	28	12	15	14	13	13	25	11-14	1
H132	11	12	12	29	11	14	15	11	14	21	18-18	1
H133	11	12	12	28	10	14	15	14	13	23	13-14	1
H134	11	12	12	28	11	15	14	14	12	24	13-19	1
H135	11	12	12	28	12	15	14	13	10	23	11-14	1
H136	11	12	13	28	12	15	14	13	13	24	11-14	1
H137	11	12	13	29	10	14	15	14	13	25	13-19	1
H138	11	12	13	29	12	14	14	14	13	23	11-14	1
H139	11	12	13	30	11	14	13	16	12	24	14-14	1
H140	11	13	10	29	12	14	16	11	13	24	11-14	1
H141	11	13	10	31	11	14	16	11	13	25	12-15	1
H142	11	13	10	30	11	14	15	11	13	21	16-17	1
H143	11	13	10	29	10	14	15	11	13	23	12-19	1
H144	11	13	11	29	12	14	13	13	14	24	11-14	1
H145	11	13	11	29	12	14	14	13	13	24	11-14	2
H146	11	13	11	29	12	15	14	13	13	24	11-14	1
H147	11	13	11	29	12	15	15	13	13	24	11-14	1
H148	11	13	11	30	10	15	15	12	15	24	14-21	1
H149	11	13	11	30	11	14	16	11	14	25	11-14	1
H150	11	13	11	29	10	15	16	12	14	23	15-15	1
H151	11	13	11	31	11	14	15	11	13	21	16-17	1
H152	11	13	11	31	11	14	15	11	13	21	17-18	1
H153	11	13	11	29	12	15	14	13	14	24	12-14	1
H154	11	13	12	29	11	14	14	14	13	24	11-13	1
H155	11	13	12	29	12	15	14	12	13	24	11-11	1
H156	11	13	12	29	12	15	14	13	13	24	11-14	2

continua

continuação

H157	11	13	12	29	12	15	14	13	13	24	12-13	1
H158	11	13	12	29	12	15	14	13	14	24	10-14	1
H159	11	13	12	29	12	15	15	13	13	24	11-14	2
H160	11	13	12	30	10	14	14	11	14	23	16-18	1
H161	11	13	12	29	12	15	14	13	13	24	13-13	1
H162	11	13	12	30	12	14	15	13	13	23	11-15	1
H163	11	13	12	31	11	14	13	11	13	24	11-14	1
H164	11	13	12	29	12	14	14	13	13	24	12-14	1
H165	11	13	12	29	12	15	14	13	12	24	11-14	1
H166	11	13	12	29	12	15	14	13	12	25	11-14	2
H167	11	13	12	29	12	15	14	13	14	23	11-14	1
H168	11	13	12	29	12	15	15	13	14	24	11-16	1
H169	11	13	12	29	12	15	15	14	13	24	13-14	1
H170	11	13	12	30	12	15	14	13	13	24	11-14	1
H171	11	13	12	31	11	14	15	11	13	21	16-17	1
H172	11	13	13	29	12	15	14	12	13	24	11-14	1
H173	11	13	13	29	12	15	14	13	13	24	11-14	1
H174	11	13	13	29	12	14	14	13	13	25	12-14	1
H175	11	14	10	30	10	14	15	14	14	23	11-12	1
H176	11	14	11	30	12	14	14	13	13	24	11-14	1
H177	11	14	11	31	11	14	15	11	13	21	16-17	1
H178	11	14	11	30	12	15	14	12	13	25	11-14	1
H179	11	14	12	32	10	15	16	11	13	24	11-11	1
H180	11	14	12	31	10	14	15	11	13	25	13-14	1
H181	11	14	12	32	10	14	17	11	13	25	13-17	1
H182	11	14	12	30	11	15	14	13	13	24	11-14	1
H183	11	14	12	30	12	14	14	13	13	24	10-13	1

continua

H184	11	14	13	30	12	14	14	13	13	24	11-15	1
H185	11	14	13	30	12	15	14	13	13	23	11-11	1
H186	11	14	13	30	12	15	14	13	13	23	11-14	1
H187	11	14	13	30	12	15	14	13	13	24	11-14	1
H188	11	14	13	29	9	15	14	10	12	23	11-12	1
H189	12	13	11	29	12	15	14	13	13	24	11-14	1
H190	12	13	12	29	13	15	14	13	13	23	11-14	1
H191	12	14	11	32	11	14	15	11	13	21	16-17	1
H192	12	14	12	30	12	16	14	13	13	24	11-16	1

n: número de indivíduos nos quais o haplótipo foi observado; B: indivíduos brancos; Pr: indivíduos pretos; A: indivíduos amarelos; Pa: indivíduos pardos

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 128/04**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa ***“Estudo de frequências alélicas de 12 loci do cromossomo Y na população brasileira de Araraquara e da região da grande São Paulo”***, de responsabilidade da Pesquisadora **Carolina Costa Góis**, sob orientação do Prof. Dr. **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, 31 de agosto de 2004

Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP