UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

AVALIAÇÃO DE NOVOS SISTEMAS ELETROFORÉTICOS
MINIATURIZADOS PARA TESTES DE PATERNIDADE

Karina Fraige

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos
2007

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar o Dom da vida e força de vontade para correr atrás do que quero.

Aos meus pais, Rosemeire e Mario Sérgio, e minha irmã Keila, pelo apoio e carinho concedido durante todos os anos de minha vida, e pela paciência nos dias em que eu chegava em casa cansada e estressada.

Ao meu namorado, Dédo, que esteve sempre ao meu lado com muito carinho e paciência.

A todos de minha família, que contribuíram para o meu crescimento.

Às amigas Thaísa e Ana Paula, pela amizade fortalecida em meio aos problemas e tristezas, e pelas boas fofocas e risadas nas horas de alegria.

Ao Prof. Dr. Emanuel, pela oportunidade e orientação, e por toda dedicação dispensada.

À Rê, por toda ajuda durante a realização do meu projeto, mesmo cheia de outras coisas a fazer, e pela amizade conquistada.

À Maribel, pela pronta ajuda sempre que solicitada, e por todo aprendizado, muito útil para a realização deste trabalho.

A todos os colegas de laboratório (que são muitos e provavelmente me esqueceria de alguns se citasse o nome de todos), que tornaram o trabalho muito mais divertido e prazeroso.

Aos colegas Sheila, Ju, Karina, Nilson, Wendell, Marcelo, Leandro, que sempre me ajudaram nas horas em que eu precisava, e à Célia, que foi quem iniciou parte deste projeto.

A Elaine e Odete pelo suporte dado durante a realização deste trabalho.

A DNA Consult, por fornecer amostras e resultados, e à Adriana, Bruno e Daniella, por toda ajuda, que foi de grande importância.

Ao Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, do IFSC, e aos colegas pertencentes a ele, que me ajudaram sempre que solicitados.

À FAPESP pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ácido desoxirribonucléico (DNA)	2
1.2. Marcadores STR	7
1.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	9
1.4. Testes de paternidade	12
<i>Sistema PowerPlex® 16</i>	16
1.5. Eletroforese capilar	18
1.5.1. Instrumentação e princípios da eletroforese capilar	19
1.5.2. Modos de separação em eletroforese capilar	24
<i>Eletroforese capilar em gel (CGE) ou com soluções poliméricas</i>	25
<i>Matrizes poliméricas para separação de DNA</i>	26
<i>Mecanismos de migração de DNA em matrizes poliméricas</i>	28
<i>Métodos de detecção de DNA e intercaladores</i>	30
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Reagentes e preparo das soluções	36
3.2. Coleta e preparo das amostras	37
3.3. Extração do DNA	37
3.4. Quantificação espectrofotométrica	38
3.5. Amplificação do DNA por PCR	39
3.6. Métodos eletroforéticos	41
3.6.1. Eletroforese em gel de agarose	41
3.6.2. Eletroforese em <i>microchip</i>	42
3.6.3. Eletroforese capilar em equipamento com arranjo de capilares	44
<i>Validação do método para testes de paternidade</i>	44
3.6.4. Eletroforese capilar acoplado a detector com arranjo de diodos	47
3.6.5. Eletroforese capilar em equipamento <i>lab-made</i> com detecção espectrofotométrica na região visível	49

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Extração e quantificação do DNA	53
4.2. Eletroforese em gel de agarose	53
4.2.1. Otimização das condições de PCR	53
<i>Temperatura de desnaturação</i>	53
<i>Temperatura de pareamento</i>	54
<i>Quantidade de DNA</i>	57
<i>Concentração de primers</i>	57
<i>Concentração de dNTPs</i>	59
4.3. Eletroforese em <i>microchip</i>	59
4.4. Eletroforese capilar acoplada a detector com arranjo de diodos	72
4.4.1. Otimização das condições de separação de DNA	72
4.5. Eletroforese capilar em equipamento <i>lab-made</i> com detecção espectrofotométrica na região visível	80
5. CONCLUSÕES	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
7. ANEXO	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bases nitrogenadas e açúcares que compõem (A) RNA e (B) DNA.	2
Figura 2 – Estrutura do DNA e pareamento das bases nitrogenadas.	5
Figura 3 – Representação de um sistema STR para um <i>loci</i> heterozigoto, com diferentes números de repetições entre os alelos.	8
Figura 4 – Representação de uma PCR.	10
Figura 5 – Representação de um sistema PCR multiplex.	12
Figura 6 - Esquema mostrando resultado de um teste de paternidade para um <i>locus</i> . Um alelo do filho vem da mãe (verde) e o outro (azul) tem que vir do pai biológico. Esse é um caso de inclusão no qual o suposto pai é o pai da criança, considerando esse <i>locus</i> .	15
Figura 7 – Produtos da amplificação de DNA pelo Sistema PowerPlex® 16. (A) um <i>primer</i> específico para D3S1358, TH01, D21S11, D18S51 e Penta E é marcado com fluoresceína; (B) um <i>primer</i> específico para D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO e Penta D é marcado com 6-carbóxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetóxi-fluoresceína; (C) um <i>primer</i> específico para Amelogenina, vWA, D8S1179, TPOX e FGA é marcado com carboxi-tetrametilrodamina; (D) padrão de tamanho molecular.	17
Figura 8 – Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.	21
Figura 9 – Representação da migração de cátions, moléculas neutras e ânions em um capilar de sílica fundida. EOF indica o fluxo eletroosmótico.	23
Figura 10 – Modelos de migração de DNA em matrizes poliméricas sob um campo elétrico constante. A) modelo de Ogston; B) modelo de reptação; C) modelo de reptação com orientação.	29
Figura 11 – Espectros de emissão dos corantes intercaladores diméricos para ácidos nucleicos.	32
Figura 12 – Padrão de tamanho de 50 bp e 25 bp (Invitrogen) em gel de agarose 2% e 3%, respectivamente, corados com brometo de etídio.	42
Figura 13 – Foto do chip utilizado pelo equipamento Bioanalyzer 2100 e os canais de separação.	44

- Figura 14** – Foto do equipamento de eletroforese capilar *lab-made* com detecção espectrofotométrica visível. (1) CCD linear; (2) célula de detecção; (3) fibra óptica; (4) mini-fonte de tungstênio; (5) software para aquisição de dados; (6) controle da fonte de alta tensão; (7) fonte de alta tensão; (8) capilar; (9) reservatórios de tampão. 50
- Figura 15** – Eletroforese em gel de agarose 2%. (A) Canaletas: 1- 53,2 °C; 2- 51,4 °C; 3- 50,3 °C; 4 – 50,0 °C, respectivamente, do *primer* D21S11; 5- padrão de 25 bp; 6- 55,5 °C, 7- 53,2 °C, 8- 51,4 °C; 9- 50,3 °C, respectivamente, do *primer* D13S317. (B) Canaletas: 1- 55,5 °C; 2- 63,5 °C, respectivamente, do *primer* CSF1PO; 3- padrão de 25 bp; 4- 50,3 °C; 5- 51,4 °C; 6- 53,2 °C; 7- 55,5 °C, respectivamente, do *primer* D7S820. (C) Canaletas: 1- 58,1 °C; 2- 60,8 °C; 3- 63,5 °C; 4- 66,0 °C, respectivamente, do *primer* Penta E; 5- padrão de 25 bp; 6- 58,1 °C; 7- 60,8 °C; 8- 63,5 °C; 9- 66,0 °C, respectivamente, do *primer* TH01. (D) 1- 53,2 °C; 2- 55,5 °C; 3- 58,1 °C; 4- 60,8 °C, respectivamente, do *primer* D18S51; 5- padrão de 25 bp. Tampão TAE 1X; V= 80 V. 55
- Figura 16** - Eletroforese em gel de agarose 2%. (A) Canaletas: 1- padrão de 50 bp; 2, 3, 4 – concentrações de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* D21S11; 5, 6, 7 - concentrações de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* Penta E; 8, 9, 10 - concentrações de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* D18S51; 11, 12, 13 - concentrações de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* TH01. (B) Canaletas: 1, 2, 3- concentrações de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* CSF1PO; 4 – padrão de 25 bp; 5, 6, 7 - concentrações de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* D7S820; 8, 9, 10 - concentrações de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* D13S317. Tampão TAE 1X; V= 80 V. 58
- Figura 17** – Eletroferograma dos produtos de PCR obtidos por amplificação do *locus* D21S11 para suposto pai, filho e mãe, em um caso de paternidade, com ampliação dos picos de interesse. 62
- Figura 18** - Eletroferogramas dos produtos de PCR obtidos por amplificação dos *loci* Penta E e D18S51, respectivamente, para suposto pai, filho e mãe, em um caso de paternidade, com ampliação dos picos de interesse. 63
- Figura 19** - Eletroferogramas dos produtos de PCR obtidos por amplificação dos *loci* TH01 e CSF1PO para suposto pai, filho e mãe, em um caso de paternidade, com ampliação dos picos de interesse. 64

Figura 20 - Eletroferogramas dos produtos de PCR obtidos por amplificação dos <i>loci</i> D7S820 e D13S317 para suposto pai, filho e mãe, em um caso de paternidade, com ampliação dos picos de interesse.	65
Figura 21 - Eletroferogramas dos fragmentos de DNA do marcador de tamanho de 25 bp em hidroxietilcelulose (A) 1,5% e (B) 2,0%. Condições de separação: tampão NPe4-TAPS 50 mmol L ⁻¹ pH 8,3; 300 V cm ⁻¹ ; capilar de sílica fundida de 75 µm d. i. recoberto com PVA de 39 cm de comprimento total e 31 cm de comprimento efetivo; detecção UV a 260 nm; injeção eletrocinética a -11,7 kV durante 10 s.	73
Figura 22 - Gráfico de pares de base <i>versus</i> tempo de migração para os fragmentos do padrão de tamanho 25 bp nas concentrações de HEC 1,5% (▲) e 2,0% (■).	73
Figura 23 – Eletroferograma dos fragmentos do complexo DNA – YOYO-1 com o marcador de tamanho 25 bp em HEC 2,0 %. Condições de análise da Figura 21. Detecção a 490 nm.	76
Figura 24 – Eletroferograma de duas amostras de produtos de PCR (A) com 190 bp e concentração de 12 ng µL ⁻¹ (B) com 298 bp e concentração de 32 ng µL ⁻¹ . Condições de análise da Figura 21; $t_{inj} = 12$ s.	79
Figura 25 – Espectros de absorção dos corantes intercaladores diméricos obtidos no sistema <i>lab-made</i> a 0,1 mmol L ⁻¹ em água Milli-Q, com caminho óptico de 75 µm.	81
Figura 26 – Eletroferogramas dos fragmentos de DNA do marcador de tamanho de 25 bp intercalado a YOYO-3. Condições de separação: mesmas da Fig. 21; capilar de sílica fundida de 75 µm d. i. recoberto com PVA de 26 cm de comprimento total e 19 cm de comprimento efetivo; detecção 570 – 600 nm; injeção eletrocinética a -7,8 kV durante 12 s.	82
Figura 27 - Gráfico de pares de base <i>versus</i> tempo de migração para os fragmentos do padrão de tamanho 25 bp intercalado a YOYO-3 em HEC 2,0%.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos de detecção utilizados em eletroforese capilar.	21
Tabela 2 - Dados dos corantes intercaladores diméricos para ácidos nucleicos.	31
Tabela 3 – Características dos <i>loci</i> utilizados: sequência do <i>primer</i> , acesso ao <i>GenBank</i> , sequência de repetição e tamanho dos alelos observados.	40
Tabela 4 – Relações para cálculo de índice de paternidade. Tabela modificada da AABB.	46
Tabela 5 – T _m e temperaturas estudadas para cada par de <i>primers</i> .	54
Tabela 6 – Temperaturas de pareamento utilizadas para amplificação de DNA por PCR.	56
Tabela 7 – Repetibilidade de tamanho dos fragmentos do padrão de 25 bp em três diferentes poços de um <i>chip</i> , para fragmentos de 50 a 350 bp, e valores esperados.	60
Tabela 8 – Resultados obtidos para o DNA K562 no equipamento Bioanalyzer 2100 e MegaBACE.	61
Tabela 9 – Resultados das amostras de paternidade para o caso 2731 no Bioanalyzer 2100 (pares de base - bp) e MegaBACE (pares de base e alelos).	67
Tabela 10 - Resultados das amostras de paternidade para o caso 2732 no Bioanalyzer 2100 (pares de base - bp) e MegaBACE (pares de base e alelos).	68
Tabela 11 – Resultados das amostras de paternidade para o caso J no Bioanalyzer 2100 (pares de base - bp)	69
Tabela 12 – Índice de paternidade e índice de paternidade acumulado para cada <i>loci</i> para o caso 2731.	71
Tabela 13 – Índice de paternidade e índice de paternidade acumulado para cada <i>loci</i> para o caso 2732.	71
Tabela 14 – Resolução à largura da base dos picos referentes aos fragmentos do marcador de tamanho de 25 bp.	75

Tabela 15 – Resolução à meia altura dos picos e em pares de base referentes aos fragmentos do marcador de tamanho de 25 bp sem intercalador e intercalado a YOYO-1.	77
Tabela 16 – Comprimentos de onda máximo de absorção experimentais para os corantes intercaladores diméricos.	81
Tabela 17 – Resolução à meia altura dos picos e em pares de base referentes aos fragmentos do marcador de tamanho de 25 bp intercalado a YOYO-3.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

STR – Short tandem repeats

PCR – Reação em cadeia da polymerase

pb – pares de base

CE – eletroforese capilar

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

UV - Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta e visível

EOF - Fluxo eletrosmótico

dsDNA – DNA dupla fita

DO – Densidade óptica

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

TAE – Tris-acetato-EDTA

Tris – Tris[hidroximetil]aminometano

TAPS – Ácido sulfônico de N-tris[hidroximetil]-3-aminopropano

dNTP – Didesoxinucleotídeos

CCD – Dispositivo de carga acoplada

HEC – hidroxietilcelulose

T_m – *Melting temperature*

CV – coeficiente de variação

SP –Suposto pai

F – filho

M- Mãe

RESUMO

Nos últimos anos a eletroforese capilar tem substituído a eletroforese em gel e está sendo usada para uma ampla variedade de aplicações forenses, incluindo tipagem de DNA. A fim de superar as desvantagens com relação à análise simultânea de amostras que a eletroforese em gel oferece, equipamentos com arranjos de capilares foram idealizados, assim como a possibilidade de análises multiplexadas em um único capilar por meio da utilização de corantes intercaladores. Neste trabalho foi otimizada a metodologia para amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase para sete *primers* correspondentes a sete regiões padronizadas e legalmente aceitas para testes de paternidade. Três casos foram avaliados por eletroforese em *microchip*, indicando que um método mais reprodutível e de maior resolução deveria ser utilizado, fato que levou ao desenvolvimento de um método para separação de um padrão de tamanho de DNA de 25 pares de base por eletroforese capilar em soluções poliméricas em um equipamento comercial. Este método foi aplicado à separação do mesmo padrão intercalado a um corante dimérico em um equipamento de eletroforese capilar *lab-made* miniaturizado, com detecção espectrofotométrica na região visível, sugerindo a possibilidade de o equipamento desenvolvido ser utilizado para análises genéticas multiplexadas com custo e tempo minimizados.

ABSTRACT

In recent years capillary electrophoresis has substituted slab gel electrophoresis and has been used in a variety of forensic applications, such as DNA typing. In order to overcome the disadvantages regarding the simultaneous samples analysis that slab gel offers, equipments with capillary arrays were developed, as well as the possibility of multiplex analysis in a single capillary by using intercalating dyes. In this work the methodology to amplify DNA by polymerase chain reaction was studied to seven primers corresponding to seven standardized and legally accepted regions in paternity tests. Three cases were evaluated by microchip electrophoresis, indicating the need for a more reproducible and with better resolution method has to be used. This fact led to the development of a method to separate a 25 base pairs DNA ladder by gel capillary electrophoresis in a commercial equipment. In the sequence, this method was applied to the separation of the same ladder intercalated to a dimeric dye in a lab-made miniaturized capillary electrophoresis system with spectrophotometric detection at visible region, suggesting that the developed equipment can be used for multiplexed genetic analysis with reduced cost and time.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ácido desoxirribonucléico (DNA)

Toda matéria viva é constituída de pequenas estruturas denominadas células, que contêm as características morfológicas e fisiológicas dos organismos. As células de diferentes organismos são similares quanto à sua estrutura e constituintes moleculares. De um modo geral pode-se dizer que as células são formadas estruturalmente por um complexo agregado de moléculas, organizadas conforme suas funções e delimitadas por uma bicamada molecular: a membrana celular. Como constituintes moleculares, além de água e íons inorgânicos, as células apresentam proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos ^(1 -5).

Os ácidos nucleicos são polímeros lineares de nucleotídeos, unidos por ligações fosfodiéster. Existem dois tipos de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucléico (DNA) e o ácido ribonucléico (RNA). Tanto o DNA como o RNA são constituídos de quatro tipos diferentes de nucleotídeos, onde a diferença entre eles reside no tipo do açúcar (pentose) e na composição de bases nitrogenadas. Um nucleotídeo é composto de um grupo fosfato (PO_4^-), um açúcar (desoxirribose ou ribose) e uma base nitrogenada (púrica ou pirimídica). A seqüência de bases das moléculas de DNA portam a informação genética, enquanto o açúcar e o fosfato têm um papel estrutural ^(1 -5).

O açúcar em um desoxorribonucleotídeo é a desoxirribose, e as bases que o compõe são adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). O açúcar faz a ligação entre a base e o grupo fosfato, e a combinação de uma base e um açúcar, sem o grupamento fosfato, constitui um nucleosídeo ^(1 -5). O açúcar em um ribonucleotídeo é a ribose, e as bases nitrogenadas adenina (A), citosina (C), guanina (G) e uracila (U). A Figura 1 apresenta as bases nitrogenadas e os açúcares que compõem o RNA e o DNA.

Figura 1 – Bases nitrogenadas e açúcares que compõem (A) RNA e (B) DNA.

Cada célula no corpo possui essencialmente a mesma constituição genética. Desse modo, o material genético precisa ser confiavelmente duplicado em cada multiplicação celular. Além disso, precisa ter um conteúdo de informação para codificar as proteínas que o organismo expressa e permitir que a informação codificada mude em raras ocasiões. Tais mudanças, denominadas mutações, fornecem o material bruto no qual a seleção da evolução

opera, e constam na substituição, adição ou deleção de um ou mais pares de nucleotídeos, o que resulta em mudança da informação codificada ⁽⁶⁾.

Em 1953, James Watson e Francis Crick propuseram um modelo de estrutura tridimensional do DNA, baseado nos estudos de difração de raios-X e em estudos da molécula. Este modelo mostrou que o DNA é uma dupla-hélice (fita dupla) e que as duas fitas se enrolam em torno do eixo da hélice. As desoxirriboses ficam externas em relação às bases nitrogenadas como se fossem corrimãos de uma escada circular, expostas ao meio aquoso, e os carbonos estão numerados de 1' a 5'. As ligações fosfodiéster nas duas fitas estão em direções opostas, (uma na direção 5' – 3' e a outra 3' – 5') sendo antiparalelas. As bases são ligadas ao carbono 1' de cada açúcar desoxirribose no suporte de cada filamento ⁽¹⁻⁵⁾.

Os anéis aromáticos das bases nitrogenadas são hidrofóbicos e ficam orientados para o interior, perpendiculares ao eixo da hélice. As bases são pareadas entre as duas fitas da molécula, mantendo a sua estrutura. O pareamento das bases é feito por ligações de hidrogênio através dos grupos ceto ($C = O$) e amino ($C - NH_2$) presentes. Desta forma, T, que contém grupos ceto, pode parear com A, que contém grupo amino, através de uma ligação de hidrogênio. As bases C e G, que contém tanto grupos ceto como amino, podem formar duas ligações de hidrogênio. Além disso, uma ligação de hidrogênio adicional pode ser formada entre os nitrogênios dos anéis aromáticos em todos os pares. Assim, entre T e A são formadas duas ligações de hidrogênio, e entre C e G são formadas três. A estrutura do DNA é apresentada na Figura 2. Devido a essa característica de pareamento, as fitas de DNA são denominadas complementares ⁽¹⁻⁵⁾. Devido à orientação em sentido invertido dos filamentos de DNA e às regras de pareamento das bases, ocorre corretamente a duplicação, sendo que cada filamento serve como molde, sem ambigüidade, para a síntese de seu

filamento complementar. A enzima responsável pela duplicação de DNA é chamada *DNA polimerase* ⁽⁶⁾.

Figura 2 – Estrutura do DNA e pareamento das bases nitrogenadas.

Várias forças agem em conjunto para estabilizar a dupla hélice do DNA. O empilhamento das bases no interior da hélice permite o estabelecimento de forças de van der Waals entre os anéis aromáticos de bases adjacentes, que são fracas, mas aditivas na manutenção da estrutura. Finalmente, as cadeias de açúcar-fosfato, que são carregadas negativamente, interagem com cátions em solução, o que neutraliza a repulsão entre as duas cadeias e estabiliza a dupla hélice ⁽¹⁻⁵⁾.

Estudos realizados por Oswald Avery, em 1944, com a bactéria *Pneumococcus*, demonstraram que o DNA é a substância que determina o genótipo dos organismos e, que, portanto, é o material hereditário. Um conjunto completo do DNA de um organismo é denominado genoma. Assim, um genoma é composto de longas moléculas de DNA, que são, por sua vez, os componentes principais dos cromossomos ⁽⁶⁾. Se a sequência da molécula de DNA é conhecida, então os genes que ela contém podem ser identificados e suas atividades estudadas em detalhes, o que contribui para o estudo de diversas doenças.

Desde o final dos anos 70, biólogos são capazes de obter seqüências de longos trechos de DNA, culminando com o término da primeira seqüência completa de um genoma em 1995, da bactéria *Haemophilus influenzae* ⁽⁷⁾. Desde então, esforços foram devotados à sequenciar o genoma humano, completo em abril de 2003.

Determinar a seqüência do genoma humano é apenas o primeiro passo para compreender a herança genética e os mecanismos dos processos essenciais à vida. Embora o seqüenciamento do DNA seja o tipo mais importante de análise genética, é reconhecido que outras técnicas de genotipagem e mapeamento são necessárias para a extração eficiente de dados do genoma humano. As técnicas de genotipagem mais comuns atualmente em pesquisa e desenvolvimento são as análises de polimorfismo de único nucleotídeo, SNP (*single-nucleotide polymorphism*), polimorfismo de conformação de fita simples, SSCP (*single-stranded conformation polymorphism*), análise heteroduplex, HA (*heteroduplex analysis*) e curtas repetições sequenciais, STR (*short tandem repeat*) ^(8,9).

SNPs são mudanças ou eliminação de um único par de base na seqüência do DNA, ou seja, posições no genoma em que alguns indivíduos possuem um nucleotídeo e outros possuem um nucleotídeo diferente ⁽⁷⁾. É estimado um número de 2 a 3 milhões de SNPs entre dois genomas individuais ⁽⁸⁾. A técnica de SSCP é utilizada para detectar mutações pontuais por meio da mobilidade eletroforética de fragmentos de DNA fita simples, obtidos por desnaturação, a fim de identificar alelos variantes. Pode estar sozinha ou em conjunto com HA, que envolve a análise combinada de híbridos duplexes de DNA mutante e normal ⁽⁸⁾. A técnica de HA baseia-se na mobilidade eletroforética de fragmentos curtos de DNA que estão perfeitamente pareados com outros que possuem erro de pareamento ⁽⁹⁾. A análise de STR é apontada por caracterizar outra variação genética comum, que é polimórfica em natureza entre os indivíduos. STRs são curtas extensões de seqüências de DNA repetitivas

(2 a 7 pares de bases) que estão distribuídas por todo o genoma com ampla aplicação em medicina legal ou forense, como em testes de paternidade e identificação de indivíduos ⁽⁸⁾.

1.2. Marcadores STR

Um marcador é uma sequência de DNA que pode ser usada para marcar uma posição em um genoma. Os marcadores podem ser utilizados para detectar mutações, identificar doenças genéticas, na descoberta de novos medicamentos ou em análises forense e identificação de indivíduos. Sequências repetitivas podem ser utilizadas como marcadores, e os STR (ou microsátélites) são os mais utilizados para testes de DNA. Apesar de sua função desconhecida, os microsátélites têm se apresentado bastante úteis em genética, já que encontram-se espalhados por todo o genoma e constituem-se em uma fonte altamente informativa para utilização em identificação de indivíduos ⁽¹⁰⁾. Sabe-se, no entanto, que estas regiões repetitivas localizam-se em partes do DNA que não codificam proteínas, portanto não contêm informações que governam funções celulares.

Centenas de sistemas STR já foram mapeados no genoma humano e alguns deles investigados para utilização em testes de identificação humana, sendo que as tipagens de DNA forense hoje em dia estão padronizadas na utilização destes marcadores ^(10 -13). Em novembro de 1997 o FBI (*Federal Bureau of Investigation*) selecionou 13 marcadores STR para integrar o CODIS (*Combined DNA Index System*), a base de dados dos Estados Unidos contendo os perfis de criminosos condenados, sendo eles CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 e D21S11 ^(12, 14).

Entre os vários avanços nas tecnologias de tipagem por STR, o desenvolvimento de métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) com produtos analisados por

eletroforese capilar tem recebido grande popularidade. Sistemas de detecção multicores por fluorescência foram desenvolvidos para genotipagem multiplexada por STR usando soluções de polímeros enovelados, o que permite detecção confiável de alelos microvariantes ^(8, 10).

O número de alelos possíveis em cada *loci* varia de 7 a 13. A amplificação por PCR destes marcadores é possível com uma variedade de kits comerciais, o que tem simplificado o uso de STRs recentemente.

Devido à necessidade de consistência de bancos de dados nacionais e internacionais ^(10, 12), a tipagem por STR será, provavelmente, um meio primordial de análise forense de DNA nos próximos anos. Entre as vantagens sobre os métodos anteriormente utilizados encontra-se a possibilidade de obtenção de resultados a partir de amostras degradadas e quantidades extremamente pequenas de DNA ^(10, 12).

Uma ilustração de um sistema STR é apresentada na Figura 3.

Figura 3 – Representação de um sistema STR para um *loci* heterozigoto, com diferentes números de repetições entre os alelos.

1.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase foi concebida por Kary Müllis, em meados da década de 80, sendo que muitos métodos tradicionais de clonagem, seqüenciamento e análise de polimorfismos de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR ⁽¹⁵⁾.

PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima *DNA polimerase* ^(7, 15-17) e de *primers*, que são oligonucleotídeos iniciadores da reação e possuem seqüências complementares àquelas da fita molde de DNA. Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, pareamento e extensão. A reação se inicia pela elevação da temperatura da mistura para 92 – 95 °C, temperatura na qual as ligações de hidrogênio da dupla fita são rompidas e o DNA alvo é desnaturado. Na etapa de pareamento, a temperatura é reduzida para 35 - 60 °C, dependendo do tamanho e seqüência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada *primer* com as seqüências complementares que delimitam a região alvo. Em seguida a temperatura é elevada para 72 °C para que a enzima *DNA polimerase* realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*, o que envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo ^(7, 15). No primeiro estágio da PCR produtos longos são sintetizados a partir de cada fita de DNA. Quando um novo ciclo se inicia, os produtos longos atuam como moldes para a síntese de novo DNA, originando produtos curtos, cujos terminais 3' e 5' são estabelecidos pelas posições de pareamento dos *primers*. Nos ciclos subseqüentes, o número destes produtos curtos se acumula de forma exponencial, dobrando a cada ciclo, até que os reagentes da reação sejam consumidos ⁽⁷⁾. O esquema de uma PCR é apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Representação de uma PCR ⁽⁷⁾.

Nos experimentos iniciais de PCR utilizou-se a enzima *DNA polimerase* de *E. coli*, cuja temperatura ótima de polimerização é 37 °C, sendo destruída toda vez que a temperatura era elevada para 95 °C durante a desnaturação do molde. Atualmente a enzima utilizada, *Taq polimerase*, é de uma bactéria que vive em fontes térmicas (*Thermus aquaticus*) e polimeriza DNA a 72 °C ⁽¹⁵⁾.

Parâmetros a serem otimizados em uma reação de PCR incluem a quantidade de DNA molde, enzima, *primer*, nucleotídeos e MgCl₂, além da temperatura ideal de pareamento dos *primers* e número de ciclos ⁽¹⁷⁾.

A principal característica da PCR é sua habilidade de amplificar quantidades ínfimas de material de partida pelo menos um milhão de vezes, produzindo produto suficiente para ser analisado por técnicas não-radioativas. As seqüências de DNA ou RNA a serem amplificadas não necessitam ser extensivamente purificadas porque o uso de *primers* específicos restringe a atividade da polimerase à seqüência alvo ^(7, 16). A amplificação é rápida e de custo relativamente baixo.

Muitas aplicações da PCR têm sido descritas, tais como na biologia evolutiva e análise forense. Em genética humana existem aplicações em exames genéticos e detecção de mutações em certas circunstâncias ⁽¹⁶⁾.

O desenvolvimento de sistemas que possibilitam amplificar múltiplas regiões do DNA simultaneamente por meio da técnica de PCR, denominados PCR multiplex, aumentou a popularidade e o uso desta ferramenta, reduzindo o esforço e o tempo requerido para amplificação, além da utilização de menor quantidade de DNA molde. Cada *locus* é amplificado utilizando-se *primers* fluorescentemente marcados com diferentes cores, o que possibilita a detecção simultânea por fluorescência. Um esquema de uma PCR multiplex é apresentado na Figura 5 ⁽¹³⁾.

Figura 5 – Representação de um sistema PCR multiplex.

Para o sucesso destas reações o desenho do *primer* é de importância crucial, a fim de assegurar que um não interaja com o outro, e a otimização da reação pode consumir meses de experimento ⁽¹³⁾.

1.4. Testes de paternidade

O exame de DNA para fins de investigação de paternidade é considerado um dos maiores avanços do século XX na área forense. Nos casos em que a paternidade de uma criança está sendo investigada, testes de vínculo genético são utilizados para identificar marcadores genéticos presentes na criança, no sangue materno e no suposto pai. Vários métodos podem ser utilizados para que se proceda a análise do vínculo genético mediante o DNA, sendo que cada um destes métodos possui características particulares ⁽¹⁸⁾. O DNA de cada ser humano é único e diferente dos demais, com exceção de gêmeos univitelinos. Todo ser humano possui duas formas de cada gene, uma forma recebida de sua mãe e outra de seu pai. Embora a maioria dos genes seja essencialmente igual entre as pessoas, algumas seqüências específicas do DNA são extremamente variáveis entre indivíduos. O local onde uma destas seqüências hipervariáveis é encontrada no cromossomo é denominado *locus*. Cada um destes *loci* pode, portanto ter várias formas diferentes denominadas alelos. A análise de vários *loci* hipervariáveis permite individualizar o ser humano. O exame de

paternidade consiste em observar e comparar o DNA de vários destes *loci* hipervariáveis da criança e do suposto pai, além de confirmar com o da mãe ⁽¹⁸⁾.

O exame de DNA já se encontra padronizado em seus procedimentos técnicos (American Association of Blood Banks, 1990) ⁽¹⁹⁾ e se encontra validado pela justiça e plenamente aceito em vários países. De posse desta ferramenta de alta tecnologia e poder de resolução é possível a elucidação de casos complexos de investigação de paternidade, inclusive aqueles em que o suposto pai encontra-se falecido ou indisponível para o teste ⁽¹⁸⁾.

A diferença entre dois indivíduos pode ser determinada através do polimorfismo de regiões repetitivas do DNA, que diferem em tamanho (número de repetições) dentro de uma população. Essas regiões repetitivas polimorfas são os marcadores genéticos utilizados nos testes de paternidade. Entre pais e filhos existem semelhanças nessas regiões polimórficas, e, através da análise comparativa destas regiões do DNA de um indivíduo com a do suposto pai ou mãe é possível estabelecer o grau de vínculo genético ⁽²⁰⁾. Os marcadores mais utilizados para teste de DNA são minissatélites (VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*) e microsatélites (STR), sendo os mais usados os marcadores STR. Os VNTRs exibem uma enorme variabilidade e são constituídos de 9 a 100 pares de bases repetidos sequencialmente em *loci* cromossômicos, enquanto que os STR apresentam repetições com unidade básica de 2 a 7 pares de bases.

A caracterização pode ser feita de duas formas: por hibridação (marcadores VNTR) ou por PCR (marcadores STR). Os marcadores VNTR são analisados pela técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que diferencia os indivíduos pelo comprimento de seqüências VNTR gerados após a ação de uma enzima de restrição. O padrão de fragmentos é característico e herdado por indivíduos geneticamente relacionados. Desta forma, para um determinado *locus*, cada sonda hibridiza com dois segmentos de DNA, correspondentes aos alelos materno e paterno de cada indivíduo. Após identificação

pelas sondas, os alelos são visualizados por raios-X. Esta técnica produz um grande número de bandas, o que pode tornar confusa e difícil a interpretação dos resultados, apesar da grande confiabilidade. Esta metodologia foi empregada para análise de DNA em casos de paternidade por quase 10 anos, sendo pouco utilizada atualmente para este fim. Ela possui a desvantagem de necessidade de DNA íntegro e em grande quantidade (100-500 ng), tornando inviável a tipagem de amostras biológicas antigas, degradadas ou com pouca quantidade de DNA ⁽²¹⁾.

Por PCR utilizam-se *primers* que delimitam as regiões STR, amplificando-as. Dependendo do tamanho da região repetitiva, os fragmentos poderão ser maiores ou menores e poderão ser diferenciados em eletroforese de gel de agarose ou poliacrilamida, em que os fragmentos de DNA negativamente carregados migram por um gel em direção ao ânodo, percorrendo distâncias dependentes de seus tamanhos. A limitação dessa técnica por PCR está no tamanho da região repetitiva, que não pode ser muito grande para que a reação seja eficiente, o que torna necessário um número de regiões entre 12 e 15. No entanto, a identificação dos alelos é simples e a sensibilidade elevada, permitindo que o exame seja feito com quantidades mínimas de DNA genômico ⁽²¹⁾. A utilização da PCR tem permitido realização de testes de paternidade em situações antigamente impossíveis, a partir de ossos e cabelos exumados em casos do pai alegado ter falecido ⁽¹⁸⁾. O resultado de cada uma dessas regiões é dado por um padrão de duas faixas (bandas) representando os dois alelos daquele *locus* (já que o ser humano é diplóide). Um dos alelos do filho vem da mãe, o outro, vem do pai verdadeiro. Com a análise de várias regiões repetitivas, pode-se então obter um padrão (quase) individual, e incluir o pai com grande grau de certeza ou excluí-lo da paternidade do filho ⁽¹⁸⁾. A Figura 6 mostra uma ilustração de identificação de paternidade, no qual o suposto pai é o pai da criança.

Figura 6 - Esquema mostrando resultado de um teste de paternidade para um *locus*. Um alelo do filho vem da mãe (verde) e o outro (azul) tem que vir do pai biológico. Esse é um caso de inclusão no qual o suposto pai é o pai da criança, considerando esse *locus*.

A partir da caracterização dos alelos encontrados no filho, suposto pai e mãe, cálculos estatísticos são indispensáveis. Os resultados de inclusão ou exclusão de paternidade são baseados no índice de paternidade e na probabilidade de paternidade. O índice de paternidade reflete quantas vezes o suposto pai em questão compartilha alelos paternos com o filho em diferentes *loci* analisados. Quando as características do suposto pai são compatíveis com as do pai biológico, a probabilidade de ele ser o pai verdadeiro é superior a 99,99 %. Por outro lado, quando os alelos não são compartilhados entre filho e suposto pai, este é excluído 100 % da possibilidade de ser o pai verdadeiro.

Com o avanço da tecnologia de tipagem STR por meio da técnica de PCR processos automatizados foram desenvolvidos, acoplando-se a produção de *primers* fluorescentemente marcados com diferentes fluoróforos e sistemas de detecção a laser, com separação por eletroforese capilar⁽²¹⁾.

Sistema PowerPlex® 16

O sistema PowerPlex® 16, comercializado pela *Promega Corporation*, é um sistema comercial bastante utilizado para análises de DNA. Ele permite a detecção de 16 *loci* (15 STR e Amelogenina, para determinação de gênero) pela incorporação de 3 marcadores fluorescentes, além de um padrão de tamanho molecular, cobrindo uma faixa de 50 a 600 pares de bases (bp). O Sistema PowerPlex® 16 é um sistema STR multiplex para uso em tipagem de DNA, incluindo teste de paternidade, análises forense e teste de identidade humana ⁽²²⁾.

O sistema permite a amplificação e detecção dos 16 *loci*, sendo todos amplificados simultaneamente em um único tubo e analisados em uma única injeção. Os *loci* incluídos no Sistema PowerPlex® 16 foram selecionados por satisfazerem as necessidades das principais organizações mundiais, incluindo INTERPOL (*European Police Network*), ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*), GITAD (*Grupo Ibero Americano de Trabajo em Análisis de DNA*) e FBI (*United States Federal Bureau of Investigation*) ⁽²²⁾.

O sistema contém os *loci* Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Amelogenina, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 e D5S818. A Figura 7 apresenta os eletroferogramas obtidos pela amplificação de DNA com o sistema PowerPlex® 16 para os 16 *loci* padronizados para testes de identificação humana.

Figura 7 – Produtos da amplificação de DNA pelo Sistema PowerPlex® 16. (A) um *primer* específico para D3S1358, TH01, D21S11, D18S51 e Penta E é marcado com fluoresceína; (B) um *primer* específico para D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO e Penta D é marcado com 6-carbóxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetóxi-fluoresceína; (C) um *primer* específico para Amelogenina, vWA, D8S1179, TPOX e FGA é marcado com carboxi-tetrametilrodamina; (D) padrão de tamanho molecular. ⁽²²⁾

O Sistema PowerPlex® 16 é de uso específico com o Analisador Genético ABI PRISM® 310 e é compatível com o Analisador Genético ABI PRISM® 3100 e o Sequenciador de DNA 377 ⁽²²⁾, sistemas consistindo de arranjos de capilares. A necessidade da utilização dos *kits* incluídos no sistema, já consistindo do polímero de separação e de *primers* marcados fluorescentemente, além da exclusividade exigida com determinados analisadores e sequenciadores, torna o custo dessas análises elevado e, portanto, de difícil acesso a qualquer laboratório de pesquisa em biologia molecular. Além disso, o conteúdo completo dos *kits* nem sempre é conhecido. No entanto, a sua utilização é importante para melhorar a consistência de dados entre laboratórios e o tempo requerido para as análises normalmente é curto.

1.5. Eletroforese capilar

Por diversas décadas a eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose tem sido utilizada como uma das ferramentas mais importantes em qualquer laboratório de biologia molecular e bioquímica para análise de macromoléculas. Nos últimos 15 anos, a eletroforese capilar (CE) tem apresentado grandes vantagens com relação à técnica de eletroforese em gel, mas com prejuízos relacionados à análise simultânea de amostras. A fim de superar esta dificuldade, instrumentos de eletroforese capilar com arranjo de capilares têm sido avaliados e alguns deles estão comercialmente disponíveis, o que possibilita análises de DNA, por meio de equipamentos consistindo de 8, 16, 96 ou até 384 capilares ⁽⁸⁾. Dispositivos que permitem o preparo da amostra e todo o processo de análise em *microchips* também estão sendo desenvolvidos ^(23, 24).

Esta técnica analítica é usada para uma variedade de aplicações forenses, incluindo a análise de resíduos de explosivos e drogas, assim como tipagem de DNA ⁽¹²⁾, tendo seus resultados aceitos pelos tribunais da lei desde 1996 ⁽²⁵⁾. A CE tem se tornado cada vez mais popular para tipagem STR porque elimina a necessidade de géis, oferece possibilidade de automação nas etapas de injeção e detecção para análise de DNA, além de consumir uma pequena quantidade de amostra ⁽¹²⁾. Sistemas de eletroforese capilar têm desempenhado um importante papel nos projetos de seqüenciamento de genomas. Os equipamentos com arranjos de capilares mais utilizados atualmente para tipagem STR são os analisadores genéticos ABI 310 e ABI 3100, que possibilitam detecção por fluorescência multicor ⁽¹²⁾.

A eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos sob influência de um campo elétrico. A separação é normalmente conduzida em tubos de dimensões de 50 a 100 µm de diâmetro interno e 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito. O uso do capilar oferece muitas vantagens

sobre os outros meios utilizados para eletroforese, como placa de gel, devido às razões geométricas em que há uma elevada relação entre área superficial e volume interno. Devido a esta elevada relação área/volume, o capilar permite a dissipação eficiente do calor gerado pela corrente elétrica, possibilitando a aplicação de campos elétricos elevados (100 a 500 V cm⁻¹) resultando em separações de alta eficiência, alto poder de resolução e reduzidos tempos de análise. Outra vantagem é o baixo consumo de amostra, com volumes da ordem de 1 a 10 nL e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo ^(8, 26 -29).

1.5.1. Instrumentação e princípios da eletroforese capilar

Um instrumento de eletroforese capilar básico consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (geralmente de sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina) e um detector apropriado ^(26, 27, 30). A fonte de alta tensão é aplicada nos eletrodos de platina situados nos dois reservatórios contendo uma solução de um eletrólito conveniente ^(26, 27), gerando o fluxo eletrosmótico, que é o fluxo do tampão através do capilar devido às cargas presentes em sua parede interna ⁽³¹⁾. Tubos capilares de sílica fundida são preenchidos com a solução e servem como canal de migração. As extremidades do capilar são imersas nos reservatórios da solução para completar o contato elétrico. Para minimizar gradientes térmicos, o capilar deve ser mantido à temperatura constante. As amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos eletrocinéticos ou hidrodinâmicos, e volumes de poucos nanolitros são injetados. Na injeção eletrocinética, um campo elétrico é aplicado entre o capilar e o frasco contendo a amostra por um período de tempo determinado, fazendo com que os componentes da amostra migrem para dentro do capilar ^(26, 27, 32). A injeção hidrodinâmica pode ser feita por aplicação de pressão, em que o reservatório da amostra é pressurizado ou

aplicado vácuo no reservatório de destino, ou por sifonamento, também chamada injeção por gravidade, na qual o reservatório da amostra é elevado e esta entra no capilar por diferença de altura ^(30, 32). Injeções hidrodinâmicas não funcionam bem para capilares preenchidos com gel, sendo a eletrocinética preferida nesse caso ⁽³²⁾.

Em polaridade normal o eletrodo positivo, ou ânodo, está localizado no reservatório de entrada, e o eletrodo negativo, ou cátodo, no reservatório de saída do tampão, sendo que o fluxo eletrosmótico parte do ânodo em direção ao cátodo. Os eletrodos são invertidos para uso com polaridade reversa. A tensão aplicada nos eletrodos pode produzir, tipicamente, 30 kV ⁽³²⁾.

O detector localiza-se em um ponto do capilar próximo ao reservatório de saída ⁽³¹⁾. Os detectores utilizados nesta técnica são similares àqueles descritos para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Enquanto que em HPLC todas as espécies passam pelo detector de acordo com a velocidade da fase móvel delineando áreas de picos independentes dos tempos de retenção, em eletroforese capilar as bandas referentes aos analitos separados passam através do detector a diferentes velocidades. Isto ocorre porque cada íon migra a uma velocidade determinada pela sua mobilidade eletroforética resultando em áreas de picos que são dependentes do tempo de migração ^(26, 27). Atualmente a maioria dos estudos feitos por CE emprega detectores de absorção no UV-Visível, que permitem seleção do comprimento de onda na faixa entre 190 e 700 nm. Detectores de fluorescência e espectrometria de massas também são empregados, com vantagens de maior sensibilidade quando comparados aos de absorção. A Tabela 1 apresenta os métodos de detecção utilizados em CE e seus limites de detecção.

Tabela 1 – Métodos de detecção utilizados em eletroforese capilar ⁽³¹⁾.

Método	Limites de detecção típicos (mols)	Vantagens e desvantagens
Absorção UV-Vis	$10^{-13} - 10^{-16}$	Universal (exceto para substâncias sem grupos cromóforos). Arranjo de diodos oferece informação espectral.
Fluorescência	$10^{-15} - 10^{-17}$	Alta detectabilidade. Geralmente requer derivatização da amostra
Fluorescência Induzida a Laser	$10^{-18} - 10^{-20}$	Detectabilidade extremamente alta. Geralmente requer derivatização da amostra.
Amperometria	$10^{-18} - 10^{-19}$	Alta detectabilidade. Seletiva mas útil somente para analitos eletroativos. Requer eletrônica especial e modificação do capilar.
Condutividade	$10^{-15} - 10^{-16}$	Universal mas requer eletrônica especial e modificação do capilar
Espectrometria de massas	$10^{-16} - 10^{-17}$	Alta detectabilidade e oferece informação estrutural

Um esquema de um equipamento de eletroforese capilar é apresentado na Figura 8.

Figura 8 – Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.

A mobilidade de um íon dentro de um capilar pode ser descrita de acordo com sua relação carga/tamanho, de acordo com a Equação 1:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

na qual v é a velocidade do íon, E o campo elétrico aplicado, q é a carga do composto, η é a viscosidade do meio e r é o raio da partícula. Quanto maior esta razão, maior a mobilidade eletroforética e, para um dado campo elétrico aplicado e tampão, maior a velocidade. Moléculas pequenas, altamente carregadas, migram através do capilar mais rápido que moléculas grandes com uma carga menor. Moléculas neutras têm uma mobilidade eletroforética igual a zero ^(30, 32-34).

As mobilidades eletroforéticas determinadas experimentalmente são dependentes do pH e da composição do tampão. Quando um tampão é colocado dentro de um capilar, a superfície interna do capilar adquire carga negativa, o que acontece devido à ionização da superfície ou adsorção de íons do tampão. No caso da sílica fundida, os grupos silanóis (Si – OH) são ionizados e passam a ser grupos carregados negativamente (Si – O⁻) em pH acima de 3. Estes grupos carregados negativamente atraem cátions do tampão, que formam uma camada próxima à parede interna do capilar, denominada camada fixa. Estes cátions não são suficientes para neutralizar todas as cargas negativas, então uma segunda camada de cátions, mais externa, a camada móvel, é formada. Quando um campo elétrico é aplicado, a camada móvel de cátions é atraída em direção ao cátodo. Como estes cátions estão solvatados, eles carregam a solução tampão ocasionando o fluxo eletroosmótico (EOF), que é representado na Figura 9.

Figura 9 – Representação da migração de cátions, moléculas neutras e ânions em um capilar de sílica fundida. EOF indica o fluxo eletroosmótico.

Sob a influência do fluxo eletroosmótico, os cátions, os ânions e moléculas neutras vão migrar na mesma direção, podendo ser separados em uma única análise. Como a mobilidade eletroforética da maioria dos ânions é menor que o EOF, eles migram com velocidade menor que o EOF. Os cátions migram em direção ao cátodo mais rápido que o EOF e as moléculas neutras serão carregadas juntas com o EOF, sem serem separadas umas das outras^(30- 34). Dessa forma, a mobilidade aparente (μ_{ap}) do íon é definida como sendo a soma da mobilidade eletroforética (μ_e) e do fluxo eletroosmótico (μ_{eof}), de acordo com a Equação 2:

$$\mu_{ap} = \mu_e + \mu_{eof} \quad (2)$$

Em capilares de sílica fundida onde houve modificação da superfície interna, o EOF pode ser reduzido, invertido ou inibido. Os fatores que influenciam uma separação eletroforética são composição e força iônica do tampão, aditivos orgânicos, tensão elétrica, dimensões do capilar, temperatura e volume de amostra injetado^(30, 32-34).

1.5.2. Modos de separação em eletroforese capilar

Vários modos de separação, com mecanismos singulares e seletividade característica, são possíveis em eletroforese capilar: eletroforese capilar de zona (CZE) ou em solução livre (FSCE); focalização isoelétrica capilar (CIEF); isotacoforese capilar (CITP); cromatografia eletrocinética micelar (MEKC); eletrocromatografia capilar (CEC) e eletroforese capilar em gel (CGE) ou com soluções poliméricas.

Na eletroforese capilar de zona (CZE), as espécies iônicas migram dependentemente da sua própria mobilidade em solução livre. Nesta modalidade cátions e ânions podem ser separados simultaneamente, porém compostos neutros são eluídos sem separação ^(26, 27, 33-35).

Na focalização isoelétrica capilar (CIEF), a coluna é preenchida com uma mistura de tampões anfólitos e a amostra. Durante a eletroforese, um gradiente de pH é estabelecido entre o cátodo e o ânodo e toda substância migra para seu ponto isoelétrico (pI) – apropriado para substâncias anfóteras como proteínas e peptídeos. Uma vez focalizadas, as bandas são mobilizadas para a detecção ^(26, 27, 33-35).

Na isotacoforese capilar (CITP), todas as bandas são separadas de acordo com sua mobilidade eletroforética, mas a separação é levada a uma mesma velocidade com a formação de uma sequência de bandas consecutivas ^(26, 27, 33-35).

A cromatografia eletrocinética micelar (MECK) e eletrocromatografia capilar (CEC) são métodos que estão baseados na partição diferenciada, sendo usados para separação de moléculas neutras, que se particionam entre a fase estacionária orgânica e a fase móvel aquosa ^(26, 27, 33-35).

Eletroforese capilar em gel (CGE) ou com soluções poliméricas

A eletroforese capilar em gel (CGE) é utilizada exclusivamente para separação de macromoléculas, tais como oligonucleotídeos, fragmentos de DNA e proteínas de alta massa molecular, devido à mobilidade eletroforética destas espécies permanecer constante em solução mesmo com o aumento da massa molecular, ou seja, a razão carga/tamanho não varia ^(26, 27, 33-35). Por esta razão, um meio de separação é necessário para a separação eletroforética por tamanho molecular.

A CGE teve início com a aplicação da eletroforese capilar nas separações de DNA por tamanho molecular ao utilizar colunas capilares preenchidas com gel, denominados géis químicos. Um gel químico consiste de um capilar tratado com um reagente funcionalizante que estabiliza o gel junto à parede do capilar através de ligações covalentes ⁽³⁰⁾. Embora a alta eficiência dos géis químicos tenha sido provada nas separações de DNA, alguns problemas associados com a rotina de preparação e o uso destes capilares foram detectados, tornando a automação deste método difícil. Dentre estes problemas estão o aparecimento de bolhas com conseqüente perda de condutividade, a introdução limitada de amostra, a retenção excessiva de moléculas de DNA com alto peso molecular e a degradação do gel por hidrólise. Tais problemas conduziram à busca de sistemas que possibilitassem sua substituição, e que foram denominados géis físicos ⁽³⁰⁾.

Géis físicos são soluções de matrizes poliméricas hidrofílicas, dissolvidas em um tampão apropriado, que não são ligados à parede do capilar, podendo assim, ser substituídos a cada separação, o que permite a reutilização de um mesmo capilar centenas de vezes sem perda de eficiência. As soluções poliméricas possibilitam ainda, a separação de moléculas de DNA por um mecanismo semelhante ao dos géis químicos. A uma dada concentração de polímero, conhecida como *entanglement threshold* (limiar de enovelamento), as fitas

poliméricas individuais começam a interagir umas com as outras, formando uma estrutura em rede dentro do capilar, possibilitando que a separação dos fragmentos de DNA ocorra. Quando a concentração do polímero atinge o ponto em que o tamanho do poro aproxima-se do tamanho de um fragmento de DNA individual, uma boa eficiência na separação pode ser alcançada. Assim, a concentração polimérica ótima depende do tamanho de DNA a ser separado ⁽³⁰⁾.

No mecanismo de separação por tamanho, os solutos direcionados pelo campo elétrico migram através da matriz polimérica e são separados de acordo com seus tamanhos hidrodinâmicos ^(26, 27, 33, 34, 36). Moléculas pequenas passam através dos poros sem nenhum impedimento. Já moléculas grandes podem percorrer caminhos tortuosos, movendo-se através dos poros de modo a sofrerem maior impedimento, e, portanto um caminho de separação mais longo ^(31, 37-39).

Matrizes poliméricas para separação de DNA

O desenvolvimento de matrizes de separação de DNA permanece um importante desafio, visto que as propriedades dos polímeros ditam diretamente a resolução da separação e o comportamento da migração das moléculas de DNA ⁽⁴⁰⁻⁴²⁾. Diferentes polímeros têm sido estudados, incluindo poliacrilamida ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾, polióxido de etileno (PEO) ⁽⁴⁶⁾, celulose e seus derivados ⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾ e poliaálcool de vinila e seus copolímeros ⁽⁵¹⁾.

Pesquisas utilizam principalmente poliacrilamida e seus derivados, uma vez que propiciam o seqüenciamento de DNA com alta eficiência ⁽⁵²⁾, existindo relatos de seqüenciamento de 1000 bases em menos de uma hora com soluções de poliacrilamida linear (LPA), sendo que, para uma dada massa molecular alta de LPA, soluções com concentrações mais altas melhoraram a resolução de fragmentos menores que 450 bases,

enquanto concentrações mais baixas apresentaram melhor resolução para fragmentos maiores que 450 bases ⁽⁴³⁾. Song *et al.* (2001) sintetizaram copolímeros de acrilamida (AM) e N,N-dimetilacrilamida (DMA), encontrando maior eficiência de separação na razão 3:1 P(AM-co-DMA) ⁽⁴⁴⁾. Em 2005 uma matriz consistindo do polímero poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) e pequenas moléculas do aditivo manitol foi utilizada para separação de dsDNA, mostrando aumento na resolução com aumento da concentração de manitol, sendo as melhores condições de separação e velocidade obtidas para 6% de manitol e 1,5% de PNIPAM ⁽⁴⁵⁾.

Fung e Yeung (1995) utilizaram misturas de PEO com diferentes massas moleculares, encontrando que menores massas moleculares provocam aumento na eficiência para fragmentos de DNA menores, enquanto altas massas moleculares favorecem os fragmentos maiores. Este polímero tem sido extensivamente estudado devido às suas propriedades de auto-recobrimento por adsorção na parede do capilar ⁽⁴⁶⁾.

Caruso *et al.* (2003) demonstraram elevada resolução em separações multiplexadas de fragmentos de dsDNA com a utilização de dois corantes intercaladores em solução de 1% hidroxietilcelulose de massa molecular 140-160 kDa ⁽⁵⁰⁾.

Importantes propriedades na escolha do polímero para aplicações em eletroforese capilar são: viscosidade, habilidade de recobrimento da parede para diminuir o fluxo eletroosmótico e, conseqüentemente, as interações DNA-parede, poder de resolução e velocidade de separação. O poder de resolução reflete a capacidade do polímero em fornecer longos comprimentos de leitura, o que é altamente desejável para os projetos de seqüenciamento de genomas. A viscosidade deve ser baixa, para permitir o bombeamento para dentro do capilar e sua substituição utilizando um sistema pressurizado robusto e prático ⁽⁵²⁾.

Mecanismos de migração de DNA em matrizes poliméricas

O mecanismo de separação de DNA em matrizes poliméricas tem sido descrito como o mesmo de eletroforese tradicional em gel, pelos modelos de Ogston e de reptação. No modelo de Ogston assume-se que uma molécula migra como uma partícula esférica rígida por uma rede de fitas linear e infinitamente longa, e se difunde lateralmente até encontrar um poro grande o suficiente para permitir sua passagem. Desse modo, moléculas menores migram mais rápido pela matriz, já que têm acesso a um número maior de poros. Este modelo prevê uma dependência linear do logaritmo natural da mobilidade eletroforética com a concentração da matriz para pequenos fragmentos de DNA e a baixos campos elétricos ^(53, 54), de acordo com a Equação 3:

$$\ln \mu = \ln \mu_0 - K_r c \quad (3)$$

onde μ_0 é a mobilidade em solução livre, K_r é o coeficiente de retardamento (proporcional ao raio da molécula e ao raio da fibra do gel) e c é a concentração do gel.

No entanto, de acordo com Ogston, moléculas grandes não penetrariam na matriz e não se movimentariam. Dessa forma, este modelo é inválido para moléculas de DNA maiores ⁽⁵⁵⁾.

Outro modelo, o modelo de reptação, assume que moléculas grandes de DNA migram pela matriz como uma fita longa, em forma de uma “serpente”, pelos poros da rede polimérica ⁽⁵⁴⁾. De acordo com este modelo a mobilidade das moléculas de DNA é inversamente proporcional ao seu tamanho (número de pares de base) em baixos campos elétricos, de forma que

$$\mu \approx N^{-1} \quad (4)$$

onde N é o tamanho da molécula dado em pares de bases ou número de bases.

No entanto, sob campos elétricos elevados, um modelo de reptação modificado é considerado, denominado reptação com orientação. Este modelo prevê que em altos campos elétricos as cadeias de DNA se orientam na direção do campo, adquirindo uma conformação alongada, não mais seguindo caminhos tortuosos pelo gel ⁽⁵⁴⁾. Desse modo, quando a magnitude do campo elétrico, ou o tamanho da molécula de DNA, aumentam, a mobilidade do DNA não mais depende de seu tamanho, o que causa perda de resolução ^(30, 37, 39, 54). Dessa forma, a mobilidade depende do campo elétrico, e é representada por

$$\mu \approx K(N^{-1} + bE^2) \quad (5)$$

onde K é uma constante e b é função do tamanho do poro do gel.

A Figura 10 apresenta os diferentes modelos de migração de DNA em matrizes poliméricas.

Figura 10 – Modelos de migração de DNA em matrizes poliméricas sob um campo elétrico constante. A) modelo de Ogston; B) modelo de reptação; C) modelo de reptação com orientação.

Métodos de detecção de DNA e intercaladores

A detecção da separação dsDNA é tipicamente feita por espectrofotometria UV a 260 nm, embora a detecção por fluorescência com corantes também seja bastante empregada^(56 -60). Vários métodos de detecção foram propostos por diversos pesquisadores. Mathies e colaboradores propuseram métodos que exploraram tanto o uso de intercaladores fluorescentes monoméricos e diméricos, como o uso de *primers* fluorescentes com transferência de energia (*primers* ET)^(61, 62).

O termo intercalador foi primeiramente usado por Lerman para definir uma molécula contendo uma estrutura aromática planar que se insere entre dois pares de base de DNA dupla fita⁽⁶³⁾. Teoricamente, a estrutura dupla hélice saturada com o intercalador deveria ter uma estequiometria de uma molécula de intercalador por par de base, que é o que ocorre com intercaladores monoméricos. No entanto estudos determinaram que alguns poderiam se intercalar entre dois pares de base, originando os bis-intercaladores, que possuem dois sistemas de anéis⁽⁶³⁾.

O fenômeno da intercalação aumenta a separação dos pares de bases adjacentes e a distorção sofrida pela hélice é compensada pelo ajuste do nucleosídeo e pela distorção da fita dupla. As interações aromáticas entre as bases e as moléculas intercaladoras são melhor estabilizadas de acordo com o caráter dos complexos formados. A maioria dos monointercaladores e bis-intercaladores possuem um ou mais cromóforos planares e um nucleosídeo. Nestas estruturas o cromóforo intercala-se de forma invertida na fita de DNA formando um ângulo reto com o eixo dos pares de bases adjacentes e o nucleosídeo ocupa a menor porção da hélice distorcida. Assim, nas análises com intercaladores monoméricos e diméricos, os fragmentos de DNA são complexados com estes a fim de produzir fluorescência. A dependência das separações com relação ao tipo de intercalador usado, a

razão DNA:corante e a concentração de DNA permitem a definição das condições que resultam em alta resolução, reprodutibilidade e alta sensibilidade na separação por CE ^(58, 61, 62).

A Tabela 2 apresenta os corantes intercaladores diméricos comercialmente disponíveis pela Molecular Probes/Invitrogen ⁽⁶⁴⁾, assim como seus comprimentos de onda máximos de absorção.

Tabela 2– Dados dos corantes intercaladores diméricos para ácidos nucleicos ⁽⁶⁴⁾.

Corante	λ Absorção (nm)	λ Emissão (nm)	MM (g mol ⁻¹)
POPO-1	434	456	1171
BOBO-1	462	481	1203
YOYO-1	491	509	1271
TOTO-1	514	533	1303
JOJO-1	529	545	1273
POPO-3	534	570	1223
LOLO-1	565	579	1463
BOBO-3	570	602	1255
YOYO-3	612	631	1323
TOTO-3	642	660	1355

Estes corantes são dímeros simétricos de corantes cianídicos e caracterizam-se por possuírem altas absortividades molares, com coeficientes de extinção molar geralmente maiores que 50000 cm⁻¹ mol L⁻¹ na faixa visível, grande afinidade por ácidos nucleicos e aumento na fluorescência de aproximadamente 1000 vezes quando ligados a estes (praticamente não são fluorescentes na ausência de ácidos nucleicos) ⁽⁶⁴⁾. A Figura 11 apresenta os espectros de fluorescência dos corantes listados.

Figura 11 – Espectros de emissão dos corantes intercaladores diméricos para ácidos nucléicos ⁽⁶⁴⁾.

Estes corantes apresentam reações simples entre ácidos nucléicos, e apesar de cada um possuir máximos de emissão e excitação distintos, alguns deles apresentam sobreposição espectral. No entanto, análises multiplexadas de complexos DNA-corantes podem ser resolvidas por meio de programas de desconvolução espectral.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo desenvolver um método para testes de paternidade utilizando-se a reação em cadeia da polimerase de regiões microssatélites (STR), e análise dos dados por eletroforese em dois sistemas miniaturizados, sendo um deles projetado no próprio laboratório.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento de um método para extração e amplificação de DNA por PCR utilizando diferentes pares de *primers* referentes a sete regiões (*loci*) padronizadas para testes de paternidade;
- Separação dos produtos de PCR por eletroforese capilar em *microchip* para comparação dos padrões de separação obtidos para pai, mãe e filho;
- Validação do método proposto a partir de amostras reais fornecidas por um laboratório especializado em testes de paternidade;
- Estabelecimento das condições de separação do marcador de tamanho de DNA dupla fita (dsDNA) com 25 pares de bases intercalado a corantes diméricos por eletroforese capilar com soluções poliméricas utilizando-se hidroxietilcelulose como matriz de separação, em um equipamento *lab-made* miniaturizado;
- Aplicação das condições de análise estabelecidas por eletroforese capilar em solução polimérica de hidroxietilcelulose à separação de produtos de PCR.

3. Materiais

e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e preparo das soluções

Os reagentes utilizados para preparo das soluções na extração de DNA foram: Tris-HCl (Sigma), HCl (J. T. Baker), EDTA (Mallinckrodt), NaCl (Mallinckrodt), SDS (Mallinckrodt), fenol (Invitrogen), clorofórmio (Mallinckrodt), álcool isoamílico (J. T. Baker), etanol (J. T. Baker) e acetato de sódio (J. T. Baker), sendo o tampão de lise preparado com tris-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 8, EDTA 10 mmol L⁻¹, NaCl 0,1 mol L⁻¹, SDS 2%.

Para a eletroforese em gel utilizou-se agarose (Gibco BRL) em tampão tris-acetato-EDTA 1 × (TAE), diluído a partir de TAE 25 × (121 g tris, 28,5 mL ácido acético e 18,6 g EDTA), em pH 8.

A solução tampão utilizada em eletroforese capilar, NPe₄-TAPS 50 mmol L⁻¹ foi preparada a partir de brometo de tetrapentil amônio (NPe₄Br) (Fluka), passado em resina de troca aniônica Amberjet 4400 OH (Sigma) previamente condicionada com NaOH (Mallinckrodt) 1 mol L⁻¹. Após a troca de Br⁻ por OH⁻ adicionou-se TAPS (Sigma) 50 mmol L⁻¹ e EDTA 2 mmol L⁻¹. O pH foi ajustado para 8,3 com HCl 0,1 mol L⁻¹ e a solução filtrada em filtro de porosidade 0,20 µm (Corning). A matriz polimérica utilizada para separação dos padrões de tamanho molecular de 25 bp (Invitrogen) foi hidroxietilcelulose 90-105 kDa (Fluka) dissolvida em NPe₄-TAPS 50 mmol L⁻¹, nas concentrações 1,5% e 2,0%.

Para eletroforese em *microchip* utilizou-se os reagentes contidos no kit DNA 1000 *LabChip*[®] (Agilent Technologies).

3.2. Coleta e preparo das amostras

As amostras utilizadas para extração de DNA foram coletadas de células bucais, a partir de saliva, uma fonte potencialmente útil de DNA genômico para estudos genéticos e que pode ser coletada de maneira não invasiva e indolor⁽⁶⁵⁾. Antes da obtenção da amostra, a boca de cada indivíduo foi lavada com água filtrada durante aproximadamente 10 segundos e a água descartada. Após aproximadamente 5 min a saliva acumulada na boca⁽⁶⁶⁾ foi coletada em tubos estéreis, que foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a etapa de extração.

3.3. Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método orgânico empregando fenol-clorofórmio, de acordo com o protocolo Walsh *et al.*^(66, 67) com algumas modificações, que apesar de levar um período de tempo relativamente longo produz bons resultados. Pipetou-se duas alíquotas de 200 μL de saliva de um mesmo indivíduo para tubos estéreis de 1,5 mL e centrifugou-se a $10000 \times g$, por 2 min, em centrífuga para micro tubos Labnet modelo Force 7 (National Labnet Company.), descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se ao *pellet* 700 μL de tampão de lise, 35 μL de proteinase K 20 mg mL^{-1} e incubou-se a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, em agitador com controle de temperatura Thermomixer Compact (Eppendorf), por aproximadamente 10 horas. Após o tempo de incubação adicionou-se um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 v/v), agitou-se levemente e centrifugou-se a $12000 \times g$ por 10 min e a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, em centrífuga refrigerada modelo 5415 R (Eppendorf). A fase superior, contendo o DNA, foi transferida para um novo tubo e um volume igual de etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 80 μL de tampão acetato de sódio 3 mol L^{-1} , pH 5,96 foram

adicionados para precipitar o DNA, e os tubos armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 5 horas. Após centrifugação a $12000 \times g$ por 8 min e a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante foi descartado e 50 μL de água grau biologia molecular (Milli-Q – Millipore[®]) foram adicionados. Repetiu-se a etapa de adição de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50 μL), centrifugação a $12000 \times g$ por 10 min, transferência da fase superior para um novo tubo e adição de etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e tampão acetato de sódio 3 mol L^{-1} . As amostras foram novamente incubadas por 5 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e após centrifugação a $12000 \times g$ por 8 min e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, o etanol foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e novamente centrifugado a $12000 \times g$ por 10 min e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O etanol foi descartado e o *pellet* seco em centrífuga a vácuo Centrivap Concentrator (Labconco), a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. O *pellet* foi então ressuspensionado em 80 μL de água grau biologia molecular (Milli-Q – Millipore[®]) estéril e quantificado em espectrofotômetro.

3.4. Quantificação espectrofotométrica

A quantificação do DNA extraído foi feita em um espectrofotômetro UV-Vis modelo U-2800 (Hitachi). Para estimar a quantidade do DNA foi utilizado o padrão de que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50 μg de DNA por mL de solução ⁽⁶⁸⁾, e medidas de absorbância em 260 nm, de acordo com a Equação 6:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/mL}) = A_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{fator de diluição} \quad (6)$$

O grau de purificação da amostra com relação à contaminação por proteínas foi obtido pelo cálculo da relação entre as absorvâncias em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), sendo valores ideais entre 1,8 e 2,1.

3.5. Amplificação do DNA por PCR

Os *primers* utilizados foram sintetizados pela Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda, de acordo com as seqüências encontradas na literatura ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. Os *primers* utilizados foram os correspondentes aos *loci* D21S11, Penta E, D18S51, TH01, CSF1PO, D7S820 e D13S317, e suas seqüências estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Características dos *loci* utilizados: sequência do *primer*, acesso ao *GenBank*, sequência de repetição e tamanho dos alelos observados ^(12, 69-71)

<i>Locus</i>	Sequência do <i>primer</i>	Acesso ao <i>GenBank</i>	Sequência de Repetição	Tamanho dos alelos (bp)
D21S11	A:ATATGTGAGTCAATTCCCCAAG B:TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG	M84567	(TCTA) _n (TCTG) _n [(TCTA)3TA(TCTA)3 TCA(TCTA)2TCCATA] (TCTA) _n - complexo	214-240
Penta E	A:GATCAAGACCAGCCTGGGCA B:TGGGTTATTAATTGAGAAAACCTTACAATTT	AC027004	AAAGA	260- 300
D18S51	A:CAAACCCGACTACCAGCAAC B:GAGCCATGTTTCATGCCACTG	L18333	(AGAA) _n	274-318
TH01	A:GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT B:GTGATTCCCATTTGGCCTGTTTCCTC	D00269	(AATG) _n	154-178
CSF1PO	A:AACCTGAGTCTGCCAAGGACTAGC B:TTCCACACACCACTGGCCATCTTC	X14720	(AGAT) _n	299-323
D7S820	A:TGTCATAGTTTGAACGAACTAACG B:CTGAGGTATCAAAAACCTCAGAGG	G08616	(GATA) _n	198-222
D13S317	A:GTTGCTGGACATGGTATCACAG B:TCAGAGAGCTTGAATTGTTGGT	AF25087	(GATA) _n	245-261

As reações foram feitas em um volume final de 20 µL, utilizando-se aproximadamente 80 ng de DNA em tampão 1 × (Invitrogen), MgCl₂ 2 mmol L⁻¹ (Invitrogen), dNTP 10 mmol L⁻¹ (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), *primer* 1 µmol L⁻¹, e água Milli-Q autoclavada para completar o

volume. As seguintes condições de amplificação foram usadas em um termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (Eppendorf): 95 °C por 10 min, 94 °C por 1 min, temperatura de pareamento otimizada para cada *primer* por 1 min, 72 °C por 1 min, durante 34 ciclos, com extensão final a 72 °C por 30 min. A concentração final de *primer* na reação variou entre 0,1 e 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2 – 10 pmol).

As amostras foram analisadas em eletroforese em gel de agarose para certificar-se de que as amplificações tiveram sucesso e avaliar a otimização das condições. Os produtos de amplificação utilizando as condições ótimas de reação foram analisados por eletroforese capilar.

3.6. Métodos eletroforéticos

3.6.1. Eletroforese em gel de agarose

O sucesso das reações de amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose, que foi feita em uma cuba eletroforética Gibco BRL Modelo 5.14, utilizando-se as seguintes condições: concentração do gel de 2,0% em tampão TAE 1 $\times$ a pH 8,3, que também foi utilizado como eletrólito de corrida, e tensão aplicada de 80 V. O gel foi fundido em microondas, adicionado de 1,5 μL de brometo de etídio 5 mg mL^{-1} para visualização em luz UV, e vertido sobre a placa de acrílico do sistema, já disposto de um espaçador para formação das canaletas. Após solidificação do gel, o tampão de corrida foi adicionado e o espaçador retirado. Em cada canaleta foram colocados 10 μL de cada produto de PCR com 2 μL de solução *loading buffer* (10 mmol L^{-1} de tris-HCl, 10 mmol L^{-1} de EDTA, 65% (m/v) de glicerol e 0,3% de azul de bromofenol). Padrões de tamanho de 25

ou 50 bp (Invitrogen), apresentados na Figura 12, foram utilizados em todas as corridas para verificação do tamanho dos produtos das reações.

Figura 12 – Padrão de tamanho de 50 bp e 25 bp (Invitrogen) em gel de agarose 2% e 3%, respectivamente, corados com brometo de etídio.

Os géis foram visualizados em transiluminador UV-Vis 20 Macrovue (Hoefer) e as imagens capturadas por uma câmera Kodak DC290, conectada ao computador, no Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, do Instituto de Física de São Carlos.

3.6.2. Eletroforese em *microchip*

Os produtos de PCR resultantes das condições otimizadas foram analisados em um equipamento de eletroforese em *microchip*, Bionalyzer 2100 (Agilent Technologies). Este sistema incorpora a tecnologia de eletroforese capilar em gel dentro de um *chip*

(*LabChip*®). O *Lab-Chip* utiliza um simples dispositivo de 3 cm² que possui microcanais para o preenchimento direto de amostras de DNA. Com este equipamento amostras de ácidos nucleicos são separadas e analisadas por eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida a laser. Cada *chip* possui 16 poços conectados por um arranjo de microcanais, que são preenchidos com a mistura de gel e corante intercalador. Doze dos dezesseis poços são utilizados para amostras e um para o marcador de tamanho ^(72, 73).

As análises foram feitas utilizando-se o kit DNA 1000 *LabChip*®, cujo padrão de tamanho varia de 15 a 1500 bp, e seguindo-se detalhadamente o protocolo de manipulação e preparo do *chip* fornecido pelo fabricante. Os microcanais foram preenchidos pela aplicação de 9 µL do gel de separação com o intercalador fluorescente nos poços apropriados e aplicação de pressão. Os poços de amostra e marcador foram preenchidos com 5 µL do marcador de corrida e 1 µL de cada amostra ou do padrão de tamanho de 1000 bp. O *chip* foi agitado e colocado dentro do equipamento para análise. Cálculos foram feitos utilizando-se o *software* Agilent Biosizing® versão A.02.12 ⁽⁷²⁾, que fornece o tamanho de cada fragmento separado, além de sua quantificação, com base no marcador com fragmentos de tamanhos conhecidos, adicionado a cada poço. Uma foto do *chip* é apresentada na Figura 13.

Figura 13 – Foto do *chip* utilizado pelo equipamento Bioanalyzer 2100 e os canais de separação ⁽⁷³⁾.

Para verificar a repetibilidade dos resultados obtidos para tamanho de cada fragmento entre diferentes poços do *chip* utilizou-se o padrão de tamanho de 25 bp (Invitrogen).

3.6.3. Eletroforese capilar em equipamento com arranjo de capilares

Validação do método para testes de paternidade

Dois casos de paternidade foram analisados e comparados com resultados fornecidos por um laboratório de São Carlos especializado em testes de paternidade, DNA Consult. As amostras foram analisadas em equipamento comercial específico para esta finalidade,

MegaBACE[®] (GE Healthcare) um sistema de análise de DNA baseado em eletroforese capilar com detecção por fluorescência, utilizando a tecnologia de kits comercialmente disponíveis para PCR, o Sistema PowerPlex 16[®].

O equipamento possui 48 capilares com 75 µm de diâmetro interno e 40 cm de comprimento efetivo, reunidos em arranjos de 16, e apresenta aplicação em seqüenciamento e genotipagem por seleção dos filtros de detecção. Possui as funções de reposição automática de matriz, injeção eletrocinética da amostra, separação de DNA e análise de dados, fornecendo o tamanho de cada fragmento e o alelo correspondente ⁽⁷⁴⁾.

A plataforma MegaBACE[®] utiliza laser confocal para focar cada fragmento fluorescente dentro de cada capilar, o que otimiza a excitação dos cromóforos e detecção da fluorescência, enquanto elimina difração e dispersão da luz. A excitação dos cromóforos é feita em 488 nm no modo de seqüenciamento e 488 e 532 nm no modo de genotipagem, sendo a detecção feita em quatro canais ⁽⁷⁴⁾.

As condições de eletroforese foram feitas como indicado pelo fabricante do equipamento, e os dados tratados pelo *software* MegaBACE Genetic Profiler[®], que fornece o tamanho dos fragmentos em pares de base, por meio da utilização de um padrão interno com fragmentos de tamanhos conhecidos, e o alelo correspondente.

Amplificações do DNA controle K562 (Promega) foram feitas com cada *primer* seguindo-se o protocolo de PCR otimizado, para verificação da qualidade de separação dos fragmentos de interesse no equipamento Bioanalyzer 2100, e comparação de tamanho dos fragmentos obtidos.

Fragmentos de diferentes tamanhos foram produzidos pelas duas metodologias, visto que a seqüência dos *primers* utilizados pelo sistema PowerPlex 16[®] não são as mesmas utilizadas neste trabalho.

Parâmetros estatísticos de índice de paternidade, índice de paternidade acumulado e probabilidade de paternidade foram calculados de acordo com as relações apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Relações para cálculo de índice de paternidade. Tabela modificada da AABB⁽¹⁹⁾.

Genótipo da Mãe	Genótipo do Filho	Genótipo do Suposto Pai	Índice de Paternidade
AA	AA	AA	1/a
AB	AA	AA	1/a
BB	AB	AA	1/a
BC	AB	AA	1/a
AA	AA	AB	0,5/a
AB	AA	AB	0,5/a
AC	AA	AB	0,5/a
BB	AB	AB	0,5/a
BC	AB	AB	0,5/a
BB	AB	AC	0,5/a
BC	AB	AC	0,5/a
BD	AB	AC	0,5/a
AB	AB	AA	1/(a+b)
AB	AB	AB	1/(a+b)
AB	AB	AC	0,5/(a+b)

A, B, C e D: alelos

a: frequência do alelo A

b: frequência do alelo B

A probabilidade de paternidade é expressa pela Equação 7:

$$PP = \frac{IPA}{IPA + 1} \quad (7)$$

na qual PP = probabilidade de paternidade e IPA = índice de paternidade acumulado, expresso de acordo com a Equação 8:

$$IPA = IP_1 \times IP_2 \times IP_3 \times \dots \times IP_n \quad (8)$$

em que IP_x são os índices de paternidade calculados para cada alelo.

3.6.4. Eletroforese capilar acoplado a detector com arranjo de diodos

Testes iniciais para estabelecimento das condições de separação de padrões de tamanho de 25 pares de bases foram feitos em um equipamento de eletroforese capilar comercial modelo HP3DCE (Agilent Technologies) acoplado a um detector com arranjo de diodos. Este tipo de detector possibilita a detecção simultânea de analitos em diferentes comprimentos de onda. As condições utilizadas foram:

- capilar de sílica fundida recoberto internamente com polivinilálcool (PVA), com 75 μm de diâmetro interno, 39 cm de comprimento total e 31 cm de comprimento efetivo;
- polaridade negativa e injeção eletrocinética a 300 V cm^{-1} , durante 10 segundos;
- monitoramento a 260 nm;
- temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$;

- tampão NPe₄-TAPS 50 mmol L⁻¹, pH 8,3;
- matriz polimérica hidroxietilcelulose 90-105 kDa (HEC) nas concentrações 1,5% e 2,0%, dissolvida no tampão de corrida;
- tensão aplicada durante corrida de – 11,7 kV, gerando um campo elétrico de 300 V cm⁻¹.

O condicionamento do capilar foi feito lavando-o com água Milli-Q durante 30 min e com a solução tampão por mais 30 min antes da primeira corrida diária. As soluções poliméricas foram introduzidas no capilar por uma seringa de 50 µL (Hamilton) conectada ao capilar por meio de um tubo de teflon de 350 µm de diâmetro interno (Sigma). Um pré-condicionamento foi feito antes de cada corrida para equilibrar eletroforéticamente o capilar, durante 15 min, antes da injeção da amostra.

Os parâmetros campo elétrico, temperatura, tempo de injeção e tampão de separação, assim como a etapa de condicionamento do capilar, não foram analisados em diferentes condições visto que já haviam sido otimizados por Caruso (2001)⁽⁷⁵⁾, em um trabalho de separação de DNA dupla-fita por eletroforese capilar neste equipamento.

Amostras de 100 µL de produtos de PCR foram purificadas com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) para retirar excesso de *primers* e dímeros formados na reação, prejudiciais à detecção dos picos de interesse, e concentradas para melhor detecção. Após a PCR, 100 µL de cada amostra foram analisados em gel de agarose, e a banda de interesse recortada e purificada de acordo com o protocolo do *kit*. As amostras foram analisadas seguindo-se as condições já descritas para o padrão de tamanho de 25 bp.

Para verificar as condições que proporcionariam intercalação do padrão de 25 bp utilizou-se o corante YOYO-1. As concentrações finais nas reações foram de 200 ng de DNA 25 bp e 0,1 mmol L⁻¹ do corante. Após a adição de DNA ao intercalador a mistura foi agitada e mantida ao abrigo da luz por aproximadamente 1 h, a fim de garantir a eficiência

do processo de intercalação. O comprimento de onda utilizado para monitorar a separação com YOYO-1 foi 490 nm, valor este correspondente ao máximo de absorção do corante em estudo.

A resolução da separação de fragmentos de 125 a 350 bp foi calculada para o padrão de 25 bp sem intercalador nas duas concentrações de HEC utilizadas, e para o padrão de 25 bp intercalado a YOYO-1.

3.6.5. Eletroforese capilar em equipamento *lab-made* com detecção espectrofotométrica na região visível

As condições otimizadas para a separação do padrão de 25 bp no equipamento HP3DCE foram utilizadas para a separação de complexos DNA-corante intercalador em um equipamento de eletroforese capilar *lab-made* miniaturizado, que utiliza um detector de dispositivo de carga acoplada (CCD) linear com espectrofotometria na região visível (Ocean Optics). Este equipamento é dotado de uma célula de detecção *on-column* conectada por fibra óptica com a radiação visível fornecida por uma mini-fonte de tungstênio (Ocean Optics) com 2 W de potência para excitação e com um mini-espectrofotômetro, instalado no computador, para a detecção. O sistema de aquisição de dados permite a visualização do espectro na região visível do composto que passa pela detector. Após a separação eletroforética, uma matriz (tempo, absorbância e comprimento de onda) é gerada para cada aquisição no tempo, permitindo a visualização do eletroferograma e dos espectros relativos a cada pico. Programas de filtragem do sinal, quantificação de amostras e tratamento de dados (desconvolução espectral) foram desenvolvidos (ou estão em desenvolvimento) por outros alunos do grupo.

O ajuste da intensidade de luz proveniente da fonte foi feito empregando-se um filtro de densidade óptica variável (Edmund Optics). Faz parte do sistema uma fonte de alta tensão (Spellman) e a eletrônica de controle. Uma foto do equipamento é apresentada na Figura 14.

Figura 14 – Foto do equipamento de eletroforese capilar *lab-made* com detecção espectrofotométrica visível. (1) CCD linear; (2) célula de detecção; (3) fibra óptica; (4) mini-fonte de tungstênio; (5) *software* para aquisição de dados; (6) controle da fonte de alta tensão; (7) fonte de alta tensão; (8) capilar; (9) reservatórios de tampão.

Este equipamento foi testado como uma alternativa de custo mais baixo quando comparado aos comerciais para separação de DNA, objetivando análises de complexos de DNA com diferentes corantes intercaladores diméricos para testes de paternidade por meio de análises multiplexadas.

Antes de qualquer reação de intercalação DNA-corante, os espectros de absorção de cada um dos corantes intercaladores diméricos listados na Tabela 1 foram obtidos no equipamento *lab-made*, aspirando-se as soluções com uma seringa de 50 μL (Hamilton) conectada ao capilar por meio de um tubo de teflon de 350 μm de diâmetro interno (Sigma).

O corante utilizado para testes iniciais foi YOYO-3, visto que seu comprimento de onda máximo de absorção localiza-se em uma região livre de ruídos da lâmpada. Para a reação utilizou-se 200 ng de DNA 25 bp e 0,1 mmol L⁻¹ do corante. As condições utilizadas para separação foram:

- capilar de sílica fundida recoberto internamente com polivinilálcool (PVA), com 75 µm de diâmetro interno, 26 cm de comprimento total e 19 cm de comprimento efetivo;
- polaridade negativa e injeção eletrocínética a 300 V cm⁻¹, durante 12 segundos;
- monitoramento na faixa de 580 - 600 nm;
- tampão NPe₄-TAPS 50 mmol L⁻¹, pH 8,3;
- matriz polimérica HEC 90-105 kDa (HEC) 2,0%;
- tensão aplicada durante corrida de -7,8 kV, gerando um campo elétrico de 300 V cm⁻¹.

O equipamento não possui controle de temperatura, mas a temperatura ambiente foi mantida ao redor de 23 °C.

O condicionamento do capilar foi feito com água Milli-Q e com a solução tampão antes da primeira corrida diária. As soluções poliméricas foram introduzidas no capilar por uma seringa de 50 µL (Hamilton) conectada ao capilar por meio de um tubo de teflon de 350 µm de diâmetro interno (Sigma). Um pré-condicionamento foi feito antes de cada corrida para equilibrar eletroforéticamente o capilar, durante 15 min, antes da injeção da amostra.

A resolução da separação de fragmentos de 125 a 350 bp do padrão de 25 bp intercalado a YOYO-3 foi calculada.

4. Resultados

e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração e quantificação do DNA

O método de extração fenol-clorofórmio possibilitou a obtenção de DNA de alta pureza, com valores de relação 260/280 entre 1,3 e 2,0, apesar da mudança de algumas condições estabelecidas no protocolo original, tais como tempos de incubação, que foram reduzidos. A extração do DNA de cada indivíduo foi feita em duplicata, e a concentração de DNA obtida foi calculada com base na absorbância da amostra a 260 nm e do valor de DO igual a 50 µg de DNA por mL de solução.

4.2. Eletroforese em gel de agarose

4.2.1. Otimização das condições de PCR

Temperatura de desnaturação

Condições típicas para desnaturação são 95 °C por 30 s ou 97 °C por 15 s ⁽¹⁷⁾. As condições utilizadas de 94 °C por 1 min foram baseadas na literatura e proporcionaram bons resultados.

Temperatura de pareamento

A temperatura de pareamento depende da composição de bases, tamanho e concentração dos *primers*, apresentando-se geralmente entre 55 e 72 °C, e ao redor da T_m , temperatura na qual metade da fita de DNA está desnaturada.

A temperatura de pareamento para cada par de *primers* foi estabelecida de acordo com os valores de T_m especificados pelo fabricante. Esta temperatura está relacionada com a quantidade de bases guanina e citosina presentes nos *primers*. Quatro temperaturas ao redor destes valores foram estudadas, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – T_m e temperaturas estudadas para cada par de *primers*

<i>Primer</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>Temperatura média (°C)</i>	<i>Temperaturas estudadas (°C)</i>
D21S11 A	52,0	49,0	50,0; 50,3; 51,4; 53,2
D21S11 B	46,0		
Penta E A	59,4	60,1	58,1; 60,8; 63,5; 66,0
Penta E B	60,8		
D18S51 A	54,3	55,2	53,2; 55,5; 58,1; 60,8
D18S51 B	56,0		
TH01 A	62,2	62,8	58,1; 60,8; 63,5; 66,0
TH01 B	63,4		
CSF1PO A	58,9	61,3	55,5; 58,1; 60,8; 63,5
CSF1PO B	63,7		
D7S820 A	51,7	51,5	50,3; 51,4; 53,2; 55,5
D7S820 B	51,4		
D13S317 A	54,1	53,5	50,3; 51,4; 53,2; 55,5
D13S317 B	52,9		

A Figura 15 apresenta os géis de eletroforese obtidos pela separação dos produtos de PCR para cada par de *primers* nas temperaturas indicadas na Tabela 5.

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose 2%. (A) Canaletas: 1 - 53,2 °C; 2 - 51,4 °C; 3 - 50,3 °C; 4 - 50,0 °C, respectivamente, do *primer* D21S11; 5 - padrão de 25 bp; 6 - 55,5 °C, 7 - 53,2 °C, 8 - 51,4 °C; 9 - 50,3 °C, respectivamente, do *primer* D13S317. (B) Canaletas: 1 - 55,5 °C; 2 - 63,5 °C, respectivamente, do *primer* CSF1PO; 3 - padrão de 25 bp; 4 - 50,3 °C; 5 - 51,4 °C; 6 - 53,2 °C; 7 - 55,5 °C, respectivamente, do *primer* D7S820. (C) Canaletas: 1 - 58,1 °C; 2 - 60,8 °C; 3 - 63,5 °C; 4 - 66,0 °C, respectivamente, do *primer* Penta E; 5 - padrão de 25 bp; 6 - 58,1 °C; 7 - 60,8 °C; 8 - 63,5 °C; 9 - 66,0 °C, respectivamente, do *primer* TH01. (D) 1 - 53,2 °C; 2 - 55,5 °C; 3 - 58,1 °C; 4 - 60,8 °C, respectivamente, do *primer* D18S51; 5 - padrão de 25 bp. Tampão TAE 1 ×; V= 80 V.

Para o *primer* CSF1PO são apresentadas apenas duas temperaturas. As setas vermelhas indicam os produtos de PCR em cada uma das diferentes temperaturas, e as setas azuis indicam o excesso de *primers* ou dímeros formados por excesso destes, visto que altas concentrações foram utilizadas nas reações para garantir a amplificação do DNA. A formação de dímeros pôde ser observada em temperaturas mais baixas para os *primers* D21S11 e D18S51. Todas as temperaturas utilizadas proporcionaram a amplificação do DNA para todos os *primers*. Desta forma, a temperatura escolhida foi aquela na qual houve menor formação de dímeros ou melhor visualização das bandas. Para o *primer* CSF1PO a temperatura de 55,5 °C propiciou a separação em duas bandas, fato não observado na temperatura maior. Com exceção deste caso, apenas para o *primer* Penta E foi observada a separação em duas bandas, típicas de produtos de amplificação destes *loci* STR para indivíduos heterozigotos, sendo uma delas herdada da mãe e outra do pai. As temperaturas escolhidas e utilizadas são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Temperaturas de pareamento utilizadas para amplificação de DNA por PCR.

Primer	Temperatura de pareamento (°C)
D21S11	53,2
Penta E	60,8
D18S51	58,1
TH01	60,8
CSF1PO	55,5
D7S820	53,2
D13S317	51,4

A comparação da separação do padrão de 25 bp com os produtos de PCR indica que os tamanhos dos produtos gerados encontram-se dentro do valor esperado, como encontrado na literatura.

Quantidade de DNA

Quantidades típicas de DNA em PCR variam entre 5 e 100 ng. Quantidades de DNA de 80 ng apresentaram bandas intensas, de fácil visualização nos géis de agarose e nas análises posteriores, sendo, desta forma, escolhidas para as reações de PCR.

Concentração de primers

Concentrações típicas de *primers* em PCR variam entre 0,1 e 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Altas concentrações de *primers* podem causar acúmulo de produtos não específicos e aumentar a probabilidade de formação de dímeros, que competem por enzima, dNTP e *primers* com o produto desejado, resultando em baixo rendimento ⁽¹⁷⁾.

A concentração final de *primers* nas reações foi variada entre 0,1 – 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mantendo-se as outras variáveis como indicado na parte experimental. A Figura 16 ilustra os resultados obtidos.

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 2%. **(A)** Canaletas: **1** - padrão de 50 bp; **2, 3, 4** - concentrações de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* D21S11; **5, 6, 7** - concentrações de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* Penta E; **8, 9, 10** - concentrações de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* D18S51; **11, 12, 13** - concentrações de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* TH01. **(B)** Canaletas: **1, 2, 3** - concentrações de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* CSF1PO; **4** - padrão de 25 bp; **5, 6, 7** - concentrações de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* D7S820; **8, 9, 10** - concentrações de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, do *primer* D13S317. Tampão TAE $1 \times$; $V = 80 \text{ V}$.

Como pode ser observado, a concentração de *primers* de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ permitiu a amplificação dos fragmentos de todos os *loci* em estudo. Portanto esta foi a concentração escolhida para dar continuidade ao trabalho, já que minimiza o gasto com reagentes, além do fato de que altas concentrações de *primers* geram dímeros e excessos que não são consumidos na reação, interferindo nas análises por eletroforese capilar.

Concentração de dNTPs

Concentrações típicas de dNTPs em PCR variam entre 20 e $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo que os quatro dNTPs devem ser usados em concentrações equivalentes para evitar erros de incorporação. As concentrações mais baixas minimizam a incorporação errônea em sítios não específicos ⁽¹⁷⁾.

Concentrações finais de dNTPs utilizadas nas reações foram $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. Visto que ambas produziram bons resultados, optou-se pela quantidade que minimiza o gasto com reagentes, de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.3. Eletroforese em *microchip*

A repetibilidade na atribuição de tamanho aos fragmentos do marcador de tamanho de 25 bp foi avaliada pela aplicação do padrão em diferentes poços de um *chip*. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para cada poço, assim como o valor esperado para o tamanho de cada fragmento.

Tabela 7 – Repetibilidade de tamanho dos fragmentos do padrão de 25 bp em três diferentes poços de um *chip*, para fragmentos de 50 a 350 bp, e valores esperados.

Valor esperado (bp)	Poço			Média	% CV *	Diferença do esperado (%)
	4	8	12			
50	52	52	49	51	3,4	2,0
75	79	79	75	78	3,0	3,5
100	104	104	98	102	3,4	2,0
125	131	129	122	127	3,7	1,9
150	155	153	144	151	3,9	0,4
175	182	180	168	177	4,3	0,9
200	208	206	193	202	4,0	1,2
225	235	232	218	228	4,0	1,5
250	260	257	242	253	3,8	1,2
275	286	283	266	278	3,9	1,2
300	311	307	289	302	3,9	0,8
325	338	334	313	328	4,1	1,0
350	364	360	339	354	3,8	1,2

* % CV = coeficiente de variação

A Tabela 7 mostra que o coeficiente de variação entre replicatas de três poços do mesmo *chip* para o padrão de tamanho de 25 bp apresentou-se entre 3 e 4,1%, e a diferença entre o valor esperado e o valor médio obtido entre 0,4 e 3,5%. Pelos resultados apresentados pode ser observado que para os fragmentos de maior tamanho, os valores em pares de base diminuem dos primeiros para os últimos poços, fato bastante acentuado no poço 12, o último a ser analisado no *chip*. No entanto, para uma extensa avaliação do desempenho dos vários *chips* mais experimentos devem ser feitos. Este erro de 4% no tamanho não é tão significativo ao avaliar os fragmentos de 50 bp, mas torna-se significativo à medida que o tamanho do fragmento aumenta.

As amostras dos produtos de PCR gerados pelos sete *primers* e pelo DNA controle K562 com as condições otimizadas foram analisadas por eletroforese em *microchip*, no equipamento Bioanalyzer 2100, o qual foi utilizado para a comparação das bandas de suposto pai, mãe e filho em três casos de paternidade. Os resultados obtidos em pares de base foram comparados com aqueles fornecidos pelo laboratório DNA Consult para cada um dos casos.

A Tabela 8 apresenta o tamanho dos fragmentos, em pares de base, atribuído pelo *software* do Bioanalyzer, e o tamanho dos fragmentos e número de alelos atribuídos pelo *software* do MegaBACE, para o DNA controle K562.

Tabela 8 – Resultados das PCR obtidos para o DNA controle K562 no equipamento Bioanalyzer 2100 e MegaBACE.

Locus	Bioanalyzer 2100	MegaBACE	
	Pares de base (bp)	Pares de base (bp)	Alelo
D21S11	240	224	29
	244	228	30
	248	232	31
Penta E	256	382	5
	292	428	14
D18S51	285	314	15
	297	318	16
TH01	179	181	9,3
CSF1PO	318	334	9
		338	10
D7S820	219	230	9
	228	238	11
D13S317	256	181	8

Os tamanhos dos fragmentos atribuídos nos dois equipamentos são diferentes, o que se deve a diferença na sequência dos *primers* utilizados para as reações de amplificação, como descrito anteriormente. No entanto, os tamanhos obtidos encontram-se dentro da faixa indicada na literatura da qual as sequências dos *primers* foram retiradas, assim como o número do alelo atribuído pelo *software* do MegaBACE corresponde ao número do alelo indicado na literatura. Desta forma, essa correspondência foi feita para os casos de paternidade analisados.

Para o *loci* CSF1PO pode-se observar que o Bioanalyzer 2100 apresentou apenas um pico, enquanto o MegaBACE apresentou dois, o que deve-se ao fato de a resolução do primeiro ser de 5 bp ⁽⁷³⁾, ou seja, dificilmente são separados em linha de base fragmentos diferindo por apenas um alelo, que no caso destas regiões seria de 4 bp, visto que são classificadas em tetranucleotídeos (com exceção de Penta E).

As Figuras 17, 18, 19 e 20 apresentam os eletroferogramas produzidos para cada um dos indivíduos com os diferentes *primers*, no equipamento Bionalzyzer 2100 para um dos casos (caso 2731).

Figura 17 – Eletroferograma dos produtos de PCR obtidos por amplificação do *locus* D21S11 para suposto pai, filho e mãe, em um caso de paternidade, com ampliação dos picos de interesse.

Figura 18 - Eletroferogramas dos produtos de PCR obtidos por amplificação dos *loci* Penta E e D18S51, respectivamente, para suposto pai, filho e mãe, em um caso de paternidade, com ampliação dos picos de interesse.

Figura 19 - Eletroferogramas dos produtos de PCR obtidos por amplificação dos *loci* TH01 e CSF1PO para suposto pai, filho e mãe, em um caso de paternidade, com ampliação dos picos de interesse.

Figura 20 - Eletroferogramas dos produtos de PCR obtidos por amplificação dos *loci* D7S820 e D13S317 para suposto pai, filho e mãe, em um caso de paternidade, com ampliação dos picos de interesse.

Indivíduos homozigotos para um determinado *locus* apresentam apenas um pico, enquanto que indivíduos heterozigotos apresentam dois picos. Para fins qualitativos, ao suposto pai é atribuída a paternidade do filho quando um dos picos (fragmentos de PCR contendo as unidades repetitivas de cada alelo) gerados no padrão do filho, para determinado *locus*, é coincidente com o dele. O outro pico, no caso de um indivíduo heterozigoto, obrigatoriamente provém da mãe. Este fato pode ser perfeitamente visualizado para os *loci* correspondentes aos *primers* Penta E, TH01, CSF1PO e D7S820. No entanto, a confirmação da paternidade é suportada em cálculos estatísticos, que são baseados nas frequências alélicas populacionais, como indicado na Tabela 4.

As Tabelas 9, 10 e 11 apresentam os resultados para os três casos de paternidade investigados. São apresentados os valores em pares de bases obtidos para cada indivíduo nos diferentes equipamentos, assim como o número do alelo correspondente atribuído pelo equipamento MegaBACE, para as amostras fornecidas e genotipadas no laboratório DNA Consult (casos 2731 e 2732). Todas as amostras analisadas no Bioanalyzer 2100 foram feitas em triplicata, e os valores apresentados nas tabelas correspondem à média entre elas.

Tabela 9 – Resultados das amostras de paternidade para o caso DNA Consult 2731 no Bioanalyzer 2100 (pares de base - bp) e MegaBACE (pares de base e alelos).

<i>Locus</i>	Bioanalyzer 2100			MegaBACE					
	S P (bp)	F (bp)	M (bp)	S P (bp)	S P (alelo)	F (bp)	F (alelo)	M (bp)	M (alelo)
D21S11	238 241	238 241	240 243	221 225	28 29	221 225	28 29	225 228	29 30
Penta E	272 288	288 296	270 297	398 418	8 12	418 428	12 14	393 428	7 14
D18S51	283	284	285	308 312	13 14	312	14 14	312 316	14 15
TH01	164 178	163 177	162 171	166 182	6 9,3	166 182	6 9,3	166 174	6 8
CSF1PO	316 324	315 324	316	338 346	10 12	338 346	10 12	338	10
D7S820	218 236	222 235	222	231 247	9 13	235 247	10 13	235	10
D13S317	270	268	267 274	198	12	198	12 12	170 198	12 14

SP = suposto pai, F = filho, M = mãe. Os valores em azul e vermelho indicam coincidências entre filho com, respectivamente, suposto pai e mãe.

Para os *loci* D21S11, Penta E, TH01, CSF1PO e D7S820 o filho é heterozigoto, ficando evidente que um alelo possui origem paterna (representado em azul) e outro materna (representado em vermelho). No entanto, para os *loci* D18S51 e D13S317 o filho é homozigoto, apresentando apenas um alelo, que pode ser de origem materna e/ou paterna. Desta forma nada pode-se afirmar com relação à paternidade pela análise dessas duas regiões. Este é um dos motivos pelos quais várias regiões devem ser analisadas nos testes de paternidade com marcadores STR, gerando um volume de dados capazes de serem tratados com confiabilidade por meio de parâmetros estatísticos.

Tabela 10 - Resultados das amostras de paternidade para o caso DNA Consult 2732 no Bioanalyzer 2100 (pares de base - bp) e MegaBACE (pares de base e alelos).

<i>Locus</i>	Bioanalyzer 2100			MegaBACE					
	S P (bp)	F (bp)	M (bp)	S P (bp)	S P (alelo)	F (bp)	F (alelo)	M (bp)	M (alelo)
D21S11	240	244	242	225		229	30	225	29
	261	261		242	33,2	242	33,2	228	30
Penta E	258	258		383	5	383	5	428	14
	267	293	296	393	7	428	14	433	15
D18S51	273			304	12	328	18	328	18
	291	292	293	328	18	340	21	340	21
		302	302						
TH01	166	166	165	166	6	166	6	166	6
				170	7	170	7	170	7
CSF1PO	317	317		338	10	338	10	342	11
	326	325	323	346	12	346	12	346	12
D7S820	222	222	222	231	9	231	9	231	9
	234	226	226	243	12	235	10	235	10
D13S317	270	273	273	194	11	198	12	198	12
	273			198	12		12		

SP = suposto pai, F = filho, M = mãe. Os valores em azul e vermelho indicam coincidências entre filho com, respectivamente, suposto pai e mãe.

Neste caso, com exceção do *locus* D13S317, todos os indivíduos são heterozigotos, sendo possível atribuir os alelos paternos (representados em azul) e maternos (representados em vermelho) em cada uma das outras regiões analisadas.

Tabela 11 – Resultados das amostras de paternidade para o caso J no Bioanalyzer 2100 (pares de base - bp).

<i>Locus</i>	S P (bp)	F (bp)	M (bp)
D21S11	245 257	240	240 243
Penta E	267 287	264 294	294
D18S51	279 289	278 288	281 287
TH01	167	167	167
CSF1PO	327	328	325
D7S820	220 225	221 225	225 233
D13S317	266 270	270	269

SP = suposto pai, F = filho, M = mãe. Os valores em azul e vermelho indicam coincidências entre filho com, respectivamente, suposto pai e mãe. Os valores em azul e vermelho indicam coincidências entre filho com, respectivamente, suposto pai e mãe.

Neste caso apenas a correspondência entre pares de base foi possível entre o filho com suposto pai e mãe, visto que as amostras foram analisadas apenas no Bioanalyzer 2100.

Como para o controle K562, pode-se observar em todos os casos regiões em que o Bioanalyzer 2100 apresentou apenas um pico, enquanto o MegaBACE apresentou dois, sugerindo erroneamente que o indivíduo seria homozigoto. Esse fato deve-se à resolução do primeiro ser de 5 bp ⁽⁷³⁾, ou seja, dificilmente são separados em linha de base fragmentos diferindo por apenas um alelo, que no caso destas regiões seria de 4 bp, visto que são classificadas em tetranucleotídeos. Por este motivo, nenhuma atribuição de alelos foi feita para o caso J por comparação com os números obtidos para o DNA controle K562, pois, erroneamente, um indivíduo heterozigoto poderia ser considerado homozigoto, o que teria

grande influência sobre os cálculos de índices de paternidade. O resultado para o *loci* D21S11 poderia ser um indicativo deste erro, já que se constatou coincidência do filho apenas com a mãe, mas não com o suposto pai.

Os coeficientes de correlação para as triplicatas de todas as amostras apresentaram-se entre 0 – 1,2 %, indicando desvio menor que o encontrado para o padrão de 25 bp. No entanto, considerando os fragmentos de maior tamanho (ao redor de 325 bp) este valor sugere erros de 4 bp, indicando que o Bioanalyzer, apesar de eficiente para várias aplicações, tais como quantificação de DNA, RNA e proteínas, em um equipamento portátil e análises rápidas, não apresenta a precisão necessária para testes de genotipagem quando se trabalha, nestas mesmas condições, com regiões STR tetranucleotídicas.

Como pode ser observado, os tamanhos dos fragmentos produzidos pelos dois laboratórios são diferentes, o que se deve a diferença na sequência dos *primers* utilizados para as reações de amplificação, como descrito anteriormente. No entanto, o número de unidades repetitivas em cada *locus*, que é correspondente ao número do alelo, coincide em ambas plataformas.

A partir da atribuição dos respectivos alelos, calcularam-se os índices de paternidade, índices de paternidade acumulados e probabilidades de paternidade. Os resultados para os casos 2731 e 2732 são apresentados nas Tabelas 12 e 13. Para o caso J não foram feitos cálculos, visto que os alelos não foram atribuídos.

Tabela 12 – Índice de paternidade e índice de paternidade acumulado para cada *loci* para o caso DNA Consult 2731.

<i>Loci</i> analisados	Alelos da mãe		Alelos do filho		Alelos do suposto pai		Índice de paternidade	Índice de paternidade acumulado
D21S11	29	30	28	29	28	29	2,30415	
Penta E	7	14	12	14	8	12	2,45098	5,64743
D18S51	14	15	14	14	13	14	3,54610	20,02633
TH01	6	8	6	9,3	6	9,3	1,93798	38,81071
CSF1PO	10	10	10	12	10	12	1,53374	59,52561
D7S820	10	10	10	13	9	13	23,8095	1417,27610
D13S317	12	14	12	12	12	12	3,64964	5172,54750

Tabela 13 – Índice de paternidade e índice de paternidade acumulado para cada *loci* para o caso DNA Consult 2732.

<i>Loci</i> analisados	Alelos da mãe		Alelos do filho		Alelos do suposto pai		Índice de paternidade	Índice de paternidade acumulado
D21S11	29	30	30	33,2	29	33,2	15,15152	
Penta E	14	15	5	14	5	7	7,81250	118,37121
D18S51	18	21	18	21	12	18	6,09756	721,77555
TH01	6	7	6	7	6	7	2,33645	1686,39170
CSF1PO	11	12	10	12	10	12	1,90114	3206,06770
D7S820	9	10	9	10	9	12	2,61097	8370,93370
D13S317	12	12	12	12	11	12	1,82482	15275,43000

A probabilidade de paternidade foi calculada para cada caso, sendo que os supostos pais foram incluídos da paternidade com 99,981 % e 99,993 %, respectivamente, para os casos 2731 e 2731, considerando estes sete *loci*. No entanto, este número de regiões não é

estatisticamente significativo, visto que pelo menos 13 regiões devem ser analisadas para que um teste de paternidade seja legalmente válido.

A partir dos resultados obtidos, e da necessidade de um sistema de alta resolução e reprodutibilidade, separações de um padrão de tamanho de DNA de 25 pb foram otimizadas em um equipamento de eletroforese comercial, e posteriormente utilizadas em um equipamento miniaturizado desenvolvido no laboratório, com detecção espectrofotométrica na região visível, visando análises multiplexadas de DNA complexado a diferentes corantes intercaladores diméricos.

4.4. Eletroforese capilar acoplada a detector com arranjo de diodos

4.4.1. Otimização das condições de separação de DNA

O estabelecimento das condições de separação de padrões de tamanho de 25 pb foi feito em um equipamento de eletroforese capilar comercial modelo HP3DCE (Agilent Technologies) dotado de um detector com arranjo de diodos, de acordo com as condições descritas na parte experimental.

A matriz de separação estudada foi HEC, nas concentrações 1,5% e 2,0%. Os eletroferogramas com a separação dos fragmentos do marcador de tamanho molecular de 25 pb, nas duas concentrações de HEC são apresentados na Figura 21. A Figura 22 apresenta o gráfico de pares de base *versus* tempo de migração para os fragmentos do padrão de tamanho 25 pb.

Figura 21 - Eletroferogramas dos fragmentos de DNA do marcador de tamanho de 25 pb em hidroxietilcelulose (A) 1,5% e (B) 2,0%. Condições de separação: tampão NPe₄-TAPS 50 mmol L⁻¹ pH 8,3; 300 V cm⁻¹; capilar de sílica fundida de 75 µm d. i. recoberto com PVA de 39 cm de comprimento total e 31 cm de comprimento efetivo; detecção UV a 260 nm; injeção eletrocinética a -11,7 kV durante 10 s.

Figura 22 - Gráfico de pares de base *versus* tempo de migração para os fragmentos do padrão de tamanho 25 pb nas concentrações de HEC 1,5% (▲) e 2,0% (■).

De acordo com a literatura, quanto maior a concentração da matriz de separação, menores são os poros produzidos, e maior o tempo de migração dos fragmentos por meio destes. Além disso, o aumento da concentração da matriz possibilita melhor separação para fragmentos de menor tamanho, como os do padrão utilizado. A concentração da matriz de 2,0% permitiu a visualização de todos os fragmentos produzidos pela separação do padrão de 25 pb, enquanto que na concentração de 1,5% foi possível detectar apenas alguns deles. Praticamente não ocorre distinção entre regimes de migração no padrão de tamanho de 25 pb, visto que o maior fragmento é de 400 pb. Uma ligeira curvatura pode ser observada a partir de 300 pb, em HEC 2,0%, indicando o início do mecanismo de migração por reptação^(53, 54).

Para confirmar os resultados obtidos visualmente, a Tabela 14 apresenta a resolução calculada à largura da base dos picos para a separação do padrão de 25 pb em HEC 1,5 e 2,0%, para os fragmentos de 125 a 350 pb, faixa de interesse para análise de amostras de PCR referentes às regiões estudadas para testes de paternidade.

Tabela 14 – Resolução à largura da base dos picos referentes aos fragmentos do marcador de tamanho de 25 pb.

<i>Picos (pb)</i>	<i>Res *</i> <i>HEC 1,5%</i>	<i>Res (pb)**</i> <i>HEC 1,5%</i>	<i>Res *</i> <i>HEC 2%</i>	<i>Res (pb)**</i> <i>HEC 2%</i>
125 / 150	3,02	4,0	2,6	4,6
150 / 175	2,16	5,5	3,44	3,5
175 / 200	1,65	7,3	3,12	3,8
200 / 225	1,57	7,7	2,88	4,2
225 / 250	1,31	9,2	2,24	5,4
250 / 275	1,27	9,4	1,96	6,1
275 / 300	1,38	8,6	1,87	6,4
300 / 325	-	-	1,88	6,4
325 / 350	-	-	1,59	7,5

* $Res = (2 \Delta t_m) / (W_n + W_{n+1})$, em que Δt_m é a diferença entre os tempos de migração dos picos adjacentes; W_n W_{n+1} são as larguras da base, em unidades de tempo, dos picos adjacentes.

** $Res(pb) = (4 \Delta_{pb}) / (W_n + W_{n+1})$, em que Δ_{pb} é a diferença, em pares de base, entre picos adjacentes; W_n W_{n+1} são as larguras da base, em pares de base, dos picos adjacentes.

Os resultados visualizados nos eletroferogramas podem ser confirmados pelos valores calculados de resolução, que foram maiores para HEC 2,0%. Portanto, a concentração de HEC que permitiu a melhor separação dos fragmentos de DNA do padrão de tamanho de 25 pb, que cobre a faixa de interesse de 125 – 350 pb, foi 2,0%. Pelos resultados de resolução em pares de base, observa-se que com HEC 2,0% obteve-se um valor médio de 5 pb, resultado semelhante ao do Bioanalyzer 2100. No entanto, este resultado pode ser melhorado pelo aumento da concentração de HEC, já que uma maior concentração da matriz polimérica induz à melhor resolução da separação de fragmentos

menores, como os do padrão utilizado. O mesmo não pode ser feito no Bioanalyzer, o qual oferece um pacote fechado de condições de operação.

Com o objetivo de verificar as condições a serem utilizadas posteriormente no equipamento de eletroforese capilar *lab-made* com detecção espectrofotométrica na região visível, o padrão de 25 pb foi intercalado ao corante YOYO-1, utilizando-se a concentração de HEC 2,0% para separação eletroforética. O eletroferograma obtido após 1 h de intercalação é apresentado na Figura 23.

Figura 23 – Eletroferograma dos fragmentos do complexo DNA – YOYO-1 para o marcador de tamanho 25 pb em HEC 2,0%. Condições de análise foram as mesmas da Figura 21, com exceção da detecção, feita em 490 nm.

Para verificar o efeito da intercalação sobre a resolução da separação, a Tabela 15 apresenta os valores de resolução calculados através da largura à meia altura dos picos, referentes ao marcador de tamanho de 25 pb sem intercalação e intercalado com YOYO-1.

Tabela 15 – Resolução à meia altura dos picos e em pares de base referentes aos fragmentos do marcador de tamanho de 25 pb sem intercalador e intercalado a YOYO-1.

<i>Picos (pb)</i>	<i>Res_{h/2}***</i> <i>25 pb</i>	<i>Res (pb)**</i> <i>25 pb</i>	<i>Res_{h/2}***</i> <i>25 pb + YOYO-1</i>	<i>Res (pb)**</i> <i>25 pb + YOYO-1</i>
125 / 150	4,6	4,6	2,0	2,8
150 / 175	7,6	3,5	2,2	3,6
175 / 200	7,25	3,8	2,3	3,7
200 / 225	4,6	4,2	2,4	3,6
225 / 250	4,6	5,4	2,1	3,7
250 / 275	4,6	6,1	1,9	4,0
275 / 300	4,6	6,4	1,9	5,1
300 / 325	4,1	6,4	1,9	5,6
325 / 350	3,5	7,5	1,7	5,4

*** $Res = (2 \Delta t_m 0,58) / (W_{nh/2} + W_{(n+1)h/2})$, em que Δt_m é a diferença entre os tempos de migração dos picos adjacentes; $W_{nh/2}$ e $W_{(n+1)h/2}$ são as larguras à meia altura, em unidades de tempo, dos picos adjacentes.

** $Res(pb) = (4 \Delta_{pb}) / (W_n + W_{n+1})$, em que Δ_{pb} é a diferença, em pares de base, entre picos adjacentes; W_n e W_{n+1} são as larguras da base, em pares de base, dos picos adjacentes.

Como relatado por Caruso (2001)⁽⁷⁵⁾, o efeito da diminuição da resolução quando o DNA está complexado a um corante intercalador pode ser verificado com o cálculo da resolução à meia altura dos picos, já que existe um alargamento na base dos picos mesmo sem a presença do corante. No entanto, este efeito é menos pronunciado que relatado pela autora quando utilizou o tampão de separação tris-TAPS-EDTA (TTE), o que se deve ao fato de que complexos DNA – corante são mais estáveis em soluções tampão contendo cátions maiores, os quais são pobres competidores dos sítios catiônicos ocupados pelas moléculas de corante⁽⁷⁵⁾. Desta forma, o tampão utilizado neste trabalho (e estudado por

ela) NPe₄-TAPS, diminui este efeito, visto que é constituído por uma amina quaternária de grande volume iônico.

Apesar da diminuição da resolução observada na separação de DNA intercalado a YOYO-1, as mesmas condições aplicadas à separação de DNA sem intercalador podem ser utilizadas sem prejuízo das análises. Além disso, a resolução em pares de base melhorou com a utilização do intercalador, apesar do alargamento dos picos. No entanto, para se obter a resolução desejada à separação de regiões STR tetranucleotídicas, uma resolução de pelo menos 4 pb deve ser atingida, o que pode ser feito com o aumento da concentração da matriz polimérica, como citado anteriormente.

A Figura 24 apresenta os eletroferogramas de duas amostras de produtos de amplificação por PCR, não intercaladas a corantes diméricos. O produto de 298 pb corresponde à amplificação da região variável do 16S rRNA de bactérias *Alicyclobacillus acidoterrestris*, e produto de 190 pb à amplificação por *primers* da região interna do produto de 298 bp, em um estudo para detectar a presença destas em amostras de sucos de laranja pasteurizados.

Figura 24 – Eletroferograma de duas amostras de produtos de PCR (A) com 190 pb e concentração de $12 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (B) com 298 pb e concentração de $32 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Condições de análise da Figura 21; $t_{\text{inj}} = 12 \text{ s}$.

As amostras foram analisadas primeiramente no Bioanalyzer 2100, que forneceu a quantificação e o tamanho dos produtos. Por comparação dos tempos de migração dos fragmentos amplificados com os tempos de migração do padrão de 25 pb, sem intercalador, em HEC 2,0%, verifica-se que os produtos amplificados encontram-se entre os fragmentos de 275 e 300 pb (para o produto de 298 pb) e entre 175 e 200 pb (para o produto de 190 pb) do padrão, de acordo com os tamanhos atribuídos pelo *software* do Bioanalyzer 2100. Por meio de interpolação dos tempos de migração de cada fragmento no gráfico da Fig. 22, pode-se ter uma estimativa do tamanho, em pares de base para cada um. Estes valores correspondem a 288 pb e 197 pb. No entanto, o *software* do HP3DCE não possui a função de atribuir tamanho aos picos, visto que não é exclusivo para esta aplicação, e sim um

equipamento de eletroforese capilar para uso geral. Uma atribuição mais exata poderia ser feita analisando-se, na mesma corrida, amostra e padrão de tamanho.

Devido ao fato de o sistema de detecção por absorção apresentar dificuldades quanto aos níveis de detectabilidade quando comparado aos sistemas de detecção por fluorescência, as amostras foram amplificadas em volumes de 100 μL , e posteriormente concentradas em centrífuga à vácuo. Este procedimento não foi efetivo para detectar amostras de produtos de PCR referentes aos *loci* STR, as quais encontraram-se em baixas concentrações.

4.5. Eletroforese capilar em equipamento *lab-made* com detecção espectrofotométrica na região visível

A determinação experimental dos comprimentos de onda máximos de absorção de cada corante intercalador dimérico foi feita por meio da obtenção de espectros no sistema *lab-made*, seguindo o procedimento descrito na parte experimental. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Espectros de absorção dos corantes intercaladores diméricos obtidos no sistema *lab-made* a $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em água Milli-Q, com caminho óptico de $75 \mu\text{m}$.

Os valores experimentais de comprimento de onda máximo de absorção para os corantes intercaladores são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Comprimentos de onda máximo de absorção experimentais para os corantes intercaladores diméricos.

<i>Corantes</i>	λ_{max} absorção experimental(nm)	λ_{max} absorção fabricante(nm)
POPO-1	410	434
BOBO-1	437	462
YOYO-1	464	491
TOTO-1	487	514
POPO-3	525	534
YOYO-3	579	612
TOTO-3	589	642

OBS.: Os corantes JOJO-1, LOLO-1 e BOBO-3 não foram utilizados.

Pela comparação dos valores experimentais com os valores apresentados na Tabela 1, fornecidos pelo fabricante, observa-se proximidade entre estes, além da permanência na sequência de comprimentos de onda para cada corante. As diferenças existentes podem ser devido ao solvente utilizado para obtenção dos espectros, que no caso do fabricante foi sulfóxido de dimetila (DMSO), e neste caso, água Milli-Q, um solvente polar e hidroxilado, capaz de formar ligações de hidrogênio entre seus prótons e elétrons não ligados, ocasionando deslocamento para menores comprimentos de onda ⁽⁷⁶⁾, como observado.

O eletroferograma obtido pela separação do padrão de 25 pb intercalado com YOYO-3, após 1 h 30 min de intercalação, é apresentado na Figura 26. A Figura 27 apresenta o gráfico de pares de base *versus* tempo de migração para os fragmentos.

Figura 26 – Eletroferogramas dos fragmentos de DNA do marcador de tamanho de 25 pb intercalado a YOYO-3. Condições de separação: mesmas da Fig. 21; capilar de sílica fundida de 75 μm d. i. recoberto com PVA de 26 cm de comprimento total e 19 cm de comprimento efetivo; detecção 570 – 600 nm; injeção eletrocinética a -7,8 kV durante 12 s.

Figura 27 - Gráfico de pares de base *versus* tempo de migração para os fragmentos do padrão de tamanho 25 pb intercalado a YOYO-3 em HEC 2,0%.

O complexo com YOYO-1 não foi utilizado neste sistema devido à melhor detecção do equipamento *lab-made* ser na região de 600 nm, sendo a região ao redor de 490 nm prejudicada pelo alto nível de ruído, contrário do que ocorre no equipamento comercial. No entanto, os corantes YOYO-1 e YOYO-3 são semelhantes estruturalmente, o que possibilitou a comparação dos resultados obtidos em ambos equipamentos. As estruturas químicas dos corantes intercaladores diméricos são apresentadas no Anexo 1.

Da mesma forma que na separação do padrão no equipamento comercial, praticamente não ocorre distinção entre regimes de migração, sendo observada uma ligeira curvatura a partir de 300 pb, em HEC 2,0%, indicando o início do mecanismo de migração por reptação.

A resolução para a separação dos fragmentos de 25 a 350 pb é apresentada na Tabela 17.

Tabela 17 - Resolução à meia altura dos picos e em pares de base referentes aos fragmentos do marcador de tamanho de 25 pb intercalado a YOYO-3.

<i>Picos (pb)</i>	<i>Res_{h/2}***</i> <i>25 pb + YOYO-3</i>	<i>Res (pb)**</i>
125 / 150	3,0	5,3
150 / 175	3,1	5,6
175 / 200	2,8	5,6
200 / 225	2,5	6,1
225 / 250	2,5	7,0
250 / 275	2,2	7,5
275 / 300	1,9	8,4
300 / 325	1,9	7,8
325 / 350	1,6	7,4

*** $Res = (2 \Delta t_m 0,58) / (W_{nh/2} + W_{(n+1)h/2})$, em que Δt_m é a diferença entre os tempos de migração dos picos adjacentes; $W_{nh/2}$ e $W_{(n+1)h/2}$ são as larguras à meia altura, em unidades de tempo, dos picos adjacentes.

** $Res(pb) = (4 \Delta_{pb}) / (W_n + W_{n+1})$, em que Δ_{pb} é a diferença, em pares de base, entre picos adjacentes; W_n e W_{n+1} são as larguras da base, em pares de base, dos picos adjacentes.

O equipamento utilizado não permite a separação do padrão de 25 pb sem a presença de um corante, visto que o detector não é indicado para a região UV. No entanto, a comparação dos resultados obtidos, nas mesmas condições de separação com o do equipamento dotado de detector com arranjo de diodos leva à mesma conclusão obtida anteriormente, ou seja, de que a resolução é afetada pela intercalação. Porém, as mesmas condições aplicadas à separação de DNA sem intercalador podem ser utilizadas sem

prejuízo das análises na separação de DNA intercalado a YOYO-3. Além disso, observa-se melhora na resolução da separação dos complexos no equipamento *lab-made*, fato que pode ser atribuído à diminuição no tamanho do capilar, sob as mesmas condições de campo elétrico, o que causa menor difusão da amostra, e, conseqüentemente, picos mais estreitos. Contudo, outros corantes devem ser investigados para avaliar a consistência dos resultados.

A observação dos resultados de resolução em pares de base novamente indica que se deve investir em matrizes poliméricas de maior concentração, ou mesmo outras matrizes, para que seja possível obter a resolução adequada aos propósitos de análise de regiões tetranucleotídicas, e conseqüentemente, de testes de paternidade. As variáveis já estudadas devem se avaliadas para outros complexos DNA – corantes intercaladores para a viabilização da análise com amostras multiplexadas. No entanto, os resultados obtidos até aqui indicam que, por meio da adequação de algumas condições, análises multiplexadas podem ser realizadas no equipamento *lab-made* miniaturizado sem perda de resolução, ou até mesmo, com melhor resolução que em equipamentos comerciais.

5. Conclusões

5. CONCLUSÕES

As condições a serem utilizadas para a amplificação de DNA por PCR foram otimizadas e estabelecidas para sete *loci* padronizados para testes de paternidade. A avaliação do sucesso das amplificações foi feita pela análise dos produtos obtidos por eletroforese em gel de agarose e as condições ótimas aplicadas ao equipamento de eletroforese em *microchip*, no qual foram analisados três casos de paternidade. A validação da metodologia foi feita comparando-se os resultados obtidos com os de um equipamento comercial para genotipagem de indivíduos. Observou-se que apesar de eficiente para várias aplicações, o equipamento Bioanalyzer 2100 não apresenta a repetibilidade e resolução necessárias aos testes de genotipagem quando trabalha-se com regiões STR tetranucleotídicas, apesar de os tamanhos dos fragmentos atribuídos encontrarem-se dentro das faixas descritas na literatura. Os valores encontrados para coeficiente de correlação entre replicatas das amostras apresentaram-se entre 0 – 1,2%, o que sugere erros de 4 pb considerando fragmentos de maior tamanho obtidos pela amplificação de regiões STR (ao redor de 325 pb), o que pode, erroneamente, excluir ou incluir um indivíduo da paternidade por diferença de um alelo.

Este fato motivou estudos em um equipamento *lab-made* miniaturizado baseado em eletroforese capilar, com o objetivo de se obter análises multiplexadas e com valores mais reprodutivos, e o desenvolvimento de um método que possibilite resolução de pelo menos 4 pb, como exigido para análise das regiões padronizadas em testes de paternidade. Atualmente as análises de genotipagem são limitadas à exclusividade de equipamentos comerciais, de alto custo, assim como de *kits* pré-estabelecidos para utilização com cada equipamento. Entre as vantagens de um sistema *lab-made* está o baixo custo quando comparado aos equipamentos comerciais destinados a estas análises. Desta forma, foram

otimizadas as condições para separação de um padrão de tamanho de DNA de 25 pb em um equipamento de eletroforese capilar comercial, por CE em soluções poliméricas, sendo a matriz utilizada hidroxietilcelulose. A concentração que permitiu boa separação de todos os fragmentos do padrão estudado foi 2,0%. Estas condições foram aplicadas para separação de um complexo DNA – corante intercalador no equipamento *lab-made* com detecção espectrofotométrica na região visível, sugerindo que as análises de moléculas intercaladas são possíveis. No entanto, parâmetros instrumentais relacionados ao sistema de detecção do equipamento precisam ser otimizados, assim como o estudo de outros complexos, para que seja possível a detecção de amostras multiplexadas sem necessidade de grande consumo de reagentes, e com custo e tempo minimizados. O estudo de concentrações mais altas de HEC, ou mesmo de outras matrizes, que possibilitem a resolução necessária à análise de regiões tetranucleotídicas também deve ser avaliado. Outra vantagem do sistema desenvolvido seria a possibilidade de adequação dos parâmetros de separação eletroforética, como variação da matriz e tampão de separação, tamanho do capilar e corante intercalador, parâmetros estes invariáveis em sistemas comerciais como Bioanalyzer 2100 e MegaBACE.

Desta forma, a partir da otimização de todas as variáveis para separação eletroforética de regiões tetranucleotídicas, seria possível a análise de um caso de paternidade em 60 min, em um equipamento com o valor de aproximadamente \$10.000,00, em contraste com oito casos no equipamento MegaBACE, mas que tem um valor em torno de 15 vezes maior, e a necessidade de funcionamento completo, mesmo que para apenas uma amostra analisada, e um caso no Bioanalyzer 2100 em 90 min, equipamento com o valor aproximado de \$25.000,00, mas a custo da utilização de 3 chips (que são descartáveis).

6. Referências

Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. p. 13-62.
- 2) SMITH, C. A.; WOOD, E. J. **Molecular biology and biotechnology**: molecular and cell biochemistry. London: Chapman & Hall, 1991. p. 1-16.
- 3) LEWIN, B. **Genes V**. Oxford: Oxford University, 1994. 1272 p.
- 4) DARNEL, J.; LODIS, H.; BALTIMORE, D. **Molecular cell biology**. 2. ed. New York: Scientific American Books, 1990. 1294 p.
- 5) ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M., ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland and Publishing, 1994. 1294 p.
- 6) GRIFFITHS, A. J., GELBART, W. M., MILLER, J. H., LEWONTIN, R. C. **Genética moderna**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001. 589 p.
- 7) BROWN, T. A. **Genomes**. 2 ed. New York: Wiley-Liss, 2002. 572 p.
- 8) KAN, C. W.; FREDLAKE, C. P.; DOHERTY, E. A.; BARRON, A. E. DNA sequencing and genotyping in miniaturized electrophoresis systems. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3564-3588, 2004.
- 9) NATARAJ, A. J.; OLIVOS-GLANDER, I.; KUSUKAWA, N.; HIGHSMITH JUNIOR, W. E. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1177-1185, 1999.
- 10) BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing**: biology and technology behind STR markers, San Diego: Academic Press, 2001. 322 p.
- 11) NATIONAL INSTITUTE OF JUSTICE. **The future of forensic DNA testing**: predictions of the research and development working group of the National Commission on the Future of DNA Evidence. Washington, DC, 2000. Disponível em: <<http://www.ojp.usdoj.gov/nij/pubs-sum/183697.htm>>. Acesso em: 20 ago. 2005.
- 12) BUTLER, J. M.; BUEL, E.; CRIVELLENTI, F.; MCCORD, B. R. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1397-1412, 2004.
- 13) SHORT Tandem DNA Internet Database. Disponível em: <<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase>>. Acesso em: 25 jul 2006.
- 14) BUTLER, J. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. **Journal of Forensic Science**, v. 51, p. 253-265, 2006
- 15) FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

- 16) McCONKEY, E.H. **Human genetics**: the molecular revolution. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1993. 322 p.
- 17) INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. M. WHITI, T. J. **PCR protocols**: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. 482 p.
- 18) SILVA, F. H. **I Escola Brasileira de Inteligência Artificial e Bioinformática**: Biologia Molecular. São Carlos: UFSCar, 2001. 24 p.
- 19) STANDARDS for relationship testing laboratories. Disponível em <<http://www.aabb.org>>. Acesso em: 10 jan. 2006.
- 20) GÊNESIS. **Diagnósticos em biologia molecular Ltda**: paternidade por DNA. Disponível em: <<http://www.genesisdbm.com.br>> Acesso em: 18 abril 2005.
- 21) GÓES, A. C. Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais. **Revista do Biomédico**. Edição n. 65. Disponível em: <http://www.crbml.com.br/bio65/artigocien_65.asp>. Acesso em: 13 jan. 2007.
- 22) GENETIC Identity. **PowerPlex 16 Systems**. Promega. Disponível em: <<http://www.promega.com>>. Acesso em: 30 março 2005.
- 23) REYES, D. R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P.; MANZ, A. Micro total analysis systems. 1. Intoduction, theory and technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2623-2636, 2002.
- 24) AUROUX, P.; IOSSIFIDIS, D.; REYES, D. R.; MANZ, A. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2637-2652, 2002.
- 25) KUFFNER, JUNIOR, C. A.; MARCHI, E.; MORGADO, J. M.; RUBIO, C. R. Capillary electrophoresis and Daubert: Time for admission. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. A241-A246, 1996.
- 26) TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.
- 27) TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.
- 28) ISAAC, H. J.; CHAN, K. C.; MUSCHIK, G. M. The effect of column length, applied voltage, gel type and concentration on the capillary electrophoresis separation of DNA fragments and polymerase chain reaction products. **Electrophoresis**, v. 18, p. 1153-1158, 1997.
- 29) BARRON, A. E.; SUNADA, W. M.; BLANCH, H. W. Capillary electrophoresis of DNA in uncrosslinked polymer solutions: evidence for a new mechanism of DNA separation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, p. 259-270, 1996.

- 30) LANDERS, J. P. **Handbook of Capillary Electrophoresis**. Boca Raton: CRC, 1997. p. 348-372.
- 31) BLANC, T., SCHAUFELBERGER, D. E., GUZMAN, N. A. **Analytical instrumentation handbook: capillary electrophoresis**. 2. ed. Las Vegas: Marcel Dekker, 1997. 80p.
- 32) BAKER, D. R. **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley, 1995. 244p.
- 33) CAMILLERI, P. **Capillary electrophoresis: theory and practice**. Boca Raton: CRC, 1993. 487p.
- 34) ALTRIA, K. D. **Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation and applications**. Totowa: Humana Press, 1996. 344p.
- 35) LUNTE, S. M.; RADZIK, D. M. **Pharmaceutical and biomedical applications of capillary electrophoresis**. New York: Elsevier Science, 1996. 502p.
- 36) LONG, D.; STONE, H. A.; AJDARI, A. Electroosmotic flows created by surface defects in capillary electrophoresis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 212, p. 338-349, 1999.
- 37) WEINBERGER, R. **Practical capillary electrophoresis**. Orlando: Academic Press, 2000. p. 245-292.
- 38) LABRIE, J.; MERCIER, J. F.; SLATER, G. W. An Exactly solvable Ogston model of electrophoresis: a gel analyte interactions and their effects on the Ferguson plot. **Electrophoresis**, v. 21, p. 823-833, 1982.
- 39) HELLER, C. Separation of double-stranded and single stranded DNA in polymer solutions: I. Mobility and separation mechanism. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1962-1977, 1999.
- 40) ALBARGHOUTHI, M. N.; BUCHHOLZ, B. A.; DOHERTY, E. A. S.; BOGDAN, F. M., ZHOU, H.; BARRON, A. E. Impact of polymer hydrophobicity on the properties and performance of DNA sequencing matrices for capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, p. 737-747, 2001.
- 41) BARRON, A. E.; SUNADA, W. M.; BLANCH, H. W. The effects of polymer properties on DNA separations by capillary electrophoresis in uncross-linked polymer solutions. **Electrophoresis**, v. 17, p. 744-757, 1996.
- 42) BARRON, A. E.; SOANE, D. S.; BLANCH, H. W. Capillary electrophoresis in uncross-linked polymer solutions. **Journal of Chromatography**, v. 652, p. 3-16, 1993.
- 43) CARRILHO, E.; RUIZ-MARTINEZ, M.C.; BERKA, J.; SMIRNOV, I.; GOETZINGER, W.; MILLER, A. W.; BRADY, D.; KARGER, B. L. Rapid DNA sequencing of more than 1000 bases per run by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrilamide solutions. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 3305-3313, 1996.

- 44) SONG, L.; LIANG, D.; KIELESCAWQ, J.; LIANG, J.; TJOE, E.; FANG, D.; CHU, B. DNA sequencing by capillary electrophoresis using copolymers of acrylamide and N,N-dimethyl-acrylamide. **Electrophoresis**, v. 22, p. 729-736, 2001.
- 45) ZHOU, P.; SHENGBING, Y.; LIU, Z.; HU, J.; DENG, Y. Electrophoretic separation of DNA using a new matrix in uncoated capillaries. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, p. 173-178, 2005.
- 46) FUNG, E. N.; YEUNG, E. S. High-speed DNA sequencing by using mixed poly(ethylene oxide) solutions in uncoated capillary columns. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 1913-1919, 1995.
- 47) NISHIMURA, A.; TSUHAKE, M. Single Strand Conformation Polymorphism Analysis of Ras Oncogene by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detector. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, p. 774-778, 2000.
- 48) TIAN, H. J.; LANDERS, J. P. Hydroxyethylcellulose as an effective polymer network for DNA in uncoated glass microchips: optimization and application to mutation detection via heteroduplex analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 309, p. 212-223, 2002.
- 49) KAN, C. W.; BARRON, A. E. A DNA sieving matrix with thermally tunable mesh size. **Electrophoresis**, v. 24, p. 55-62, 2003.
- 50) CARUSO, C. S.; LANÇAS, F. M.; CARRILHO, E. Multiplexed DNA sizing by capillary electrophoresis using entangled polymer solutions and diode array detection. **Electrophoresis**, v. 24, p. 78-85, 2003.
- 51) MORITANI, T.; YOON, K.; CHU, B. DNA capillary electrophoresis using poly(vinyl alcohol).II.Separation media. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2772-2778, 2003.
- 52) XU, F.; BABA, Y. Polymer solutions and entropic-based systems for double-stranded DNA capillary electrophoresis and microchip electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 2332-2345, 2004.
- 53) GROSSMAN, P. D.; SOANE, D. S. Experimental and theoretical studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer solutions. **Biopolymers**, v. 31, p. 1221-1228, 1991.
- 54) ALBARGHOUTH, M. N.; BARRON, A. E. Polymeric matrices for DNA sequencing by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, p. 4096-4111, 2000.
- 55) SLATER G. W.; MAYER P.; DROUIN G. Migration of DNA through gels. **Methods in Enzymology**, v. 270, p. 272-295, 1996.
- 56) WANG, X.; SAWAGUSHI, T.; SAWAGUCHI, A. Application of electrophoresis technology to DNA analysis. **Electrophoresis**, v. 21, p. 334-337, 2000.

- 57) CHIARI, M.; DAMIN, F.; MELIS, A.; CONSONNI, R. Separation of oligonucleotides and DNA fragments by capillary electrophoresis in dynamically and permanently coated capillaries, using a copolymer of acrylamide and β -D-glucopyranoside as a new low viscosity matrix with high sieving capacity. **Electrophoresis**, v. 19, p. 3154-3159, 1998.
- 58) SKEIDSVOLL, J.; UELAND, P. M. Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser- induced fluorescence detection using the monomeric dye SYBR GREEN I. **Analytical Biochemistry**, v. 231, p. 359-365, 1995.
- 59) OWENS, C. V.; DAVIDSON, Y. Y.; KAR, S.; SOPER, S. A. High resolution separation of DNA restriction fragments using capillary electrophoresis with near-IR, diode-based, laser-induced fluorescence detection. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 1256-1261, 1997.
- 60) RAMPAL, S.; LIU, M.; CHEN, F. Characterization of TO-PRO-3 as an intercalator for double-stranded DNA analysis with red diode laser-induced fluorescence detection. **Journal Chromatography A**, v. 781, p. 357-365, 1997.
- 61) ZHU, H.; STEVEN, M. C.; BENSON, S. C.; RYE, H. S.; GLAZER, A. N.; MATHIES, R. A. High sensitivity capillary electrophoresis of dsDNA fragments using monomeric and dimeric fluorescent intercalating dyes. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 1941-1948, 1994.
- 62) HUNG, S.; JU, J.; MATHIES, R. A.; GLAZER, A. N. Cyanine dyes with high absorption cross section as donor chromophores in energy transfer primers. **Analytical Biochemistry**, v. 243, p. 15-27, 1996.
- 63) MARINO, M. A.; DEVANEY, J. M.; DAVIS, P. A. SMITH, J. K.; GIRARD, J. E. Spectral measurements of intercalated PCR-amplified short tandem repeat alleles. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 4514-4519, 1998.
- 64) NUCLEIC acid detection and genomics technology. In: THE HANDBOOK: a guide to fluorescent probes and labeling technologies. Invitrogen. Disponível em: <<http://probes.invitrogen.com>> Acesso em: 10 jan. 2005.
- 65) NG, D. P. K.; KOH, D.; CHOO, S. G. L.; NG, V.; FU, Q. Effect of storage conditions on extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. **Clinica Chimica Acta**, v. 343, p. 191-194, 2004.
- 66) SWEET, D.; LORENTE, M.; VALENZUELA, A. LORENT, J. A. ALVAREZ, J. C. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. **Forensic Sciences International**, v. 83, p. 167-177, 1996.
- 67) WALSH, D. J.; COREY, A. C.; COTTON, R. W.; FORMAN, L.; HERRIN, G. L.; WORD, C. J.; GARNER, D. D. Isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva. **Journal of Forensic Sciences**, v. 37, p. 387-395, 1992.
- 68) SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

- 69) RICCI, U.; SANI, I.; KLINTSCHAR, M.; CERRI, N.; DE FERRARI, F.; UZIELLI, M. L. G. Identification of forensic samples by using an infrared-based automatic DNA sequencer. **Forensic Sciences**, v. 44, p. 299-305, 2003.
- 70) STRAUB, R. E.; SPEER, M. C.; LUO, Y.; ROJAS, K.; OVERHAUSER, J.; OTT, J.; GILLIAM, T. C. A microsatellite genetic linkage map of human chromosome 18. **Genomics**, v. 15, p. 48-56, 1993.
- 71) NUTINI, A. L.; MARIOTTINI, A.; GIUNTI, L.; TORRICELLI, F.; RICCI, U. Double incompatibility at human alpha fibrinogen and Penta E loci in paternity testing. **Croatian Medical Journal**, v. 44, p. 342-346, 2003.
- 72) FUNES-HUACCA, M.; REGITANO, L. C. A.; MUELLER, O.; CARRILHO, E. Semiquantitative determination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by reversetranscriptase polymerase chain reaction and capillary electrophoresis – laser induced fluorescence using microchip technology. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3860–3864, 2004.
- 73) 2100 BIOANALYZER. Agilent Technologies. Disponível em: <<http://www.agilent.com>>. Acesso em: 20 nov. 2006.
- 74) INSTRUMENTATION – MegaBACE 500. GE Healthcare. Disponível em: <<http://www4.gelifesciences.com>>. Acesso em: 10 fev. 2007.
- 75) CARUSO, C. S. **Análise de DNA dupla-fita por eletroforese capilar acoplado a um detector com arranjo de diodos**. 2001. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- 76) SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. Florida: Harcourt Brace College Publishers, 1998. p. 332.

7. ANEXO

Corantes intercaladores diméricos

♦ BOBO™-1 iodide

Molecular Formula: $C_{41}H_{54}I_4N_6S_2$

Molecular Weight: 1202.66

CAS Number/Name: 169454-13-1 / Benzothiazolium, 2,2'-[1,3-propanediylbis[(dimethyliminio)-3,1-propanediyl-1(4H)-pyridinyl-4-ylidenemethylidyne]]bis[3-methyl]-, tetraiodide

♦ BOBO™-3 iodide

Molecular Formula: $C_{45}H_{58}I_4N_6S_2$

Molecular Weight: 1254.73

CAS Number/Name: N/A

♦ POPO™-1 iodide

Molecular Formula: C₄₁H₅₄I₄N₆O₂

Molecular Weight: 1170.53

CAS Number/Name: 169454-99-0 / Benzoxazolium, 2,2'-[1,3-propanediylbis[(dimethyliminio)-3,1- propanediyl-1(4H)-pyridinyl-4-ylidenemethylidyne]]bis[3-methyl]-, tetraiodide

♦ POPO™-3 iodide

Molecular Formula: C₄₅H₅₈I₄N₆O₂

Molecular Weight: 1222.61

CAS Number/Name: 154757-99-0 / Benzoxazolium, 2,2'-[1,3-propanediylbis[(dimethyliminio)-3,1- propanediyl-1(4H)-pyridinyl-4-ylidene-1- propen-1-yl-3-ylidene]]bis[3-methyl]-, tetraiodide

♦ TOTO®-1 iodide

Molecular Formula: $C_{49}H_{58}I_4N_6S_2$

Molecular Weight: 1302.78

CAS Number/Name: 143413-84-7 / Quinolinium, 1-1'-[1,3-propanediylbis[(dimethyliminio)-3,1-propanediyl]]bis[4-[(3-methyl-2(3H)-benzothiazolylidene)methyl]]-, tetraiodide

♦ TOTO®-3 iodide

Molecular Formula: $C_{53}H_{62}I_4N_6S_2$

Molecular Weight: 1354.85

CAS Number/Name: N/A

♦ YOYO®-1 iodide

Molecular Formula: $C_{49}H_{58}I_4N_6O_2$

Molecular Weight: 1270.65

CAS Number/Name: 143413-85-8 / Quinolinium, 1,1'-[1,3-propanediylbis[(dimethyliminio)-3,1-propanediyl]]bis[4-[(3-methyl-2(3H)-benzoxazolylidene)methyl]]-, tetraiodide

♦ YOYO®-3 iodide

Molecular Formula: $C_{53}H_{62}I_4N_6O_2$

Molecular Weight: 1322.73

CAS Number/Name: 156312-20-8 / Quinolinium, 1,1'-[1,3-propanediylbis[(dimethyliminio)-3,1-propanediyl]]bis[4-[3-(3-methyl-2(3H)-benzoxazolylidene)-1-propenyl]]-, tetraiodide