**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS**

**Estudo dos polimorfismos das regiões
hipervariáveis HV1 e HV2 do DNA mitocondrial da
população brasileira aplicado a identificação
humana**

BETY CHEN

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo
2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C518e Chen, Bety
Estudo dos polimorfismos das regiões hipervariáveis HV1
e HV2 do DNA mitocondrial da população brasileira aplicado
a identificação humana / Bety Chen. -- São Paulo, 2003.
94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mário Hiroyuki

1. Análise clínica : Medicina 2. DNA : Polimorfismo
genético I. T. II. Hirata, Mário Hiroyuki, orientador.

616.0756-9 CDD

Bety Chen

**Estudo dos polimorfismos das regiões hipervariáveis
HV1 e HV2 do DNA mitocondrial da população
brasileira aplicado a identificação humana**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Mestre

Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata
orientador/presidente

Prof. Titular Paulo Alberto Otto

Prof. Assoc. Daniel Romero Muñoz

São Paulo, 03 de setembro de 2003.

Dedico este trabalho...

*Aos MEUS QUERIDOS PAIS a quem
muito respeito e devo grande parte do que
sou hoje.*

*Às minhas irmãs JUTY e KETY que
sempre me estimularam e
incondicionalmente apoiaram todas
decisões da minha vida.*

*Aos MEUS SOGROS pelo carinho e
compreensão..*

*Aos professores MÁRIO HIROYUKI
HIRATA e ROSÁRIO DOMINGUEZ
CRESPO HIRATA pela excelente infra-
estrutura oferecida para este trabalho,
pela paciência e pela árdua tarefa de
ensinar e orientar os alunos para a
vida.*

*Ao meu marido LEE HSIAO WEN pelo
amor, pelo companheirismo, pela
paciência e apoio irrestrito em mais
uma etapa de minha vida.*

Outras ainda virão...

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu diretor Prof. Tit. Jorge Mancini Filho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido para a realização do presente trabalho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Profa. Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla.

À grande amiga-mucama Dra. Adriana Natsue Ozaki, cuja afinidade descobri no primeiro contato, pessoa maravilhosa que me ajudou de forma incondicional em todas as etapas do meu trabalho fornecendo apoio técnico e um ombro amigo.

Ao Prof. David Bernard Levin e Dra. Gionvana Valadares de Amorim do Department of Biology - University of Victoria, Canadá, pelo grande auxílio nos primeiros passos da minha parte experimental.

Aos amigos Hamilton Massayuki Hinuy e Luiz Antonio Salazar Navarrete que sempre se fizeram presentes nos momentos difíceis do meu trabalho, cujas críticas e sugestões foram de grande importância.

Ao professor Dr. Rogério Nogueira de Oliveira da Faculdade de Odontologia da USP pelos estímulos dados nos momentos de inércia e que me motivaram a continuar, reforçando a minha pertinácia.

Ao professor Titular Paulo Alberto Otto do Instituto de Biociências da USP, que pela minha resistência idiossincrática a números, pacientemente me conduziu nos difíceis meandros dos cálculos e estatísticas deste trabalho.

Aos amigos aquáticos: Maria Vanda Andrade da Silva, Simone Ribeiro Spinetti e Serjim Ricardo Alves pelo apoio e amizade compartilhados nos infintos ofurô-*breakfast* e cobranças que me ajudaram a manter *mens sana in corpino sano*.

Aos amigos e pacientes da Clínica Paulista de Nefrologia Diálise e Transplante e CTSP-Centro de Terapia Renal da Cidade de São Paulo pelo calor humano e pelo apoio logístico pois, entusiasmados, foram os meus primeiro voluntários.

Ao meu chefe da Clínica Paulista de Nefrologia, Dr. Paulo Sérgio Luconi e Dr. Cláudio Santiago Melaragno pelo constante apoio e incentivo em todos os campos do meu amadurecimento profissional, permitindo o perfeito equilíbrio entre o trabalho e as atividades acadêmicas.

À todos os colegas, freqüentadores do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo dos anos de 2000 a 2003, em especial: Alice Rodrigues, Carlos Eduardo Melo, Elizabeth Cecília Rodriguez Guzmán, Érika Miguel de Souza, Fabiana Cristina Pereira, Heluih Atta Abdalah, Ivanise Marina Moretti Rebecchi, Marcos de Oliveira Machado, Mustafá Hassan Issa, Paulo Henrique Carbone, Rosilene Fressati, Selma Andréa Cavalli, Simone Cohen Sorkin, Sun Ok Yoon e Vladmir Pereira.

Ao Rogério Vitiello pela ajuda para operacionalizar os NumSeqs, NumDifs, LenSeqs e inúmeros FOR.... NEXT... GO TO, do sistema de cálculo e comapração pareada, que somente os programadores entendem...

À bibliotecária Adriana de Almeida Barreiros pela revisão das referências bibliográficas.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo.

Aos amigos peritos criminais do Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística de São Paulo: Akimi Mori Honda, Norma Bonacorso, Cristina Lekich Gonzales e, *in memoriam*: Kazuyo Umeda Iwasa e Massato Yamagushi.

Às Secretárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Márcia Cristina Caramico, Sueli Providelo, Ana Maria Dias Dantas e Dora Lima. Aos funcionários da secretaria do curso de pós-graduação em Farmácia: Benê Oliveira, Elaine Ychico e Jorge de Lima.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução	1
1.1. DNA genômico	4
1.2. DNA mitocondrial	14
2. Objetivos	29
3. Material e métodos	30
3.1. Casuística	30
3.2. Amostras biológicas	30
3.3. Materiais	31
3.4. Métodos	32
4. Resultados	40
4.1. Obtenção de produto de PCR das regiões HV1 e HV2 do mtDNA	40
4.2. Resultados dos polimorfismos e frequências	42
4.3. Índice de diversidade genética e Probabilidade de semelhança	55
4.4. Análise de comparação pareada	56
5. Discussão	59
6. Conclusões	69
7. Referências bibliográficas	70
8. Anexos	89

Lista de abreviaturas

µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
A	adenina
ATP	Adenosina tri fosfato
C	citossina
CRS	<i>Cambridge Reference Sequence</i>
dATP	desoxiadenina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
ddNTPs	didesoxinucleotídeo trifosfato
dGTP	desoxiguanina trifosfato
D-Loop	Alça D
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
dTTP	desoxitimina trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
G	guanina
H	<i>heavy</i> – Cadeia pesada
HCl	ácido clorídrico
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HV1	Hipervariável 1
HV2	Hipervariável 2
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kb	kilobase
KCl	cloreto de potássio
Kv	Kilovolt
L	<i>light</i> – Cadeia leve

M	Molar
mg	Miligrama
MgCl ₂	Coreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
MLP	Multi Locus Probe
mM	Milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	Cloreto de Sódio
NADH	Nicotinamida Adenina dinucleotídeo reduzida
nM	Nanomolar
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PH	Potencial hidrogeniônico
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA transportador
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
T	Timina
U/mL	Unidade por mililitro
UV	Ultra violeta
V	Volts
VNTR	Número variável de repetições consecutivas

RESUMO

Com o intuito de avaliar os polimorfismos de mtDNA e a diversidade genética na população brasileira, foram estudados 84 indivíduos não aparentados: 49 caucasóides e 35 negróides da região sudeste do Brasil. As amostras de sangue obtidas por punção da polpa digital foram colocadas em papel de filtro e o mtDNA extraído pelo método orgânico. Foram amplificadas as regiões hipervariáveis HV1 a partir do nucleotídeo 16.051 até 16.365 e HV2 entre os nucleotídeos 71 e 340. O fragmento foi purificado e após a reação de seqüenciamento, as fitas *sense* e *anti-sense* foram alinhadas com a seqüência de Anderson e sobrepostas para confirmação. Foram encontradas 108 posições contendo transições, 15 transversões, 11 deleções e 4 inserções. Nove regiões apresentaram duas variantes de seqüência polimórfica. A maioria das seqüências foi observada uma única vez e em 84 indivíduos foram observados 80 haplótipos distintos. O índice de diversidade genética e a probabilidade de semelhança entre duas seqüências escolhidas ao acaso foram respectivamente de 0,9714 e 0,0286 para os negróides e de 0,9788 e 0,0212 para os caucasóides. Ao realizar análise pareada dos haplótipos, a média de nucleotídeos diferentes entre as seqüências foi de $14,36 \pm 5,68$ bases em um total de 3.486 pares comparados, indicando uma alta diversidade entre haplótipos nesta população. Os resultados demonstraram que o mtDNA é informativo para identificação humana e o conhecimento da freqüência dos haplótipos na população de interesse tem utilidade significativa na aplicação Forense, principalmente para se avaliar estatisticamente os resultados, fornecendo maior precisão, exatidão e dados contundentes nas investigações.

ABSTRACT

In order to evaluate the mtDNA polymorphism and demonstrate the sequence diversity in Brazilians, we established a database of 84 unrelated individuals, 49 Caucasians and 35 negroids from the southeast of Brazil. The samples were collected on a whatman paper by finger puncture, the mtDNA was extracted by organic method and hypervariable regions, HV1 from 16.051 to 16.365 bp and HV2 from 71 to 340 bp were amplified. Both sense and anti-sense strands were sequenced. When compared to Anderson sequence, 108 transitions, 15 transversions, 11 deletions and 4 insertions were found. Nine positions exhibited two variants of polymorphic sequence. The majority of the sequences were observed once, and in 84 sequences, 80 haplotypes were observed. The sequence diversity and the probability for two individuals randomly matching over two hypervariable regions were 0.9714 and 0.0286 for persons of color and 0.9788 and 0.0212 for Caucasians. In pair wise comparison, the mean sequence difference of $14,36 \pm 5,68$ nucleotides over 3,486 pairs compared, indicates a high diversity in this population. The data demonstrates that mtDNA sequencing can be informative in forensic cases, but it is of crucial importance to know the frequency of the mtDNA haplotypes to statistically evaluate the results.

1. INTRODUÇÃO

O perfil genético de um indivíduo é resultado da combinação de diversos marcadores herdados de seus genitores. Esses marcadores podem ser representados por proteínas, enzimas, antígenos celulares ou seqüências polimórficas de determinadas regiões não codificadoras do DNA, que apresentam diferenças em suas seqüências. A análise dessas diferenças, através da caracterização das proteínas ou através da tecnologia do DNA pode ser utilizada para identificação (ALVES, 2001).

Em 1900 foi descoberto o primeiro marcador genético confiável, o grupo do sistema sanguíneo, conhecido como sistema ABO por Landsteiner (RACE & SANGER, 1975). Em 1910, Dungern e Hirszfeld demonstraram a herança Mendeliana do grupo sanguíneo ABO, permitindo que fosse utilizado para estudo de parentesco (SILVER, 1989). Apesar de ser pouco informativo e apresentar baixa capacidade discriminatória, o uso de sistemas de antígenos eritrocitários foi um dos primeiros testes empregado na identificação e análise de vínculo familiar (MUKAIDA *et al.*, 2000). Os antígenos do sistema ABO também foram aplicados em testes forenses devido a sua boa estabilidade e facilidade de detecção em diversas evidências biológicas (REYNOLDS & SENSABAUGH, 1991).

Em 1927 Landsteiner e Levine descobriram um segundo marcador polimórfico do sistema sanguíneo fornecendo mais uma contribuição para o estudo de vínculo genético, o sistema MN (RACE & SANGER, 1975). Mais de vinte anos se passou até que o mesmo Landsteiner descobrisse o sistema Rh. Em 1960 já haviam sido descobertos 17 sistemas sanguíneos dentre eles o sistema Duffy, Kell e Kidd embora nem todos fossem aplicáveis à identificação humana (CROW, 1999)

Durante a década de 70, as ferramentas para tipagem genética forense incluíam técnicas de eletroforese (em papel, acetato de celulose e ágar) e “blotting” para marcadores proteicos e enzimas celulares (SILVER, 1989). Esses marcadores eram suficientemente robustos para serem analisados quando a evidência era constituída de sangue, mas forneceram

resultados insignificantes quando se tratava de outro líquido orgânico como saliva ou sêmem (REYNOLDS & SENSABAUGH, 1991).

Em 1980 o sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) foi incorporado às análises de vínculo genético, individualmente apresentava uma probabilidade de exclusão para paternidade de 90-95% (SILVER, 1989) e foi adicionado às mais de 150 proteínas polimórficas já disponíveis para identificação, como a haptoglobina e fator C3 do complemento, e às inúmeras enzimas polimórficas, como fosfatase ácida, esterase D, peptidase A e fosfoglicomutase (GILL *et al.*, 1985; CROW, 1999).

Os marcadores polimórficos como HLA-DQ α e Polymarker[®] lideraram o cenário da identificação até a segunda metade da década de 80, apesar das metodologias da época apresentarem a desvantagem de requerer grande quantidade de material para análise (CROW, 1999).

A partir da década de 80, a tecnologia do DNA, através da identificação dos VNTRs, começou a ocupar grande espaço nos laboratórios de identificação (REYNOLDS & SENSABAUGH, 1991). A descrição da reação em cadeia pela polimerase (PCR), em 1985 por Mullis e Faloona, revolucionou as análises de vínculo genético, fornecendo uma nova e poderosa ferramenta para os pesquisadores no campo das ciências biológicas, médicas e forenses (BUTLER & LEVIN, 1998).

O aperfeiçoamento das técnicas moleculares levou a uma melhoria dos testes de identificação por meio da variação genética entre os indivíduos e vem sistematicamente substituindo os testes tradicionais pelo seu maior poder discriminatório, sendo capaz de solucionar casos antes considerados inconclusivos (CAWOOD, 1989).

O desenvolvimento da tecnologia dos ácidos nucleicos aplicadas à análise de evidências biológicas começou a se expandir quando GILL *et al.* (1985); TYLER *et al.* (1986) e GIUSTI *et al.* (1986) demonstraram que o DNA poderia ser extraído de praticamente todo o tipo de evidência biológica, e após a constatação de que o DNA das células do líquido seminal poderiam ser extraídos de forma diferenciada de outras células (GILL *et al.*, 1985; REYNOLDS e SENSABAUGH, 1991).

Em abril de 1985, Alec Jeffreys utilizando DNA como evidência, solucionou o primeiro caso judicial na Inglaterra pelo método de RFLP em um caso envolvendo uma disputa sobre imigração. Também em 1985, Alec Jeffreys usou pela primeira vez os marcadores moleculares, as VNTRs, na investigação de um crime de estupro seguido de morte de duas jovens, sendo interessante neste caso, a exclusão de um dos suspeitos do crime (JEFFREYS, *et al.*, 1985).

Em meados de 1995 começa haver um claro predomínio das STRs nos estudos de vínculo genético e familiar devido ao seu grande poder de discriminação. Além disso, o tamanho pequeno destes fragmentos permitia a recuperação em amostras degradadas (CROW, 1999).

Mais recentemente, em virtude das dificuldades encontradas para obter material genético de amostras degradadas e submetidas a condições extremas do ambiente foi incorporada aos estudos forenses a análise de haplótipos de DNA mitocondrial devido a sua facilidade de recuperação, principalmente em evidências biológicas mal conservadas, que se encontram em quantidade diminuta como em amostras ancestrais, por possuir um grande número de cópias de mtDNA por célula e serem muito resistentes a condições adversas (BUTLER & LEVIN, 1998).

Em 1996, o DNA mitocondrial foi usado pela primeira vez em um Tribunal Americano do Estado do Tennessee. Contra o suspeito só existiam provas circunstanciais relacionadas ao estupro seguido de morte de uma menina de 4 anos de idade, uma vez que nenhuma evidência de sangue da vítima fora encontrada no suspeito e nem o esperma do suspeito fora identificado na vítima. A confrontação do mtDNA de amostras de cabelo encontrado no local do crime e no corpo da vítima com amostra de saliva do suspeito o levaram à condenação (DAVIS, 1998).

1.1 O DNA GENÔMICO

As funções vitais de uma célula são codificadas pelas informações contidas no seu núcleo, que contém 22 pares de cromossomos chamados de autossômicos e um par de cromossomos sexuais X e Y, sendo cada cromossomo do par é originário de um dos genitores.

Os cromossomos são estruturas compostas de ácidos nucléicos e proteínas organizadas em fibras de cromatina onde estão localizados os genes. Os genes estão localizados em sítios específicos chamados de loci e podem se apresentar em várias versões diferentes denominadas de alelos (REYNOLDS & SENSABAUGH, 1991).

Os genes são responsáveis por toda informação necessária para especificar a estrutura de todas as proteínas e RNAs, assim como programar no espaço e tempo a biossíntese ordenada dos componentes celulares e tissulares, coordenar todos os eventos de processamento de aminoácidos, lipídeos, carboidratos e outros elementos essenciais, regular a manutenção da homeostasia e respiração celular, armazenar e transmitir a informação genética, regular a expressão das informações contidas e determinar a individualidade de cada organismo (LEHNINGER, 1994).

A molécula de DNA é encontrada em todas as células nucleadas e possui uma estrutura tridimensional em dupla hélice formado por duas fitas anti-paralelas complementares, enrolada ao longo do mesmo eixo, proposto por JAMES WATSON e FRANCIS CRICK, em 1953. O DNA é formado por uma cadeia de nucleotídeos, sendo cada nucleotídeo constituído por uma base nitrogenada, um grupamento fosfato (PO_4^-) e uma molécula de açúcar que pode ser 2-deoxi-D-ribose, no caso de DNA e ribose para RNA. O DNA possui uma “direção” originada pela polaridade da molécula, sendo que a fita “sense” é a que possui a região promotora, onde está localizada a origem de replicação e por convenção, a sequência de DNA é definida na direções 5' e 3' (WATSON & CRICK, 2003).

A replicação do DNA é semi-conservativa, pois após a separação das fitas da dupla hélice, cada uma servirá de molde para replicação que ocorre de forma bidirecional através da inserção dos nucleotídeos catalizada

pela enzima DNA polimerase, gerando duas moléculas de DNA idênticas e conservando uma fita parenteral em cada molécula de “DNA-filha”. (WATSON & CRICK, 2003)

Dois alelos de um par de genes segregam e se distribuem independentemente, de modo que a informação genética de um indivíduo é herdada de ambos os genitores segundo a herança Mendeliana de segregação independente, podendo gerar indivíduos heterozigotos - quando possui dois alelos diferentes em um determinado loco do cromossomo-, ou indivíduos homozigotos - quando possuem o mesmo alelo entre dois cromossomos homólogos para um determinado loco (LEWIN, 2000).

A constituição genética em um determinado loco ou conjunto de loci é denominada de genótipo. A expressão desses genes é representada pelas características físicas como estatura, cor de olhos, cabelo e pele, que podem sofrer influência do meio caracterizando o fenótipo (OTTO *et al.*, 1998).

1.1.1. POLIMORFISMO GENÉTICO DO DNA NUCLEAR

Polimorfismo genético por definição são alelos gênicos que possuem frequência entre 1% e 99% na população estudada (BEIGUELMAN, 1994).

A interação com o ambiente, a recombinação dos cromossomos e sucessivas mutações durante as divisões meióticas e mitóticas são responsáveis pelas diferenças nas seqüências gênicas. Estas alterações podem ser devidas a inserção ou deleção de nucleotídeos, alteração da posição ou tamanho de determinada região do gene. A coexistência de múltiplos alelos em um loco gênico caracteriza os polimorfismos. Os polimorfismos de DNA podem ou não se relacionar com a expressão do gene e/ou proteína e têm sido a base dos estudos moleculares para identificação humana. Apesar da maioria dos polimorfismos se distribuírem de forma aleatória pelo genoma, existem regiões onde estas alterações

ocorrem com maior frequência (*hotspots*), como nas regiões não codificadoras dos genes (LEWIN, 2000).

Polimorfismos de DNA podem ser divididos em polimorfismos de sequência (ou pontual) e polimorfismos de comprimento (ou de tamanho).

Os polimorfismos de sequência ou pontual podem ocorrer em várias regiões do genoma como por exemplo nos genes do complexo HLA (TROWSDALE *et al.*, 1985; MAYRS, 1995) e região “D-loop” (alça D ou região de controle) do mtDNA (GREENBERG *et al.*, 1983). Os polimorfismos de sequência podem ser originados pela inserção ou deleção de um nucleotídeo entre as bases da sequência original ou podem ser causados por erros, durante a replicação, que vão inserir uma base errada durante a síntese (LEWIN, 2000). As substituições de nucleotídeos na sequência de DNA podem ser divididas em dois tipos dependendo da natureza da troca de base. A substituição mais comum é a transição que compreende substituição de uma pirimidina por outra ou substituição de uma purina por outra e a transversão corresponde à troca de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa (BUDOWLE, *et al.*, 1999).

Os polimorfismos de tamanho ou comprimento geralmente estão localizados em regiões não codificadoras dos genes e se caracterizam por possuírem uma série de repetições consecutivas na sequência de bases do DNA, no intervalo de dois sítios de restrição. As VNTRs descritos em 1980 por Wyman e White são caracterizados pela presença de fragmentos de comprimentos diferentes quando se digere o material com enzimas de restrição. O tamanho do fragmento obtido após digestão depende do número de nucleotídeos e repetições existentes, e pode variar de 2 a centenas de pares de bases. As VNTRs possuem grande diversidade entre indivíduos não aparentados e portanto são extremamente informativos para identificação humana ou estudo de vínculo genético (PENNA *et al.*, 1993)

Os polimorfismos das VNTRs são subdivididos em minissatélites e microsatélites, também chamados de STRs.

As minissatélites são locos polimórficos formados a partir de 15 a 65 pares de bases de comprimento (PENA *et al.*, 1993). Estas sequências

estão distribuídas aleatoriamente pelo genoma nuclear humano, inclusive os cromossomos sexuais X e Y sem apresentar papel funcional conhecido de codificação ou de expressão gênica (PENA *et al.*, 1993). As seqüências de minissatélites também servem de instrumentos moleculares para análise do DNA em outros campos na ciência, como a genética médica e a antropologia (JEFFREYS *et al.*, 1985; PENA *et al.*, 1993).

Os minissatélites mais utilizados para estudo de vínculo genético são os locos D1S7, D2S44, D4S139, D5S110, D10S28 (BUDOWLE, 1997). Os locos D6S132, D7S467 e D17S26 foram avaliados por SILVA e MOURA-NETO (1998) e além dos locos ApoB, D1S80, D17S30, HVRGIg citados por OZAKI (1999).

As VNTRs podem ter tamanhos menores, sendo então denominadas de microsatélites ou STR e constituem-se de repetições de 2 a 9 pares de bases. Os microsatélites mais abundantes no genoma humano são dímeros $(CA)_n$ - $(GT)_n$, uniformemente distribuídos no genoma, e ocorre em número de 25 a centenas de repetições. Existem outros microsatélites muito utilizados na identificação humana, compostos de tri e tetra nucleotídeos, como as repetições $(AGC)_n$ e $(AAAG)_n$ respectivamente. Dentre as STRs normalmente utilizados na identificação humana, podemos citar os locos CSF1PO, TH01, TPOX, F13A01, FESFPS e vWA (BUSQUE *et al.*, 1997). Os locos vWA, FESFPS e F13A01 foram estudados na população Australiana (AMBACH *et al.*, 1997), além dos locos D18S51, D19S253, D21S11, SE-33 que são também muito informativos para estudo de vínculo genético familiar e identificação humana (OZAKI, 1999).

As STRs são muito úteis na identificação de indivíduos por ser de pequeno tamanho, o que facilita a recuperação de amostras degradadas que contêm pouco DNA (PENA, *et al.*, 1993).

Nos cromossomos autossômicos, o locus pode apresentar-se em homo ou heterozigose, ou seja, para cada região de VNTR estudada podemos ter um alelo - indivíduo homozigoto - ou dois alelos - indivíduo heterozigoto - sendo este dado de heterozigose importante em estudos populacionais e de seleção, para aplicação forense de determinado locus.

Entretanto, em ambos os casos, sempre haverá um alelo paterno e um alelo materno para cada locus; a homozigose ocorrerá quando os alelos recebidos pelo indivíduo forem coincidentes (JOBIM *et al.*, 1999).

1.1.2 TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS NA TIPAGEM DO DNA

1.1.2.1. POLIMORFISMO DE TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Inicialmente nos estudos de vínculo genético empregava-se a técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), também conhecida como impressão digital genética (DNA-fingerprint). Essa técnica baseia-se na detecção de fragmentos de restrição de DNA de diferentes tamanhos, contendo diferentes números de cópias de seqüências repetidas (VNTRs), formando um perfil de restrição diferente para cada indivíduo que é separado por eletroforese e analisado através de sondas após *Southern blot* (LUDWIG *et al.*, 1989). Foi uma das primeiras técnicas empregadas em laboratório forense, em 1985 por Alec Jeffreys (JEFFREYS *et al.*, 1985).

O método consiste na digestão do DNA obtido das amostras biológicas, com enzimas de restrição. Os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose onde ocorre migração do DNA conforme seu tamanho molecular e a seguir são desnaturados (separação da fita dupla) em pH alcalino. A etapa seguinte é a transferência do DNA fita simples para uma fina membrana de náilon, também conhecida como “Southern Blotting” (SOUTHERN, 1975) onde o material genético se imobiliza através do calor e luz ultravioleta. Os fragmentos de restrição, que estão imobilizados na membrana de náilon os quais são de interesse para identificação, são visualizados e localizados através de sondas de DNA, marcadas com fósforo radioativo ou substância quimiluminescente, desenhadas para se ligar especificamente a estes fragmentos. Uma sonda de DNA, por definição, é um segmento de DNA, com uma seqüência específica de pares

de base, a qual irá se ligar a uma seqüência complementar de DNA alvo. Quando a sonda e o fragmento que se quer estudar possuem complementaridade, elas se ligam. A seguir é feita uma lavagem para eliminar sondas não ligadas. Condições rigorosas de lavagem, incluindo concentração salina e temperatura, afetam a sensibilidade e a especificidade da reação. A próxima etapa consiste na exposição da membrana de náilon a um filme fotográfico, que é sensibilizado pela radiação ou pela emissão de luz, formando uma imagem do fragmento de DNA. A imagem se dá no formato de bandas, aparecendo em determinadas localizações no filme de acordo com o tamanho do fragmento de restrição (WALKER & RAPLEY, 1999).

Podem-se utilizar dois tipos de sondas na RFLP, as unilocais (SLPs – Single Locus Probes) e multilocais (MLPs – Multi Locus Probes). As sondas unilocais buscam, no locus de um par de um determinado cromossomo analisar um fragmento por vez, portanto o emprego dessas sondas resulta em, no máximo, dois fragmentos diferentes - nos casos de indivíduos heterozigotos, ou em apenas um fragmento - nos casos de homozigotos (PENA & JEFFREYS, 1993).

As sondas multilocais detectam vários segmentos de DNA repetitivos, localizando diferentes regiões dos diversos cromossomos (WONG *et al.*, 1986). O emprego destas sondas fornece um padrão de múltiplos fragmentos de DNA para cada amostra, formando um perfil genético composto por muitas bandas de intensidade variada e indivíduo-específica (PENA & JEFFREYS, 1993). Devido ao elevado número de caracteres a serem analisados e ao perfil gerado pelas bandas, a probabilidade de igualdade entre duas ou mais amostras de indivíduos não aparentados é baixa (JOBIM *et al.*, 1999).

As sondas multilocais são mais informativas que as sondas unilocais, pois permitem analisar várias regiões do genoma (PENA *et al.*, 1994). Por outro lado, as sondas unilocais possuem uma sensibilidade maior, onde quantidades próximas de 30 ng podem ser visualizadas, em

contraposição aos 50 ng de DNA, necessários à detecção pelas sondas multilocais (GILL *et al.*, 1994; WEEDN & SWARNER, 1998).

As análises RFLPs são muito robustas e constituem a mais poderosa dentre as tecnologias de tipagem do DNA, freqüentemente propiciando valores discriminatórios de 1 em muitos milhões (WEEDN & SWARNER, 1999), no entanto o método além de ser moroso, leva em torno de 6 a 8 semanas para o processamento, e requer grandes quantidades de DNA íntegro de alto peso molecular. Portanto, DNA degradado, em quantidade insuficiente (inferior a 100 ng) ou que apresente essas duas características simultaneamente, pode resultar na impossibilidade de análise completa pelo RFLP (SMITH *et al.*, 1997). O método também apresenta baixa resolução quando se compara alelos com pequenas diferenças de tamanho (WEEDN & SWARNER, 1999).

1.1.2.2. PCR

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi descrita em 1985 por KARY MULLIS (MULLIS & FALOONA 1987) e tem sido extensivamente utilizada nas ciências biológicas e médicas. É uma engenhosa ferramenta para biologia molecular que permite o aumento da sensibilidade de um procedimento sub-analítico para níveis analíticos em um período de tempo relativamente curto e permite que o produto da amplificação seja avaliado por procedimentos relativamente simples, evitando o uso de material radioativo. Possui sensibilidade e especificidade capaz de amplificar uma única molécula de DNA ou RNA.

A PCR é uma técnica de síntese enzimática “in vitro”, similar ao processo de replicação do DNA, que permite amplificar uma seqüência conhecida de DNA ou RNA empregando-se um par de iniciadores ou *primers* compostos por pequenas seqüências de oligonucleotídeos conhecidas que flanqueiam a região alvo do DNA de interesse, denominado de DNA molde ou *template*. A reação acontece em meio estável e tamponado na presença de concentrações adequadas de desoxirribo-

nucleotídeos trifosfatos (dNTP) que servem como substrato para a nova seqüência, catalizada por uma DNA polimerase cuja atividade depende dos íons Mg^{2+} . A reação ocorre em três etapas: Desnaturação ou *melting*, Hibridação ou *annealing* e Polimerização ou *extension* (SAIKI *et al.*, 1988).

A Desnaturação consiste no rompimento das pontes de hidrogênio e separação da fita dupla do DNA baseado na característica natural dos ácidos nucleicos de se dissociarem em condições extremas de temperatura (entre 90 a 100 °C) ou de pH (abaixo de 2 e acima de 10). Com o resfriamento da solução, para temperaturas que variam entre 45 e 65°C, o iniciador encontra-se com sua seqüência complementar e a estrutura de dupla hélice reconstitui-se, num processo denominado hibridação ou *annealing*, que vai permitir que a enzima polimerase exerça sua função. A polimerização da cadeia mediada pela enzima DNA polimerase, que tem sua atividade máxima a 72°C, e a partir das pequenas seqüências de DNA fita dupla formada pela hibridação dos iniciadores, incorpora um a um os nucleotídeos complementares ao molde de DNA na posição 3' polimerizando a fita.

O conjunto de reações de desnaturação, hibridação e polimerização é definida como um ciclo; e vários ciclos envolvendo estas três etapas resultam num acúmulo exponencial da seqüência-alvo, pois o produto da polimerização do iniciador de um ciclo serve como molde para o ciclo seguinte, desta forma a quantidade de DNA dobra a cada ciclo até atingir um patamar onde algum dos elementos da reação se torna o fator limitante.

Vários são os métodos utilizados para visualização e detecção e análise do produto de amplificação pela PCR; podemos citar as mais comumente utilizadas, como separação em gel da agarose ou poliacrilamida, onde o produto de amplificação pode ser separado de acordo com o seu tamanho e os fragmentos visualizados através de coloração por brometo de etídeo, impregnação por sais de prata ou análise de fragmentos feita em sistema que utiliza marcadores fluorescentes. Existem várias técnicas disponíveis para tipagem e detecção de DNA amplificado

pela PCR, como a hibridização com sonda gênica (Southern blotting), sondas de oligonucleotídeos alelo-específicas marcadas enzimaticamente ou radioativamente.

As técnicas mais usadas para identificação humana na área forense são: 1) SISTEMAS DE DETECÇÃO POR SEQUÊNCIA-BASE, que utilizam oligonucleotídeos Alelo-específicos (ASO); como exemplos deste sistema temos os locos do sistema Amplitype DQaA-1 e Polimarker™. 2) SISTEMAS DE VARIAÇÃO DE COMPRIMENTO OU AMP-FLP (polimorfismo do comprimento do fragmento de DNA amplificado), que utilizam a amplificação de minissatélites e microsatélites (BUDOWLE, *et al.*, 1995). E 3) SEQUENCIAMENTO DIRETO, muito utilizado no estudo dos polimorfismos de sequência que normalmente ocorre no mtDNA, o qual tem se tornado uma técnica importante para o estudo forense (BENDER, *et al.*, 2000).

O sequenciamento direto de DNA é baseado no método de Sanger, através da incorporação de 2',3'-didesoxinucleotídeo trifosfato (ddNTP) que por não possuir o grupo 3'-hidroxil, impede a extensão da cadeia terminando a reação na posição onde o ddNTP foi incorporado (SANGER *et al.*, 1977). Na reação de sequenciamento, o iniciador é incubado com uma mistura de dNTPs e ddNTPs. Cada base de dideoxinucleotídeo trifosfato é marcada com um fluoróforo que possua uma boa resolução de cores entre uma e outra. Os dNTPs e ddNTPs vão competir na reação formando diversos fragmentos de tamanhos variados que serão aplicados em gel, coluna ou capilar de poliacrilamida, e os fragmentos serão separados pelo tamanho molecular. Os fragmentos serão detectados através da excitação do fluoróforo pelo laser, resultando na emissão de sinais luminosos captados por um detector que vai transmitir sob forma de impulsos elétricos para um sistema computadorizado capaz de decodificar a informação e convertê-los em gráficos. O resultado poderá ser apresentado na forma de eletroferogramas ou na própria sequência de nucleotídeos (SMITH, *et al.*, 1986)

Atualmente as técnicas de amplificação de DNA *in vitro*, como a PCR, são as mais utilizadas em estudos forenses por apresentarem inúmeras vantagens como alta sensibilidade, especificidade e redução no tempo de ensaio (OZAKI, 1999). Em casos forenses, as evidências biológicas, normalmente se encontram em quantidades reduzidas e degradadas, tornando a recuperação difícil; o que também inviabiliza estudos por RFLP que necessitam de grande quantidade de DNA. A especificidade é obtida com iniciadores que flanqueiam regiões específicas a serem estudadas e fornecem um perfil individualizado o qual é posteriormente confrontado com amostras de parentes próximos ou evidência biológica. A rapidez e a possibilidade automação do processo permite eliminar etapas laboriosas do “Southern blot” e o manuseio com radioisótopos (MULLIS & FALOONA 1987; REYNOLDS e SENSABAUGH, 1991; WEEDN & SWARNER, 1999).

A tecnologia da PCR é muito poderosa, mas apresenta algumas desvantagens como susceptibilidade à inibição da atividade enzimática por diversos fatores, como por exemplo, a hemoglobina (AKANE, *et al.*, 1994); ou corantes encontrados em tecidos (DeFRANCHIS, *et al.*, 1988), possui tamanha sensibilidade que resulta em uma elevada susceptibilidade aos contaminantes externos do DNA (PRADO *et al.*, 1997; MUKAIDA *et al.*, 2000), mas que podem ser eliminados ou minimizados pela adoção de normas rígidas de manipulação e procedimentos controlados (TULLY, 2001) e pode ocorrer uma amplificação preferencial de um alelo sobre outro, o que pode resultar em uma falsa exclusão alélica (WEEDN & SWARNER, 1999).

1.2. DNA MITOCONDRIAL

A mitocôndria é uma organela citoplasmática responsável pela geração de energia através da fosforilação oxidativa para sua própria manutenção e regulação térmica (WALLACE *et al.*, 1999). Cada célula possui centenas de mitocôndrias que por sua vez possuem milhares de moléculas de mtDNA que codificam principalmente proteínas necessárias para sua auto-regulação e perpetuação da organela (BOGENHAGEN & CLAYTON, 1974). As outras proteínas necessárias são codificadas pelo núcleo da célula, expressas no citoplasma e importadas para dentro da organela, onde serão utilizadas (LEWIN, 2000).

O DNA mitocondrial é normalmente referido como genoma extra-nuclear que possui fita dupla circular contendo genes que codificam funções relacionadas, numa organização típica de operons encontrada em procariotos, muitas das proteínas codificadas por ele são homólogas às proteínas correspondentes em bactérias, o que gera muitas especulações quanto a sua origem. Uma das hipóteses é que eles sejam vestígios dos cromossomos de bactérias antigas que invadiram o citoplasma das células hospedeiras e se tornaram precursoras destas organelas. O DNA mitocondrial codifica tRNAs e rRNAs e algumas poucas proteínas, mas cerca de 95 por cento das proteínas mitocondriais são codificados pelo DNA nuclear e transportados para dentro da organela, portanto a existência do DNA na mitocôndria permanece um mistério (LEWIN, 2000).

O mtDNA humano foi sequenciado pela primeira vez por ANDERSON *et al.*, em 1981, sendo composto de 16.569 pares de bases de comprimento, possui uma fita abundante em purinas denominada de cadeia pesada (H) e uma fita abundante em pirimidinas denominada cadeia leve (L). Na fita H está localizada a origem de replicação, de forma que esta é considerada como a fita “sense” e a cadeia L é considerada a fita “anti-sense”, complementar.

O mtDNA possui uma região que contém seqüências que codificam para 2 RNA ribossômicos, 22 RNA de transferência e 13 proteínas. Sessenta por cento do mtDNA codificam a enzima NADH-Redutase, uma

subunidade da citocromo redutase, três subunidades da citocromo oxidase e duas subunidades da ATP-sintetase. A sequência obtida é considerada como referência com a qual a sequência das amostras a serem testadas são alinhadas e comparadas para análise, cada uma das bases do genoma mitocondrial recebe um número consecutivo a partir da origem de replicação da cadeia pesada denominada de 1 até a posição 16.569. Esta sequência (Número de Acesso no GeneBank: M63933) é denominada de sequência de Anderson, com a qual novas sequências são comparadas. Uma vez que a primeira sequência foi obtida de uma linhagem de células, observou-se que esta continha fragmentos com sequências bovinas e de células HeLa (TULLY *et al.*, 2001). Recentemente, ANDREWS e colaboradores fizeram uma revisão da sequência de Anderson que foi denominada de CRS - *Cambridge Reference Sequence* (ANDREWS, *et al.*, 1999), que não altera a sequência da região de controle onde estão localizadas as regiões hipervariáveis.

O mtDNA possui uma região de controle não codificadora denominada “D-Loop” (*Displacement loop*) localizada entre os genes da tRNA^{Pro} e tRNA^{Phe}, nas posições 16.024 a 576 da sequência de mtDNA (ANDERSON *et al.*, 1981), com aproximadamente 1.100 pares de base de comprimento, onde se encontram as regiões hipervariáveis HV1 e HV2 que são as regiões mais polimórficas do mtDNA humano (STONEKING *et al.*, 1991; TULLY *et al.*, 2001). A região HV1 se localiza entre as posições 16.024 a 16.365 e a região HV2 da posição 73 b a 340 (MILLER e BUDOWLE, 2001). A maioria das variações encontradas na sequência de mtDNA se localiza na região do “D-loop” que não codifica proteínas (GREENBERG *et al.*, 1983), mas por conter, elementos reguladores da transcrição, sítios de ligação para os fatores de transcrição, além da origem de replicação da cadeia pesada, possui uma pressão seletiva muito maior do que simples regiões não codificadoras (LUTZ, *et al.*, 2000; TULLY, *et al.*, 2001). A região de controle ou “D-Loop” é a principal região analisada nos estudos de identificação de indivíduos e vínculo genético familiar (BUDOWLE *et al.*, 2002).

1.2.1. HERANÇA UNIPARENTAL

O mtDNA possui herança não-Mendeliana uniparental materna (GILES *et al.*, 1980; HUTCHISON III *et al.*, 1974) o que ocorre devido a inativação e degradação das mitocôndrias paternas no estágio pronuclear da embriogênese, dentro do citoplasma do óvulo (KANEDA *et al.*, 1995; SUTOVSKY, *et al.*, 1999).

A herança materna é devida a degradação ativa da mitocôndria paterna sinalizada pela perda do potencial de membrana dentro do citoplasma do óvulo nos estágios iniciais da embriogênese. A inativação e degradação das mitocôndrias paternas são feitas pelos corpos multivesiculares e ocorrem entre a segunda divisão celular e o estágio pronuclear (KANEDA *et al.*, 1995). Recentemente foi feita correlação entre a presença de marcadores na porção média do espermatozóide, que sinalizam sua eliminação pelas lisossomas e proteasomas do embrião. Desta forma o mtDNA materno é transmitido de uma geração para outra através do citoplasma do ovócito (WALLACE *et al.*, 1999; SUTOVSKY, 1999).

Embora atualmente haja questionamentos quanto a herança materna do mtDNA (MORRIS e LIGHTOWLERS, 2000) e controvérsias quanto a recombinação do mtDNA (ARCTANDER, 1999; WIUF, 2001) que sugerem que mtDNA materno e paterno sofrem recombinação no óvulo gerando um mtDNA híbrido (EYRE-WALKER *et al.*, 1999; AWADALLA, *et al.*, 1999). O efeito parece ser mínimo sobre a região de controle do mtDNA, de forma que para efeito de análise forense, o DNA mitocondrial é considerado como herança materna (TULLY, 2001); assim, um indivíduo é monoclonal para mtDNA e a sequência dos alelos é tratada como um único locus, chamada haplótipo (JOBIM *et al.*, 1999).

Como visto anteriormente, o polimorfismo é constituído de diferenças nas sequências gênicas, e a combinação particular destas diferenças numa determinada região é chamada de haplótipo (LEWIN, 2000).

1.2.2. POLIMORFISMO GENÉTICO DO DNA MITOCONDRIAL

O DNA mitocondrial possui uma região altamente polimórfica, denominada de região hipervariável 1 e 2, localizado na alça D ou “D-loop” e possui alta taxa de polimorfismo (BROWN *et al.*, 1971 e CANN *et al.*, 1987). Exibe uma rápida evolução, apresentando taxa de mutação de 5 a 10 vezes maiores que o do genoma nuclear (WILSON *et al.*, 1993;) o qual aumenta o poder discriminatório na identificação de indivíduos (PARSONS & COBLE, 2001). Erros durante a replicação e alta concentração de compostos de oxigênio, devido ao processo de fosforilação oxidativa, aliado a um sistema de reparo ineficiente, parecem responsáveis pelo acúmulo de mutação (WILSON, *et al.*, 1985). Adicionalmente, esta alta taxa de mutação ocorre em decorrência da susceptibilidade de danos ao mtDNA, provocada pela ausência de uma barreira protetora, como a existente no DNA genômico, que possui uma organização complexa na cromatina e também pela baixa fidelidade da enzima polimerase da mitocôndria (LUTZ, *et al.*, 2000). Estima-se que estas regiões de alta mutabilidade do mtDNA variam entre 1% a 3%, ou uma diferença de 1 a 3 nucleotídeos para cada 100 nucleotídeos analisados, entre indivíduos não relacionados, permitindo a discriminação entre indivíduos (BUTLER & LEVIN, 1998).

Uma vez que existe uma variação substancial entre os indivíduos, a análise por restrição enzimática se tornou uma ferramenta para estudo antropológicos e de filogenia, sendo que os resultados obtidos sugerem uma correlação entre padrão de restrição e origem étnica do indivíduo (HORAI e MATSUNAGA, 1986).

Os polimorfismos de seqüência, também denominados de polimorfismo pontual, podem ser decorrentes de substituição, inserção ou deleção de nucleotídeo na seqüência do DNA e geralmente apresenta mais de um tipo de alteração na região hipervariável do mtDNA (BUTLER & LEVIN, 1998).

As substituições de bases são os polimorfismos predominantes no mtDNA, sendo que mais de 92% dos casos de substituição referem-se a transições, substituição de uma pirimidina por outra ou substituição de uma

purina por outra (BORTOLINI *et al.*, 1997; BUDOWLE *et al.*, 1999a) e em menor frequência ocorrem as transversões que correspondem a uma substituição de uma purina por pirimidina ou vice-versa (LEWIN, 2000).

Por vários anos assumiu-se que o genoma mitocondrial de um indivíduo era idêntico em um mesmo tipo de célula, assim como entre células de tecidos diferentes (MONNAT e LOEB, 1985; STONEKING *et al.*, 1991). Posteriormente, observou-se a existência da heteroplasmia, definida como a presença de mais de um haplótipo ou seqüência de mtDNA num mesmo indivíduo (BUDOWLE, *et al.*, 1999, CALLOWAY, 2000).

A princípio a heteroplasmia foi associada com algumas doenças raras, mas recentemente, a heteroplasmia foi comprovada entre células de diferentes tecidos, como cabelo e sangue (WILSON *et al.*, 1997; GRZYBOWSKI, 2000) e entre as células do mesmo tecido, como as do cérebro (JAZIN *et al.*, 1996). Esta característica se tornou mais um parâmetro a ser utilizado para análise forense de mtDNA (BRETTELL *et al.*, 1999 e CARRACEDO *et al.*, 2000, LAGERSTRÖM-FERMÉR, 2001).

A heteroplasmia pontual, quando ocorre no indivíduo, geralmente difere entre si por apenas um nucleotídeo, embora dois ou mais nucleotídeos diferentes podem ocorrer num mesmo indivíduo em níveis muito mais baixos (BUDOWLE *et al.*, 1999b). A heteroplasmia pode ser observada nas seguintes situações: 1) Indivíduos podem ter mais de um haplótipo de mtDNA no mesmo tecido; 2) Indivíduos podem exibir um tipo de mtDNA em um tecido e um haplótipo diferente em outro tecido ou 3) Indivíduos podem ser heteroplásmicos em um tecido e homoplásmico em outro tecido (CARRACEDO *et al.*, 2000; BUDOWLE *et al.*, 2002).

A heteroplasmia de comprimento normalmente se manifesta através da variação no número de bases na região homopolimérica C ou cauda poli-C. Este tipo de polimorfismo é muito mais prevalente na população do que a heteroplasmia pontual, e consiste em inúmeras inserções do nucleotídeo citosina. Na região HV1 heteroplasmia de comprimento se localiza entre as posições 16.183 e 16.194 e de forma análoga na região HV2 entre as posições 302 a 315 (BUDOWLE *et al.*,

1999a; BÄASNER *et al.*, 1998; TULLY *et al.*, 2001). Quando há uma transição T-C na posição 16.189 da região HV1, geralmente ocorre heteroplasmia de comprimento (CARRACEDO *et al.*, 2000).

Embora o sequenciamento das regiões hipervariáveis da alça D-loop seja o mais utilizado, o DNA mitocondrial possui outras regiões informativas como região V (PÄABO *et al.*, 1988) localizada entre o citocromo oxidase II e o gene codificador da Lisi-t-RNA que possui duas repetições de 9 pares de base, onde a presença de deleção constitui marcador específico para indivíduos de origem asiática (WRISCHNIK *et al.*, 1987; HORAI E MATSUNAGA, 1986; ROCCO *et al.*, 2002), e que pode ser determinada por polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição. Dentro da região V existe também uma substituição de base na posição 8.251 (ANDERSON *et al.*, 1981) onde ao invés de A temos G, o que representa perda de sítio para enzima HaeIII na posição 8.250 e ganho de sítio para enzima Avall na posição 8.249 (PÄABO *et al.*, 1988) no gene da citocromo oxidase II. Uma outra região informativa é o sítio da enzima Hinc II na posição 13.259 que predomina entre os ameríndios e descendentes de orientais (ROCCO *et al.*, 2002; SIMPSON & SMITH, 1995).

A maioria das substituições de base corresponde a troca de T por C, principalmente na região HV1, enquanto que em certas populações, como a africana, afro-americana e hispânica é encontrado um número considerável de transversões, substituição de C→A e A→C, nas posições 186-189 da HV2. A maioria das inserções ocorre na região hipervariável 2 da região de controle do DNA mitocondrial, principalmente nos sítios 309.1 e 315.1 na região homopolimérica C (BUDOWLE, *et al.*, 1999a).

1.2.3. APLICAÇÕES DA ANÁLISE DE DNA MITOCONDRIAL

A análise do mtDNA é uma importante ferramenta no estudo da evolução humana, na genealogia, no estudo populacional, na medicina forense e na identificação de espécies (CANN *et al.*, 1987; ALONSO *et al.*, 1996; BATAILLE *et al.*, 1999).

O estudo de DNA mitocondrial também é aplicado nos estudos filogenéticos, uma vez que, teoricamente, as linhagens hoje existentes derivam de uma única origem, a chamada Eva mitocondrial (KRINGS, *et al.*, 1999). Devido à herança matrilinear, o DNA mitocondrial também é usado para estudo de migrações e composição da população. À medida que os homens migraram para novas regiões, os haplótipos foram sendo alterados por mutações, originando novas seqüências gênicas que foram constituindo os haplogrupos, formando linhagens evolutivas independentes (PENA *et al.*, 2000).

No Brasil, o mtDNA tem sido utilizado em estudos antropológicos (RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 1996), em estudo de populações indígenas (BORTOLINI *et al.*, 1998), de populações negróides do Brasil (BORTOLINI *et al.*, 1997), de mistura e composição racial (ALVES-SILVA *et al.*, 1999; BORTOLINI *et al.*, 1997). Santos *et al.*, estudando a composição indígena na população da região amazônica através de mtDNA e cromossomo Y, determinaram que 10 vezes mais contribuição de mulheres ameríndias, contra 5% de contribuição de homens na população da região, conseqüência do processo de integração que estimulava a mistura entre homens europeus e indígenas (SANTOS, *et al.*, 1999)

Recentemente ALVES-SILVA e colaboradores estudaram a composição étnica da população brasileira através da análise de 247 indivíduos brasileiros provenientes de 5 regiões geográficas. Obtiveram 33,2% de haplótipos característicos de nativos ameríndios e asiáticos; 38,8% de haplogrupos europeus e 27,9% de vários haplogrupos africanos. Considerando que a população estudada era autodenominada de “brancos” e foi composta de indivíduos da classe média e média alta, a amostragem não é representativa da população brasileira (ALVES-SILVA, *et al.*, 2000).

Pena *et cols.* discorrem sobre a complexa miscigenação da qual é formada a população brasileira e da dificuldade de se estabelecer geneticamente a contribuição de cada grupo que formou nosso povo (ameríndios, europeus e africanos). Assim, estudaram brasileiros brancos e encontraram que a grande maioria das linhagens paternas é proveniente da Europa (haplogrupo 2); já com relação às linhagens maternas, através do DNA mitocondrial, obtiveram que 60% são de origem ameríndia ou africana (PENA *et al.*, 2000).

1.2.4. UTILIZAÇÃO DO mtDNA NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

O mtDNA é bastante utilizado em ciências forenses para estudos de identificação humana e confrontação de evidências biológicas com possíveis suspeitos e sua confiabilidade foi validada para caracterização genética de evidências biológicas (BUDOWLE *et al.*, 1999a). Após a demonstração de que um único fio de cabelo pode fornecer material suficiente para determinar a seqüência do DNA de um indivíduo (HIGUCHI *et al.*, 1988), numerosos estudos se basearam na obtenção de amostra de forma não invasiva para estudos genéticos. Várias particularidades do mtDNA o tornam muito conveniente para análise genética quando há escassez de amostra, a saber:

1) A grande quantidade de cópias por célula, entre 1.000 a 10.000 cópias por célula, (ALLEN *et al.*, 1998), o que é por si só um processo de amplificação e que permite a análise de material com quantidade escassa ou parcialmente degradado. De fato, restos arqueológico humanos de mais de 7.000 anos têm sido obtidos estudados através do mtDNA (PÄÄBO *et al.*, 1988).

2) Possui uma região altamente polimórfica, localizado no “D-loop” ou regiões hipervariáveis 1 e 2 com alta taxa de polimorfismo (BROWN *et al.*, 1971 e CANN *et al.*, 1987).

3) Possui herança uniparental materna (HUTCHISON III *et al.*, 1974; GILES *et al.*, 1980), uma vez que não existem ainda evidências de

recombinação entre moléculas de mtDNA. Portanto a seqüência do mtDNA é tratada como um haplótipo (BUDOWLE *et al.*, 1999a). Este tipo de herança permite a identificação de indivíduos confrontando-se a amostra com o perfil de qualquer parente da linhagem materna, ou quando a identificação é feita após várias gerações, pois é esperado que o mtDNA de parentes da linhagem materna permaneça idêntico, exceto quando ocorre alguma mutação (BOLES *et al.*, 1995; CARRACEDO *et al.*, 2000).

4) A presença de heteroplasmia é muito útil na confirmação de amostras, sendo uma ferramenta adicional quando se compara um evidência com amostras dos suspeitos, pois é um parâmetro extra para confrontação, aumentando o poder de discriminação (GRZYBOWSKI, 2000).

O mtDNA, portanto, apresenta vantagens sobre o DNA genômico por possuir grande número de cópias por célula e por apresentar maior sensibilidade em casos onde são encontradas quantidades limitadas de material biológico (SULLIVAN *et al.*, 1991 e 1992). Além disso, o mtDNA é mais resistente em condições ambientais desfavoráveis (BUTLER & LEVIN, 1998) permitindo que amostras degradadas possam ser recuperadas e utilizadas nos testes de identificação (WILSON *et al.*, 1993 e MUKAIDA *et al.*, 2000). Além das amostras biológicas regularmente utilizadas na identificação humana como sangue, sêmen e saliva, o mtDNA também pode ser obtido de dentes (BOLES *et al.*, 1995; GINTHER *et al.*, 1992), fragmentos de ossos (SULLIVAN *et al.*, 1992; KUROSAKI *et al.*, 1993), fios de cabelo sem bulbo (HOPGOOD *et al.*, 1992; WILSON *et al.*, 1995), unhas (ANDERSON *et al.*, 1999; PARSONS & COBLE, 2001) e, até mesmo, de fezes que normalmente falham ao fornecer resultados para marcadores de DNA nuclear (HOPGOOD *et al.*, 1996). A análise de mtDNA também tem sido empregada para identificação de traços como fragmentos de células transferidos através de arranhaduras, saliva proveniente de mordidas, além de algumas poucas células deixadas em bitucas de cigarro (SZIBOR, *et al.*, 2000). Van Oorschot e Jones (1997) relataram a possibilidade de se extrair

material genético de impressões digitais e obter um DNA *fingerprint* do suspeito.

No âmbito da investigação criminal, a análise das regiões HV1 e HV2 do mtDNA foi utilizada na resolução de uma série de 3 roubos armados a bancos ocorrida em Estocolmo entre 1990 e 1991, onde as evidências constituíam de mancha de saliva e cabelo encontrados no capuz próximo ao local do crime, e fios de cabelo em roupas ligados aos assaltos. As evidências foram capazes de incriminar 3 dos 4 suspeitos. Em outro caso, fios de cabelo, encontrados entre os dedos e na roupa da vítima, assassinada em sua residência, puderam ligar o crime ao suspeito através da análise do mtDNA (ALLEN, *et al.*, 1998).

O primeiro caso forense onde o mtDNA foi utilizado em um Tribunal Americano no Estado de Tennessee, em setembro de 1996. O caso envolveu a análise de um pelo pubiano encontrado na laringe de uma criança de 4 anos que foi estuprada e assassinada. O perfil do mtDNA do pelo não permitia a exclusão do suspeito que combinado a outras evidências, o levou a condenação (DAVIS, 1998; BRETTELL, 1999; LINCH, *et al.*, 2001).

No Brasil, a análise da região HV1 do mtDNA foi utilizada para solução de um caso forense envolvendo identificação humana. Ossos irreconhecíveis e quase totalmente incinerados de uma mulher foram recolhidos de um acidente de carro e, uma vez que a identificação convencional por antropologia e odontologia não eram possíveis, procedeu-se a análise de mtDNA. Amostras da mãe e filhos da vítima foram colhidas para confrontação apresentaram 7 divergências configurando uma exclusão. Baseado no laudo do DNA, familiares confessaram tentativa de fraude contra seguradora, onde uma indigente fora assassinada (PRADO, *et al.*, 1997).

Quatro casos forenses na Alemanha envolvendo ossos com idades entre 2 anos e meio a 9 anos foram analisados através do sequenciamento de mtDNA, obtendo três resultados de inclusão e uma de exclusão, concluindo que a análise das seqüência de mtDNA sozinha

fornece possibilidade de identificar vítimas de crimes ou pessoas desaparecidas quando os restos mortais são descobertos anos mais tarde (BENDER *et al.*, 2000).

A tecnologia do DNA também tem sido utilizada no campo das investigações históricas. Foi empregada na identificação de restos mortais enterrados há mais de 70 anos em uma vala comum na Rússia, em que se suspeitava pertencer a Família Romanov, mortos durante a revolução Bolchevique de 1918. Neste estudo, a análise de STRs foi importante para estabelecer o vínculo genético entre os esqueletos encontrados. As seqüências das regiões HV1 e HV2 do mtDNA dos ossos foram comparadas com amostras doadas por parentes vivos da linhagem materna, permitindo a identificação dos restos e confirmação como pertencentes a família real. Para identificação da Czarina Alexandra e seus filhos, foi utilizada para comparação, amostra de sangue doada pelo príncipe Philip, Duque de Edimburgo (vivo) neto da irmã da Czarina, e foi encontrado o mesmo haplótipo em todas as amostras. Na identificação do Czar Nikolai Romanov II, o esqueleto foi comparado com amostras de sangue doadas pelos descendentes maternos de Louise of Hesse-Cassel, avó do Czar – bisneta da irmã e bisneto da tia do Czar. A seqüência das amostras extraídas dos ossos foi concordante com as dos parentes maternos, inclusive numa heteroplasmia comum a todos (GILL *et al.*, 1994).

A análise do mtDNA foi utilizado para identificação de soldados mortos durante a guerra do Vietnam (HOLLAND, *et al.*, 1993). Atualmente nas Forças Armadas dos Estados Unidos, amostra referência de sangue é colhido de todo ingressante para uma eventualidade de guerra onde há impossibilidade de se fazer o reconhecimento através de amostras odontológicas ou impressões digitais. O DNA será então utilizado na identificação dos corpos.

A análise de DNA mitocondrial também foi utilizada para auxiliar na identificação de 340 esqueletos, pertencentes a vítimas da ditadura na Argentina ocorrida entre 1976 e 1983, encontrados em uma vala comum no cemitério de Avellaneda, próximo a Buenos Aires (CORACH *et al.*, 1997)

Mais recentemente, o sequenciamento das regiões hipervariáveis do mtDNA foi utilizado com sucesso na identificação de amostras bastante degradadas de um acidente aéreo ocorrido nas remotas montanhas das Filipinas, em 1998, no qual morreram 104 pessoas. As vítimas foram submetidas condições extremas, não permitindo a identificação pelos métodos tradicionais, sendo que a recuperação do DNA genômico, na maioria das amostras, falhou (GOODWIN *et al.*, 1999).

Na tentativa de identificar restos humanos recuperados do fundo mar, os quais foram pulverizados durante uma explosão em vôo, MUKAIDA *et al.* tentaram a identificação através de genotipagem ABO, análise de STR e mtDNA. Devido às condições em que os tecidos foram expostos, o mtDNA foi o que apresentou melhor recuperação de material genético para estudo (MUKAIDA *et al.*, 2000).

Recentemente, o “The International Commission on Missing Persons” (ICMP) criou um laboratório nas cidades de Bósnia e Herzegovina e, em colaboração com laboratórios croatas, tem auxiliado na identificação de vítimas da Guerra da Bósnia (1992-1995) que deixou pelo menos 250 mil mortos e desaparecidos. O polimorfismo de STR do DNA genômico tem sido utilizado com sucesso na identificação de mais de 80% de desaparecidos. O DNA mitocondrial tem sido usado em casos de amostras altamente degradadas ou quando somente familiares maternos distantes estão disponíveis para confrontação (MARUSIC, 2001).

Vários laboratórios dentre eles, FBI LABORATORY (Washington, DC, USA), The ARMED FORCES DNA IDENTIFICATION LABORATORY (Rockville, MD, USA) e FORENSIC SCIENCE SERVICE (Birmingham, UK) da Inglaterra estão ativamente envolvidos no uso de mtDNA para identificação forense (BUTLER & LEVIN, 1998).

As técnicas mais utilizadas atualmente para identificação forense compreendem o uso de PCR para amplificar regiões polimórficas, como STR e VNTR do DNA genômico, mas falham quando a quantidade de amostra é pequena e/ou quando a amostra está bastante degradada ou possui células anucleadas. Nestas condições, a escolha do mtDNA é mais

adequada para estudos de identificação e vínculo familiar. De modo geral, para amostras forenses, a amplificação de fragmentos pequenos fornece melhores resultados (WILSON, 1995) e o mesmo se aplica ao mtDNA onde fragmentos de aproximadamente 200 pb (GOODWIN *et al.*, 1999) e 350 pb (MUKAIDA *et al.*, 2000) foram utilizados para identificação de amostras bastante degradadas.

A análise do mtDNA pela reação de amplificação por PCR e sequenciamento de DNA é um procedimento seguro, robusto, válido e confiável para identificação forense (WILSON *et al.*, 1995), pois foi comprovado que diferentes processos de extração, uso de diferentes iniciadores, aliado a diferentes condições de amplificação e estratégias diferentes da PCR apresentam resultados concordantes (CARRACEDO *et al.*, 1998) e aplicando o teste de proficiência para análise de heteroplasmia entre diversos laboratórios de vários países que utilizavam diferentes métodos, incluindo o Brasil, foram obtidos resultados concordantes (ALONSO, *et al.*, 2002).

O principal objetivo da análise forense de DNA é obter a identificação correta de um indivíduo com a menor probabilidade de erro portanto, para a individualização de uma amostra, existe a necessidade de se fazer uma comparação da sequência obtida com um banco de dados da população específica (BUTLER & LEVIN, 1998), assim a existência de um banco de dados contendo a frequência dos haplótipos na região HV1 e HV2 do mtDNA da população estudada assegura o poder de discriminação (BOLES *et al.*, 1995; BUDOWLE *et al.*, 1999a) e elimina ou minimiza a probabilidade de falsa inclusão. O conhecimento desta frequência do mtDNA da população é de extrema importância para a interpretação dos resultados e cálculo da probabilidade de inclusão (WILSON *et al.*, 1993; ALLEN, *et al.*, 1998; BUDOWLE *et al.*, 1999a; CARRACEDO *et al.*, 2000; WITTIG, *et al.*, 2000). A significância da coincidência entre amostras é confrontada com a frequência, normalmente obtida contando-se o número de ocorrências desta sequência em todo banco de dados disponível (BUTLER & LEVIN, 1998).

Em 1998, os institutos de medicina forense da Europa Central que incluem Alemanha, Áustria e Suíça, iniciaram os trabalhos para estabelecer um banco de dados, conseguindo reunir no ano de 2000, seqüências de mtDNA de 1.410 indivíduos que foram disponibilizadas para comparação (WITTIG *et al.* 2000).

COMAS *et cols.*, sequenciaram a região HV1 do bulbo capilar de 45 indivíduos não relacionados da Anatólia (porção asiática da Turquia), encontrando 40 seqüências distintas entre a posição 16.024 e 16.383, com 55 transições e somente uma transversão (COMAS *et al.*, 1996).

Em 1999, BUDOWLE e colaboradores analisaram seqüências das regiões HV1 e HV2 de 1.393 indivíduos caucasianos, asiáticos, afro-americanos e africanos. Entre os caucasianos 64,6% das seqüências de mtDNA eram únicas dentro do universo de 604 indivíduos estudados. A maioria das seqüências de mtDNA foi observada somente 1 vez em cada grupo populacional obtendo-se entre os asiáticos americanos freqüência abaixo de 60,3% para ocorrência de haplótipo único, e acima de 85,3% entre os franceses, 79,2% para os austríacos, 64,6% para os caucasianos, 79,2% para os afro-americanos, 64,9% para os africanos de Serra Leoa e 77,2% para os japoneses. A combinação de todas as seqüências obtidas das 8 populações estudadas, totalizando 1393 indivíduos, forneceu 66,9% (932/1393) de haplótipos com ocorrência única (BUDOWLE *et al.*, 1999a).

Em 1998 BÄASNER *et cols.* analisaram as regiões hipervariáveis HV1 e HV2 de 50 indivíduos não relacionados encontrando 35 haplótipos diferentes para HV1 e 28 haplótipos diferentes para HV2 (BAASNER *et al.*, 1998) e mais recentemente Koyama *et cols.* apresentaram 50 haplótipos da população da região central do Japão (KOYAMA *et al.*, 2002).

Em 2000, ALVES-SILVA *et cols.* estudaram a composição genética da população brasileira e adicionalmente identificaram 170 haplótipos diferentes para a região hipervariável I da população brasileira (ALVES-SILVA *et al.*, 2000).

Os dados genético-populacionais de mtDNA ainda são escassos, não existindo publicações suficientes e representativas da população

brasileira, nem de regiões específicas da grande São Paulo, sudeste do Brasil. Desta forma, investimentos devem ser feitos no estudo dos polimorfismos de mtDNA em brasileiros, que futuramente poderão ser compilado para um banco de dados mundial, contendo seqüências da região HV1 e HV2 do mtDNA, que está sendo criado com esforços de vários países da América, Europa e Ásia (CARRACEDO *et al.*, 2000; TULLY *et al.*, 2000; WITTIG *et al.*, 2000; MILLER & BUDOWLE, 2001).

2. OBJETIVOS

Estudar os polimorfismos das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 de mtDNA e suas respectivas frequências, em indivíduos brasileiros natos, que se auto declararam brancos ou negros, residentes na cidade de São Paulo.

Avaliar o poder de individualização da análise do mtDNA para identificação humana, através dos resultados de índice de diversidade genética e comparação pareada entre haplótipos.

Estabelecer através dos resultados de frequência dos polimorfismos, frequência dos haplótipos e probabilidade de semelhança, parâmetros para melhorar o poder de discriminação do método para identificação humana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

O grupo de estudo foi constituído por 84 indivíduos brasileiros natos não aparentados da população em geral, escolhidos ao acaso, residentes na cidade de São Paulo, região sudeste do Brasil (ANEXO 1), que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2). Foi adotado neste trabalho, o critério de classificação pela cor utilizado pelo IBGE (Intituto Brasileiro de Geografia e Estatística), segundo o qual a cor é declarada pelo próprio indivíduo. O grupo de estudo foi dividido em dois sub-grupos: um denominado caucasóide constituído de 49 indivíduos que se auto classificaram como brancos; e um segundo grupo denominado de negróide, constituído de 35 indivíduos que se auto classificaram como negros. Do total dos indivíduos estudados 15 deles são naturais da região nordeste, 65 na região sudeste e 03 na região sul do Brasil (ANEXO 1).

As regiões escolhidas para este estudo foram as regiões hipervariáveis HV1 entre os nucleotídeos 16051 e 16365 e HV2 entre os nucleotídeos 71 e 340 do mtDNA segundo a sequência de ANDERSON (ANDERSON *et. al.*, 1981).

3.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Três gotas de sangue foram obtidas através de punção da polpa digital e colhidas em papel de filtro estéril tipo Whatman N° 1.

3.3. MATERIAIS

3.3.1. Reagentes

Taq DNA polimerase (Biotools – Madrid, Espanha); Brometo de etídeo, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); padrão de DNA de 100 bp, azul de bromofenol e agarose ultra pura, foram adquiridos da Pharmacia Biotech, Inc. (Uppsala, Suécia); Iniciadores para amplificação dos locos da região HV1 e HV2 do DNA mitocondrial, DNA Low Mass Ladder e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) adquiridos da Invitrogen (São Paulo, Brasil); Acetato de sódio, álcool isoamílico, EDTA, cloreto de sódio, etanol absoluto, glicerol e hidróxido de sódio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha); Ácido bórico, EDTA e Tris Base (USB, EUA); Fenol equilibrado com Tris, Ditioneitol e xilenocianol da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA); Kit QIAquick PCR purification Kit (Qiagen Inc, USA).

3.3.2. Materiais Descartáveis

Os tubos de microcentrífuga de 1,5; 0,5; 0,2 mL e as ponteiros de 0,5 a 10 μ l; 10 a 200 μ l e 100 a 1000 μ l, foram adquiridos da Sarsted (São Paulo, SP)

3.3.3. Equipamentos

As micropipetas foram adquiridas da Gilson (Emeryville, CA, Estados Unidos). Os termocicladores DNA Engine da M & J Research modelo PTC-200 (Watertown, MA, EUA). A fonte de eletroforese modelo EPS 200 foi adquirida da Pharmacia Biotech, Inc. (Uppsala, Suécia). Cubas para eletroforese horizontal modelo Horizon-58 da Gibco BRL, Life Technologies Inc. (Gaithersburg/ MD, EUA). Centrífugas para microtubos modelos 5415C e 5415R fornecidos pela Eppendorf (Hamburg, Alemanha). Centrífuga concentradora à vácuo modelo 5301 (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Agitador de tubos modelo AP-56 da Phoenix (Araraquara/SP, Brasil).

Balança analítica modelo AL-500 fabricada pela Marte (São Paulo/ SP, Brasil). Banho de água a 37°C modelo 5415C fabricada pela Fanen (São Paulo/ SP, Brasil). Banho de água a 56 °C modelo Q-304-1105 da Quimis (Diadema/SP, Brasil). Sistema de digitalização de imagens Multimage™ Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro/ CA, EUA). Papel térmico UPP 110 HD Sony. Impressora térmica modelo CP700D (Mitsubishi, Japão). Fluxo laminar (Veco, Brasil). Espectofotômetro UV para quantificação de ácidos nucleicos Gene Quant da Pharmacia (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia).

3.4. MÉTODOS

3.4.1. EXTRAÇÃO DO mtDNA DAS MANCHAS DE SANGUE

O mtDNA das amostras de mancha de sangue foi extraído pelo método de Wilson modificado (Wilson *et al.*, 1995). Em recipientes previamente descontaminados, colocar o fragmento de aproximadamente 2,0 x 2,0 mm com mancha de sangue. Adicionar 490 µL de tampão de extração (10mM Tris, 100 mM NaCl, 32 mM DTT, 10 mM EDTA, 2% SDS, pH 8), 10 µL de proteinase K a 10 mg/mL e incubar “overnight” a 56° C. Adicionar 500 µL de fenol tamponado (Sigma, USA) e homogeneizar por 5 minutos, a seguir centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm, transferir a fase aquosa para um novo microtubo e repetir a extração com fenol tamponado. Transferir a fase aquosa para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionar 500 µL de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1), homogeneizando bem por 5 minutos; a seguir, centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm e desprezar a fase orgânica. Repetir a extração com clorofórmio : álcool isomílico (24:1) e transferir a fase aquosa para um novo tubo. À fase aquosa, adicionar 50 µL acetato de sódio 3M pH 5,2 e 750 µL de etanol absoluto gelado, armazenar *overnight* em freezer -20° C. Centrifugar por 30 minutos a 13.000 rpm em temperatura ambiente. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 50 µL de água destilada e deionizada e lavar com 500 µL de etanol

absoluto, centrifugar por 30 minutos a 13.000 rpm em temperatura ambiente e secar o *pellet* em centrífuga concentradora à vácuo. Ressuspender o *pellet* em 20 µL de tampão TE pH 7,5 (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8,0).

3.4.2. QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação e análise da pureza dos extratos de DNA foram realizadas em espectrofotômetro após diluição das amostras (1:20) em tampão TE (SAMBROOK *et al.*, 1989).

As amostras também foram analisadas quanto a sua integridade, em gel de agarose a 1% em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM, EDTA 2,5 mM) sem marcador molecular. A 5µL do produto de extração foi adicionado 1 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianlo FF 0,25% e glicerol 30%) e a separação eletroforética foi realizada a 100V, 60 mA por 30 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas e as imagens documentadas.

3.4.3. AMPLIFICAÇÃO DO mtDNA PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

As regiões HV1 e HV2 do mtDNA foram amplificadas pela técnica PCR (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS *et al.*, 1986; MULLIS & FALOONA, 1987), utilizando-se iniciadores previamente descritos, de acordo com o quadro abaixo.

QUADRO A : Iniciadores utilizados para amplificação das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA

Região	Posição do mtDNA	Tamanho	Fragmento Amplificado
HV1	L15,977 - L15,997 ^{a,b,c}	20 pb	418
	H16,415 - H16,395 ^a	20 pb	
HV2	L028 - L048 ^a	20 pb	398
	H430 - H408 ^{a, b, c}	22 pb	

a – Wilson *et al.*, 1995

b – Baasner *et al.*, 1998

c – Carracedo, *et al.*, 1998

Figura 1. Esquema representativo das regiões em que os iniciadores se localizam para amplificação das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 da região de controle do mtDNA.

A reação de amplificação foi feita em volume final de 50 μ L, aplicando-se 1 unidade da enzima *Taq* DNA Polimerase 1U/ μ L, tampão de reação de PCR (Tris-HCl a 75 mM; MgCl₂ a 1,5 mM e KCl a 50 mM), desoxinucleotídeos (dNTPs) na concentração final de 200 μ M e 1 μ M de cada iniciador. A reação foi realizada nas seguintes condições:

QUADRO B: Programa utilizado para amplificação da região o hipervariável HV1 empregando os iniciadores L15997 e H 16395

Desnaturação inicial	95°C	2 minutos	
Desnaturação	95°C	45 segundos	
Hibridação	51° C	1 minuto	32 ciclos
Polimerização	72°C	2 minutos	
Elongação final	20 °C	10 minutos	

QUADRO C: Programa utilizado para amplificação da região hipervariável HV2 empregando os iniciadores L48 e H408

Desnaturação inicial	95°C	2 minutos	
Desnaturação	95°C	45 segundos	
Hibridação	50° C	1 minuto	35 ciclos
Polimerização	72°C	2 minutos	
Elongação final	20 °C	10 minutos	

3.4.4. ANÁLISE E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

A qualidade da amostra de DNA é um dos fatores mais críticos no seqüenciamento semi-automático, portanto o DNA deve estar livre de contaminantes.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM, EDTA 2,5 mM), juntamente com um marcador de tamanho molecular de 100 pares de base. A 5 µL do produto de PCR foram adicionados 2 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianlo FF 0,25% e glicerol 30%) e a separação eletroforética foi

realizada a 100V, 60 mA por 40 minutos. O produto de DNA foram digitalizados e as imagens foram documentadas.

Havendo somente a presença de um fragmento único, as amostras foram purificadas empregando-se o QIAquick PCR purification Kit para eliminação do excesso de sais e reagentes.

Após a purificação, o DNA foi avaliado e quantificado através de eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM, EDTA 2,5 mM) comparando-se com um padrão de densidade de DNA. A 4 μ L do produto de PCR foi adicionado 1 μ L de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianlo FF 0,25% e glicerol 30%) e a separação eletroforética foi realizada a 100V, 60 mA por 35 minutos. A concentração do produto de PCR foi ajustada para 20 ng/ μ L com água ultrapura.

3.4.5. SEQUÊNCIAMENTO do mtDNA:

Foram fornecidos 10 μ L de produto de PCR a 20ng/ μ L e sequenciadas as fitas “sense” e “anti-sense:” separadamente. A reação de sequenciamento foi realizada pelo Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo com o equipamento Megabace 1000 (Pharmacia – Upsala, Suécia), conforme procedimentos abaixo:

Foi utilizado aproximadamente 70ng de produto de PCR num volume de reação de 20 μ L, adicionando-se 5 pmoles de primer (1 μ L de solução a 5 μ M) aplicando-se o seguinte protocolo:

DYEnamic ET Terminator reagent premix	8,0 μ L
Primer (5 μ M)	1,0 μ L
Produto de PCR (20ng/ μ L)	3,5 μ L
H ₂ O ultrapura	7,5 μ L
	<hr/> 20,0 μ L

Para a ciclagem foi utilizado o seguinte protocolo:

95 °C	20 segundos	
50 °C	30 segundos	30 ciclos
60 °C	2 minutos	

A purificação pós-reação foi feito por precipitação com Acetato de Amônia 7,5 M, etanol absoluto e centrifugação, após a secagem, o pellet foi ressuspenso em Loading Solution e aplicado no sequenciador.

As amostras foram injetadas no sequenciador a 3KV (kilovolts) durante 150 segundos e a corrida eletroforética foi realizada a 9 Kv por 120 minutos.

A sequência de cada uma das fitas sequenciadas foi sobreposta, alinhada e analisada utilizando o programa BLAST II na URL: [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html). para identificação de bases polimórficas em relação a sequência de Anderson, e o número de acesso para HV-1 (número de acesso AF243627-AF243796) e HV-2 (número de acesso AF243539-AF243626). Bases ambíguas entre as duas sequências foram resolvidas através do programa BioEdit Versão 5.0.9 - Department of Microbiology North Carolina State University (HALL, 1999). Os polimorfismos de comprimento foram tratados segundo recomendações de WILSON e colaboradores (2002).

Figura 2: Imagem do programa BioEdit utilizado para análise dos eletroferogramas e resolução de ambiguidades da reação de sequenciamento.

3.4.6. CONTROLE DE QUALIDADE

Para avaliar a ausência de contaminação durante o processo de extração das amostras de mancha de sangue, foi feito um controle negativo dos reagentes, procedendo-se todo processo de extração sem amostra.

Para avaliar a ausência de contaminantes na técnica de PCR, foi utilizado um controle de reagentes, o qual contém todas as soluções de amplificação, exceto o DNA que é substituído por água estéril.

3.4.7. ANÁLISE DOS RESULTADOS

A frequência de polimorfismo encontrada em cada posição de nucleotídeo em relação da sequência de Anderson foi calculada dividindo-se o número de ocorrências pelo tamanho da amostra.

O cálculo da frequência (q) de um determinado haplótipo na população foi feito pela contagem do número de vezes que esta sequência foi observada na população e dividido pelo número de sequências disponíveis no banco de dados (BUDOWLE, *et al.*, 1993)

O índice de diversidade genética (equivalente à taxa de heterozigose) esperado numa população pan-mítica foi calculado conforme descrito por NEI e TAJIMA (1981) o qual representa a probabilidade de duas amostras, colhidas aleatoriamente, apresentarem sequências distintas, sendo estimado em:

$$h = (1 - \sum x^2)$$

onde x é a frequência de cada haplótipo de mtDNA.

A probabilidade de semelhança (taxa de identidade) é a chance de se encontrar dois haplótipos colhidos ao acaso e idênticos quanto ao seu mtDNA. Evidentemente essa probabilidade tem valor complementar ao índice h

$$P = (1 - h) = \sum x^2$$

A análise incluiu a comparação pareada entre todas as sequências encontradas para estabelecer a média do número de resíduos de nucleotídeos diferentes entre as amostras, que foi feito através de programa desenvolvido pelo Professor Titular Paulo Alberto Otto do Instituto de Biociências da USP, a qual agradecemos a gentileza da colaboração.

3.4.8. ASPECTOS ÉTICOS DO PROJETO

Este projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em 27 de junho tendo sido aprovado conforme Ofício CEP Nº 52 de 03 de agosto de 2001.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENÇÃO DE PRODUTO DE PCR DAS REGIÕES HV1 E HV2 DO mtDNA.

Na figura 3, pode-se observar os fragmentos de 416 pb obtidos pela PCR da região HV1 do mtDNA e na figura 4 os fragmentos de 398 pb obtidos pela PCR da região HV2 do mtDNA. Na figura 5 observa-se o produto de PCR purificado juntamente com um padrão de densidade de DNA para quantificação.

Figura 3. Fotografia do gel de agarose a 2% dos fragmentos de 416 pb amplificados pela PCR da região HV1 do mtDNA, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil Image™ Alpha Innotech Corporation. P corresponde ao marcador de tamanho molecular de DNA (100 pb) e B controle negativo da reação de PCR.

Figura 4. Fotografia do gel de agarose a 2% dos fragmentos de 398 pb amplificados pela PCR da região HV2 do mtDNA, após coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation. P corresponde ao marcador de tamanho molecular de DNA (100 pb)

Figura 5: Fotografia do gel de agarose a 2% dos fragmentos de 398pb da região HV2 do mtDNA após purificação e coloração com brometo de etídio e sob luz ultravioleta, obtida no sistema digital Multil ImageTM Alpha Innotech Corporation. P corresponde ao marcador de concentração para quantificação do DNA.

4.2. RESULTADO DOS POLIMORFISMOS E FREQUÊNCIAS

Os resultados da avaliação dos polimorfismos das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA, em uma amostragem da população da cidade de São Paulo, assim como, a frequência destas alterações apresentaram uma heterogeneidade significativa que poderá ser observada a seguir.

No **Quadro 1**, estão discriminados os polimorfismos encontrados na região hipervariável HV1 do mtDNA dos indivíduos avaliados e a frequência do polimorfismo obtida em cada posição de nucleotídeo em relação a sequência de Anderson ou CRS (sequência de Anderson revisada), obtida através da contagem do número de ocorrências pelo tamanho da amostragem.

Foram observadas 85 regiões polimórficas, sendo que 8 delas com mais de uma variante polimórfica. Nos nucleotídeos 16.078 e 16.325 foram observadas ocorrência de transições e deleções; nas regiões 16.182, 16188 e 16319 foram encontradas transições e transversões; as posições 16.265 e 16.286 apresentaram duas variantes diferentes de transversão e no nucleotídeo 16.193 observou-se transições e inserções de citosina.

Das 93 as regiões polimórficas, considerando as variantes como uma região poimórfica, observou-se que 45,2% dos nucleotídeos apresentaram apenas uma ocorrência de alteração no grupo estudado, 40,8% das posições de nucleotídeo apresentaram frequências de polimorfismos entre 2 e 11% e somente 14% apresentaram frequências superiores a 11%. As posições mais polimórficas foram 16.223, 16.129, 16.278, 16.311 e 16.294, e a substituição C → T na posição 16.223 a mais predominante com uma ocorrência de 64,29% entre os indivíduos avaliados.

Quadro 1: Frequência de polimorfismo comparadas à sequência de Anderson, da região hipervariável HV1 do mtDNA de amostras de 84 indivíduos não aparentados da população brasileira.

Posição	16.051	16.056	16.066	16.069	16.071	16.078	16.078	16.081	16.092	16.093	16.111	16.114
CRS	A	C	A	C	C	A	A	A	T	T	C	C
Alteração	G	A	G	T	T	G	-	-	C	C	T	A
Nº Ocorrências	2	1	1	3	2	1	1	1	3	7	5	1
Frequência	0,0238	0,0119	0,0119	0,0357	0,0238	0,0119	0,0119	0,0119	0,0357	0,0833	0,0595	0,0119
Posição	16.124	16.126	16.129	16.145	16.148	16.153	16.158	16.163	16.166	16.168	16.172	16.173
CRS	T	T	G	G	C	G	A	A	A	C	T	C
Alteração	C	C	A	A	T	A	G	G	G	T	C	T
Nº Ocorrências	1	11	10	3	7	2	1	2	1	2	11	2
Frequência	0,0119	0,1310	0,1190	0,0357	0,0833	0,0238	0,0119	0,0238	0,0119	0,0238	0,1310	0,0238
Posição	16.176	16.178	16.179	16.182	16.182	16.183	16.184	16.186	16.187	16.188	16.188	16.189
CRS	C	T	C	A	A	A	C	C	C	C	C	T
Alteração	T	C	T	C	G	C	A	T	T	G	T	C
Nº Ocorrências	3	1	1	3	1	11	1	3	12	5	2	29
Frequência	0,0357	0,0119	0,0119	0,0357	0,0119	0,1310	0,0119	0,0357	0,1429	0,0595	0,0238	0,3452
Posição	16.190	16.192	16.193	16.193.1	16.209	16.210	16.213	16.215	16.217	16.220	16.223	16.224
CRS	C	C	C	-	T	A	G	A	T	A	C	T
Alteração	T	T	T	C	C	G	A	G	C	G	T	C
Nº Ocorrências	1	4	2	5	3	1	3	1	8	1	54	4
Frequência	0,0119	0,0476	0,0238	0,0595	0,0357	0,0119	0,0357	0,0119	0,0952	0,0119	0,6429	0,0476
Posição	16.230	16.234	16.235	16.239	16.241	16.243	16.249	16.256	16.259	16.260	16.261	16.264
CRS	A	C	A	C	A	T	T	C	C	C	C	C
Alteração	G	T	G	T	G	C	C	T	G	T	T	T
Nº Ocorrências	6	1	1	1	4	1	1	2	1	1	1	1
Frequência	0,0714	0,0119	0,0119	0,0119	0,0476	0,0119	0,0119	0,0238	0,0119	0,0119	0,0119	0,0119
Posição	16.265	16.265	16.269	16.270	16.274	16.278	16.284	16.286	16.286	16.290	16.292	16.293
CRS	A	A	A	C	G	C	A	C	C	C	C	A
Alteração	C	T	G	T	A	T	G	A	G	T	T	G
Nº Ocorrências	3	1	1	3	1	18	1	1	2	9	1	3
Frequência	0,0357	0,0119	0,0119	0,0357	0,0119	0,2143	0,0119	0,0119	0,0238	0,1071	0,0119	0,0357
Posição	16.294	16.295	16.298	16.300	16.304	16.309	16.311	16.318	16.319	16.319	16.320	16.325
CRS	C	C	T	A	T	A	T	A	G	G	C	T
Alteração	T	T	C	C	C	G	C	-	A	T	T	C
Nº Ocorrências	15	1	8	1	3	3	18	1	8	1	12	8
Frequência	0,1786	0,0119	0,0952	0,0119	0,0357	0,0357	0,2143	0,0119	0,0952	0,0119	0,1429	0,0952
Posição	16.325	16.327	16.342	16.343	16.355	16.356	16.360	16.362	16.365			
CRS	T	C	T	A	C	T	C	T	C			
Alteração	-	T	C	G	T	C	T	C	G			
Nº Ocorrências	1	13	1	1	1	1	3	14	1			
Frequência	0,0119	0,1548	0,0119	0,0119	0,0119	0,0119	0,0357	0,1667	0,0119			

CRS – Cambridge Reference Sequence (Andrews et al., 1999);

C – Citosina; G – Guanina; T – Timina; A – Adenina

- Regiões que possuem mais de uma variante polimórfica
- Polimorfismos encontrados somente entre os brancos
- Polimorfismos encontrados somente entre os negros

Das 93 regiões polimórficas, incluindo as variantes, 24 foram observadas somente entre os indivíduos que se declararam brancos e 24 foram encontradas entre os indivíduos que se declararam negros. Dentre as regiões que apresentaram mais de uma variante polimórfica, observa-se que as transversões C→G e C→T na posição 16.188 ocorrem somente entre os brancos e, além da transversão G16319T, a deleção de T no nucleotídeo 16.325 também foi encontrada nos indivíduos que se declararam brancos. Dentre as variantes observadas entre os indivíduos negros, encontrou-se a transversão A→T na posição 16.265.

No **Quadro 2** estão apresentados os resultados obtidos da avaliação dos polimorfismos na região hipervariável HV1 do mtDNA dos indivíduos que se declararam brancos. Foram caracterizadas ao todo, 63 regiões polimórficas, com 3 regiões com mais de uma variante polimórfica.

Foram constadas que as regiões com maior frequência de alterações foram as dos nucleotídeos 16.223, 16.189 e 16.311.

Entre as 67 regiões polimórficas, incluindo as variantes, verificou-se que 37,31% apresentaram uma única ocorrência de alteração no grupo estudado, 58,20% das regiões apresentaram frequências entre 4 e 20% e 4,49% dos nucleotídeos apresentaram frequência superior a 20%.

No **Quadro 3** estão apresentados os resultados dos polimorfismos encontrados na região hipervariável HV1 de indivíduos que se declararam negros, descrevendo as alterações e a frequência dos polimorfismos para cada posição de nucleotídeo em comparação a seqüência de ANDERSON.

Foram observadas neste grupo 64 regiões polimórficas, ao total, sendo que 2 delas contendo mais de uma variante. As regiões mais polimórficas deste grupo foram as dos nucleotídeos 16.223, 16.189 e 16.278.

Entre as 66 regiões polimórficas, incluindo as variantes, verificou-se que 62,12% apresentaram uma única ocorrência de polimorfismo no grupo de indivíduos estudados, 34,85% das regiões apresentaram frequências entre 5% e 28% e 3,03% dos nucleotídeos apresentaram frequências superiores a 28%.

Quadro 2 : Freqüência de polimorfismo encontrado na região hipervariável HV1 do mtDNA de 49 indivíduos, não aparentados, que declararam brancos.

Posição	16.051	16.069	16.071	16.078	16.092	16.093	16.111	16.126	16.129	16.145
CRS	A	C	C	A	T	T	C	T	G	G
Alteração	G	T	T	-	C	C	T	C	A	A
Nº Ocorrências	2	2	1	1	1	4	4	7	5	1
Freqüência	0,0408	0,0408	0,0204	0,0204	0,0204	0,0816	0,0816	0,1429	0,102	0,0204

Posição	16.148	16.153	16.163	16.166	16.168	16.172	16.173	16.176	16.178	16.179
CRS	C	G	A	A	C	T	C	C	T	C
Alteração	T	A	G	G	T	C	T	T	C	T
Nº Ocorrências	6	2	2	1	2	7	2	2	1	1
Freqüência	0,1224	0,0408	0,0408	0,0204	0,0408	0,1429	0,0408	0,0408	0,0204	0,0204

Posição	16.182	16.182	16.183	16.184	16.186	16.187	16.188	16.188	16.189	16.190
CRS	A	A	A	C	C	C	C	C	T	C
Alteração	C	G	C	A	T	T	G	T	C	T
Nº Ocorrências	2	1	5	1	2	8	5	1	17	1
Freqüência	0,0408	0,0204	0,102	0,0204	0,0408	0,1633	0,102	0,0204	0,3469	0,0204

Posição	16.192	16.193.1	16.209	16.210	16.213	16.215	16.217	16.223	16.224	16.230
CRS	C	-	T	A	G	A	T	C	T	A
Alteração	T	C	C	G	A	G	C	T	C	G
Nº Ocorrências	1	2	2	1	1	1	3	29	3	5
Freqüência	0,0204	0,0408	0,0408	0,0204	0,0204	0,0204	0,0612	0,5918	0,0612	0,102

Posição	16.234	16.241	16.256	16.259	16.260	16.265	16.270	16.278	16.284	16.286
CRS	C	A	C	C	C	A	C	C	A	C
Alteração	T	G	T	G	T	C	T	T	G	G
Nº Ocorrências	1	1	2	1	1	2	2	8	1	2
Freqüência	0,0204	0,0204	0,0408	0,0204	0,0204	0,0408	0,0408	0,1633	0,0204	0,0408

Posição	16.290	16.293	16.294	16.298	16.304	16.311	16.319	16.319	16.320	16.325
CRS	C	A	C	T	T	T	G	G	C	T
Alteração	T	G	T	C	C	C	A	T	T	C
Nº Ocorrências	8	2	8	6	2	12	7	1	8	4
Freqüência	0,1633	0,0408	0,1633	0,1224	0,0408	0,2449	0,1429	0,0204	0,1633	0,0816

Posição	16.325	16.327	16.343	16.356	16.360	16.362	16.365
CRS	T	C	A	T	C	T	C
Alteração	-	T	G	C	T	C	G
Nº Ocorrências	1	7	1	1	2	7	1
Freqüência	0,0204	0,1429	0,0204	0,0204	0,0408	0,1429	0,0204

Regiões que possuem mais de uma variante polimórfica
 CRS – Cambridge Reference Sequence (Andrews et al., 1999);
 C – Citosina; G – Guanina; T – Timina; A – Adenina

Quadro 3 : Freqüência de polimorfismo encontrado na região hipervariável HV1 do mtDNA de 35 indivíduos, não aparentados, que se declararam negros

Posição	16.056	16.066	16.069	16.071	16.078	16.081	16.092	16.093	16.111	16.114
CRS	C	A	C	C	A	A	T	T	C	C
Alteração	A	G	T	T	G	-	C	C	T	A
Nº Ocorrências	1	1	1	1	1	1	2	3	1	1
Freqüência	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0571	0,0857	0,0286	0,0286

Posição	16.124	16.126	16.129	16.145	16.148	16.158	16.172	16.176	16.182	16.183
CRS	T	T	G	G	C	A	T	C	A	A
Alteração	C	C	A	A	T	G	C	T	C	C
Nº Ocorrências	1	4	5	2	1	1	4	1	1	6
Freqüência	0,0286	0,1143	0,1429	0,0571	0,0286	0,0286	0,1143	0,0286	0,0286	0,1714

Posição	16.186	16.187	16.189	16.192	16.193	16.193.1	16.209	16.213	16.217	16.220
CRS	C	C	T	C	C	-	T	G	T	A
Alteração	T	T	C	T	T	C	C	A	C	G
Nº Ocorrências	1	4	12	3	2	3	1	2	5	1
Freqüência	0,0286	0,1143	0,3429	0,0857	0,0571	0,0857	0,0286	0,0571	0,1429	0,0286

Posição	16.223	16.224	16.230	16.235	16.239	16.241	16.243	16.249	16.261	16.264
CRS	C	T	A	A	C	A	T	T	C	C
Alteração	T	C	G	G	T	G	C	C	T	T
Nº Ocorrências	25	1	1	1	1	3	1	1	1	1
Freqüência	0,7143	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0857	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286

Posição	16.265	16.265	16.269	16.270	16.274	16.278	16.286	16.290	16.292	16.293
CRS	A	A	A	C	G	C	C	C	C	A
Alteração	C	T	G	T	A	T	A	T	T	G
Nº Ocorrências	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1
Freqüência	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,2857	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286

Posição	16.294	16.295	16.298	16.300	16.304	16.309	16.311	16.318	16.319	16.320
CRS	C	C	T	A	T	A	T	A	G	C
Alteração	T	T	C	C	C	G	C	-	A	T
Nº Ocorrências	7	1	2	1	1	3	6	1	1	4
Freqüência	0,2000	0,0286	0,0571	0,0286	0,0286	0,0857	0,1714	0,0286	0,0286	0,1143

Posição	16.325	16.327	16.342	16.355	16.360	16.362
CRS	T	C	T	C	C	T
Alteração	C	T	C	T	T	C
Nº Ocorrências	4	6	1	1	1	7
Freqüência	0,1143	0,1714	0,0286	0,0286	0,0286	0,2000

Regiões que possuem mais de uma variante polimórfica
 CRS – Cambridge Reference Sequence (Andrews et al., 1999);
 C – Citosina; G – Guanina; T – Timina; A – Adenina

É interessante observar que a transição C16223T é predominante nos dois grupos e é o polimorfismo mais comum na região HV1 da população estudada.

O **Quadro 4** apresenta os resultados dos polimorfismos encontrados na região hipervariável HV2 do mtDNA dos indivíduos avaliados, descrevendo o tipo de alteração encontrada (substituição de base, inserção ou deleção). A frequência do polimorfismo descrita em cada posição foi obtida através da contagem do número de ocorrências pelo tamanho da amostragem.

Foram observadas 43 regiões polimórficas no total, entre as quais 3 delas apresentaram mais de um tipo de polimorfismo. Nas regiões 185, 186 e 189 foram observadas transições e transversões. Três regiões apresentaram inserções em relação à sequência de Anderson e corresponderam às regiões 309.1, 309.2 e 315.1.

Considerando as 49 regiões polimórficas encontradas, incluindo as variantes e inserções, observou-se que 30,6% dos nucleotídeos apresentaram apenas uma ocorrência de polimorfismo no grupo estudado; 51% apresentaram frequências de ocorrência entre 2% e 11%; 14,2% das regiões apresentaram frequências entre 13,10% e 59,52% e apenas 4,08% dos nucleotídeos apresentaram frequências superiores a 60%.

Os nucleotídeos que apresentaram maior frequência de polimorfismos foram, em ordem decrescente, 263, 73, 309.1, sendo que a inserção de citosina na posição 315.1 foi observada em todos os indivíduos estudados.

Entre as 49 regiões polimórficas, incluindo as variantes e inserções, 15 foram verificadas entre os indivíduos que se declararam brancos e três foram encontradas exclusivamente entre os indivíduos que se declararam negros. Observa-se que a variante da transição C → T na posição 186 foi encontrada somente em um indivíduo branco.

Quadro 4: Frequência de polimorfismos em relação a sequência de Anderson, encontrados na região hipervariável HV2 do mtDNA de 84 indivíduos não aparentados da população brasileira.

Posição	71	73	93	95	103	114	143	146	150	151
CRS	G	A	A	A	G	C	G	T	C	C
Alteração	A	G	G	C	A	T	A	C	T	T
Nº de Ocorrências	1	70	6	3	2	1	4	20	19	4
Frequência	0,0119	0,8333	0,0714	0,0357	0,0238	0,0119	0,0476	0,2381	0,2262	0,0476

Posição	152	153	182	185	185	186	186	189	189	194
CRS	T	A	C	G	G	C	C	A	A	C
Alteração	C	G	T	A	T	A	T	G	C	T
Nº de Ocorrências	33	8	4	5	1	3	1	14	3	2
Frequência	0,3929	0,0952	0,0476	0,0595	0,0119	0,0357	0,0119	0,1667	0,0357	0,0238

Posição	195	198	199	200	204	207	210	228	235	236
CRS	T	C	T	A	T	G	A	G	A	T
Alteração	C	T	C	G	C	A	G	A	G	C
Nº de Ocorrências	27	8	1	7	3	1	1	1	9	5
Frequência	0,3214	0,0952	0,0119	0,0833	0,0357	0,0119	0,0119	0,0119	0,1071	0,0595

Posição	247	249	263	272	278	279	282	290	291	295
CRS	G	A	A	A	A	T	T	A	A	C
Alteração	A	-	G	G	C	C	C	-	-	T
Nº de Ocorrências	10	8	83	1	1	2	1	8	8	3
Frequência	0,1190	0,0952	0,9881	0,0119	0,0119	0,0238	0,0119	0,0952	0,0952	0,0357

Posição	297	306	307	308	309	309.1	309.2	315.1	316
CRS	A	C	C	C	C	-	-	-	G
Alteração	G	-	-	-	-	C	-	C	A
Nº de Ocorrências	6	1	1	1	1	47	7	84	4
Frequência	0,0714	0,0119	0,0119	0,0119	0,0119	0,5595	0,0833	1,0000	0,0476

CRS – Cambridge Reference Sequence (Andrews et al., 1999);

C – Citosina; G – Guanina; T – Timina; A – Adenina

Regiões que possuem mais de uma variante polimórfica

Polimorfismo encontrado somente entre indivíduos que se declararam brancos

Polimorfismo encontrado somente entre indivíduos que se declararam negros

No **Quadro 5** estão demonstrados os polimorfismos encontrados na região hipervariável HV2 do mtDNA dos indivíduos que se declararam brancos. Observou-se neste grupo 40 regiões polimórficas no mtDNA, sendo duas delas, nas regiões 186 e 189, com mais que uma variante, e 3 regiões correspondentes a inserções nos nucleotídeos 309.1, 309.2 e 315.1. Encontrou-se nas regiões 263, 100% de transição A→G e inserções de citosina na posição 315.1 em todos os indivíduos estudados.

Considerando 45 regiões polimórficas, incluindo as variantes e inserções, observou-se que 31,1 % das regiões apresentaram apenas uma ocorrência de alteração, 53,3% apresentaram entre duas a dez alterações e 15,6% dos nucleotídeos apresentaram mais de dez alterações na mesma posição.

No **Quadro 6** estão tabulados os polimorfismos encontrados na região hipervariável HV2 do mtDNA dos indivíduos que se declararam negros. Observou-se neste grupo 30 regiões polimórficas sendo que a posição 189 apresenta mais de uma variante com transições e uma transversão.

Encontrou-se também neste grupo inserções de citosina na posição 315.1 em todos os indivíduos estudados. Os nucleotídeos que apresentaram maior frequência de polimorfismos foram, em ordem decrescente, 73, 309.1 e 152.

Considerando 33 regiões polimórficas, incluindo as variantes e inserções, observou-se que 39,4 % das regiões apresentaram apenas uma ocorrência de alteração, 42,4% apresentaram entre duas a dez alterações e 18,2% dos nucleotídeos apresentaram mais de dez alterações na mesma posição.

Quadro 5: Frequências de polimorfismo encontradas na região hipervariável HV2 do mtDNA de 49 indivíduos não aparentados que se declararam brancos.

Posição	71	73	93	95	103	114	143	146	150	151
CRS	G	A	A	A	G	C	G	T	C	C
Alteração	A	G	G	C	A	T	A	C	T	T
Nº Ocorrências	1	36	5	3	1	1	1	11	10	2
Frequência	0,0204	0,7347	0,102	0,0612	0,0204	0,0204	0,0204	0,2245	0,2041	0,0408

Posição	152	153	182	185	186	186	189	189	194	195
CRS	T	A	C	G	C	C	A	A	C	T
Alteração	C	G	T	A	A	T	G	C	T	C
Nº Ocorrências	18	7	2	5	2	1	9	2	2	11
Frequência	0,3673	0,1429	0,0408	0,102	0,0408	0,0204	0,1837	0,0408	0,0408	0,2245

Posição	198	199	200	204	207	210	228	235	236	247
CRS	C	T	A	T	G	A	G	A	T	G
Alteração	T	C	G	C	A	G	A	G	C	A
Nº Ocorrências	3	1	3	2	1	1	1	7	5	7
Frequência	0,0612	0,0204	0,0612	0,0408	0,0204	0,0204	0,0204	0,1429	0,102	0,1429

Posição	249	263	282	290	291	295	297	306	307	308
CRS	A	A	T	A	A	C	A	C	C	C
Alteração	-	G	C	-	-	T	G	-	-	-
Nº Ocorrências	5	49	1	5	5	2	5	1	1	1
Frequência	0,102	1	0,0204	0,102	0,102	0,0408	0,102	0,0204	0,0204	0,0204

Posição	309	309.1	309.2	315.1	316
CRS	C	-	-	-	G
Alteração	-	C	C	C	A
Nº Ocorrências	1	26	6	49	2
Frequência	0,0204	0,5306	0,1224	1	0,0408

Regiões que possuem mais de uma variante polimórfica
 CRS – Cambridge Reference Sequence (Andrews et al., 1999);
 C – Citosina; G – Guanina; T – Timina; A – Adenina

Quadro 6: Freqüências de polimorfismo encontradas na região hipervariável HV2 do mtDNA de 35 indivíduos não aparentados que se declararam negros.

Posição	73	93	103	143	146	150	151	152	153	182
CRS	A	A	G	G	T	C	C	T	A	C
Alteração	G	G	A	A	C	T	T	C	G	T
Nº Ocorrências	34	1	1	3	10	10	2	15	1	2
Freqüência	0,9714	0,0286	0,0286	0,0857	0,2857	0,2857	0,0571	0,4286	0,0286	0,0571

Posição	185	186	189	189	195	198	200	204	235	247
CRS	G	C	A	A	T	C	A	T	A	G
Alteração	T	A	G	C	C	T	G	C	G	A
Nº Ocorrências	1	1	5	1	16	5	4	1	2	3
Freqüência	0,0286	0,0286	0,1429	0,0286	0,4571	0,1429	0,1143	0,0286	0,0571	0,0857

Posição	249	263	272	278	279	290	291	295	297	309.1
CRS	A	A	A	A	T	A	A	C	A	-
Alteração	-	G	G	C	C	-	-	T	G	C
Nº Ocorrências	3	34	1	1	2	2	2	1	1	21
Freqüência	0,0857	0,9714	0,0286	0,0286	0,0571	0,0571	0,0571	0,0286	0,0286	0,6

Posição	309.2	315.1	316
CRS	-	-	G
Alteração	C	C	A
Nº Ocorrências	1	35	1
Freqüência	0,0286	1	0,0286

Regiões que possuem mais de uma variante polimórfica
 CRS – Cambridge Reference Sequence (Andrews et al., 1999);
 C – Citosina; G – Guanina; T – Timina; A – Adenina

No presente estudo, as regiões hipervariáveis HV1 e HV2, dos indivíduos do grupo de brancos apresentaram 106 posições polimórficas ao passo que as mesmas regiões dos indivíduos do grupo de negros apresentaram 97 posições polimórficas em relação a sequência de Anderson.

Na Tabela 1 observa-se que o número de polimorfismos em um segmento de 269 pares de bases da região hipervariável HV2 apresentaram 544 polimorfismos, número superior ao da região HV1, onde foi observado 419 polimorfismos em uma sequência contendo 314 pares de bases. Verificou-se também que o polimorfismo predominante na região HV1 é de

transição (89,97%) seguido de transversão (7,88%), enquanto que na região HV2 temos um predomínio e transição (67,46%) seguido de inserção (25,36%) que ocorre principalmente na região homopolimérica C .

Tabela 1: Frequência de polimorfismo das regiões hipervariáveis HV 1 e HV 2 do mtDNA de 84 indivíduos não aparentados, na amostra avaliada.

	HV1	HV2
Número total de Polimorfismos	419	544
Transições	89,97%	67,46%
Transversões	7,88%	2,02%
Inserções	1,20%	25,36%
Deleções	0,95%	5,16%
Transição : Transversão	11,4 : 1	36,8 : 1

Na **Tabela 2** observa-se os tipos de polimorfismos encontrados nas regiões hipervariáveis HV1 e HV2 de 49 indivíduos brancos e 35 indivíduos negros, onde é mantida a proporção das frequências dos polimorfismos em relação ao grupo de estudo.

Tabela 2: Frequência de polimorfismo das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA de indivíduos não aparentados da amostra estudada, subdivididos em dois grupos: brancos e negros.

	HV1		HV2	
	Branco	Negro	Branco	Negro
Número total de Polimorfismos	243	176	320	224
Transições	90,12%	89,77%	66,56%	68,75%
Transversões	8,24%	7,39%	2,19%	1,79%
Inserções	0,82%	1,70%	25,31%	25,45%
Deleções	0,82%	1,14%	5,94%	4,01%
Transição : Transversão	10,95 : 1	12,15 : 1	30,4 : 1	38,5 : 1

A **Tabela 3** apresenta os tipos de transições observadas nas regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA. Verificou-se que na região HV1 há um predomínio de transições de pirimidinas (84,35%) enquanto que as substituições predominantes na região HV2 são as transições entre purinas (63,49%).

Tabela 3: Frequências relativas das transições encontradas nas regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA de 84 indivíduos não aparentados da população brasileira.

		HV1	HV2
Total de Transições		377	367
Transição de Pirimidinas	T → C	35,28%	25,07 %
	C → T	49,07%	11,44%
Transição de Purinas	A → G	8,49%	55,86%
	G → A	7,16%	7,63%

A – Adenina; C – Citosina; G – Guanina; T – Timina

A **Tabela 4** apresenta os tipos de transição que foram observadas para as regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA das populações branca e negra. Foi verificado que na região HV1 há um predomínio de transições de pirimidinas, 84,47% entre os brancos e 84,18% entre os negros. Na região HV2 as transições entre purinas correspondem a 66,20% das transições entre os brancos e 59,75% das transições entre negros.

Tabela 4: Frequências relativas das transições encontradas nas regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA de 49 indivíduos brancos e 35 indivíduos negros não aparentados.

		HV1		HV2	
		Brancos 219	Negros 158	Brancos 213	Negros 154
Transição de Pirimidinas	T → C	35,16%	36,08%	23,00%	27,92%
	C → T	49,31%	48,10%	10,80%	12,33%
Transição de Purinas	A → G	8,22%	8,86%	57,27%	53,89%
	G → A	7,31%	6,96%	8,93%	5,86%

No grupo de estudo, as transversões representaram apenas 4,56% do total de polimorfismos encontrados (**Tabela 5**). Verifica-se que a transversão A → C é a mais comum nos dois grupos e não foi encontrada nenhuma transversão com a base timina.

Tabela 5: Frequências absolutas das transversões e tipos de substituições de bases encontrados nas regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA de 84 indivíduos não aparentados avaliados.

		HV1		HV2	
		Brancos	Negros	Brancos	Negros
Transversões	A → C	9	9	6	2
	A → T	-	1	-	-
	C → G	9	-	-	-
	C → A	1	3	2	1
	G → T	1	-	-	1

Os haplótipos 16169A, 16148T, 16168T, 16172C, 16187T, 16188G, 16189C, 16223T, 16230G, 16278T, 16293G, 16311C, 16320T, 93G, 95C, 185A, 189G, 236C, 147A, 263G, 315.1C foram observados nos indivíduos 143 e 165, duas mulheres, que se declararam brancas, filhas de mães brancas, nascidas nos estado de São Paulo. O haplótipo 16176T, 16223T, 16327T, 73G, 150T, 152C, 189G, 200G, 263G, 315.1C foi encontrado nos indivíduos 38 e 82, duas mulheres nascidas nos estado de São Paulo, a primeira que se declarou branca, filha de mãe branca e a segunda que se declarou negra e filha de mãe negra. Os resultados apresentados nos **Quadro 1** e **Quadro 4** mostram diferenças no perfil de polimorfismos entre indivíduos caucasóides e negróides, o que caracterizam a origem geográfica de cada população e, portanto, são utilizadas como base para os estudos filogenéticos.

4.3. ÍNDICE DE DIVERSIDADE GENÉTICA E PROBABILIDADE DE SEMELHANÇA

A análise do mtDNA apresentou um total de 74 haplótipos distintos para a região hipervariável HV1, sendo 41 haplótipos característicos entre os brancos e 35 haplótipos definidos para os negros. Para região HV2, foram encontrados um total de 70 haplótipos distintos, sendo 42 haplótipos peculiares para os brancos e 31 haplótipos característicos para os negros. A análise combinada das regiões HV1 e HV2 forneceu 82 haplótipos distintos, sendo que duas seqüências apresentaram uma repetição. Baseados nestes dados de haplótipos, foram calculados os índices de diversidade genética e as probabilidades de semelhança entre as amostras avaliadas, que estão apresentadas na **Tabela 6**.

Tabela 6: Valores de Índice de diversidade genética (h) e Probabilidade de Semelhança (p) para regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA de indivíduos não aparentados avaliados.

	HV1		HV2		HV1 + HV2	
	h	p	h	p	h	p
Branco	0,9696	0,0304	0,9729	0,0271	0,9788	0,0212
Negro	0,9665	0,0335	0,9616	0,0384	0,9714	0,0286
Branco e Negro	0,9836	0,0164	0,9854	0,0146	0,9875	0,0125

h = índice de diversidade genética

P = probabilidade de semelhança entre 2 indivíduos não aparentados

HV1 e HV2= região hipervariável do mtDNA

4.4. ANÁLISE DE COMPARAÇÃO PAREADA

A comparação pareada é feita comparando duas a duas, cada sequência de mtDNA obtida para verificar o número de nucleotídeos diferentes entre os haplótipos. A análise de 3.486 pares de comparações feitas com as 84 sequências de mtDNA grupo de estudo (**Tabela 7**) apresentou uma média de 8,30 nucleotídeos de divergentes para a região HV1 e 6,07 resíduos de nucleotídeos diferentes para a região HV2. Combinando as duas regiões hipervariáveis HV1 e HV2, obtivemos uma diferença média de 14,37 nucleotídeos entre os haplótipos.

Tabela 7: Número de nucleotídeos divergentes existentes entre as sequências analisadas pelo teste da comparação pareada (Média $\pm$ desvio padrão).

Região do mtDNA	Número de nucleotídeos diferentes entre as sequências
HV1	8,30 $\pm$ 3,52
HV2	6,07 $\pm$ 2,86
HV1 + Hv2	14,37 $\pm$ 5,67
N = 84	

Os histogramas abaixo (**Figuras 6, 7 e 8**) mostram a distribuição de frequências absolutas de resíduos de nucleotídeos diferentes encontrados nas 84 seqüências de mtDNA estudadas. Valores encontram-se nas tabelas do anexo 3.

Figura 6: Distribuição da frequência absoluta de resíduos de nucleotídeos divergentes entre as seqüências da região HV1 do mtDNA de 84 indivíduos não aparentados da população estudada.

Figura 7: Distribuição da frequência absoluta de resíduos de nucleotídeos divergentes entre as seqüências da região HV2 do mtDNA de 84 indivíduos não aparentados da população estudada.

Figura 8: Distribuição da frequência absoluta de resíduos de nucleotídeos divergentes entre as seqüências da região HV1 e HV2 do mtDNA de 84 indivíduos não aparentados da população estudada.

5. DISCUSSÃO

A análise de mtDNA é uma ferramenta muito útil para identificação de pessoas desaparecidas, particularmente em casos de desastres, como catástrofes naturais e acidentes, nos quais número variável de indivíduos são submetidos a condições extremas de temperatura e pressão, como ocorre em acidentes aéreos. Também é utilizado para investigações forenses quando se envolvem evidências biológicas em quantidades diminutas e bastante degradadas. Mas para uso de mtDNA em casos forenses é necessário o conhecimento da frequência dos haplótipos de DNA da população a ser analisada, pois este dado será utilizado para avaliar estatisticamente o resultado obtido, evitando falsas inclusões.

O método usado neste trabalho para classificar os grupos pela cor, foi baseado nos critérios do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) que estabelece a auto-classificação do participante.

Segundo ALLEN *et. al.* (1998) análise de mtDNA nos permite inferir a origem geográfica do ancestral materno, desde que a população não seja muito miscigenada, o que não é o caso da brasileira que possui uma das populações mais heterogêneas do mundo (ALVES-SILVA, *et. al.*, 2000). Este fato se deve em parte aos cinco séculos de cruzamentos inter-étnicos, que a princípio ocorreram entre os vários grupos de nativos Ameríndios da América do Sul e mais tarde, logo após a chegada dos primeiros colonizadores, o cruzamento entre europeus e indígenas foi estimulado como forma para povoar a nova terra. No meio do século XVI, com a chegada dos primeiros escravos africanos para trabalharem nas lavouras, houve o início do cruzamento entre os três grupos: europeus, indígenas e africanos (BORTOLINI, *et. al.*, 1997). Após a abertura dos portos para nações amigas em 1808 o país recebeu grande número de imigrantes de outros países europeus como Itália, Espanha e Alemanha. No século XX iniciou a imigração dos povos orientais principalmente pelos de origem japonesa, libanesa e síria (ALVES-SILVA *et. al.*, 2000).

CALLEGARI-JACQUES e SALZANO (1999) estimaram que dos imigrantes que aportaram no Brasil entre 1500 e 1972, 58% eram de origem européia, 40% africana e 2% descendentes de asiáticos. Trabalhos recentes têm utilizado a análise do mtDNA para caracterizar a composição genética originária dos vários continentes e a influência na grande diversidade genética da população brasileira (ALVES-SILVA *et. al.*, 2000; BATISTA DOS SANTOS *et. al.*, 1999; SANTOS *et. al.*, 1999).

Embora não seja o objetivo principal deste trabalho, é interessante observar que no presente estudo, o polimorfismo mais comum encontrado na região hipervariável HV1 é a transição C16223T, comum entre populações de origem africana, nativos americanos e alguns povos asiáticos. Embora a caracterização de um haplogrupo dependa da presença de vários polimorfismos compondo um perfil específico para cada população e grupo étnico, foi utilizado o polimorfismo C16223T para diferenciar os indivíduos de origem européia dos de origem “negra” (incluindo os indígenas). Observamos que entre os 49 indivíduos que se declararam brancos 59,18% (29/49) possuem origem materna “não-branca”. Destes 29 indivíduos que se declararam brancos, 7 deles haviam declarado no questionário de entrevista que suas mães eram de origem negra mostrando uma inconsistência no método de auto classificação pela cor. Este fato corrobora com a utilização deste tipo de análise para estudos filogenéticos.

Entre os 35 indivíduos que se declararam negros, 71,43 % (25/35 indivíduos) possuem de fato, haplogrupo de origem “negra”, sendo os dez restantes pertencentes ao haplogrupo europeu. Destes dez indivíduos, três haviam declarado no questionário de entrevista serem suas mães brancas, portanto a sua cor de pele se deve a linhagem paterna.

Nos dados obtidos no presente estudo, 58% dos indivíduos se declararam brancos e 42% negros. A análise do mtDNA para determinação da linhagem materna utilizando apenas o polimorfismo C16223T, apresentou resultados ligeiramente discrepantes daqueles declarados pelo questionário, apresentando 64,3% dos indivíduos de origem “negra” e somente 35,7% de haplogrupos “brancos”.

Baseado neste resultado, a análise das seqüências de mtDNA mostrou-se útil para inferir a origem geográfica dos ancestrais maternos e para identificação de vínculo genético dos indivíduos estudados, embora não permita fazer nenhuma correlação entre as características fenotípicas com as genotípicas, pois a população brasileira é bastante miscigenada. Desta forma, a aplicação da análise do perfil do mtDNA para identificação humana na população brasileira, não permite classificar a cor da pele do indivíduo.

Dos quase 42% de indivíduos que se declararam brancos e filhos de mães brancas que apresentaram haplogrupo negróide, possivelmente há o desconhecimento de um ancestral negróide na sua linhagem matrilinea várias gerações anteriores ou pelo fato cultural do negro se auto denominar como pardo, moreno, mulato e, muitas vezes, como branco. O resultado obtido neste trabalho também é demonstrado pelo último censo realizado pelo IBGE no ano de 2000 onde 54% da população brasileira se declarou branca, 6,2 % preta e 38,45% parda (Censo 2000, IBGE). Se agruparmos os pretos e pardos como negróides, temos 44,66% de indivíduos que se declararam negros contra uma grande maioria branca o que, do ponto de vista de nossa percepção, não parece ser fiel e representativo da composição racial da população brasileira.

Considerando que a análise do mtDNA permite estudar a origem da linhagem materna de um indivíduo, uma vez que existem haplogrupos característicos para cada grupo populacional, lembramos que a análise das seqüência obtidas na região HV1 e HV2 do mtDNA deste estudo, apresentou dois haplótipos idênticos entre os indivíduos 38 e 82, que correspondem a duas mulheres, que se declararam branca e negra, respectivamente. As duas amostras apresentaram substituição C→T nas posições 16223 e 150 das regiões HV1 e HV2 respectivamente, caracterizando um haplogrupo L3e, tipicamente africano da região oeste da África como Angola e Camarões. Segundo ALVES-SILVA, *et. al.* (2000), os haplogrupos L3e e L1c constituem 49% da fração africana da população brasileira. As voluntárias foram procuradas para uma análise e questionamento mais detalhado para verificar a existência de algum vínculo familiar. Não foi constatado nenhum

vínculo familiar entre os dois indivíduos e a análise fenotípica (que é subjetiva) das duas mulheres caracterizou claramente uma como branca e outra negra. O indivíduo 38 foi questionado sobre sua origem materna, mas desconhecia qualquer ascendente negróide na sua linhagem materna, até duas gerações acima, portanto a ancestral negróide que lhe transmitiu este perfil de mtDNA deveria estar várias gerações anteriores.

Uma vez que existiu uma dificuldade de caracterizar os indivíduos pelas características fenotípicas de cor de pele, a nossa opção neste trabalho foi avaliar o índice de diversidade genética, a probabilidade de encontrar duas seqüências idênticas e comparação das seqüências pareadas no grupo sem divisão entre brancos e negros.

Foram encontradas 10 transversões em 4 regiões diferentes (95,186,189-282) do segmento hipervariável HV2, enquanto que em um estudo realizado com 50 indivíduos da população do norte da Alemanha, onde não foi descrito nenhuma transversão nesta região (BÄASNER *et. al.*, 1998). Foram também observados na região HV2 deste estudo que os nucleotídeos 186 e 189 apresentaram mais de uma variante polimórfica concordando com TSAI *et. al.* (2001) que observaram 8 posições com mais de um tipo de polimorfismo, seis delas com duas variantes e duas com três variantes.

Todos os 84 indivíduos analisados apresentaram inserção de citosina na posição 315.1 e quase a totalidade apresentou transição A263G. Alinhando estes resultados com estudos realizados em outros grupos populacionais, onde obtiveram as mesmas freqüências de alterações nestas regiões, reforça a evidência de que a seqüência de Anderson não é representativo da maioria dos haplótipos da população (TULLY, *et. al.*, 2001).

Conforme descrito por outros autores os polimorfismo de substituição são predominantes e dentre as substituições de bases, as transições correspondem a cerca de 92% das substituições (BUDOWLE *et. al.*, 1999a) encontramos em nosso grupo 94,41% de transições, sendo 91,63% entre os brancos e 92,39% entre os negros.

O **Quadro 8** apresenta o número de posições polimórficas de várias populações descritas na literatura. Foram encontrados no grupo de estudo, 85 posições contendo alterações de sequência da região HV1 do mtDNA comparado com 34 posições de japoneses do município de Aichi, 63 e 52 regiões polimórficas em alemães da região noroeste e oeste, respectivamente, 62 de italianos da região central e 102 posições polimórficas para HV1 em um grupo de 155 chineses de Taiwan. A análise da região HV2 do mtDNA dos 84 indivíduos brasileiros do estudo apresentou 43 posições contendo alterações em relação a sequência de Anderson comparado a 20 de japoneses do município de Aichi, 37 e 26 posições polimórficas em alemães da região noroeste e oeste, respectivamente, 44 em italianos da região central e 55 posições polimórficas para região HV2 em chineses de Taiwan.

Quadro 8: Número de regiões polimórficas para cada uma das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 de várias populações descritas na literatura e número de indivíduos avaliados.

População	n	HV1	HV1/n	HV2	HV2/n	Referência
Alemã (Oeste)	50	52	1,04	26	0,52	BÄASNER <i>et al.</i> , 1998
Alemã (Noroeste)	109	63	0,61	37	0,34	PFEIFFER <i>et al.</i> , 1999
Brasileira (Negros)	49	63	1,29	43	0,87	
Brasileira (Branços)	35	65	1,86	32	0,91	
Italiana (Central)	83	62	0,75	44	0,53	TAGLIABACCI <i>et al.</i> , 2001
Japonesa (Aichi)	50	34	0,68	20	0,40	KOYAMA <i>et al.</i> , 2002
Taiwanesa (Han)	155	102	0,66	55	0,36	TSAL <i>et al.</i> , 2001

n = número de indivíduos estudados

No mesmo **Quadro 8**, ao observar a razão entre o número de posições polimórficas e o tamanho da amostragem, a população brasileira, apresenta o maior número de posições polimórficas por indivíduo estudado.

Estudos realizados em outras populações demonstraram que a maioria dos haplótipos foi observada apenas uma vez na população estudada. Neste estudo 95,3% (80/84) dos haplótipos eram únicos na população. BUDOWLE *et. al.* (1999) compilando os dados de várias populações observou que os haplótipos de 60,30% (35/58) de asiáticos americanos foram observados apenas uma vez; 85,30% (93/109) de franceses; 64,6% (309/640) de caucasianos americanos e 79,2% (80/101) dos haplótipos dos austríacos eram únicos para o grupo estudado. Na população da etnia Han de Taiwan foram observados 96,13% (149/155) haplótipos únicos (TSAI *et. al.*, 2001). Os alemães da região oeste apresentaram 91,7 % (100/109) de seqüências únicas (PFEIFFER *et. al.*, 1999). Entre os índios Apaches e Navajos foram encontrados respectivamente 17,8% (32/180) e 25,8% (37/146), pois estas duas populações são muito pouco miscigenadas. Pode se observar que existe uma menor variedade de haplótipos em populações mais homogêneas.

Estes resultados são importantes no contexto Forense, uma vez que permitem inferir uma baixa a probabilidade de encontrar dois haplótipos idênticos entre indivíduos não aparentados e, conseqüentemente, quando há identidade entre uma evidência biológica e um suspeito, as chances de inclusão são bastante consistentes.

Ao avaliar as duas regiões HV1 e HV2 combinadas, classificando os indivíduos entre brancos e negros, observamos que 96% dos haplótipos entre brancos foi observada apenas uma vez, não sendo encontrado nenhum haplótipo idêntico entre os negróides.

O **Quadro 9** apresenta dados de diversidade genética e probabilidade de se encontrar duas seqüências idênticas entre indivíduos não aparentados, para a combinação das regiões HV1 e HV2 de várias populações descritas na literatura. A análise do sequenciamento das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA de 84 indivíduos apresentou uma diversidade genética de 0,9875, sendo 0,9788 para os brancos e 0,9714

para os negros. Este dado é próximo ao encontrado por KOYAMA *et. al.* (2002) que obtiveram um índice de diversidade genética de 0,9780 ao analisar 50 indivíduos japoneses do município de Aichi. Em 1998, BÄASNER *et. al.*, obtiveram e uma diversidade de 0,9943 estudando o mtDNA de 50 indivíduos não aparentados da região oeste da Alemanha e TSAI *et. al.*, (2001) analisando 155 indivíduos pertencentes a etnia Han de Taiwan, obtiveram um índice de 0,9994. BUDOWLE *et. al.*, (1999), compilou 1.393 amostras de 8 grupos populacionais: Afro-Americanos, Africanos (Serra Leoa), caucasianos americanos, austríacos, franceses, hispânicos, japoneses e americanos de origem asiática, obtiveram um índice que variava entre 0,990 para amostras de origem africana e 0,998 para os afro-americanos. Estes resultados mostram que quanto maior o tamanho da amostragem, menor a probabilidade de se encontrar duas seqüências idênticas. Estes dados justificam e demonstram a necessidade de se criar um banco de dados de mtDNA para que se conheça a freqüência de determinados haplótipos para sua aplicação na identificação criminal e forense.

Quadro 9: Índice de diversidade genética (h) e probabilidade de semelhança (P) de vários grupos populacionais descritos na literatura.

Grupo de	n	h	P	Referência
Africanos (Serra Leoa)	111	0,990	0,0187	BUDOWLE <i>et. al.</i> , 1999
Afro Americanos	149	0,998	0,0089	BUDOWLE <i>et. al.</i> , 1999
Alemães	50	0,994	0,0130	BÄASNER <i>et. al.</i> , 1998
Apaches (Indígena Americano)	180	0,930	0,0748	BUDOWLE, <i>et. al.</i> , 2002b
Asiáticos Americanos	58	0,992	0,0250	BUDOWLE <i>et. al.</i> , 1999
Brasileiros Brancos	49	0,979	0,0212	
Brasileiros Negros	35	0,971	0,0286	
Caucasianos Americanos	604	0,996	0,0052	BUDOWLE <i>et. al.</i> , 1999
Caucasianos Franceses	109	0,996	0,0130	BUDOWLE <i>et. al.</i> , 1999
Caucasionos Australianos	101	0,997	0,0128	BUDOWLE <i>et. al.</i> , 1999
Croatas	105	0,952	0,0480	GABRIEL <i>et. al.</i> , 2001
Espanhóis do Nordeste	118	0,990	0,0130	CRISPILLO, <i>et.al.</i> , 2000
Hispanicos	99	0,993	0,0174	BUDOWLE <i>et.al.</i> , 1999
Japoneses	162	0,996	0,0101	BUDOWLE <i>et.al.</i> , 1999
Italianos	83	0,990	0,0190	TAGLIABRACCI <i>et.al.</i> , 2001
Japoneses	162	0,997	0,0096	IMAIZUMI <i>et.al.</i> , 2002
Japoneses (Aichi)	50	0,978	0,0220	KOYAMA <i>et al.</i> , 2002
Navajos (Indígena Americano)	146	0,963	0,0770	BUDOWLE, <i>et.al.</i> , 2002b
Suicos (Oeste)	154	0,960	0,0084	DIMO-SIMORIN <i>et.al.</i> , 2000
Taiwaneses	155	0,999	0,0070	TSAI <i>et al.</i> , 2001

A comparação de cada uma das seqüências hipervariáveis de mtDNA com seqüências obtidas da população estudada, permitem calcular o número médio de nucleotídeos diferentes entre eles.

O estudo de comparação pareada entre as seqüências de mtDNA do grupo de estudo apresentou média de 8,30 nucleotídeos diferentes entre os haplótipos na região HV1 e média de 6,06 nucleotídeos divergentes para a região HV2. A combinação das duas regiões HV1 e HV2 apresentou uma média de 14,37 bases de diferentes entre as seqüências. Estudos realizados em 118 indivíduos do nordeste da Espanha apresentaram média de 7,74

diferenças nas duas regiões hipervariáveis (CRESPILO, et. al., 2000). A análise pareada entre as seqüências de mtDNA das regiões HV1 e HV2 em 180 índios Apache e 146 Navajos dos Estados Unidos forneceram, respectivamente, a diferença de 7,70 e 9,00 nucleotídeos na comparação pareada das amostras (BUDOWLE et al., 2002). A comparação pareada entre seqüências de mtDNA da população da Europa Central constituído de 850 indivíduos da Alemanha, Áustria e Suíça estudados por WITTING, et. al. (2000) apresentou uma média de 8,47 nucleotídeos diferentes após comparação de 360.825 seqüências pareadas nas regiões HV1 e HV2.

Estes resultados permitem concluir que entre indivíduos não relacionados, a probabilidade de encontrar seqüências que diferem em apenas um ou dois nucleotídeo é baixa. Os valores das comparações pareadas, cujas tabelas podem ser observadas no anexo 3, entre 84 indivíduos estudados permitem inferir que ao confrontar duas amostras de indivíduos sem vínculo genético, seja esperado que o número de nucleotídeos diferentes seja superior a 5 quando as duas regiões HV1 e HV2 são analisadas. O presente estudo apresenta uma média alta de nucleotídeos divergentes quando se comparam as duas regiões hipervariáveis (14 nucleotídeos de diferença), superiores as encontradas em outros grupos populacionais para as duas regiões HV1 e HV2. Este fato pode ser explicado dificuldade de se caracterizar o grupo estudado entre caucasóides e negróides.

Os resultados de índice de diversidade genética, frequência de haplótipos e comparação pareada, fornecem subsídios para afirmar que a análise do seqüenciamento do mtDNA pode ser bastante informativo em casos de investigação forense e identificação de indivíduos.

Em virtude da população brasileira ser bastante heterogênea e miscigenada, existe uma dificuldade de se relacionar as características genotípicas e fenotípicas limitando o uso da análise do mtDNA para inferir a origem genética do indivíduo, seja em um caso de identificação humana ou de uma investigação de evidências em cenas de crime. Mas estas mesmas características de heterogeneidade e miscigenação da população brasileira

fornece uma grande diversidade genética aumentando o poder de discriminação devido ao um maior número de haplótipos e conseqüentemente, existe um maior número de nucleotídeos diferentes no estudo de comparação pareada entre dois indivíduos quaisquer da população escolhidos ao acaso.

A herança materna do mtDNA limita o uso da análise da seqüência do mtDNA para investigações criminais, desta forma este método se torna um adjuvante às evidências factuais e circunstanciais do caso. Por outro lado, é muito útil para identificação humana principalmente quando não há disponibilidade de familiares próximos para fornecerem material para análise genética por VNTRs e STRs, por exemplo, existindo a necessidade de se fazer uma identificação várias gerações posteriores.

A boa recuperação de material para análise, devido ao grande número de cópias do mtDNA, foi confirmado neste estudo uma vez que reduzida quantidade de amostra contida na mancha de sangue foi utilizada para o estudo. As técnicas utilizadas neste trabalho, permitem consolidar o sequenciamento e análise do mtDNA como uma ferramenta para ser aplicada na identificação humana e investigações forenses.

6. CONCLUSÃO

A análise das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 na população estudada apresentou um grande número de polimorfismos, sendo alguns, característicos de cada grupo populacional avaliado.

O resultado da comparação pareada entre haplótipos e o índice de diversidade genética mostram grande heterogeneidade entre as seqüências do grupo estudado o que torna este método uma boa ferramenta para ser aplicada a análise forense.

A frequência de haplótipos e a probabilidade de identidade encontrada fornecem subsídios que tornam método sensível e preciso, permitindo que a análise do mtDNA seja bastante informativa para identificação humana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKANE, A.; MATSUBARA, K.; NAKAMURA, H.; TAKAHASHI, S.; KIMURA, K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. **J. Forensic Sci.**, West Conshohocken, v.39, n.2, p.362-372, 1994.
- ALLEN, M; ENGSTROM, A.-S.; MEYERS, S.; HANDT, O.; SALDEEN, T.; HAESELER, A.V.; PÄABO, S.; GYLLENSTEN, U. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. **J. Forensic Sci.**, West Conshohocken, v.43, n.3, p.453-464, 1998.
- ALVES, H.B. **Avaliação de três métodos de extração de DNA de tecido ósseo para identificação humana “post mortem” através da análise de marcadores do DNA**. São Paulo, 2001. 103p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.S.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.-J.; PENA, S.D.J.; PRADO, V.F. The ancestry of brazilian mtDNA lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v.67, p.444-461, 2000.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

ALONSO A.; SALAS, A.; ALBARRAN, C.; ARROYO, E.; CASTRO, A.; CRESPILO, M.; DI LONARDO, A.M.; LAREU, M.V.; CUBRIA, C.L.; SOTO, M.L.; LORENTE, J.A.; SEMPER, M.M.; PALACIO, A.; PAREDES, M.; PEREIRA, L.; LEZAUN, A.P.; BRITO, J.P.; SALA, A.; VIDE, M.C.; WHITTLE, M.; YUNIS, J.J.; GOMEZ, J. Results of the 1999-2000 collaborative exercise and proficiency testing program on mitochondrial DNA of the GEP-ISFG: an inter-laboratory study of the observed variability in the heteroplasmy level of hair from the same donor. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.125, n.1, p.1-7, 2002.

ALVES-SILVA, J.; GUIMARAES, P.E.; ROCHA, J.; PENA, S.D.; PRADO, .F. Identification in Portugal and Brazil of a mtDNA lineage containing a 9-bp triplication of the intergenic COII/tRNA^{Lys} region. **Hum. Hered.**, Basel, v.49, n.1, p.56-58, 1999

ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARRELL, B.J.; DE BRUIJN, M.H.L.; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F.; SCHREIER, P.H.; SMITH, A.J.H.; STADEN, R.; YOUNG, I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, London, v.290, p.457-465, 1981.

ANDERSON, T.A.; ROSS, J.P.; ROBY, R.K.; LEE, D.A.; HOLLAND, M.M. A validation study for the extraction and analysis of DNA from human nail material and its application to forensic casework. **J. Forensic Sci.**, West Conshohocken. v.44, p.1053-1056, 1999.

ANDREWS, R.M.; KUBACKA, I.; CHINNERY, P.F.; LIGHTOWLERS, R.N.; TURNBULL, D.M.; HOWELL, N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. **Nat. Genet.**, Brentwood, v.23, p.147, 1999.

ARCTANDER, P. Mitochondrial recombination? **Science**, Washington, v.284, n.5423, p.2090-2091, 1999.

AWADALLA, P.; EYRE-WALKER, A.; SMITH, J.M. Linkage disequilibrium and recombination in hominoid mitochondrial DNA. **Science**, Washington, v.286, p.2524-2525, 1999.

BAASNER, A.; SCHÄFER, C.; JUNGE, A.; MADEA, B. Polymorphic sites in human mitochondrial DNA control region sequences: population data and maternal inheritance. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.98, p.169-178, 1998.

BATAILLE, M.; CRAINIC, K.; LETERREUX, M.; DURIGON, M.; DE MAZANCOURT, P. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.99, p.165-170, 1999.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. 1 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 472p.

BENDER, K.; SCHNEIDER, P.M.; RITTNER, C. Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.113, p.103-107, 2000.

BOLES, T.C; SNOW, C.C; STOVER, E. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. **J. Forensic Sci.**, West Conshohocken, v.40, p.349-355, 1995.

BORTOLINI, M.C.; BAPTISTA, C.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; WEIMER, T.A.; SALZANO, F.M. Diversity in protein, nuclear DNA, and mtDNA in South Amerinds -- agreement or discrepancy? **Ann. Hum. Genet.**, Cambridge, v.62, n.2, p.133-145, 1998.

BORTOLINI, M.C.; SALZANO, F.M.; ZAGO, M.A.; SILVA JÚNIOR, W.A.; WEIMER, T.A. Genetic variability in two brazilian ethnic groups: a comparison of mitochondrial and protein data. **Am. J. Phys Anthropol.**, New York, v.103, p.147-156, 1997.

BORTOLINI, M.C.; ZAGO, M.A.; SALZANO, F.M.; SILVA-JÚNIOR, W.A.; BONATTO, S.L.; SILVA, M.C.B.O.; WEIMER, T.A. Evolutionary and anthropological implications of mitochondrial DNA variation in african brazilian populations. **Hum. Biol.**, Detroit, v.69, n.2, p.141-159, 1997.

BRETTELL, T.A.; INMAN, K.; RUDIN, N.; SAFERSTEIN, R. Forensic science. **Anal. Chem.**, Columbus, v.71, p.235R-255R, 1999.

BROWN, W.M.; GEORGE, M. JR.; WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.76, n.4, p.1967-1971, 1979.

BUDOWLE, B.; BAECHEL, F.S; COMEY, C.T.; GIUSTI, A.M.; KLEVAN, L. Simple protocols for typing forensic biological evidence: Chemiluminescent detection for human DNA quantitation and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses and manual typing of polymerase chain reaction (PCR) amplified polymorphism. **Electrophoresis**, Weinheim, v.16, p.1559-1567, 1995.

BUDOWLE, B.; WILSON, M.R.; DIZINNO, J.A.; STAUFFER, C.; FASANO, M.A.; HOLLAND, M.M.; MONSON, K.L. Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.103, p.23-35, 1999a.

BUDOWLE, B.; DIZINNO, J.A.; WILSON, M.R. Interpretation guidelines for mitochondrial DNA sequencing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HUMAN IDENTIFICATION, 10, USA, 2002. Disponível em: <http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp10proc/content/37Budowle.pdf>. Acesso em: 07 out. 2002, 1999b.

BUDOWLE, B.; ALLARD, M.W.; WILSON, M.R. Critique of interpretation of high levels of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA hypervariable region I from hair. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.126, p.30-33, 2002a.

BUDOWLE, B.; ALLARD, M.W.; FISCHER, C.L.; ISENBERG, A.R.; MONSON, K.L.; STEWART, J.E.; WILSON, M.R.; MILLER, K.W. HVI and HVII mitochondrial DNA data in apaches and navajos. **Int. J. Legal Med.**, Heidelberg, v.116, p.212-215, 2002b.

BUSQUE, L.; DESMARAIS, D.; PROVOST, S.; SCHUMM, J.W.; ZHONG, Y.; CHAKARABORTY, R. Analysis of allele distribution for six short tandem repeat loci in the French Canadian population of Quebec. **J. Forensic Sci.**, West Conshohocken. V. 42, n. 6, p. 1147-1153, 1997.

BUTLER, J.M.; LEVIN, B. Forensic applications of mitochondrial DNA. **TibTech**, v.16, p.158-162, 1998.

CALLEGARI-JACQUES, S.M.; SALZANO, F.M. Brazilian indians / non-indians interactions and their effects. **Cienc. Cult**, São Paulo, v.51, p.166-174, 1999.

CALLOWAY, C.D.; REYNOLDS, R.L.; HERRIN, G.L.; ANDERSON, W.W. The frequency of heteroplasmy in the HV II region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v.66, p.1384-1397, 2000.

CANN, R.L.; STONEKING, M.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature**, London, v.325, p.31-36, 1987.

CARRACEDO, A.; ALOJA, E.D.; DUPUY, B.; JANGBLAD, A.; KARJALAINEN, M.; LAMBERT, C.; PARSON, W.; PFEIFFER, H.; PFITZINGER, H.; SABATIER, M.; SYNDERCOMBE COURT, D.; VIDE, C. Reproducibility of mtDNA analysis between laboratories: a report of the European DNA Profiling group (EDNAP). **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.97, p.165-170, 1998.

CARRACEDO, A.; BÄR, W.; LINCOLN, P.; MAYR, W.; MORLING, N.; OLAISEN, B.; SCHNEIDER, P.; BUDOWLE, B.; BRINKMANN, B.; GILL, P.; HOLLAND, M.; TULLY, G.; WILSON, M. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNAtyping. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.110, p.79-85, 2000.

CAWOOD, A.H. DNA fingerprinting. **Clin. Chem.**, Washington, v.35, n.9, p.1832-1837, 1989.

COMAS, D.; CALAFELL, F.; MATEU, E.; PÉREZ-LEZAUN, A.; BERTRANPETIT, J. Geographic variation in human mitochondrial DNA control region sequence: the population history of Turkey and its relationship to the european populations. **Mol. Biol. Evol.**, Lawrence, v.13, n.8, p.1067-1077, 1996.

CORACH, D.; SALA, A.; PENACINO, G.; IANNUCCI, N.; BERNARDIZ, P.; DORETTI, M.; FONDEBRIDER, L.; GINARTE, A.; INCHAURREGUI, A.; SOMIGLIANA, C.; TURNER, S.; HAGELBERG, E. Additional approaches to DNA typing of skeletal remains: The search for 'missing' persons killed during the last dictatorship in Argentina. **Electrophoresis**, Weiheim, v.18, n.9, p.1608-1612, 1997.

CROW, J.F. DNA forensic: past, present and future. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HUMAN IDENTIFICATION, 10, USA, 1999. Disponível: <http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp10proc/content/01crow.pdf>. Acesso em: 07 out. 2002.

DeFRANCHIS, R.; CROSS, N.C.P.; FOULKES, N.S.; COX, T.M. A potent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.16, p.10355, 1988.

DAVIS, L. Mitochondrial DNA: State of Tennessee vs. Paul Ware. Profiles in DNA. v.1, n.3, p.6-7, 1998. Disponível em: http://www.promega.com/profiles/103/ProfilesinDNA_103_06.pdf. Acesso em: 07 out. 2002.

DIMO-SIMONIN, N.; GRANGE, F.; TARONI, F.; BRANDT-CASADEVALL, C.; MANGIN, P. Forensic evaluation of mtDNA in a population from south west Switzerland. **Int. J. Legal Med.**, Heidelberg, v.113, p.89-97, 2000.

EYRE-WALKER, A.; SMITH, N.H.; SMITH, J.M. How clonal are human mitochondria. Proc. R. Soc. Lond B, 1999. 266:477-483 *apud* ARCTANDER, P. Mitochondrial recombination? **Science**, Washington, v.284, n.5423, p.2090-2091, 1999.

GABRIEL, M.N.; CALLOWAY, C.D.; REYNOLDS, R.L.; ANDELINOVIC, S.; PRIMORAC, D. Population variation of human mitochondrial DNA hypervariable regions I and II in 105 Croatian individuals demonstrated by immobilized sequence-specific oligonucleotide probe analysis. **Croat Med. J.**, Zagreb, v.42, p.328-335, 2001.

- GILES, R.E.; BLANC H., CANN, H.M.; WALLACE, D.C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.77, n.11, p.6715-6719, 1980.
- GILL, P.; IVANOV, P.L.; KIMPTON, C.; PIERCY, R.; BENSON, N.; TULLY, G.; EVETT, I.; HAGELBERG, E.; SULLIVAN, K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. **Nat. Genet.**, Brentwood, v.6, n.2, p.130-135, 1994.
- GILL, P.; JEFFREYS, A.J.; WERRETT, D.J. Forensic application of DNA 'fingerprints'. **Nature**, London, v.318, p.577-579, 1985.
- GREENBERG, B.D.; NEWBOLD, J.E.; SUGINO, A. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. **Gene**, Amsterdam, v.21, p.33-49, 1983.
- GIUSTI, A.; BAIRD, M.; PASQUALE, S.; BALAZS, I.; GLASSBERG, J. Application of deoxyribonucleic acid (DNA) polymorphisms to the analysis of DNA recovered from sperm. **J. Forensic Sci.**, West Conshohocken, v.31, p.409-417, 1986.
- GOODWIN, W.; LINACRE, A.; VANEZIS, P. The use of mitochondrial DNA and short tandem repeat typing in the identification of air crash victims. **Electrophoresis**, Weinheim, v.20, p.1707-1711, 1999.
- GRZYBOWSKI, T. Extremely High Levels of Human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots. **Electrophoresis**, Weinheim, v 21, p.548-553, 2000.

GYLLENSTEN, U.B.; ERLICH, H.A. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.85, p.7652-7656, 1988.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v.41, p.95-98, 1999.

HIGUCHI, R.; VON BEROLDING, C.H.; SENSABAUGH, G.F.; ERLICH, H.A. DNA typing from single hair. **Nature**, London, v.332, p.543-546, 1988.

HOLLAND, M.M.; FISCHER, D.L.; MITCHELL, L.G.; RODRIGUEZ, W.C.; CANIK, J.J.; MERRIL, C.R.; WEEDN, V.M. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam war. **J. Forensic Sci.**, West Conshohocken, v.38, p.542-553, 1993.

HOPGOOD, R; SULLIVAN, K.M.; GILL, P. Strategies for automated sequencing of human mitochondrial DNA directly from PCR products. **BioTechniques**, Natick, v.13, p.82-92, 1992.

HOPGOOD, A.J.; MANNUCCI, A.; SULLIVAN, K.M. DNA typing from human faeces. *International Journal of Legal Medicine*, 1996. 108:237-243 *apud* BUTLER, J.M.; LEVIN, B. Forensic applications of mitochondrial DNA. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v.16, p.158-162, 1998.

HORAI, S.; MATSUNAGA, E. Mitochondrial DNA polymorphism in japanese. **Hum. Genet.**, Berlin, v.72; p.105-117, 1986.

HUTCHISON, C.A. 3rd; NEWBOLD, J.E.; POTTER, S.S.; EDGELL, M.H. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. **Nature**, London, v.251; p.536-538, 1974.

IMAIZUMI, K.; PARSONS, T.J.; YOSHINO, M.; HOLLAND, M.M. A new database of mitochondrial DNA hypervariable regions I and II sequences from 162 japanese individuals. **Int. J. Legal Med.**, Heidelberg, v.116, p.68-73, 2002.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hipervariable 'minisatélites' regions in human DNA. **Nature**, London, v.314, p.67-73, 1985.

JAZIN, E.E.; CAVELIER, L.; ERIKSSON, I.; ORELAND, L.; GYLLENSTEN, U. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.93, p.12382-12387, 1996.

JOBIM, L.F.; JOBIM, M.R.; BRENNER, C. Identificação humana pelo DNA. In: GALANTE FILHO, H.; FIGINI, A.L.; REIS, A.B.; JOBIM, L.F.; SILVA, M. **Identificação humana**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1999. p.239-303.

KANEDA, H.; HAYASHI, J.I.; TAKAHAMA, S.; TAYA, C.; LINDAHL, K.F. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.92, p.4542-4546, 1995.

KOYAMA, H.; IWASA, M.; MANEO, Y.; TSUCHIMOCHI, T.; ISOBE, I.; SEKO-NAKAMURA, Y.; MONMA-OHTAKI, J.; MATSUMOTO, T.; OGAWA, S.; SATO, B.; NAGAO, M. Mitochondrial sequence haplotype in the japanese population. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.125, p.93-96, 2002.

- KRINGS, M.; GEISERT, H.; SCHMITZ, R.W.; KRAINITZKI, H.; PAABO, S.
DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the
neandertal type specimen. **Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.**, Washington,
v.96, n.10, p.5581-5585, 1999.
- LAGERSTRÖM-FERMÉR, M.; OLSSON, C.; FORSGREN, L.; SYVÄNEN, C.
Heteroplasmy of the human mtDNA control region remains constant
during life. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v.68, p.1299-1301, 2001.
- LEWIN, B. **Genes VII**. 7.ed. Oxford: Oxford University Press, 2000. cap.3,
p.80-85.
- LINCH, C.A.; WHITING, D.A.; HOLLAND, M.M. Human hair histogenesis for
the mitochondrial DNA for forensic scientist. **J. Forensic Sci.**, West
Conshohocken, v.46, n.4, p.844-853, 2001.
- LUDWIG, E.H.; FRIEDL, W.; MC CARTHY, B.J. High-resolution analysis of a
hipervariable region in human apolipoprotein B gene. **Am. J. Hum.
Genet.**, Chicago, v.44, p.397-401, 1989.
- LUTZ, S.; WITTIG, H.; WEISSER, J.; HEIZMANN, J.; JUNGE, A.; DIMO-
SIMONIN, N.; PARSON, W.; EDELMANN, J.; ANSLINGER, K.; JUNG,
S.; AUGUSTIN, C. Is it possible to differentiate mtDNA by means of
HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HV1
and HVII regions? **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.113, p.97-101,
2000.
- MARUSIC, A. DNA lab helps identify missing persons in Croatia and Bosnia
and Herzegovina. **Lancet**, London, v.358, p.1244, 2001.
- MYRS, W.R. DNA markers in forensic medicine. **Transfus. Clin. Biol.**, Paris,
v.2, n.4, p.325-328, 1995.

- MILLER, K.W.P.; BUDOWLE, B. A compendium of human mitochondrial DNA control region: Development of an international Standard Forensic Database. **Croat. Med. J.**, Zagreb, v.42, n.3, p.315-327, 2001.
- MONNAT, R.J. JR; LOEB, L.A. Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.82, n.9, p.2895-2899, 1985.
- MORRIS, A.A.M.; LIGHTOWLERS, R.N. Can paternal mtDNA be inherited? **Lancet**, London, v.355, n.9212, p.1290-1291, 2000.
- MUKAIDA, M.; KIMURA, H.; TAKADA, Y.; MASUDA, T.; NAKATA, Y. The personal identification of many samples recovered from under the sea. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.113, p.79-85, 2000.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F. Specific syntesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.155, p.335-350, 1987.
- NEI, M.; TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics**, Bethesda, v.97, n.1, p.145-163, 1981.
- OLIVEIRA, R.N., NUNES, F.D., ANZAI, E.K., DARUGE, E., MESQUITA R.A., OZAKI, A.N., HIRATA, R.D.C., HIRATA, M.H. Population studies of the Y-chromossome of loci DYS390, DYS391 and DYS393 in brazilians subjects and its use in human identification. **J. Forensic Odontosmastol.**, v.20, p.6-9. 2002.
- OTTO, P.G.; OTTO, P.A.; FROTA-PESSOA, O. **Genética humana e clínica**. São Paulo: Roca, 1998. p.285-294.

OZAKI, A.N. **Determinação da frequência de genes de algumas regiões hipervariáveis do genoma humano para estudo do vínculo genético familiar em caucasianos brasileiros.** São Paulo, 1999. 96p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

PÄÄBO, S.; GIFFORD, J.A.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.16, p.9775-9787, 1988.

PARSONS, T.J.; IRWIN, J.A. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. **Science**, Washington, v.288, p.1931, 2000.

PARSONS, T.J.; COBLE, M.D. Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. **Croat. Med. J.**, Zagreb, v.42, n.3, p.304-309, 2001.

PENA, S.D.J.; JEFFREYS, A. Breve introdução às impressões digitais de DNA. **Rev. Bras. Genet.**, Ribeirão Preto, v.16,n.3, p.856-857, 1993.

PENA, S.D.J.; CARVALHO-SILVA, D.R.; ALVES-SILVA, J.; PRADO, V.F.; SANTOS, F.R. Retrato molecular do Brasil. **Cienc. Hoje**, Rio de Janeiro, v.27, n.159, p.16-25, 2000.

PFEIFFER, H.; BRINKMANN, B.; HUHNE, J.; ROLF, B.; MORRIS, A.A.; STEIGHNER, R.; HOLLAND, M.M.; FORSTER, P. Expanding the forensic German mitochondrial DNA control region database: genetic diversity as a function of samples size and microgeography. **Int. J. Legal Med.**, Heidelberg, v.112, p.291-298, 1999.

PRADO, V.F.; CASTRO, A.K.F.; OLIVEIRA, C.L.; SOUZA, K.T.; PENA, D.D.J. Extraction of DNA from human skeletal remains: practical applications in forensic sciences. **Biomol. Eng.**, Amsterdam, v.14, p.41-44, 1997.

RACE, R.R.; SANGER, R. Blood groups. In: RACE, R.R.; SANGER, R. **Blood groups in man**. 6.ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1975. cap.1, p.1-7.

REYNODS, R.; SENSABAUGH, G. Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polymerase chain reaction. **Anal. Chem.**, Columbus, v.63, p.2-15, 1991.

RIBETIO-DOS-SANTOS, A.K.; SANTOS, S.E.; MACHADO, A.L.; GUAPINDAIA, V.; ZAGO, M.A. Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in pre-columbian natives of Amazon region. **Am. J. Phys. Anthropol.**, New York, v.101, p.29-37, 1996.

ROCCO, P.P.; MORALES, G.C.; MORAGA, V.M.; MIGUEL, J.F.; NERVI, O.F.; LLOP, R.E.; CARVALHO, S.P.; ROTHHAMMER, E.F. Genetic composition of the chilean population: analysis of mitochondrial DNA polymorphism. **Rev. Med. Chile**, Santiago, v.130, n.2, p.125-132, 2002.

SAIKI, R.; GELFOND, D.H.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D., **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. v.3, p. A8-20 – A8-21.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.74, p.5463-5468, 1977.

SANTOS, S.E.B.; RODRIGUES, J.D.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; ZAGO, M.A. Differential contribution of indigenous men and woman to the formation of an urban population in the Amazon Region as revealed by mtDNA and Y-DNA. **Am. J. Phys. Anthropol.**, New York, v.109, p.175-180, 1999.

SILVER, H. Paternity testing: critical reviews in clinical laboratory. **Science**, Washington, v.27, p.391-408, 1989.

SIMPSON, T.A.; SMITH, R.J.H. Amplification of mitochondrial DNA from archival temporal bone specimens. **Laryngoscope**, Hagerstown, v.105, p.28-34, 1995.

SMITH, L.M.; SANDERS, J.Z.; KAISER, R.J.; HUGHES, P.; DODD, C.; CONNELL, C.R.; HEINER, C.; KENT, S.B.H.; HOOD, L.E. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, London, v.,321, n.12, p.674-679, 1986.

SMITH, B.C.; HOLLAND, M.M.; SWETT, D.L.; DIZINNO, J.A. DNA and the forensic odontologist. In: BOWERS, C.M.; BELL, G.L. **Manual of forensic odontology**. 3.ed. Ontario: Manticore, 1997. cap.10, p.283-298.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel Electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, Sidcup, v.98, p.503-517, 1975.

- STONEKING, M.; HEDGECOCK, D.; HIGUCHI, R.G.; VIGILANT, L.; ERLICH, H.A. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v.48, p.370-382, 1991.
- SULLIVAN, K.M.; HOPGOOD, R.; LANG, B.; GILL, P. Automated amplification and sequencing of human mitochondrial DNA. **Electrophoresis**, Weinheim, v.12, p.17-21, 1991.
- SUTOVSKY, P.; MORENO, R.D.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; SIMERLY, C.; SCHATTEN, G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. **Nature**, London, v.402, p.371, 1999.
- SZIBOR, R.; MICHAEL, M.; PLATE, I.; KRAUSE, D. Efficiency of forensic mtDNA analysis: case examples demonstrating the identification of traces. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.113, p.71-78, 2000.
- TAGLIABABRACCI, A.; TURCHI, C.; BUSCENI, L.; SASSAROLI, C. Polymorfism of the mitochondrial DNA region in italians. **Int. J. Legal Med.**, Heidelberg, v.114, p.224-228, 2001.
- TROWSDALE, J.; YOUNG, J.A.T.; KELLY, A.P.; AUSTIN, P.J.; CARSON, S.; MEUNIER, H.S.O.A.; ERLICH, H.A.; SPIELMAN, R.S.; BODMER, J.; BODMER, W.F. Structure sequence and polymorfism in the HLA-D region. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v.85, p.5-43, 1985.
- TULLY, G.; BÄR, W.; BRINKMANN, B.; CARRACEDO, A.; GILL, P.; MORLING, N.; PARSON, W.; SCHNEIDER, P. Considerations by the European DNA Profiling (EDNAP) Groupon the working practise, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.124, p.83-91, 2001.

VAN OORSCHOT, R.A.H.; JONES, M.K. DNA fingerprints from fingerprints. **Nature**, London, v.387, p.767, 1997.

WALLACE, D.C. Mitochondrial DNA Sequence variation in human evolution and disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.91, p.8739-8746, 1994.

WALLACE, D.C.; BROWN, M.D.; LOTT, M.T. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. **Gene**, Amsterdam, v.238, p.211-230, 1999.

WATSON, J.D.; CRICK, F.H. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic Acid. **Am. J. Psychiatry**, Washington, v.160, n.4, p.623-624, 2003.

WEEDN, V.W.; SWARNER, S.L. Exames forenses de identidade por análises do DNA. In: HENRY, J.B. ed. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1999. p.1427-1438. Notas: Tradução de "Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 19.ed.

WYMAN, A.R.; WHITE, R. A highly polymorphic locus in human DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.77, p.6754-6758, 1980.

WRISCHNIK, L.A.; HIGUCHI, R.G.; STONEKING, M.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N.; WILSON, A.C. Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.15, n.2, p.539-542, 1987.

WILSON, A.C. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biol. J. Linn. Soc.**, Sidcup, v.26, p.375-400, 1985.

- WILSON, M.R.; HOLLAND, M.M.; STONEKING, M.; DIZINNO, J.A.; BUDOWLE, B. Guidelines for the use of mitochondrial DNA sequencing in forensic science. **Crime Lab. Dig.**, v.20, p.68-77, 1993.
- WILSON, M.R.; DIZINNO, J.A.; POLANSKEY, D.; REPLOGLE, J.; BUDOWLE, B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. **Int. J. Legal Med.**, Heidelberg, v.108, p.68-74, 1995.
- WILSON, M.R.; POLANSKEY, D.; BUTLER, J.M.; DIZINNO, J.A.; REPLOGLE, J.; BUDOWLE, B. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. **BioTechniques**, Natick, v.18, p.662-669, 1995.
- WILSON, M.R.; POLANSKEY, D.; REPLOGLE, J.; DIZINNO, J.A.; BUDOWLE, B. A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. **Hum. Genet.**, Berlin, v.100, p.167-171, 1997.
- WILSON, M.R.; ALLARD, M.W.; MONSON, K.; MILLER, K.W.P.; BUDOWLE, B. Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.129, p.35-42, 2002.
- WITTIG, H.; AUGUSTIN, C.; BAASNER, A.; BULNHEIM, U.; DIMOSIMONIN, N.; EDELMANN, J.; HERING, S.; JUNG, S.; LUTZ, S.; MICHAEL, M.; PARSON, W.; POETSCH, M.; SCHNEIDER, P.M.; WEICHHOLD, G.; KRAUSE, D. Mitochondrial DNA in the Central European Population Human identification with the help of the forensic mtDNA D-Loop-base database. **Forensic Sci. Int.**, Amsterdam, v.113, p.113-118, 2000.

WIUF, C. Recombination in human mitochondrial DNA? **Genetics**, Bethesda, v.159, p.749-756, 2001.

WONG, Z.; WILSON, V.; JEFFREYS, A.J.; THEIN, S.L. Cloning a selected fragment from a human DNA "fingerprint" : isolation of na extremely polymorphic minisatélite. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.14, p.4605-4616, 1986.

Anexo 1 – Iniciais dos nomes, sexo e naturalidade dos indivíduos do estudo com suas respectivas classificação de cor auto-declarada e cor que declararam serem suas mães.

Amostra	Nome	Sexo	Cor auto declarada	Cor declarada da mãe	Naturalidade	UF
2	I. C. S.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
12	L. F. N.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
22	M. A.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO VICENTE	SP
24	A. C. O.	M	CAUCASÓIDE	NEGRÓIDE	CORONEL FABRICIANO	MG
27	E. G. S.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	RIO DE JANEIRO	RJ
31	A. R. R.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
36	E. A. S.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	ILHA SOLTEIRA	SP
38	T. A. M.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
39	P. M.	M	CAUCASÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
40	L. E. S.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
41	M. X.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
49	E. S.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
51	C. H. G.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
52	C. F. P.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
55	H. J. A.	M	CAUCASÓIDE	NEGRÓIDE	JATARIBA	PE
58	U. S. M.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	JOINVILLE	SC
59	W. C. C.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	CABO VERDE	MG
62	R. C. S.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	S. BERNARDO DO CAMPO	SP
65	J. A. T.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
66	J. A. P.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	BOM CONSELHO	PE
67	M. P. S. L.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
68	J. M. A.	F	CAUCASÓIDE	DESCONHECE	RECIFE	PE
70	L. M. L.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SANTO ANDRÉ	SP
71	J. P. R.V.S.	M	CAUCASÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
73	F. B. B.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
74	G. A.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
78	A. M. R.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
79	S. A. L.	F	CAUCASÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
80	E. P. N.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
81	E. J. C.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	LICÍNIO DE ALMEIDA	BA
84	M. B. M.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	MOSSORÓ	RN
86	L. R.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO VICENTE	SP
87	C. P. W.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
90	P. L.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	OLÍMPIA	SP
93	O. D.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	ARIRANHA	SP
96	A. J. G. S.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
98	R. N. O.	M	CAUCASÓIDE	NEGRÓIDE	VOTUPORANGA	SP
99	R. C. R. M. C.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	ARAÇATUBA	SP
104	O. S. N.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
125	M. M.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	BOMBAÇA	CE
137	O. A. O.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	INITINGA	SP
143	L. R. A.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	JUNDIAÍ	SP
151	T. G. G.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO JOÃO DA BOA VISTA	SP
152	O. W. L.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP

Amostra	Nome	Sexo	Cor auto declarada	Cor declarada da mãe	Naturalidade	UF
153	C. V. S.	M	CAUCASÓIDE	NEGRÓIDE	PATOS	PB
157	J. G. O.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
161	V. B. M.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
165	A. E. M.	F	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
173	A. F. B.	M	CAUCASÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO JOSÉ DO EGITO	PE
11	E. R. S.	M	NEGRÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
18	A. F. A.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	DIADEMA	SP
23	F. J. N.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	LINS	SP
25	J. S.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
28	C. S. F.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
29	J. L. O.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
30	M. S. C.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
32	K. C. P.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	TEÓFILO OTONI	MG
46	M. P. S.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	CARAÍ	MG
50	W. G. C.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
53	J. E. S.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	CABO	PE
54	J. C. A.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
56	O. B. A.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	UBERABA	MG
57	A. J. C.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
60	A. J. S.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	BARRA DO MENES	BA
61	R. C.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SANTA MARIANA	PR
63	C. M.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
64	R. P. A.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
72	A. C. R.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	BELO HORIZONTE	MG
82	B. F. A.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
83	N. S.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
88	S. U. S.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	RECIFE	PE
94	C. J. G. S.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	MACEIÓ	AL
95	A. P. L.	M	NEGRÓIDE	CAUCASÓIDE	AGUA BRANCA	AL
102	J. A. F. C.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	LONDRINA	PR
103	K. D. S.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP
123	A. P.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	VIRADOURO	SP
127	N. M. M.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	ILHÉUS	BA
135	R. J. C.	M	NEGRÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
136	A. S.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	BIRIGUI	SP
138	G. R. C.	M	NEGRÓIDE	CAUCASÓIDE	SÃO PAULO	SP
156	D. M. S.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	BAIXIO	CE
159	M. A. S.	F	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	PROPRIÁ	SE
169	R. S.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	RIBEIRÃO VERMELHO	MG
171	M. C. Q.	M	NEGRÓIDE	NEGRÓIDE	SÃO PAULO	SP

ANEXO 2 : Modelo de termo de consentimento empregado antes da obtenção das amostras de sangue.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Protocolo de Pesquisa: *Estudo da frequência dos haplótipos da região hipervariável do DNA mitocondrial de indivíduos caucasianos e negróides da população brasileira para estudo forense.*

Pesquisadora: *Dra. Bety Chen*

Orientador: *Professor Associado Mário Hiroyuki Hirata,*

Cargo/ Função: *Farmacêutica Bioquímica Pós-graduanda de mestrado*

Registro no Conselho Regional de Farmácia: *CRF-SP Nº 17.240*

Local onde será realizado a pesquisa: *Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências farmacêuticas da Universidade de São Paulo localizado a Av. Lineu Prestes, 580 Bloco 17 superior – Cidade Universitária – São Paulo – SP. CEP. 05508-900*

Avaliação do Risco da pesquisa (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo): *risco mínimo*

Duração da Pesquisa: *24 meses*

II – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE SOBRE A PESQUISA

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA: O trabalho visa fazer um estudo do material genético (DNA mitocondrial) para calcular a chance de uma pessoa ter sequência igual a de outra pessoa qualquer da população. Para isso será colhido um número grande de amostras para se montar uma base de dados de uso público, que permita fazer o cálculo de probabilidade (chance) que será usado na identificação de indivíduos ou estudo de vínculo familiar.

AMOSTRA BIOLÓGICA: Pelo menos 3 gotas de sangue.

PROCEDIMENTOS A SEREM SEGUIDOS: Será feito uma punção em um dedo de qualquer uma das mãos através de lanceta estéril e descartável. O sangue será recolhido através de papel absorvente especial e estéril na quantidade de pelo menos 5 gotas.

RISCOS E DANOS: O trabalho não oferece em nenhuma hipótese risco de vida e tão pouco apresenta qualquer risco posterior nem qualquer tipo de desconforto clínico ao participante.

CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS: Os dados e resultados obtidos durante a investigação serão divulgados de forma indireta e se tornarão públicos, sem conter nenhuma identificação pessoal ou qualquer dado que possa comprometer a confidencialidade e privacidade do participante.

III – DADOS DO PARTICIPANTE E CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIDO PARA OBTENÇÃO DE AMOSTRA

Após ter recebido todas as informações relacionadas ao estudo e não restando mais nenhuma dúvida quanto ao estudo e aos procedimentos que serão utilizados Eu, _____ do sexo _____, da raça _____, sendo minha ascendência materna da raça _____, nascido em ____/____/____ no município de _____ no estado de _____, portador (a) do documento de identidade tipo/ N° _____ emitido por _____, Residente e domiciliado a _____ no município de _____ estado de _____, CEP. _____ Telefone (____) _____, autorizo de livre e espontânea vontade a retirada de amostras do meu sangue e cabelo, estando ciente que este material será utilizado exclusivamente para fins de pesquisa científica e os dados obtidos serão utilizados para cálculos estatísticos ou o propósito científico que couber, por tempo indeterminado.

Declaro que eu não recebi nenhuma transfusão de sangue ou de medula óssea nos últimos seis meses.

_____, ____ de _____ de _____

Assinatura

ANEXO 3: Resultados da comparação pareada entre as seqüências.

HV1	
0	19
1	38
2	87
3	151
4	202
5	255
6	334
7	368
8	444
9	419
10	299
11	254
12	180
13	145
14	98
15	77
16	60
17	43
18	10
19	3

Média: 8,3003
 Desvio Padrão: 3,5246
 Erro Padrão: 5,9697
 N° comparações: 3.486

HV2	
0	34
1	88
2	205
3	350
4	437
5	492
6	454
7	400
8	315
9	273
10	174
11	123
12	76
13	37
14	20
15	8

Média: 6,0651
 Desvio Padrão: 2,8613
 Erro Padrão: 4,8462
 N° comparações: 3.486

HV1 + HV2	
0	3
1	7
2	26
3	21
4	20
5	38
6	78
7	121
8	151
9	206
10	244
11	257
12	249
13	278
14	243
15	226
16	230
17	198
18	138
19	123
20	100
21	93
22	99
23	65
24	61
25	59
26	40
27	36
28	36
29	20
30	9
31	7
32	3
33	1

Média: 14,3655
 Desvio Padrão: 5,6674
 Erro Padrão: 0,0960
 N° comparações: 3.486