UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em FARMÁCIA
Área de Análises Clínicas

Caracterização e desenvolvimento de sistemas de referências alélicas
de loci de STR para controle de qualidade em identificação humana

Evelyn Kuroki Anzai

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Tit. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo

2007

18.925

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

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013025

FICHA CATALOGRÁFICA

Anzai, Evelyn Kuroki

Caracterização e desenvolvimento de sistemas de referências alélicas de loci de STR para controle de qualidade em identificação humana / E. K. Anzai. -- São Paulo, 2007.

112 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas.

1. DNA (Identificação; Humano) 2. Marcador molecular 3. Biologia molecular I . Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Análises Clínicas

Evelyn Kuroki Anzai

**Caracterização e Desenvolvimento de Sistemas de Referências Alélicas de
Loci de STR para Controle de Qualidade em Identificação Humana**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Mário Hiroyuki Hirata
orientador/presidente

Prof. Dr. Gilma Jorge Figueiro Gattas
1º. examinador

Prof.ª Dr.ª Regina Maria Baretto
2º. examinador

Prof. Dr. Fabris Daumas Nunes
3º. examinador

Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
4º. examinador

São Paulo, 10 de 08 de 2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em FARMÁCIA
Área de Análises Clínicas

Caracterização e desenvolvimento de sistemas de referências alélicas
de loci de STR para controle de qualidade em identificação humana

Evelyn Kuroki Anzai

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Concentração: Análises Clínicas
DOUTORADO

Orientador: Prof. Tit. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo
2007

Dedico essa tese..

*Ao meu marido, amigo e grande amor **Marcio Tetsuya Kanto** que com carinho, companheirismo, e muito amor auxilia no meu crescimento pessoal. Sempre me apoiou na elaboração dessa tese, com muita paciência e tolerância, entendendo e me ajudando muito nessa grandiosa etapa da minha vida.*

*Aos meus pais, **Yoshio Anzai** e **Marie Kuroki Anzai**, que com amor, apoio e compreensão, foram os meus primeiros mestres!*

*E ao orientador **Prof. Tit. Mário Hiroyuki Hirata**,
por me dar a oportunidade de aprender muito,
tanto para a elaboração da tese como para a minha vida pessoal;
além de contribuir significativamente para a realização desse trabalho!*

Muito Obrigada!

Agradecimentos

À DEUS, pela vida e pela luz que me direciona todos os dias da minha vida.

À Universidade de São Paulo, pela minha formação acadêmica iniciada na graduação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome da sua Diretora, Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

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

À Profa. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata pela sua contribuição paciente e prestativa na elaboração desse trabalho.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

Ao Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira que com seu incentivo, conhecimento e principalmente sua amizade, sempre acompanhou, orientou e auxiliou constantemente na minha formação acadêmica desde a iniciação científica.

À Prof. Dr. Ida T. P. Calvielli que com os seus ensinamentos, amizade e árduo apoio, sempre incentivou minha carreira acadêmica, além de ser uma inspiração como profissional e amiga .

Ao Álvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas, em nome de Álvaro Largura que disponibilizou reagentes e análises dos plasmídeos recombinantes. Agradeço também Fabiano Sandrini por analisar as amostras com muita competência e paciência.

Ao Laboratório de Investigação de Paternidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de São Paulo, em nome da Profa Tit. Regina Maria Cicarelli, que disponibilizou reagentes e análises dos plasmídeos recombinantes. Agradeço também Joyce Aparecida Martins pelo auxílio prestativo e ensinamentos para a análise das amostras.

À Cristina Fajardo, que além de uma grande amiga, ainda nos auxiliou prestativamente como técnica do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico.

Às secretárias do Departamento de Análises Clínicas, Ana Maria Dias Dantas, Maria Auxiliadora Lima, Edna Batista Lima e Sueli Providelo; e da secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Elaine Midory Ychico e Jorge Alves Lima que nos auxiliaram durante todos esses anos.

À todos os alunos e ex-alunos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico que além de compartilhar conhecimentos, a inestimável amizade, o árduo companheirismo e constante incentivo foram essenciais para o desenvolvimento e concretização desse trabalho. Espero que de alguma forma eu tenha demonstrado o carinho que tive e terei por todos vocês! Em especial: Paulo Henrique Lage Carbone, Ana Cristina Messas, Simone Sorkin Arazi, Hamilton Hinuy, Mustafá Issa, Fabiana Pereira dos Santos, Fabiana Vecchia, Maria Alice Willrich, Selma Cavalli, Ivanise Rebecchi, Verônica Oliveira, Helder Basques, Nadia de Godoy, Sarah Soares, Antonio Rago, Claudia Gonzáles, Silvia Himerfarb, Lidio Lima Neto, Jamile Couto, Erika de Souza, Bety Chen, Adriana Ozaki, Renata de Assis, Maurício de Andrade, Álvaro Largura, Vivian Silbiger, André Luchessi, Raffaella Picciotti, Daniela Oliveira, Alice Rodrigues, Iara Nomiyama, Fabiana Yamada, Liliane Yamamoto, Álvaro Nishikawa

À bibliotecária de referência Maria Lúcia Adamo Attar da Biblioteca da Engenharia Química da Universidade de São Paulo por auxiliar na ficha catalográfica.

À Dorlei, Claudia, Rose e Carmen, pela convivência e pelos cafezinhos!

À querida amiga Regina Braz da Silva Santos que auxiliou prestativa e pacientemente na correção ortográfica.

À Carolina Góis, Amanda Nardis, Jamille Musse, Vanessa Remualdo e Marcio Seto que com suas indagações me incentivaram sempre a aprender mais.

À minha irmã Eleine Kuroki Anzai, sempre amiga e companheira!

Às famílias Anzai, Kuroki, Kanto e Kagohara: minha eterna gratidão por sempre acreditarem em mim e por serem a minha FAMÍLIA!

Aos amigos e dirigentes do Grupo Maria de Magdala, que contribuíram significativamente para minha evolução e meu aprendizado moral.

Aos meus queridos amigos Binho, Briane, Ricardinho, Débora, Ricardo, Ilka, Tony, Eliene, Meire, Valéria, Leo, Fernando, Nilceia que em momentos diferentes desse doutorado me deram muito apoio, incentivo e alegria!

E à todos amigos, colegas de trabalho e familiares que aqui citados ou não, que em diferentes circunstâncias e momentos ao longo de minha vida, tanto contribuíram com amizade e conhecimentos para minha formação pessoal e acadêmica.

*“A educação é uma coisa admirável.
Mas é sempre bom lembrar, de tempos em tempos,
que nada daquilo que realmente vale a pena saber pode ser ensinado.”
(Oscar Wilde)*

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar...
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”
(Francisco Cândido Xavier)*

SUMÁRIO

p.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 ANÁLISE DE DNA EM IDENTIFICAÇÃO HUMANA E A INCORPORAÇÃO DE CONTROLES DE QUALIDADE	5
2.2 ANÁLISE DE DNA EM IDENTIFICAÇÃO HUMANA	6
2.3 UTILIZAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO E EXTERNO EM IDENTIFICAÇÃO HUMANA PELO DNA.....	16
2.3.1 Controle de qualidade interno.....	17
2.3.2 Controle de qualidade externo: Testes de proficiência em genética forense	27
3. OBJETIVOS.....	33
4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 CASUÍSTICA.....	34
4.2 MATERIAL	34
4.2.1 Material descartável	34
4.2.2 Equipamentos.....	35
4.2.3 Reagentes	36
4.3 MÉTODOS	37
4.3.1 Coleta e preparo das amostras para extração de DNA.....	37
4.3.1.1 Sangue total.....	37
4.3.1.2 Saliva total.....	38
4.3.2 Extração de DNA	38
4.3.3 Quantificação e análise da integridade do DNA	38
4.3.4 Identificação dos alelos dos diversos loci das STR de interesse.....	39
4.3.4.1 Amplificação da região polimórfica do DNA	39

4.3.4.2	<i>Visualização e análise do DNA</i>	40
4.3.5	Preparo dos fragmentos dos loci das STRs para clonagem	40
4.3.5.1	<i>Análise dos oligonucleotídeos iniciadores para incorporação de sítio de restrição</i>	40
4.3.5.2	<i>Amplificação da região polimórfica do DNA</i>	41
4.3.5.3	<i>Purificação do produto da PCR</i>	42
4.3.5.4	<i>Seqüenciamento do fragmento de DNA</i>	42
4.3.6	Clonagem dos fragmentos de DNA (alelo)	43
4.3.6.1	<i>Transformação da Escherichia coli com plasmídeo p-GEM®-Zf(+)</i>	44
4.3.6.2	<i>Obtenção e purificação do plasmídeo recombinante</i>	45
4.3.6.3	<i>Análise do plasmídeo recombinante</i>	45
4.3.6.4	<i>Análise do tamanho do fragmento clonado no pGEM®-5Zf(+)</i>	46
4.3.7	Construção dos controles de qualidade e encaminhamento aos laboratórios de análises clínicas	46
5.	RESULTADOS	50
5.1	COLETA E EXTRAÇÃO DE DNA	50
5.2	ANÁLISE DO PERFIL GENÉTICO PARA SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	51
5.3	CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA – ANÁLISE DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE	53
5.4	CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DAS REFERÊNCIAS ALÉLICAS	64
6.	DISCUSSÃO	76
7.	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Seqüência do promotor, do sítio múltiplo de clonagem e da região de inserção do inserto no pGEM® easy vector.....	43
Figura 4.2 - Esquema da clonagem dos fragmentos da PCR utilizando pGEM easy vector.....	43
Figura 4.3 - Sistemas multiplex comercialmente disponíveis para amplificação dos 13 loci de STRs indicados pelo CODIS, distribuídos de acordo com o tamanho do produto de PCR em pares de bases e seus fluoróforos. Os loci marcados em retângulo não são indicados pelo CODIS.....	47
Figura 5.1 - Fotografia do gel de agarose a 0,8%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo com marcador de 100bp e amostras de DNA distintas extraídas de sangue.	50
Figura 5.2 - Fotografia do gel de agarose a 0,8%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo das amostras de DNA extraídas de sangue (posição 1 ao 5) e de saliva (posição 6 a 10).....	51
Figura 5.3 - Fotografia do gel de agarose a 2%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo com marcador de 100bp e com produtos da PCR da STR FGA.	52
Figura 5.4 - Fotografia do gel de agarose a 2%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo com marcador de 100bp e com produtos da PCR purificados da STR FGA.....	52
Figura 5.5 - Fotografia do gel de agarose a 2%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo dos produtos da PCR purificados das STRs CSF, TPOX, D5S818, D8S1179, D7S820, FGA, D21S11, VWA, D13S317, D3S1358, D18S51, TH01, D16S539; na presença de marcador de 100bp e marcador de peso molecular Low Mass com os respectivos valores equivalente em ng.....	53
Figura 5.6 - Eletroferograma do alelo 25 da STR FGA mostrando parte das repetições consecutivas [TTTC] ₃ TTTTTCT[CTTT] ₁₇ CTCC[TTCC] ₂	53
Figura 5.7 - Fotografia do gel de agarose a 1,0%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos contendo insertos extraídos de <i>E.coli</i> DH5α recombinantes com marcador de 100bp.....	54

- Figura 5.8 - Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos das STRs VWA (1 e 2), D21S11 (3 a 5) e CSF (6 e 7) e com marcador de 100bp. 54
- Figura 5.9 - Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D5S818 (1 a 3) e TPOX (4 e 5) e com marcador de 100bp 55
- Figura 5.10 - Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D3S1358 (1 a 3, que foram reanalisados, vide figura 5.11) e D13S317 (4 e 5, amostra 5 não foi utilizada) e com marcador de 100bp 55
- Figura 5.11 - Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D3S1358 (1 e 2), D8S1179 (3 e 4) e D16S539 (5 e 6) e com marcador de 100bp..... 55
- Figura 5.12 - Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos das STRs FGA (1 e 2), TH01 (3 e 4) e D7S820 (5 e 6). 56
- Figura 5.13 - Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos da STR D18S51 e com marcador de 100bp..... 56
- Figura 5.14 - Fotografia do gel de poliácridamida a 8% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D7S820 (1 a 3), TH01 (4 a 5), VWA (6 e 7), D21S11 (8 a 10) e D3S1358 (11 a 14) e marcador de 10bp. 57
- Figura 5.15 - Fotografia do gel da figura 5.15 corado posteriormente com prata. Plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D7S820 (1 a 3), TH01 (4 e 5), VWA (6 e 7) D21S11 (8 a 10) e D3S1358 (11 a 14) e marcador de 10bp..... 57
- Figura 5.16 - Fotografia do gel de poliácridamida a 8% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com

enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D13S317 (1 a 3), D5S818 (4 a 7) e D8S1179 (8 a 9) e marcador de 10bp.....	58
Figura 5. 17- Fotografia do gel de poliacrilamida a 8% corado com corado com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D18S51 (1 a 2), D16S539 (3 e 4) e CSF (5 e 6) e marcador de 10bp.....	58
Figura 5.18 - Fotografia do gel de poliacrilamida a 8% corado com corado com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos da STR FGA (1 a 3) e marcador de 10bp.....	59
Figura 5.19 - Fotografia do gel de poliacrilamida a 8% corado com corado com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima EcoR1, com insertos correspondentes aos alelos da STR TPOX (1 a 3) e marcador de 10bp.....	59
Figura 5.20 - Eletroferograma da análise da STR FGA em ABI 310. A: Padrão alélico do AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega); B: Amostra de produto de PCR de DNA de plasmídeo extraído de uma única colônia amplificado com AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega).....	60
Figura 5.21 - Eletroferograma da análise da STR TH01 em ABI 310. A: Padrão alélico do AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega); B: Amostra de produto de PCR de DNA de plasmídeo extraído de uma única colônia amplificado com AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega).....	61
Figura 5.22 - Eletroferograma da análise da STR TH01 em ABI 310. A: Padrão alélico do AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega); B: Amostra de produto de PCR de DNA de plasmídeo extraído de uma única colônia amplificado com AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega).....	62
Figura 5.23 - Eletroferograma da análise da STR D21S11 em ABI 310. A: Padrão alélico do AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega); B: Amostra de produto de PCR de DNA de plasmídeo extraído de uma única colônia amplificado com AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega).....	63
Figura 5.24 - Eletroferograma das amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 dos loci marcados com fluoresceína, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50.	65

- Figura 5.25 - Eletroferograma ampliado das amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 dos loci marcados com fluoresceína, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50. 66
- Figura 5.26 - Eletroferograma das amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 dos loci marcados com JOE, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50. 67
- Figura 5.27 - Eletroferograma ampliado de amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 dos loci marcados com JOE, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50. 68
- Figura 5.28 - Eletroferograma de amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 dos loci marcados com TMR, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica 1:50. 69
- Figura 5.29 - Eletroferograma ampliado de amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 do locus VWA, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50. 70
- Figura 5.30 - Eletroferograma ampliado de amostras amplificadas por AmpFISTR® Identifilier™ e analisadas em ABI 310 dos loci D8S1179, D21S11, D7820, CSF1PO, marcados com fluorescência 6-FAM, obtidos por análise pelo software GenoTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do AmpFISTR® Identifilier™; B: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50. 71
- Figura 5.31 - Eletroferograma ampliado de amostras amplificadas por AmpFISTR® Identifilier™ e analisadas em ABI 310 dos loci D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, marcados com

fluorescência VIC, obtidos por análise pelo software GenoTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do AmpFISTR® Identifilier™; B: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50.. 72

Figura 5.32 - Eletroferograma ampliado de amostras amplificadas por AmpFISTR® Identifilier™ e analisadas em ABI 310 dos loci D19S433 (amplificação não adequada), VWA, TPOX, D18S51 marcados com fluorescência NED, obtidos por análise pelo software GenoTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do AmpFISTR® Identifilier™; B: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50. 73

Figura 5.33 - Eletroferograma ampliado de amostras amplificadas por AmpFISTR® Identifilier™ e analisadas em ABI 310 dos loci D5S818 E FGA, marcados com fluorescência PET, obtidos por análise pelo software GenoTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do AmpFISTR® Identifilier™; B: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Informação dos 13 STRs recomendados pelo CODIS..... 21

Tabela 5.1 - STRs e os respectivos alelos encontrados na casuística obtida..... 51

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1	- Os loci mais utilizados no FBI e INTERPOL distribuídos segundo os kits comerciais multiplex.	12
Quadro 4.1	- Loci utilizados e suas referências.	37
Quadro 4.2	- Reagentes utilizados na PCR para análise do perfil genético.....	39
Quadro 4.3	- Programa padrão utilizado nas PCRs com iniciadores marcados com fluorescência para análise do perfil genético.....	40
Quadro 4.4	- Programa padrão utilizado nas PCRs dos iniciadores com sítio de restrição EcoR1	41
Quadro 4.5	- Temperatura de hibridização utilizada nas PCRs dos iniciadores com sítio de restrição EcoR1	41
Quadro 4.6	- Quantidade de reagentes utilizados na reação de ligação.....	44
Quadro 4.7	- Tipos e concentração de reagentes utilizados na PCR com o sistema multiplex PowerPlex®16	47
Quadro 4.8	- Programa padrão utilizado nas PCRs com o sistema multiplex PowerPlex®16.	48
Quadro 4.9	- Tipos e concentração de reagentes utilizados na PCR com o sistema multiplex AmpFISTR® Identifilier™.....	48
Quadro 4.10	- Programa padrão utilizado na PCR com o sistema multiplex AmpFISTR® Identifilier™.	49
Quadro 5.1	- Alelos das STRs presentes na referência alélica construída e resumo dos resultados da análise da PCR realizada com o sistema multiplex PowerPlex®16 e AmpFISTR® Identifilier™	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
AABB	Associação Americana de Banco de Sangue
ASCLD/LAB	Sociedade Americana de Diretores de Laboratórios Criminais / Laboratórios Credenciados
BLAST®	Ferramenta de Procura de Alinhamento Local Básico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CODIS / FBI	Sistema de Índice de Combinação de DNA / Agência Federal de Investigação
DAB	Conselho Consultivo de DNA
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDNAP	Perfil de DNA Europeu
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENFSI	Rede Européia de Instituto de Ciências Forenses
ESS	Conjunto Padrão Europeu
EUA	Estados Unidos da América
FBI	Agência Federal de Investigação
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
FO-USP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GEP-ISFG	Grupo Espanhol e Português – Sociedade Internacional de Genética Forense
HCl	Ácido clorídrico
INTERPOL	Organização Internacional da Polícia Criminal
IPTG	Isopropiltiogalactosidase
ISFG	Sociedade Internacional de Genética Forense
ISFH	Sociedade Internacional de Hemogenética Forense

ISSOL	Conjunto de Loci Padrão da INTERPOL
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
LB	Meio Luria-Bertani
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
M	Molar
mA	Miliampere
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
NIST	Instituto Nacional de Referência e Tecnologia (EUA)
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
P.A.	Persulfato de amônia
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pM	Picomolar
PNCQ	Programa Nacional de Controle de Qualidade
RFU	Unidade de Fluorescência Relativa
SBAC	Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SENASP	Secretaria Nacional de Segurança Pública (BRASIL)
SLAGF	Sociedade Latino-America de Genética Forense
SSP-SP	Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo
STRbase	Banco de Dados de STRs
STR	Pequena Repetição Consecutiva
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamino
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TWGDAM	Grupo de Trabalho Técnico em Métodos de Análise de DNA
UV	Ultravioleta
V	Volts
VNTRs	Número Variável de Repetições Consecutivas
W	Watts

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE REFERÊNCIAS ALÉLICAS DE LOCI DE STR DO PARA CONTROLE DE QUALIDADE EM IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Reprodutibilidade, sensibilidade e controle de qualidade são essenciais em identificação humana pelos ácidos nucléicos exigindo uma referência que seja estável a temperatura ambiente e que monitore todo procedimento de manipulação da amostra. O estudo se propõe a construção de referências alélicas com plasmídeos recombinantes de 13 loci de STRs recomendados pelo CODIS-CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 e D21S11. Os ácidos nucléicos foram extraídos de amostras de sangue ou saliva, com caracterização das STRs pela PCR e análise de fragmento. Os fragmentos dos diferentes alelos foram clonados em plasmídeos pGEM-T. Estes clones foram avaliados, utilizando-se dois sistemas comerciais. Obteve-se amplificações dos alelos das STRs D3S1358, TH01, D21S11, D5S818, D13S317 e VWA pelo PowerPlex®16 e D18S51, D21S11, D3S1358, D5S818, D8S1179, TH01 e TPOX pelo AmpFLSTR®Identifiler™. A referência alélica com plasmídeos recombinantes foi construída e devidamente caracterizada demonstrando o seu potencial de aplicação como controle positivo.

Palavras-Chaves: STR. Identificação Humana. Marcador Molecular. Controle de Qualidade

ABSTRACT

CARACTERIZATION AND DEVELOPMENT OF STRS ALLELIC REFERENCE SYSTEM TO QUALITY CONTROL IN HUMAN IDENTIFICATION

Reproducibility, sensibility and quality control are essentials in DNA human identification, requiring a stabile ambient temperature reference that monitors all procedures of samples manipulation. This study propose allelic reference construction, that will be useful as external positive control for 13 CODIS STRs - CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, e D21S11. The nucleic acid was extracted from saliva or blood samples and enabling PCR-based typing and fragment analysis. Differents alleles founded were cloned into pGEM-T easy vector plasmids. The clones were analyzed using two commercial systems. The STRs D3S1358, TH01, D21S11, D5S818, D13S317 and VWA were amplified by PowerPlex®16, and D18S51, D21S11, D3S1358, D5S8181, D8S1179, TH01 and TPOX by AmpFLSTR® Identifiler™. The allelic reference with recombinants plasmids was constructed and duly characterized, and the positive control potential application was demonstrated.

Keywords: STR. Human Identification. Molecular Marker. Control Quality.

1 INTRODUÇÃO

O estudo de regiões polimórficas de DNA (ácido desoxirribonucléico) para a identificação humana resulta em alto poder discriminatório. Entretanto, a definição de um determinado alelo está associado à capacidade discriminatória do processo, incluindo a qualidade da amostra biológica (pela extração do DNA), o bom desempenho da amplificação da região polimórfica (pela PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase) e da separação dos fragmentos, que depende da resolução do sistema de eletroforese assim como do sistema de detecção utilizado. A garantia de qualidade estará diretamente relacionada a uma referência de procedência idônea deste processo todo que deve ser cuidadosamente controlada a cada etapa.

As medidas de controle de qualidade interno e externo consistem na monitoração dos procedimentos desde a coleta de amostra, rastreamento, identificação, metodologia e manutenção dos equipamentos e do material do laboratório utilizado. Para isso, utilizam-se também amostras controle com resultados conhecidos, objetivando desde a avaliação dos métodos empregados até a correlação entre dados laboratoriais e clínicos, adicionado da interpretação dos resultados gerados pelo sistema (BUTLER, 2005; FBI – Agência federal de Investigação, 2001; INTERPOL, 2001; PNCQ, 2006).

Os propósitos de um programa de controle de qualidade externo não podem ser esquecidos em uma rotina laboratorial, pois a qualidade e o desempenho analítico do laboratório, assim como o estabelecimento das variações intra e interlaboratoriais, devem ser constantemente realizados. Esse programa também

inclui estudos de correlação entre reagentes comerciais, instrumentos, procedimentos de calibração e analíticos, e análise de seus resultados (FBI, 2001; INTERPOL, 2003; BUTLER, 2005; PNCQ, 2006).

Utilizando-se testes de controle de qualidade, há a possibilidade de detectar erros sistemáticos e aumento da precisão dos resultados, sendo que, na maioria dos casos, os erros só podem ser devidamente detectados após a sua revisão (BLICK & PASSEY, 1996; CARRACEDO et al, 1998; CARRACEDO et al, 2001; GARCIA-HIRSCHFELD et al, 2005; GÓMEZ et al, 2004; SCHNEIDER et al, 1999). O custo da análise errônea se eleva de diferentes formas, seja na obrigatoriedade da repetição e no reembolso dos prejuízos como nos custos da revogação da prova, se utilizada no julgamento criminal (FBI, 2001; INTERPOL, 2003), ou cível. Tais erros resultam na perda de confiança do laboratório se tornando um grande problema na aceitação futura.

A elaboração de teste de proficiências em análise de ácidos nucleicos ou exercícios colaborativos inclui diversos passos metodológicos, tais como: (1) escolha e obtenção de amostras de DNA ou material biológico; (2) desenvolvimento do exercício a ser aplicado, estipulando-se o tipo, a característica e a quantidade de amostra a ser analisada; (3) encaminhamento das amostras aos laboratórios; (4) análise e interpretação dos resultados; (5) informação detalhada aos laboratórios participantes (KLINE et al, 2005; SCHNEIDER et al, 2004). No Brasil, não existem testes de proficiência, mas somente exercícios colaborativos em identificação humana pelo DNA que são realizados pelo Grupo Espanhol Português da Sociedade Internacional de Genética Forense - GEP-ISFG (GOMÉZ et al, 2004), e pela Sociedade Latina-Americana de Genética Forense – SLAGF (PENACINO et al, 2006), não havendo um grupo brasileiro específico que realize controle de qualidade

As amostras controle utilizadas para controle de qualidade interno, externo e em exames de proficiência são construídas com amostras biológicas como sangue total de indivíduos (PETERSON & MARKHAM, 1995 a e b; BARKER, 2002; BJERRE et al, 1997; HALLENGERG & MORLING; 2001; PETERSON et al, 2003; GARCIA-HIRSCHFELD et al, 2005; GÓMEZ et al, 2004; KLINE et al, 2005), que mesmo sendo devidamente esclarecidos eticamente são submetidos a diversas coletas. A possibilidade de diminuir essa coleta a uma única realizada no início do desenvolvimento do controle de qualidade, disponibilizando outros tipos de materiais biológicos não humanos contendo somente o fragmento de DNA pertinente para o estudo ou para controle de qualidade, pode ser uma solução viável e interessante. Além disso, esse método não permite que o código genético total do doador não seja amplamente divulgado e em alguns casos comercializado.

A importância da construção de uma referência é de utilizá-la como controle positivo para PCR e, também, como marcador ou padrão alélico amplificável pela PCR, caso sejam incorporados todos os alelos de uma determinada Pequena Repetição Consecutiva - STR. Havendo a possibilidade de incorporá-la em um sistema de gerenciamento de qualidade, o mesmo poderá ser utilizado para avaliação de qualidade regional e nacional.

A referência seria composta de uma mistura de plasmídeos recombinantes contendo vários lóci com diferentes alelos que podem ser periodicamente relacionados de forma randômica e sistemática, além de serem amplificáveis pela PCR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O Programa Nacional de Controle de Qualidade – PNCQ (2006), vinculado à Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, SBAC – define controle de qualidade externo como *“a utilização de amostras-controle de valor desconhecido, sendo sua avaliação realizada pelo valor médio de consenso de todos os participantes que utilizam a mesma metodologia”*, tendo como objetivo *“assegurar que os resultados laboratoriais fiquem o mais próximo possível do valor real dos parâmetros analisados”*. O teste de proficiência é realizado para averiguar a competência e a capacidade dos laboratórios para a execução de determinados exames, podendo ou não utilizar de amostras-controle do programa de controle de qualidade. Já o controle de qualidade interno consiste *“na utilização de amostras-controle de valores conhecidos, dosadas ao mesmo tempo em que as amostras dos pacientes”* (PNCQ, 2005).

No âmbito da ciência forense, em 1974, Thompson já havia descrito a importância da utilização de controles de qualidades pelos laboratórios, tanto internos, como externos. Ressalta ainda que, o produto presente na cena do crime normalmente é único, não havendo possibilidades de repetições, e também possui qualidades variadas, que só podem ser mensuradas por controles independentes e indiretos.

2.1 ANÁLISE DE DNA EM IDENTIFICAÇÃO HUMANA E A INCORPORAÇÃO DE CONTROLES DE QUALIDADE

Análise de amostras para caracterização individual foi revolucionada em meados dos anos 80, quando Jeffreys (1985) sugeriu a análise de minissatélites ou VNTRs presentes no DNA objetivando a individualização de diferentes alelos existentes na população. Jeffreys propôs a utilização de sondas multilocus para identificar regiões polimórficas de DNA, sendo conhecida como "impressão digital de DNA" ou "*DNA fingerprint*". O poder discriminatório para identificação pessoal é adquirido utilizando-se pelo menos quatro loci (COMMITTEE ON DNA TECHNOLOGY IN FORENSIC SCIENCE, 1992).

A identificação das regiões foi realizada empregando-se o princípio do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), no qual o DNA é submetido à restrição enzimática clivando a dupla fita de DNA em regiões determinadas. Os fragmentos são separados eletroforeticamente e, posteriormente, desnaturados, neutralizados e transferidos do gel de eletroforese para uma membrana de *nylon* (*Southern blot*). Mediante a presença de uma solução de hibridização com sondas específicas contendo marcação com fósforo radioativo ou biotina, os fragmentos de DNA fita simples hibridizam. Remove-se o excesso de sonda e a seguir revela-se por autorradiografia (se marcado com fósforo radioativo) ou com reação enzimática utilizando estreptoavidina ligada a fosfatase alcalina, que por quimioluminescência, visualiza-se os fragmentos das VNTRs (COMMITTEE ON DNA TECHNOLOGY IN FORENSIC SCIENCE, 1992; JEFFREYS et al, 1985).

No final dos anos 90, a reação de amplificação de DNA pela enzima polimerase foi incorporada aos estudos de caracterização de vínculo genético. A utilização da PCR possibilita a amplificação dos fragmentos polimórficos, e ao ser comparado com as outras metodologias citadas anteriormente é altamente sensível e específico possibilitando a análise de quantidades mínimas de DNA, característica normalmente constante em análise de evidências criminais. Atualmente, os microssatélites ou as STRs são amplamente utilizados em identificação humana, possuindo repetições constituídas de 2 a 9 bases (EDWARDS et al, 1992). O tamanho dos fragmentos correspondentes a alelos das STRs são de 100 a 400bp, aproximadamente, sendo que das repetições consecutivas de número variável - VNTRs - variam de 400 a 1000bp (NAKAMURA et al, 1987). Tal fato torna as STRs às melhores candidatas para a análise de amostras forenses degradadas (BUTLER, 2005).

A análise de DNA em identificação humana engloba inúmeros procedimentos técnicos que podem ser concretizados utilizando-se diferentes metodologias. A análise das características e indicações de cada procedimento é primordial para o posterior entendimento dos controles de qualidade empregados em sua análise.

2.2. ANÁLISE DE DNA EM IDENTIFICAÇÃO HUMANA

A aplicabilidade da tipagem do DNA em identificação humana é muito ampla, englobando desde a identificação de corpos em estado avançado de putrefação ou

esqueletizado, a exclusão de paternidade ou parentesco familiar, até a correlação de amostras biológicas encontradas em corpos ou na cena de um crime com algum suspeito (BRETTELL et al, 2005).

A análise do DNA compreende diversas etapas, independente da metodologia a ser empregada e do tipo de amostra que será analisada (COMMITTEE ON DNA TECHNOLOGY IN FORENSIC SCIENCE, 1992; BONACCORSO, 2005). O processo inclui: 1) coleta de amostras; 2) extração, purificação e quantificação do DNA de todas as amostras; 3) análise dos loci; 4) visualização dos fragmentos e caracterização; 5) interpretação e análise comparativa dos resultados (INTERPOL, 2001).

As amostras de material biológico devem ser minuciosamente colhidas, seja quando dispostas na cena do crime ou quando forem de indivíduos devidamente identificados. É importante que todas as pessoas que manipulam as amostras tenham conhecimentos específicos baseados na literatura especializada, e ainda possuem treinamento em boas práticas de manipulação em laboratórios forenses com rígida formação em controle de qualidade (INTERPOL, 2001). Amostras que não estiverem adequadamente identificadas e documentadas podem ser questionadas; aquelas, que não forem corretamente coletadas, são passíveis de não serem analisadas; outras, se não forem devidamente acondicionadas, pode sofrer contaminação e se, não forem criteriosamente preservadas, pode ocorrer decomposição e deterioração (FBI, 2003).

Amostras de sangue podem ser coletadas dos indivíduos, encontradas em corpos, objetos e superfície. Qualquer que seja o material biológico a ser coletado, o manipulador deverá utilizar luvas ou pinças devidamente estéreis. A coleta de

sangue em indivíduos hígidos deverá ser realizada em dois tubos de 5mL contendo EDTA como anticoagulante, devidamente identificado e a seguir refrigerado. Recomenda-se que os objetos, superfícies ou corpos que possuem as amostras de sangue sejam recolhidas se possível; além de realizar esfregaços nas formas líquidas; ou se secas, umidificar a região com água estéril, seguida de esfregaço. Em ambos os casos aconselha-se esperar secar os esfregaços para posteriormente serem embalados em envelope de papel limpo, evitando que a umidade facilite o crescimento de bactérias e fungos. Amostras de sêmen, de saliva e urina, ou de objetos que os contém, podem ser utilizados e seguem a mesma metodologia descrita anteriormente. Tecidos, dentes, ossos e fios de cabelos também podem servir de fonte de células para análise de DNA (FBI, 2003). A estocagem do material deve ser em refrigerador a 4°C ou em freezer a -20°C, no entanto, para longos períodos, estocar a -70°C (BUTLER, 2005).

O material biológico presente na cena do crime pode aparentar invisível a olho nu, dessa maneira, pode-se utilizar reagente como o luminol que não interfere na análise do DNA para detecção de amostras com vestígios de sangue (GROSS et al, 1999), kits de reagentes contendo antígeno próstata-específico para sêmen (HOCHMEISTER et al, 1999) e para saliva, o teste de detecção de amilase por Phadebas® (WILLOTT & GRIFFITHS, 1980).

Outros cuidados devem ser tomados para a documentação das amostras coletadas na cena do crime: fotografar o local de remoção das evidências, realizar anotações da sua disposição e de características pertinentes (SÃO PAULO, 1999; INTERPOL, 2001 ; FBI, 2003; BONACORSO, 2005).

A degradação do DNA de amostras biológicas, utilizadas em investigação criminal, pode ocorrer decorrente de um processo natural de exposição ao meio-ambiente. Luz, umidade, temperaturas elevadas, bem como contaminações bacterianas ou fúngicas levam à degradação química do DNA humano (SCHNEIDER et al, 2004).

Após a coleta do material biológico, o DNA da amostra deverá ser separado de outras substâncias celulares antes de ser examinado. Proteínas celulares, contaminações químicas e microbiológicas diminuem o poder discriminatório das análises utilizando o DNA (BUTLER, 2005; HOFF-OLSEN et al, 1999; JUNG et al, 1991). A maioria dos procedimentos de extração de DNA compreende a lise celular, seguida da remoção das proteínas celulares precipitadas e por fim a precipitação do DNA com sua final eluição. Existem diversos métodos para obtenção de DNA: a extração orgânica, que é a mais tradicional, empregando-se a proteinase K para lise celular e fenol clorofórmio para a precipitação das proteínas; a extração pela resina *Chelex*; pela sílica; por precipitação salina; e por tiocianato de guanidina. Cada uma delas possuem suas indicações, vantagens e desvantagens (BONACCORSO, 2005; BUTLER, 2005; RAND et al, 1991; SALAZAR et al, 1998; HIRATA, 2002).

A quantidade, a pureza e a integridade do DNA dependem de vários fatores como condições da amostra e da conservação, sendo necessário utilizar critérios para escolha da metodologia de extração para cada tipo de amostra (HAGELBERG et al., 1991; HOCHMEISTER, 1998; SALAZAR et al., 1998; SCHNEIDER, 1998; ALVES, 2000; ANZAI et al., 2001; MESQUITA et al, 2001; OLIVEIRA et al, 2002).

A qualidade e quantidade de DNA devem ser examinadas após a extração, além de verificar a possibilidade de degradação (JUNG et al, 1991; HOFF-OLSEN et

al, 1999). O DNA pode ser quantificado por espectrofotometria a 260 nm, sua pureza pela relação 260/280 nm e a sua integridade pode ser avaliada em géis de agarose. No entanto, esses métodos avaliam a quantidade geral de DNA, seja ele humano ou de outro tipo. Quando se refere às amostras utilizadas em investigação criminal ou passíveis de degradação e contaminação, recomenda-se a utilização da quantificação de DNA de humano (INTERNACIONAL SOCIETY FOR FORENSIC HAEMOGENETICS - ISFH, 1992). Essa quantificação pode ser realizada por hibridização de uma sonda utilizando-se um determinado locus (D17Z1) em uma amostra de DNA imobilizada em uma membrana de nylon – *dot blot* (WALSH et al., 1992; ANDERSEN, 1998), e por kits comerciais como, por exemplo, o AluQuant™ *human DNA quantitation system* (WAYE et al, 1989; HOFF-OLSEN et al, 1999; MANDREKAR et al., 2001; SCHNEIDER et al, 2004; BUTLER, 2005).

A PCR foi descrita em 1985 por Mullis e colaboradores (SAIKI et al, 1985; MULLIS, 1990) e representou um avanço significativo para a genética forense, possibilitando a amplificação de fragmentos de DNA específicos, chegando a milhões de cópias. Resumidamente, a PCR é uma reação enzimática catalisada por uma enzima termoestável, na qual uma região específica de DNA é replicada seguidamente. Na presença de solução tampão específica e íons Mg^{2+} , a amplificação ocorre em três etapas: desnaturação das fitas duplas de DNA, hibridização dos iniciadores oligonucleotídeos na fita simples e extensão da fita pela enzima polimerase utilizando-se nucleotídeos trifosfatados. Essas etapas podem ser repetidas, multiplicando-se exponencialmente a quantidade do fragmento de DNA. A PCR de cada iniciador diferente deve ser otimizada previamente (OWCZARZY et al, 1997).

Regiões específicas de amplificação são escolhidas de acordo com o objetivo da análise. Atualmente, são utilizadas as STRs para a identificação humana, como descrita anteriormente. Edwards et al (1991) relata que as melhores STRs utilizadas na identificação humana são aquelas com maior polimorfismo (maior número de alelos), menor tamanho (100 a 200 pares de bases), elevado índice de discriminação e heterozigose e baixa frequência de mutações. Para isso, há a necessidade dos laboratórios realizarem previamente um estudo da frequência genética em pelo menos 100 indivíduos não relacionados.

A PCR permite que mais de uma região possa ser copiada simultaneamente se adicionado mais de um iniciador sense e anti-sense em uma única reação. A amplificação simultânea de 2 ou mais regiões de DNA é conhecida por PCR multiplex. Para essa reação, a temperatura de hibridização dos iniciadores deve ser compatível e a complementaridade excessiva das regiões deve ser criteriosamente analisada, para prevenir a formação de dímeros de iniciadores que não hibridizam com o DNA (EDWARDS & GIBBS, 1994). Há diversas vantagens da PCR multiplex para DNA forense: 1) diminui o tempo de preparo e a quantidade de reagentes utilizados; 2) diversos loci podem ser amplificados em uma única reação, empregando-se pouca quantidade de DNA, aumentando a chance de sua amplificação. Atualmente há diversos conjuntos multiplex comercialmente disponíveis, facilitando a padronização e comparação dos resultados entre os laboratórios forenses (LEVEDAKOU et al., 2002; WALLIN et al., 2002; KRENKE et al, 2002; COLLINS et al, 2004) (Quadro 2.1).

Quadro 2.1 - Os loci mais utilizados no FBI e INTERPOL distribuídos segundo os kits comerciais multiplex

Fornecedor	Applied Biosystems http://home.appliedbiosystems.com					Promega http://www.promega.com	
PRODUTO	AmpFLSTR®					Power-Plex®	Power-Plex® 16
LÓCUS	SGM Plus	Profiler	Profiler Plus	Cofiler	Identifier		
D21S11 (1)(2)	X		X		X		X
FGA (1)(2)	X	X	X		X		X
VWA (1)(2)	X	X	X		X	X	X
THO1 (1)(2)	X	X		X	X	X	X
D3S1358 (1)(2)	X	X	X	X	X		X
D8S1179 (1)(2)	X		X		X		X
D18S51 (1)(2)	X		X		X		X
D16S539 (2)	X			X	X	X	X
TPOX (2)		X		X	X	X	X
CSF1P0 (2)		X		X	X	X	X
D13S317 (2)		X	X		X	X	X
D7S820 (2)		X	X	X	X	X	X
D5S818 (2)		X	X		X	X	X
D19S433 (3)	X				X		
D2S1338 (3)	X				X		
Penta D (3)							X
Penta E (3)							X
Amelogenin (1)	X	X	X	X	X	X	X

(1) ISSOL – Conjunto Padrão de Loci da INTERPOL, idêntico Conjunto Padrão Europeu - ESS, com uma exceção: para o ISSOL a amelogenina é opcional
 (2) Os 13 loci do Sistema de Índice de Combinação de DNA - CODIS do FBI
 (3) Locus que fazem parte do grupo dos mais utilizados mundialmente segundo a INTERPOL

Fonte: <<http://www.interpol.int/public/Forensic/DNA/loci.asp>> acessado em 22/05/2006.

Outra técnica que deve ser comentada seria a utilização da PCR em tempo real, que, no momento, está sendo utilizada em ciência forense para determinar a quantidade de DNA humano viável para a amplificação. A PCR em tempo real amplifica regiões específicas de DNA. Diferencia-se da PCR tradicional pois possui sondas marcadas com fluoróforos proporcionando detecção em tempo real dos fragmentos amplificados, sendo simultaneamente quantificados. Dessa maneira, não há necessidade da utilização de géis e análise por *Southern Blot* como nas outras técnicas quantitativas descritas anteriormente (ANDREASON, 2003). Entretanto, para a realização da PCR em tempo real, necessita-se de equipamento

específico e sondas adequadas. O DNA humano pode ser especificamente quantificado para posterior análise do perfil genético pelas STRs (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006).

A eletroforese é empregada para a separação dos fragmentos de DNA (SOUTHERN, 1979) e a sua detecção é realizada com coloração pela prata, por brometo de etídeo ou pela fluorescência reconhecida por lasers específicos (AAIJ & BORST, 1972; BASSAM et al, 1991; BUDOWLE et al, 1991; COMMITTEE ON DNA TECHNOLOGY IN FORENSIC SCIENCE, 1992; GILL, 1992; SULLIVAN et al, 1992; FRÉGEAU & FOURNEY, 1993; PRINZ et al, 1996; KIMPTON et al, 1996; INTERPOL, 2001; BUTLER, 2005).

Após a visualização, dá-se a análise dos resultados comparando os fragmentos de DNA amplificados das amostras do pai, mãe e filho em caso de paternidade; ou das amostras encontradas na cena do crime, em corpos ou vítimas com as de suspeitos (INTERPOL, 2001; BUTLER, 2005). No entanto, durante a PCR, um número de artefatos podem ocorrer e interferir na interpretação e genotipagem dos alelos presentes na amostra de DNA, sendo visualizadas somente após a eletroforese. Entre esses artefatos incluem: os produtos "stutters" (WALSH et al, 1996) e adição de nucleotídeos não pertencentes ao DNA alvo (CLARCK, 1988). Outros fatores podem estar presentes na análise da STR e devem ser criteriosamente analisados. São eles: microvariações alélicas (MISCICKA-SLIWKA et al, 1997), padrão tri-alélico (CROUSE et al, 1999), perda de um alelo (WALSH et al, 1986) e mutações (NADIR et al, 1996).

Havendo uma correlação entre as amostras, verifica-se a significância do resultado. A importância da evidência de DNA é dada por meio da probabilidade de

que a casualidade tenha ocorrido. Para isso, tem-se antecipadamente a frequência dos perfis genéticos de uma população. Caso o perfil genético seja extremamente raro em uma dada população, pode-se dizer que a evidência é extremamente forte, caso contrário, pode consistir em uma mera casualidade. A frequência de um perfil genético em uma determinada população é calculada com base na multiplicação das frequências do genótipo de cada locus (EVETT & WEIR, 1998).

Variações nos alelos dos loci mais utilizados na identificação humana já foram descritas nas diversas populações (RUITBERG et al, 2001; BUTLER, 2005). Entretanto, a determinação da frequência genética em um grupo étnico pode estar sujeita a divergências, principalmente na população brasileira, que é fruto de uma grande miscigenação (MOURA-NETO & BUDOWLE et al, 1997; SOARES-VIEIRA et al. 2000,2001).

Para a população brasileira, Moura-Neto e Budowle (1997) determinaram a frequência genética da população do Rio de Janeiro, para 6 loci de VNTRs: D1S7, D2S44, D4S139, D5S110, D10S28 e D14S13. Outros loci de VNTRs tiveram suas frequências populacionais determinadas: D6S132, D7S467, D17S26 (SILVA & MOURA-NETO, 1998) e D2S44, D4S139, D5S110, D8S358, D10S28 e D17S79 (RAMOS et al, 2004).

Ozaki (1999), ao estudar 4 STRs (D18S51, D19S253, D21S11 e SE33), verificou a distribuição e frequência dos alelos, assim como, suas taxas de heterozigose. Observou que os aspectos avaliados apresentam valores significativos para o estabelecimento do vínculo genético familiar. As STRs D3S1358, HUMvWA31/A, HUMFIBRA/FGA, D8S 1179, D2S11, D18S51, D5S818, D13S317, e D7S820 tiveram as frequências populacionais dos seus alelos estabelecidas para a

população brasileira, obtendo o poder de discriminação acima de 0,9999999999 e o poder de exclusão de 0.9999 (CORTE-REAL et al 2000)

Soares-Vieira et al. determinaram a frequência dos alelos e dos genótipos na população brasileira para a STR D1S80 (2000) e para as STRs CSF1PO, TPOX e TH01 (2001). Para a STR D1S80, os autores identificaram 19 alelos distintos na população caucasiana e 15 entre os mulatos, demonstrando a variabilidade genética da população. Whittle et al (2004) analisou a frequência alélica de 19 STRs distintas utilizando o perfil genético de 13000 indivíduos brasileiros. Constatou que a frequência da presença de perda de alelos e da taxa de mutação observada podem contribuir significativamente para a discriminação genética dessa população.

Pimenta et al (2006) avaliaram 12 STRs de 752 indivíduos de São Paulo, que foram divididos em categorias de cor de pele e analisando os dados não houve diferenciação genética significativa entre os três grupos. Esse resultado alerta do perigo em classificar a população brasileira pela cor de pele com seu ancestral geográfico (PENA, 2005).

Um importante aspecto da utilização do cromossomo Y para a identificação humana se dá principalmente em casos criminais na qual um indivíduo do sexo masculino deixa vestígios biológicos para a análise do DNA em um corpo do sexo feminino, facilitando a análise do DNA do agressor.

Oliveira et al (2001) determinou a frequência alélica para 3 regiões do cromossomo sexual Y DYS390, DYS391 e DYS393, sendo que a combinação dessas três STRs revelaram um poder de exclusão de 0,9498. Góis et al (2007) analisou 12 STRs do cromossomo Y incluídos no sistema PowerPlex® Y (Promega). A diversidade genética dessas STRs foi de 0,6746 e a diversidade haplotípica

0,9996. A comparação entre os resultados obtidos demonstrou que a variação dentro de cada grupo é maior que a variação entre os grupos.

2.3 UTILIZAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO E EXTERNO EM IDENTIFICAÇÃO HUMANA PELO DNA

No teste de vínculo genético familiar, a quantidade de amostra coletada normalmente é previsível e constante, não havendo muitos problemas com sua quantidade e qualidade. Entretanto, há materiais biológicos utilizados nestes testes, que são coletados post-mortem oriundos de corpos exumados ou putrefeitos. Nesse caso, o material predominante está degradado da mesma maneira que as evidências de material biológico encontrado na cena do crime. O produto obtido de provas forenses é único e muitas vezes a garantia de sua qualidade só é adquirida através de alguma forma de controle independente e indireto (FBI, 2001, INTERPOL, 2001).

Controles de qualidade internos e externos servem para esse propósito. Os laboratórios forenses podem utilizar como controle interno, padrões reconhecidos e devidamente testados para tal finalidade. Controles externos devem ser introduzidos por programas administrados por organizações certificadas, que, inicialmente, preparam padrões de espécimes conhecidas, como sangue, e envia para todos os laboratórios credenciados. A metodologia utilizada e os respectivos resultados devem ser informados para o comitê, que analisará os dados e avaliará as alterações entre os laboratórios (THOMPSON, 1974; KLOOSTERMAN, 2001; BLICK & PASSEY, 2003).

2.3.1 Controle de qualidade interno

Ao analisar uma amostra biológica destinada à caracterização de vínculo genético, seja familiar ou em casos forenses, qualquer contaminação com DNA estranho ou metodologias inadequadamente aplicadas podem resultar: na impossibilidade de obter o DNA para amplificação, o não estabelecimento dos perfis genéticos e na inutilização da amostra. A primeira preocupação no estudo do perfil genético para a identificação humana, é avaliar o quanto as metodologias de detecção utilizadas pelos laboratórios são válidas, assim como seus princípios. Para assegurar resultados, um programa de controle de qualidade é fundamental para os laboratórios que realizam identificação humana pelo DNA. Todas as metodologias de análise de DNA forense devem ser submetidas à validação para assegurar a reprodutibilidade e a robustez da técnica (KLOSTERMAN, 2001).

Procedimentos inadequados, que possam levar a contaminação de amostras pelos investigadores e os profissionais do laboratório, podem resultar em uma incorreta interpretação do perfil genético. Dessa maneira, o desenvolvimento e cumprimento de normas e procedimentos de boas práticas de laboratórios são imprescindíveis, assim como, treinamentos específicos para o exame de DNA, tornaram-se obrigatórios (NEUMAYER, 1998; INTERPOL, 2001).

Desde 1992, a ISFH faz recomendações para a análise de DNA pela PCR. A contaminação pode ser evitada atendendo a certos cuidados durante todo o processo de análise de DNA, que vão desde a coleta e armazenamento do material biológico do qual será extraído o DNA, até o próprio local de preparação da PCR (ISFG, 1992).

A preservação do DNA para a amplificação pela PCR também envolve o controle da temperatura, da umidade, o valor do pH (BENDER, 2004), a presença de ácido húmico e fúlvico e microorganismos. A temperatura baixa pode preservar o DNA, seja ele datado de milhares de anos, ou de amostras forenses, assim como o DNA pode ser mais bem preservado em ambientes secos e com o mínimo crescimento de microorganismos. A presença de ácido fúlvico e húmico inibi a enzima Taq DNA polimerase. O pH neutro ou levemente alcalino na amostra também ajuda na preservação do DNA. Os microorganismos se em grande quantidade podem degradar o DNA por completo (BURGER et al., 1999).

O FBI (1999, 2001) e a INTERPOL (2001) estabeleceram normas para os laboratórios forenses, que participam da construção dos bancos de DNA internacional. Relaciona-se, principalmente, a procedimentos de coleta de amostras biológicas para análise do DNA, que podem ser consideradas evidências, assim como, vários aspectos importantes para o treinamento técnico. No Brasil, a Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo (São Paulo, 1999) e a Secretaria Nacional de Segurança Pública – SENASP (2006) elaboraram documentos na tentativa de padronizar métodos e cuidados de coleta e manutenção das amostras pelos peritos criminais.

Sucintamente, a coleta do material deve ser realizada em condições assépticas e o indivíduo responsável pela coleta estar devidamente paramentado para se evitar contaminação em ambos os sentidos, como por exemplo, utilização de hastes com algodão, tubos, frascos e envelopes plásticos ou de papel. Para a coleta de amostras biológicas umedecidas é aconselhado a posterior secagem em ambiente estéril para o seu acondicionamento, no entanto, se isso não for possível, transporta-se imediatamente para o laboratório e congela-se a -20 °C no mínimo

(SÃO PAULO, 1999; FBI, 1999 e 2001; INTERPOL, 2001; SENASP, 2006). Não se deve descongelar e congelar as amostras repetidamente, pois causaria a degradação do DNA (INTERPOL, 2001).

A escolha de métodos de extração de DNA está relacionada ao tipo de material e é importante para que se obtenha sucesso no estudo das STRs. Dessa maneira, cada laboratório deve realizar testes e otimizações de técnicas específicas para cada tipo de amostra forense (FBI, 2001; INTERPOL 2001; BUTLER, 2005; BONACCORSO, 2005). Em 1996, a maioria dos laboratórios entrevistados por uma filial da Sociedade Internacional de Genética Forense (53%) realiza a purificação do DNA pelo método orgânico (67%) seguido por não orgânico (33%).

Hoff-Olsen et al (1999) avaliaram cinco métodos de extração de DNA de tecidos humanos em estado de decomposição, que normalmente encontram-se altamente degradados, para análise das STRs. Os métodos empregados foram: extração orgânica com fenol-clorofórmio, sílica, filtro de fibra de vidro, Insta Gene Matrix™ e Chelex. O método da sílica, além de ser mais econômico, obteve melhores resultados ao comparar com método fenol-clorofórmio e resultou em um perfil genético completo em 90% dos casos contra 60%. Isso torna a sílica o método mais indicado pelos autores para a extração de DNA de amostras degradadas. O método de Chelex não foi satisfatório para dentes, demonstrando que ele deve ser indicado principalmente para saliva, como descreveu Sweet et al (1996). Em casos como esse, emprega-se controle positivo constituído de amostra conhecida, para verificar se o método foi eficaz (FBI, 2001; INTERPOL, 2001)

Kwok & Higuchi (1989) e Neumaier (1998) descreveram várias recomendações para assegurar a qualidade dos métodos de biologia molecular em

diagnósticos clínicos referentes às fases pré-analíticas e analíticas, principalmente para a realização da PCR. Objetivando evitar a contaminação das amostras, recomenda-se o isolamento físico da área de preparação da PCR, de seus reagentes e todos os materiais descartáveis utilizados na reação, que devem ser previamente esterilizados. Outros cuidados são fundamentais: os reagentes devem ser aliquotados; a utilização de luvas descartáveis é obrigatória e devem ser constantemente trocadas; deve-se ter cuidado ao abrir os tubos, pois parte do produto da PCR pode estar na sua tampa, possibilitando o seu desperdício; a mistura dos reagentes da PCR deve ser feita em um único tubo para posteriormente aliquotá-los em tubos individuais; deve-se adicionar o DNA individualmente em cada tubo e, finalmente, a inclusão obrigatória de controles negativos e positivos, que podem auxiliar na detecção de contaminantes.

Atualmente utiliza-se a linhagem de célula comercial K562 como controle positivo (BJERRE et al, 1997; FBI, 2001; INTERPOL, 2001) ou uma amostra de DNA previamente validada pelo próprio laboratório ou externamente, como ocorre em kits de identificação humana (LAFOUNTAIN et al, 2001; KRENKE et al, 2002; LEVEDAKOU et al, 2002; SCHLENK et al, 2004).

Com o intuito de unificar os loci a serem utilizados em identificação humana para a incorporação de perfis genéticos de criminosos em seu banco de dados - CODIS, o FBI indicou a utilização de 13 loci para a sua análise; a saber, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, e D21S11 (BUDOWLE & MORETTI, 1999) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Informação das 13 STRs recomendadas pelo CODIS.

Nome do Locus	Localização no cromossomo	Unidade de repetição	Acesso de GenBank	Variação dos alelos	Número de alelos observados
CSFIPO	5q33.1 c-fms pronto-oncogene, 6° intron	TAGA	X14720	6-16	15
FGA	4q31.3 α -fibrinogênio 3° intron	CTTT	M64982	15-51,2	69
TH01	11p15.5 Tirosina hidroxilase 1° intron	TCIAT	D00269	3-14	20
TPOX	2p25.3 Tiroide peroxidase 10° intron	GAAT	M68651	6-13	10
VWA	12p13.31 von Willebrand factor 40° intron	[TCTG] [TCTA]	M25858	10-24	28
D3S1358	3q21.31	[TCTG] [TCTA]	NT_005997	9-20	20
D5S818	5q23.2	AGAT	G08446	7-16	10
D7S820	7q21.11	GATA	G08616	6-15	22
D8S1179	8q24.13	[TCTA] [TCTG]	G08710	8-19	13
D13S317	13q31.1	TATC	G09017	5-15	14
D16S539	16q24.1	GATA	G07925	5-15	10
D18S51	18q21.33	AGAA	L18333	7-27	43
D21S11	21q21.1	[TCTA] [TCTG] complexo	AP000433	24-38	70

Adaptado de Butler, 2005

Esse conjunto de loci tornou-se referência para todos os países no que se refere à ciência forense (SUN et al, 2003). Essa normatização permitiu estudos de frequências alélicas populacionais comparativas mais adequadas, possibilitando a universalização dos dados genéticos com critérios homogêneos. Com o objetivo futuro de implantar um banco de perfis genéticos de criminosos como o CODIS, o governo federal brasileiro já adotou as STRs sugeridas pelo CODIS como referência em seu Manual de Padronização de Exames de DNA em Perícias Criminais (SECRETARIA NACIONAL DE SEGURANÇA PÚBLICA - SENASP, 2005).

Esses loci contêm repetições bem caracterizadas que podem ser facilmente determinados com uso de uma referência de tamanho de fragmento de DNA. As vantagens da utilização de marcadores de tamanho em análise de DNA têm sido observadas desde o início das análises de VNTRs (WYMAN & WHITE, 1980).

A reprodutibilidade do método de detecção é confirmada observando a intensidade dos fragmentos do marcador podendo fornecer informações relativas à possível variação linha a linha na migração eletroforética de um mesmo material. O marcador é aplicado em linhas dispostas em regiões distintas, destinado a abranger uma maior região do gel. A separação eletroforética depende não somente do tamanho dos fragmentos, mas também da sequência do nucleotídeo (FRANK & KOSTER, 1979). Dessa maneira, os marcadores de tamanho só garantem a eficácia da leitura do comprimento do DNA quando o marcador e o fragmento de DNA desconhecido têm a mesma sequência e o mesmo tamanho. Se as sequências do marcador e dos fragmentos das amostras não são os mesmos, a migração das amostras em relação os fragmentos do marcador podem ser diferentes. Isso se deve a parâmetros ambientais como porcentagem de agarose ou poliacrilamida, a quantidade de sais no tampão de corrida, a voltagem da eletroforese (BUDOWLE et al, 1995; MISCICKA-SLIWKA, 1997; SULLIVAN, 1992) ou mesmo a detecção da emissão de fluorescência presente no fragmento amplificado, como ocorre na utilização de iniciadores marcados com fluorescência (GRIFFITHS et al; 1998; WATSON et al, 2001).

Inúmeros marcadores de tamanho de fragmentos de DNA para eletroforese são disponibilizados comercialmente: 10, 50, 100 bp e 1Kb (INVITROGEN, 2007), ILS600 CXR presente no PowerPlex®16 (PROMEGA, 2007) e GS500 LIZ, no AmpFISTR® Identifiler™ (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005); marcadores de peso

molecular, como o Low DNA Mass Ladder (INVITROGEN, 2005-2); marcadores ou padrões alélicos que possuem os diversos alelos de um determinado locus (PUERS et al, 1993; SULLIVAN et al, 1992).

O marcador alélico é uma mistura artificial de alelos presentes em uma população de uma determinada STR (SAJANTILLA et al, 1992, SULLIVAN et al, 1992). Esses marcadores alélicos servem como padrão de migração para cada STR. Eles devem ser ajustados para os diferentes tamanhos de mensuração presente em instrumentos e condições de cada laboratório (BUTLER, 2005).

Sullivan et al (1992) além de realizarem a amplificação de VNTRs com iniciadores marcados com fluorescência, construíram um padrão de tamanho contendo todos os produtos da PCR, objetivando minimizar erros na estimativa do tamanho causada pelas diferenças de migração eletroforética.

Puers et al (1993) verificaram que ao compararem o padrão de migração das amostras com o marcador construído por eles, observaram a presença de deleções ou inserções menores que um conjunto de repetição na população estudada. Após a realização de seqüenciamento das amostras observaram a presença de microvariações alélicas. Em 1994, Puers et al construíram marcador alélico para a STR HUMF13A01.

Budowle et al (1995) utilizaram um marcador alélico para estipular a migração eletroforética de diversas amostras e determinar, posteriormente, a frequência alélica do locus D1S80 de diversas populações. A STR HUMCD4 também teve o marcador alélico construído e a frequência alélica para a população caucasiana da Áustria estabelecida (GLOCK et al, 1995).

Utilizando três sistemas diferentes de eletroforese e um marcador alélico para a separação de alelos do VNTR Apo B. Printz et al (1996) observaram que aparentes subtipos de alelos tiveram o mesmo padrão migratório em gel de agarose e em gel de poliacrilamida desnaturante. Concluíram que o subtipo e o marcador alélico possuíam o mesmo número de unidades repetitivas, mas diferenciavam na seqüência e no tipo de repetições.

Zhang e Yeung (1996) construíram um marcador alélico do VNTR D1S80 utilizando-se produtos da PCR de diversas amostras, e relataram que é possível a detecção de amostras contendo uma quantidade mínima de DNA. A STR ACTBP2 ou SE-33 teve seu marcador alélico desenvolvido por Miscika-Sliwka e Grzybowski (1997), no qual observaram também a presença de variações alélicas que eram detectadas como se tivessem os mesmos tamanhos, mas possuíam seqüências diferentes. Ressaltaram ainda a importância da utilização dos marcadores alélicos para aumentar a precisão e exatidão da análise, principalmente em situações como a descrita pelos autores.

Dupuy et al (1997) construíram marcadores alélicos para HUMACTBP2, HUMAPOA11 e D11S554 e demonstraram a importância da construção de um sistema de referência alélica para uso local, contendo um número maior de polimorfismos e sendo mais fidedigno que os comerciais, que apresentavam uma quantidade menor de alelos..

Liu et al (1997) sugeriram a importância da análise do polimorfismo populacional que encontraram após o estudo da freqüência alélica na população japonesa e chinesa e a construção do respectivo marcador alélico para a STR ACTBP2. Além de observarem alelos raros dentro de cada população, analisaram

dois alelos que só foram encontrados na população japonesa, enquanto outros dois, somente na chinesa. Esse fato demonstra a variação dos polimorfismos em populações diferentes. Os autores encontraram também algumas microvariações alélicas raras. Todas essas variações foram incorporadas no marcador alélico construído pelos autores, possibilitando uma maior discriminação alélica.

Uma mistura de diversos marcadores alélicos foi desenvolvida para a sua utilização em sistemas multiplex, e possuíam as seguintes STRs: HUMTH01, D21S11, D18S51, D8S1179, HUMVWA, HUMFIBRA/FGA e amelogenina. Os produtos da PCR possuindo os alelos amplificados foram seqüenciados e posteriormente agrupados para a sua análise em um sistema automático (GRIFFITHS et al; 1998; WATSON et al, 2001). Outro marcador alélico multiplex foi desenvolvido por Fujii et al (2000) para as STRs HUMTH01, D9S304 e D3S1744, e também homogeneizaram os produtos da PCR.

Potter (2003) validou novas seqüências de oligonucleotídeos iniciadores e construiu um sistema de referência alélica de três loci recomendados pelo *European Network of Forensic Science Institute* (ENFSI), com alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Entretanto, esclareceu que o objetivo de se estabelecer esse sistema não foi de competir comercialmente com os kits multiplex do mercado e sim dispor de um suplemento eficiente e usual para as análises de amostras forenses com quantidades mínimas de DNA pela PCR.

Hou et al (2001) ao descrever o polimorfismo de seis novas STRs do cromossomo Y, assim como a freqüência populacional para a população chinesa, desenvolveram marcadores alélicos utilizando-se de clonagem para perpetuar os fragmentos de DNA referentes aos alelos analisados.

Zhang et al (2003) estudaram algumas STRs do cromossomo 9 e analisaram que um deles, D9S1118, possuía um alto polimorfismo, e também construíram marcadores alélicos utilizando-se a clonagem para perpetuar os fragmentos.

Fujii et al (2004) desenvolveram um marcador alélico do locus D1S80 com os alelos devidamente seqüenciados e clonados pelo pT7Blue T-Vector. Outros marcadores alélicos para os loci D1S1676, D2S2735, D11S1977 e D22S444 também foram devidamente clonados pelo vetor pGEM-T e seqüenciados (DENG et al, 2005).

Em suma, pôde-se observar que a maioria dos marcadores alélicos foram construídos com produtos da PCR (BUDOWLE et al, 1995; DUPUY et al, 1997; FUJII et al, 2000; GLOCK, 1995; GRIFFITHS et al, 1998; LIU et al, 1997; MISCIK-SLIWKA e GRZYBOWSKI, 1997; PRINTZ et al, 1996; POTTER, 2003; PUERS et al, 1993, 1994; SULLIVAN et al, 1992; ZHANG & YEUNG, 1996; WATSON et al, 2001;) sendo que a minoria são clonados para a sua perpetuação (FUJII et al, 2004; HOU et al, 2003; ZHANG et al, 2003) não havendo nenhum trabalho que realizou a clonagem de diversos alelos concomitantemente e nem relacionado com a construção de uma referência alélica ou controle positivo.

Outro fator que pode interferir na caracterização dos alelos, é a quantidade de DNA utilizada na PCR podendo ser um fator crucial para sua amplificação correta. Kobayashi et al (2004) ao analisar os produtos de DNA obtidos pela PCR da STR TH01 de amostras de DNA de diferentes concentrações, constataram a perda de um alelo com quantidades de DNA muito baixas. De 100pg a 10ng, o DNA foi corretamente amplificado, mas quando analisou utilizou 10pg ou 1pg de DNA, houve

a perda de um dos alelos ou não foi possível detectá-los, sendo que o indivíduo era heterozigoto. Esse dado nos fornece justificativas para analisar cuidadosamente a quantidade de DNA a ser colocada para PCR, evitando a amplificação errônea dos fragmentos.

2.3.2 Controle de qualidade externo: Testes de proficiência em genética forense

Atualmente, são realizados diversos testes de proficiência: o Serviço Cooperativo de Testes (*Collaborative Testing Services*), o Colégio Americano de Patologistas (*College of American Pathologists*), o Instituto de Pesquisas Sorológicas (*Serological Research Institute*), Grupo de Diagnóstico Cellmark (*Cellmark Diagnostic's International Quality Assurance Survey*) a Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB), a Sociedade Americana de Diretores de Laboratórios Criminais (ASCLD/LAB), o Grupo Europeu de Perfil de DNA (EDNAP) e o Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense (GEP-ISFG) (PETERSON et al, 2003).

O primeiro teste de proficiência em análises clínicas relatado foi realizado em 1946 quando Belk e Sunderman distribuíram espécies anônimas para laboratórios de hospitais para avaliar a performance e padronizar os resultados. Os resultados variaram entre os laboratórios, avaliando-se a causa das discrepâncias dos resultados e a qualidade do trabalho realizado (BELK, SUNDERMAN, 1988).

Em 1974, a Fundação de Ciências Forense (Forensic Science Foundation) conduziu um estudo que trouxeram diversos problemas na análise e interpretação dos resultados. Uma combinação de grandes esforços dos laboratórios resultou no aperfeiçoamento na educação e nas oportunidades de treinamento, implementação de programas de certificação e creditação, bem como a realização de testes de proficiência e implementação de programas de controle de qualidade (PETERSON & MARKHAM, 1995 a e b).

A AABB publicou, em 1991, um conjunto de controle de qualidade em teste de DNA utilizando-se RFLP. O Grupo de Trabalho Técnico em Métodos Baseados em Análise de DNA (TWGDAM) foi criado nos Estados Unidos em 1988 e realizou sua primeira publicação de 1991 (PETERSON et al, 2003). Estabeleceu-se, nos EUA, um conjunto de padrões em controle de qualidade e testes de proficiência para aplicação em laboratórios forenses. Em 1994, criou-se o Conselho de DNA (DAB) cujos membros reportam-se diretamente ao diretor do FBI (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 1994).

Desde 1989, a Sociedade Internacional de Hemogenética Forense (ISHF), que atualmente é denominada de Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG), publica recomendações sobre análise de polimorfismos de DNA descrevendo e discutindo procedimentos para melhoria na reprodutibilidade e exatidão das metodologias utilizadas. O FBI recomenda outros detalhes sobre o controle de qualidade dos laboratórios que trabalham com evidências de DNA forense, que inclui além desses cuidados, a realização de testes periódicos de proficiência (a cada 180 dias) e auditorias anuais, para a manutenção da garantia de qualidade. O teste de proficiência é utilizado para monitorar o rendimento e para identificar tópicos que devem ser aperfeiçoados, e a auditoria para averiguar a

qualidade das atividades realizadas pelo laboratório (DNA ADVISORY BOARD, 2000).

O Instituto Nacional de Padronização e Tecnologia (NIST) - desenvolve e certifica padrões físicos e químicos para comercialização, manufatura e utilização em pesquisas, incluindo os utilizados em análise de ácidos nucleicos. Entre eles, aqueles utilizados em diagnóstico molecular de doenças infecciosas, genéticas, câncer e, também, vínculo genético. O NIST também conduz um abrangente teste de validação interlaboratorial para análises forenses e identificação genética humana (BARKER, 2002).

A conduta de avaliação proposta para laboratórios que realizam vínculo genético normalmente são constituídos de amostras biológicas de indivíduos mãe, filho e suposto pai, com o intuito de comparar as estratégias utilizadas, seus protocolos metodológicos, assim como os resultados obtidos entre os participantes (BJERRE et al, 1997; HALLENGERG & MORLING; 2001).

A avaliação do DNA degradado por diversas condições foi realizada por diversos laboratórios europeus. Inicialmente, células foram degradadas em condições específicas (BENDER, 2004) e foram encaminhadas para 50 laboratórios europeus, com o objetivo de melhorar o entendimento sobre os diferentes parâmetros que influenciam a tipagem pelas STRs de DNA degradado. Abrange ainda a tentativa de otimização para minimizar problemas. Após a análise dos resultados de 38 laboratórios participantes concluíram que para superar os efeitos da degradação do DNA, protocolos da PCR devem ser otimizados para todos os parâmetros. Protocolos flexíveis para a interpretação dos perfis alélicos devem ser

desenvolvidos, e se necessário, a elaboração de softwares para auxiliar na análise (SCHNEIDER et al, 2004).

Em 2004, O NIST (KLINE et al, 2005) realizou estudo de quantificação de DNA entre 80 laboratórios que participaram do 14º Simpósio Internacional de Identificação Humana que foi realizado em Phoenix, AZ, EUA. Oito amostras de DNA extraídas foram liofilizadas e entregues aos laboratórios objetivando: examinar os resultados avaliando a performance dos laboratórios quando utiliza-se concentrações baixas de DNA, que são freqüentes em casos forenses, e examinar a consistência das diversas metodologias utilizadas entre os laboratórios. Ao final do estudo, houve uma variabilidade de 20% nos resultados utilizando-se 19 metodologias. Desses, 65% derivaram de técnicas abrangendo hibridização *Slot Blot* e 21%, da PCR em tempo real. Comparando-se os resultados de todos os laboratórios teve-se uma variação de 20% utilizando-se técnicas diferentes. Com isso, estabeleceu-se que o controle positivo externo que foi gerado deveria ter os seus resultados comparados dentro de cada metodologia utilizada, quando o material fosse utilizado em testes de proficiência.

Um exercício colaborativo foi realizado em 1989 por 12 laboratórios Europeus utilizando-se VNTR pYNH24. Os resultados demonstraram que a correlação entre os perfis genéticos adquiridos podem ser alcançados tanto intra como entre os laboratórios, sob condições mínimas de padronização (SCHNEIDER et al, 1991).

Um dos primeiros estudos em controle de qualidade das STRs foi realizado entre laboratórios participantes de um encontro do TWGDAM em 1995. Empregou-se, inicialmente, um triplex que amplificava as STRs CSF1PO, TPOX, TH01 e

posteriormente foi acrescentado vWA, tornando-se um quadruplex. Mesmo utilizando-se protocolos idênticos, inúmeros fatores contribuíram para a variabilidade de tamanho dos alelos identificados que chegaram a uma diferença de acima de 4bp. Entre todos os fatores discutidos, a instabilidade eletroforética dos equipamentos pode ser considerado como primordial (MICKA et al, 1999).

A análise das STRs não substituiu de imediato os VNTRs. Em 1995 e 1996, um grupo filiado à Sociedade Internacional de Genética Forense (BJERRE, 1997) observou que as VNTRs eram analisadas por RFLP e seus fragmentos identificados utilizando-se sistema de câmera de detecção (57%) e 14% ainda utilizavam régua para mensuração.

Um estudo semelhante foi realizado em 1997, 1998 e 1999 pelo mesmo grupo, no qual houve uma diminuição na análise de VNTR por sondas de locus e RFLP de 83% em 1997 a 66% em 1999, enquanto mais de 90% dos laboratórios já utilizavam sistemas baseados na PCR. O coeficiente de variação foi de 1,3% na análise de VNTRs e de menos de 0,3% na análise das STRs. Segundo os autores, esse baixo valor se deu pela incorporação de conjuntos comerciais para análise de STR, melhorando a qualidade da mesma (HALLENBERG & MORLING 2001).

No Brasil, os exercícios de controle de qualidade em identificação humana pelo DNA são realizados pelo GEP-ISFG e pela SLAGF, não havendo um grupo brasileiro específico que realize testes de proficiência. Desde 1992, o GEP-ISFG realiza um programa de controle de qualidade, sendo relatados como membros: 324 geneticistas forenses de 118 laboratórios de 19 países. Espanha, Portugal, Brasil, Argentina e Colômbia são os países mais representativos do grupo. A maioria dos

laboratórios está relacionada com testes de paternidade, sendo 58% envolvidos com casos criminais (GOMÉZ et al, 2004).

As amostras incluídas nos testes de proficiência realizados pelo GEP-ISFG de 2002 a 2005 (GARCIA-HIRSCHFELD et al, 2005; GÓMEZ et al, 2004), variaram de cinco a seis amostras diversificando entre: 100µL de sangue, incluindo caso de teste de paternidade; um fio de cabelo de 2 cm, realizado desde 2000; e amostras forenses incluindo saliva, em 1997; amostras mistas, em 1998, 2000, 2003, 2004 e 2005; sêmen, em 2002 e não humanas em 2001. O número total de erros variou de 0,6% a 2,3% em diferentes anos, sendo que esse valor está concentrado principalmente em laboratórios que utilizaram sistemas manuais de eletroforese e marcadores alélicos construídos internamente.

A SLSGF observou que a porcentagem dos laboratórios participantes, que estão obtendo resultados de análise corretos, vêm crescendo progressivamente, variando de 48% em 1998 até 84% em 2004-2005 (PENACINO et al, 2005). Isso demonstra uma crescente melhoria da análise e de formação de recursos humanos mais adequados.

Também já foram realizados testes de proficiência para a análise de DNA mitocondrial (SCHNEIDER et al, 1999) e DNA do cromossomo Y (CARRACEDO et al, 1998; CARRACEDO et al, 2001), observando-se a importância e a crescente incorporação de programas de controle de qualidade e testes de proficiência em identificação humana pelo DNA pelos laboratórios.

3 OBJETIVOS

O estudo propõe a construção de referências alélicas inseridos em plasmídeos por clonagem dos fragmentos amplificados pela PCR, para os 13 STRs recomendados pelo CODIS (Budowle & Moretti; 1999) - CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, e D21S11

Analisar e validar as referências utilizando produtos distintos comercialmente disponíveis em 2 laboratórios de análises clínicas que realizam caracterização de vínculo genético.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram coletadas aleatoriamente 100 amostras de sangue e 10 de saliva de indivíduos de ambos os sexos. O material biológico foi colhido após a Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, protocolo nº184, Ofício CEP nº108 (ANEXO 1). Foi solicitado o consentimento livre e esclarecido aos voluntários que aceitarem participar da pesquisa, anteriormente à coleta do material biológico, seja saliva (ANEXO 2) ou sangue (ANEXO 3).

4.2 MATERIAL

4.2.1 Material descartável

Pote de plástico estéril para coleta de material orgânico “coletor universal esterilizado, volume 80 mL” foi adquirido da STLU Ind. e Com. de Artefatos Plásticos Ltda-Me (São Paulo, SP, Brasil); papel especial “Kimwipes EXL® - Delicate Task Wipers”, da Kimberly Clark Corporation (Roswell, GA., USA); Parafilm®, da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA); placa de petri em poliestireno, estéril, na dimensão de 90x15mm, sem divisão, fundo plano da Ciencor Scientific (São Paulo, Brasil); ponteiros 0,5 a 10µL, 10 a 200µL, e 100 a 1000µL, e tubos de polipropileno com

tampa de 0,2; 0,5 e 1,5mL da Axygen Scientific (Union City, CA, USA); tubos de coleta de sangue com sistema a vácuo da Vacutainer® BD Diagnostics Systems (Sparks, MD, USA); e tubos estéreis de polipropileno com fundo redondo para meio de cultura (Nunc; Nunc, Roskilde, Denmark).

4.2.2 Equipamentos

Utilizaram-se agitador de tubos AP 56 da Phoenix Ind. e Com. De Equipamentos Científicos Ltda (Araraquara, SP, Brasil); balança Eletrônica de Precisão AL 500 da Marte® (São Paulo, SP, Brasil); centrífuga CELM LS-3 da CELM (São Paulo, SP, Brasil), a centrífuga modelo 5415C e a centrífuga Concentradora ambos da Eppendorf modelo AG 5301 (Hamburg, Germany); cuba de eletroforese Horizon®58 da Whatman Biometra® (Goettinger, Germany); espectrofotômetro Nano Drop ND-1000 da NanoDrop Technologies (Wilmington, DE, EUA); fonte de eletroforese EPS 200 da GE Healthcare (Chalfont St. Giles, United Kingdom); freezer -20° C vertical Electrolux (São Paulo, SP, Brasil); incubadora de bancada com agitação orbital TE 420 da Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil); pHmetro OAKTON Instruments (Vernon Hills, IL, EUA); pipetador de 0,5 a 10µL 10 a 200µL e 100 a 1000µL da Gilson® (Middleton, WI, EUA); seqüenciador automático ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer e ABI PRISM®377 DNA Sequencer da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA); seqüenciador de DNA automático ALFexpress®, com utilização do programa de corrida de gel "ALFwin Instrument Control Version 2.00 15" e ALFwin Sequence Analyser da GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Reino Unido); sistema de fotodocumentação digital Multimage™ Light Cabinet com o software Chemil Imager™ 4400 v.5.5., ambos da Alpha Innotech Corporation (San Leandro, CA; EUA) e impressora digital Mitsubishi CP700D (Tóquio, Japão);

termociclador modelo PTC 200 com o bloco Dual Alpha Unit™ da Bio-rad (Hercules, CA, EUA).

4.2.3 Reagentes

Acetato de sódio, ágar, álcool isoamílico, CaCl_2 , clorofórmio P.A., dimetilformamida, etanol 70 e 100%, glicerol, ácido clorídrico – (HCl), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de magnésio (MgCl_2) foram adquiridos da Merck S.A. Indústria Química (São Paulo, Brasil); bacto-triptona e extrato de levedura da Difco™ - BD Diagnostic Systems (Franklin Lakes, NJ, EUA); desoxirribonucleotídeos trifosfatados -dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), fenol, isopropiltiogalactosidase (IPTG), padrão de 50, 100 e 1000 pares de bases, padrão de peso molecular Low DNA Mass Ladder, Platinum Taq Polimerase e proteinase K 20mg/mL da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA); acrilamida, agarose, ALFexpress™ Sizer™ 50-500, azul de bromofenol, bis-acrilamida, GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GFX™ plasmid purification, Loading Dye®, Plus One Amberlite IRN, TEMED (N,N,N',N'-teramethylethylenediamine) da GE Healthcare (Chalfont St. Giles, United Kingdom); AmpF/STR® Identifiler® PCR Amplification Kit, POP-4™ Polymer e 1X Genetic Analyser Buffer da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA); ampicilina, persulfato de amônia (P.A.), triton X-100, uréia ultrapura, xilenocianol FF da USB Corporation (Cleveland, Ohio, EUA); brometo de etídio, dimetil sulfóxido (DMSO), ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de dodecil sódio (SDS), Tris ultra puro (Trizma®), X-gal da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA); tampão para PCR, MgCl_2 50mM e Tth polimerase da Biotools (Madrid, Espanha); e pGEM®-T Easy Vector e PowerPlex®16 system PCR amplification Kit da Promega Corporation (Madison, WI, EUA).

Foram utilizados iniciadores oligonucleotídeos marcados com fluorescência Cy5 (Quadro 4.1) sintetizados pela Synthegen™ e aqueles com sítio de restrição foram sintetizados pela IDT™ - Integrated Device Technology, Inc. (Santa Clara, CA, USA)

Quadro 4.1 - Loci utilizados e suas referências

STR lócus	Referência:
CSF1PO	Hammond et al. (1994)
D3S1358	Liu et al. (1993)
D5S818	Jin et al. (1997)
D7S820	Jin et al. (1997)
D8S1179	Barber et al. (1996)
D13S317	Jin et al. (1997)
D16S539	NCBI (2005); número de acesso G07925
D18S51	Urquhart et al. (1995)
D21S11	Urquhart et al. (1994)
FGA	Urquhart et al. (1995)
TH01	Urquhart et al. (1994)
TPOX	Huang et al. (1995)
VWA	Moller et al. (1994)

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Coleta e preparo das amostras para extração de DNA

4.3.1.1. Sangue total

Foi obtido 3 a 5 mL de sangue anticoagulado (EDTA, 1 mg/mL sangue) utilizando o sistema a vácuo (Vacuntainer®) para obtenção do sangue total, sendo esta amostra utilizada para a extração do DNA genômico.

4.3.1.2. *Saliva total*

Antes da coleta, recomendou-se aos voluntários que não ingerissem alimentos, líquidos ou fumassem por 30 minutos prévio a coleta. A saliva total foi coletada em coletor universal esterilizado, em uma quantidade mínima de 2mL, sendo posteriormente transferidas para tubos eppendorf 1,5 mL e congeladas a -20°C até a realização da extração.

4.3.2 **Extração de DNA**

Realizou-se a extração de DNA da saliva total e dos swabs através do método orgânico, tendo-se como referência o protocolo adaptado por Anzai et al. (2001) (Anexo 4). O DNA do sangue foi extraído pelo método de precipitação salina modificado em nosso laboratório (SALAZAR et al, 1998) (Anexo 5).

4.3.3 **Quantificação e análise da integridade do DNA**

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 baseado em absorvidade molar do DNA a 260nm e 280nm. Para avaliação da pureza das amostras de DNA extraído, calculou-se a relação de absorvidade molar 260/280 nm e a integridade foi avaliada pela eletroforese em gel de agarose a 1%

em tampão tris-borato-EDTA - TBE (Tris-HCl a 0,45 mM, ácido bórico a 0,45 mM e EDTA a 2,5 mM, pH 8,0) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

4.3.4 Identificação dos alelos dos diversos loci das STR de interesse

As amostras foram todos submetidos a extração de DNA, amplificação dos loci (13 STRs) e devidamente identificados. A partir deste banco de dados, selecionaram-se os que apresentavam alelos diferentes para cada loci que serviram de base para a construção das referências de interesse.

4.3.4.1 Amplificação da região polimórfica do DNA

A otimização definida para as reações da PCR foi estabelecida previamente para todos os loci de interesse. A sequência e a concentração dos iniciadores foram preparados segundo recomendação do NIST (NIST, 2006; OWCZARZY et al, 1997; VALONE & BUTLER, 2002). A solução de magnésio foi utilizada a 25mM e o mix de dNTP a 10mM de cada nucleotídeo. Os reagentes e sua quantidade foram os mesmos para todas as reações (Quadro 4.2). O programa de ciclagem foi o mesmo para todos os iniciadores (Quadro 4.3).

Quadro 4.2 - Reagentes utilizados na PCR para análise do perfil genético

Reagentes	Concentração final
H ₂ O	—
Tampão	1X
dNTP	0,4µM
MgCl ₂	0,5µM
Iniciador sense	0,4µM
Iniciador anti sense	0,4µM
Taq DNA polimerase	0,4u
DNA molde	500ng

Quadro 4.3 - Programa padrão utilizada nas PCRs com iniciadores marcados com fluorescência para análise do perfil genético

Programa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	98°	3'	35 ciclos
Desnaturação	94°	1'	
Hibridização	56°	1'	
Extensão	72°	2'	
Extensão Final	72°	10'	
Resfriamento	4°	Oo	

4.3.4.2 Visualização e análise do DNA

A amplificação e caracterização das STRs pela PCR e análise de fragmento foram utilizados iniciadores marcados com fluoróforo para sistema ALFexpress® em gel de poliacrilamida 20% com uréia 7M contendo 0,5x TBE; 0,035% de TEMED e 0,07 de P.A.), em tampão TBE 0,5x. Utilizou-se como marcador ALFexpress™ Sizer™ 50-500 e padrões alélicos. A separação eletroforética foi realizada em 120 minutos, a 1500 V, 60 mA, 25 W e 55°C. O processamento e caracterização foram realizados com auxílio do software - ALLELE LOCATOR®.

4.3.5 Preparo dos fragmentos dos alelos dos loci das STRs para clonagem

4.3.5.1 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores para incorporação de sítio de restrição

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores usados na PCR foram acrescido com seqüências para reconhecimento da enzima de restrição EcoRI em suas regiões 5' com auxílio do software Primer Premier 5®, e análise posterior para averiguação com o software *Basic Local Alignment Search Tool* – BLAST®.(NIST,

2007). Verificou-se também pela análise com o primer premier: a temperatura de desnaturação (T_m), estabilidade interna (ΔG), porcentagem de ligações C-G e avaliação de pareamento inespecífico.

4.3.5.2 Amplificação da região polimórfica do DNA

As temperaturas de hibridização foram estabelecidas a partir análise no Primer Premier. A otimização da PCR para todos os iniciadores, assim como o programa utilizado (Quadro 4.4 e 4.5).

Quadro 4.4 - Programa padrão utilizado nas PCRs dos iniciadores com sítio de restrição EcoR1.

Programa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96°	5'	} 35 ciclos
Desnaturação	96°	1'	
Hibridização	X	1'	
Extensão	72°	2'	
Extensão Final	72°	10'	
Resfriamento	4°	Oo	

X: varia conforme disposto no quadro 4.5

Quadro 4.5 - Temperatura de hibridização utilizada nas PCRs dos iniciadores com sítio de restrição EcoR1.

STR locus	Temperatura de hibridização
CSF1PO	49
D3S1358	65
D5S818	59
D7S820	65
D8S1179	58
D13S317	65
D16S539	60
D18S51	65
D21S11	57
FGA	65
TH01	63
TPOX	65
VWA	60

4.3.5.3 Purificação do produto da PCR

O produto da PCR foi purificado, empregando-se o produto comercial GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification. O DNA purificado pode ser ressuspendido em tampão tris-EDTA (T.E.- Tris-HCl 10 mM e 1mM EDTA, pH 8,0) ou água. O produto purificado foi visualizado e quantificado em eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), utilizando-se padrão de peso molecular Low Mass.

4.3.5.4 Seqüenciamento do fragmento de DNA.

As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo. As seqüências foram analisadas pelo *software Sequence Analyser* utilizando o *Base Caller Cimarron* 3.12.

4.3.6 Clonagem dos fragmentos de DNA (alelo)

A clonagem do produto da PCR foi realizada com os plasmídeos pGEM®-T Easy Vector (Figura 4.1) de acordo com as especificações do fabricante (PROMEGA, 2003), utilizando-se como referência a construção de marcadores alélicos efetuada por Hou et al (2003) e Zhang et al (2003).

O vetor pGEM®-T easy possui em ambas extremidades 3' uma base timidina, que promove a ligação do produto da PCR amplificado com o plasmídeo (Figura 4.2). O produto deve ser amplificado por determinadas polimerases

termoestáveis (CLARCK 1988), que incluem uma base adenina na porção 3' de seus fragmentos, incluindo a utilizada nessa pesquisa, *Tth* polimerase.

Figura 4.1. Sequência do promotor, do sítio múltiplo de clonagem e da região de inserção do inserto no pGEM® easy vector (PROMEGA, 2003).

Adaptado de <http://www.bioteach.utoronto.ca/Molecular Biology/BAC/plasmid-text.pl?2>, acessado em 10/06/2005.

Figura 4.2 Esquema da clonagem dos fragmentos da PCR utilizando pGEM® easy vector.

Os reagentes e todo material para a sua realização foi preparado segundo ANEXO 4, sendo eles: meio LB (Luria-Bertani) líquido, meio LB sólido ágar, meio SOB e SOC e células competentes DH5 α pelo cloreto de cálcio - CaCl₂.

A quantidade de inserto:vetor foi calculado, determinando-se o valor de inserto: vetor de 5:1 como demonstra a fórmula abaixo e seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante (Quadro 4.6)

$$\frac{X \text{ ng de vetor} \times Y \text{ tamanho do inserto}}{Z \text{ kb do tamanho do vetor}} \times \text{razão inserto:vetor} = \text{ng de inserto}$$

Quadro 4.6: Quantidade de reagentes utilizados na reação de ligação

Reagente	Quant.
Tampão de ligação rápida 2X, T4 DNA ligase	5 μ L
pGEM®-T easy vectors (50ng)	1 μ L
Produto da PCR	X μ L
T4 DNA Ligase (4u/ μ L)	1 μ L
Água deionizada estéril para um volume final de	10 μ L

X: Razão molar do Produto de PCR, que requer otimização para cada reação

4.3.6.1 Transformação da *Escherichia coli* com plasmídeo pGEM®-5Zf(+)

Utilizou-se 100 μ L de células *E. Coli* DH5 α competentes preparadas pelo método de CaCl₂, que foi transformado com 2 μ L do plasmídeo pGEM easy vector (Promega) pelo método clássico de cloreto de cálcio e choque térmico (incubação em gelo 20 minutos e 50 segundos a 42°C, seguido de 2 minutos no gelo), seguido da adição de 1 mL de meio de cultura SOC (Tryptona a 2 %, extrato de levedura a 0,5 %, NaCl a 0,05 %, KCl 2,5 mM, Glicose 20 mM, MgCl₂ 10 mM), incubando por 5 minutos a 37°C e então sob agitação 150 rpm por 1h30min. a 37°C. As células transformadas foram submetidas a seleção em volumes distintos (150 μ L, 300 μ L, 500 μ L) em meio de LB-ágar contendo ampicilina (100 μ g/mL), 40 μ L de X-GAL 20

mg/mL em dimetilformamida e 4 µL de IPTG 20% distribuídos em placas de petri, que foram incubadas a 37°C de 18 a 24 horas em incubadora bacteriológica.

4.3.6.2 *Obtenção e purificação do plasmídeo recombinante*

As colônias brancas, que supostamente continha os plasmídeos recombinantes, foram isoladas e expandidas em 5 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina a 37°C por 16 horas, sob agitação de 150 rpm. Cerca de 1 mL de suspensão de células transformadas com o plasmídeo recombinante de cada colônia expandida foi armazenada em criotubos em uma solução com 20% de glicerol a -80°C (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

A extração e purificação do plasmídeo foram realizadas utilizando produto comercial GFX™ Micro Plasmid Prep Kit, utilizando-se o protocolo descrito pelo fabricante (GE HEALTHCARE – AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002).

4.3.6.3 *Análise do plasmídeo recombinante*

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, baseado em absorvidade molar do DNA a 260nm e 280nm. O DNA extraído foi avaliado em gel de agarose a 1%, com tampão TBE por 40 min. a 100 V, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A caracterização dos fragmentos de DNA foi feita em transluminador sob luz UV, utilizando-se como referência um marcador de 1kb. Documentou-se no sistema MultiImage™ Light Cabinet. Para confirmar a presença do fragmento de DNA inserido, os plasmídeos foram submetidos à clivagem com enzima de restrição EcoRI sendo a sua identificação realizada por outra eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando-se os mesmos parâmetros acima citados.

4.3.6.4 *Análise do tamanho do fragmento clonado no pGEM®-5Zf(+)*

Após confirmar a presença do inserto e do seu tamanho, realizou-se a análise dos fragmentos por gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, seguido da eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para a melhor visualização dos fragmentos, contendo 19:1 de acrilamida e N,N'-metil-bis-acrilamida, tampão TBE 0,5X; 0,07x persulfato de amônio e 0,028% de TEMED® com tampão TBE 0,5x, por 100V, 35mA, por 6 horas e 30 minutos, posteriormente corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), seguido ou não por coloração pela prata segundo protocolo descrito por Bassam et al (1991).

4.3.7 **Construção dos controles de qualidade e encaminhamento aos laboratórios de análises clínicas**

Os plasmídeos recombinantes foram devidamente selecionados e homogeneizados de acordo com as STRs.

As amostras de plasmídeos foram encaminhadas para o Laboratório de Investigação de Paternidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de São Paulo e Álvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas para análise e validação das referências se empregando dois sistemas multiplex distintos (Figura 4.3).

Figura 4.3 Sistemas multiplex comercialmente disponíveis para amplificação dos 13 loci de STRs indicados pelo CODIS, distribuídos de acordo com o tamanho do produto de PCR em pares de bases e seus fluoróforos. Os loci marcados em retângulo não são indicados pelo CODIS.

No primeiro laboratório, utilizou-se o kit PowerPlex®16 e eletroforese em ABI PRISM® 377 DNA Sequencer, segundo as instruções do fabricante (PROMEGA, 2005; APPLIED BIOSYSTEMS, 2000). A PCR foi realizada com concentrações de reagentes e o programa pré-definido (Quadro 4.7 e quadro 4.8).

Quadro 4.7 - Tipos e concentração de reagentes utilizados na PCR com o sistema multiplex PowerPlex®16.

Reagentes	Quantidade (concentração)
H ₂ O	Qsp 12,5µL
Tampão	1,25µL (1x)
Platinum Taq Polimerase	0,4µL (2 unidades)
DNA plasmidial	400 ng a 4 ng

Quadro 4.8 - Programa padrão utilizado nas PCRs com o sistema multiplex PowerPlex®16.

Programa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	11'	
	96°C	2'	
Desnaturação	94°C	1'	} 10 ciclos
Hibridização	60°C	1'	
Extensão	70°C	1,5'	
Desnaturação	90°C	1'	} 22 ciclos
Hibridização	60°C	1'	
Extensão	70°C	1,5'	
Extensão final	60°C	30'	
Resfriamento	4°C	∞	

A análise dos fragmentos amplificados desnaturados com formamida contida no Blue Dextran Loading, foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% contendo 6M urea, 0,1% persulfato de amônia, 0,01% de TEMED e TBE 1x por 3 horas a 3000V, 35mA, 100W, e 51°C. As amostras foram analisadas com o auxílio dos softwares GeneScan (APPLIED BIOSYSTEMS, 2000) e PowerTyper™ Macro v.2 (PROMEGA, 2005).

No Laboratório Álvaro, utilizou-se ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer para eletroforese do produto de PCR obtido com AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Quadro 4.9; 4.10), segundo as especificações do fabricante (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005).

Quadro 4.9 - Tipos e concentração de reagentes utilizados na PCR com o sistema multiplex AmpFISTR® Identifiler™

Reagentes	Quantidade (concentração)
H ₂ O	qsp 12,5µL
PCR Reaction Mix	5,2µL
AmpliTaQ Gold Polimerase	0,25µL (1,25 unidades)
DNA plasmidial	400 ng a 4 ng

Quadro 4.10 - Programa padrão utilizado na PCR com o sistema multiplex AmpFISTR® Identifilier™

Programa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	11'	} 28 ciclos
Desnaturação	94 °C	1'	
Hibridização	59 °C	1'	
Extensão	72 °C	1,5'	
Extensão final	60 °C	60'	
Resfriamento	4 °C	∞	

Os fragmentos amplificados foram desnaturados em formamida com aquecimento a 95 °C por 5 minutos, seguida da separação realizada por eletroforese capilar de 47 cm com Polímero POP-4™ em tampão 1 X *Genetic Analyser*, com capilares 50µm, por 30 minutos a 15000V, 10mA a 60 °C. As amostras foram analisadas com o auxílio dos softwares GeneScan (APPLIED BIOSYSTEMS, 2000) e PowerTyper™ Macro v.2 (PROMEGA, 2005).

5 RESULTADOS

5.1 COLETA E EXTRAÇÃO DO DNA

Do total de 110 amostras coletadas (100 de sangue e 10 de saliva), 30 foram utilizadas para a construção da referencia alélica, pois as outras possuíam alelos coincidentes aos das outras amostras.

As quantificações das amostras mostraram valores totais médios de 6458,14 μ g de DNA, com intervalo com confiança variando de 1583,08 a 11333,19 μ g/ μ L, sendo a média de 260/280 de 1,81, com intervalo de confiança variando de 1,66 a 1,96. A integridade do DNA também foi avaliada (Figuras 5.1 e 5.2).

Figura 5.1 – Fotografia do gel de agarose a 0,8%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo com marcador de 100bp e amostras de DNA distintas extraídas de sangue.

Figura 5.2 – Fotografia do gel de agarose a 0,8%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo das amostras de DNA extraídas de sangue (posição 1 ao 5) e de saliva (posição 6 a 10).

5.2. ANÁLISE DO PERFIL GENÉTICO PARA SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Os perfis genéticos foram obtidos para a seleção das amostras e diferentes alelos foram encontrados (tabela 5.1).

Tabela 5.1: STRs e os respectivos alelos encontrados na casuística obtida

Nome do Locus	Número de alelos observados	Alelos observados
CSF1PO	9	7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15
FGA	15	16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 22,2; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 31
TH01	7	05; 06; 07; 08; 09; 9,3; 10
TPOX	7	06; 07; 08; 09; 10; 11; 12
VWA	8	13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20
D3S1358	8	13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20
D5S818	9	5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12
D7S820	9	6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14
D8S1179	10	8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17
D13S317	8	8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15
D16S539	9	7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15
D18S51	18	9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 25; 27; 29
D21S11	16	25; 26; 27; 28; 29; 29,2; 30; 30,2; 31; 31,2; 32; 32,2; 33,2; 34,2; 35; 36

Para cada STR, selecionaram-se amostras que possuíam os alelos específicos (Figura 5.3), e realizou-se a purificação dos seus fragmentos e quantificação pelo marcador de peso Low Mass, que possuía bandas com intensidades equivalentes a 10, 20, 40, 80, 120 e 200ng/ μ L de DNA (Figura 5.4, 5.5).

Figura 5.3 – Fotografia do gel de agarose a 2%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo com marcador de 100bp e com produtos da PCR da STR FGA.

Figura 5.4 – Fotografia do gel de agarose a 2%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo com marcador de 100bp e com produtos da PCR purificados da STR FGA.

Figura 5.5 – Fotografia do gel de agarose a 2%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo dos produtos da PCR purificados das STRs CSF, TPOX, D5S818, D8S1179, D7S820, FGA, D21S11, VWA, D13S317, D3S1358, D18S51, TH01, D16S539; na presença de marcador de 100bp e marcador de peso molecular Low Mass com os respectivos valores equivalente em ng.

As amostras que possuem os alelos já identificados foram encaminhados para sequenciamento (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Eletroferograma do alelo 25 da STR FGA mostrando parte das repetições consecutivas [TTTC]₃TTTCTTCT[CTTT]₁₇CTCC[TTCC]₂

5.3 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA – ANÁLISE DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE

A porcentagem média de colônias brancas em relação às colônias azuis foi de 83,325% ($\pm 5,03$) e a média da Unidade Formadora de Colônia 4,191UFC/mL de meio LB líquido.

As quantificações dos plasmídeos mostraram valores médios de 2301,25 μ g de DNA, com intervalo com confiança variando de 1177,14 a 3425,36 μ g, sendo o valor médio de 260/280nm de 1,80 a 2,10.

A análise dos plasmídeos antes (Figura 5.7) e após digestão para confirmação da presença dos insertos (Figura 5.8 a 5.13).

Figura 5.7 - Fotografia do gel de agarose a 1,0%, após a separação eletroforética e a coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos contendo insertos extraídos de *E.coli* DH5 α recombinantes com marcador de 100bp.

Figura 5.8 - Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos das STRs VWA (1 e 2), D21S11 (3 a 5) e CSF (6 e 7) e com marcador de 100bp.

Figura 5.9 Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D5S818 (1 a 3) e TPOX (4 e 5) e com marcador de 100bp

Figura 5.10 Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D3S1358 (1 a 3, que foram reanalisados, vide figura 5.11) e D13S317 (4 e 5, amostra 5 não foi utilizada) e com marcador de 100bp

Figura 5.11 Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D3S1358 (1 e 2), D8S1179 (3 e 4) e D16S539 (5 e 6) e com marcador de 100bp

Figura 5.12 Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos das STRs FGA (1 e 2), TH01 (3 e 4) e D7S820 (5 e 6).

Figura 5.13 Fotografia do gel de agarose a 1,5%, após a separação eletroforética e coloração com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos da STR D18S51 e com marcador de 100bp

Os produtos da reação de restrição enzimática visualizados na figuras 5.9 a 5.13 foram também analisados em gel de poliácridamida (figuras 5.14 a 5.19).

Figura 5.14 Fotografia do gel de poliacrilamida a 8% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D7S820 (1 a 3), TH01 (4 a 5), VWA (6 e 7), D21S11 (8 a 10) e D3S1358 (11 a 14) e marcador de 10bp.

Figura 5.15 Fotografia do gel da figura 5.15 corado posteriormente com prata. Plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D7S820 (1 a 3), TH01 (4 e 5), VWA (6 e 7) D21S11 (8 a 10) e D3S1358 (11 a 14) e marcador de 10bp.

Figura 5.16 Fotografia do gel de poliacrilamida a 8% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D13S317 (1 a 3), D5S818 (4 a 7) e D8S1179 (8 a 9) e marcador de 10bp.

Figura 5.17 Fotografia do gel de poliacrilamida a 8% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos das STRs D18S51 (1 a 2), D16S539 (3 e 4) e CSF (5 e 6) e marcador de 10bp.

Figura 5.18 Fotografia do gel de poliacrilamida a 8% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos da STR FGA (1 a 3) e marcador de 10bp.

Figura 5.19 Fotografia do gel de poliacrilamida a 8% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos submetidos à restrição enzimática com enzima *EcoRI*, com insertos correspondentes aos alelos da STR TPOX (1 a 3) e marcador de 10bp.

Os plasmídeos visualizados na figura 5.4 foram amplificados utilizando-se AmpFLSTR® Identifiler como demonstra figura 5.20 e também realizou-se a amplificação das STRS TH01 (figura 5.21 e 5.22) e D21 (figura 5.23).

Figura 5.20. Eletroferograma da análise da STR FGA em ABI 310. A: Padrão alélico do AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega); B: Amostra de produto de PCR de DNA de plasmídeo extraído de uma única colônia amplificado com AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega).

Figura 5.21. Eletroferograma da análise da STR TH01 em ABI 310. A: Padrão alélico do AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega); B: Amostra de produto de PCR de DNA de plasmídeo extraído de uma única colônia amplificado com AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega).

Figura 5.22. Eletroferograma da análise da STR TH01 em ABI 310. A: Padrão alélico do AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega); B: Amostra de produto de PCR de DNA de plasmídeo extraído de uma única colônia amplificado com AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega).

Figura 5.23. Eletroferograma da análise da STR D21S11 em ABI 310. A: Padrão alélico do AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega); B: Amostra de produto de PCR de DNA de plasmídeo extraído de uma única colônia amplificado com AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Promega).

5.4 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DAS REFERÊNCIAS ALÉLICAS

A análise das referências amplificadas com PowerPlex 16® e após eletroforese no ABI 377 em Software PowerTyper foi demonstrada nas figuras 5.24 a 5.29; e com AmpFISTR® Identifilier® e após eletroforese no ABI 310 em Software GenoTyper foi demonstrada nas figuras 5.30 a 5.33. Os dados foram resumidos no quadro 5.1.

Figura 5.24. Eletroferograma das amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 dos loci marcados com fluoresceína, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50.

Figura 5.25. Eletroferograma ampliado das amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 dos loci marcados com fluoresceína, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50.

Figura 5.26. Eletroferograma das amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 dos loci marcados com JOE, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50.

Figura 5.27. Eletroferograma ampliado de amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 dos loci marcados com JOE, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50.

Figura 5.28. Eletróferograma de amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 dos loci marcados com TMR, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50.

Figura 5.29. Eletroferograma ampliado de amostras amplificadas por PowerPlex®16 e analisadas em ABI 370 do locus VWA, obtido por análise pelo software PowerTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do PowerPlex®16; B: Produto de PCR do controle positivo 9947A; C: Produto de PCR de referência alélica; D: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50.

Figura 5.30. Eletroferograma de amostras amplificadas por AmpFISTR® Identifiler™ e analisadas em ABI 310 dos loci D8S1179, D21S11, D7820, CSF1PO, marcados com fluorescência 6-FAM, obtidos por análise pelo software Genotype, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do AmpFISTR® Identifiler™; B: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50

Figura 5.31. Eletroferograma de amostras amplificadas por AmpFISTR® Identifier™ e analisadas em ABI 310 dos loci D2S1338, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, marcados com fluorescência VIC, obtidos por análise pelo software GenoTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do AmpFISTR® Identifier™; B: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50

Figura 5.32. Eletroferograma de amostras amplificadas por AmpFISTR® Identifier™ e analisadas em ABI 310 dos loci D19S433 (amplificação não adequada), VWA, TPOX, D18S51 marcados com fluorescência NED, obtidos por análise pelo software GenoTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do AmpFISTR® Identifier™. B: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50

Figura 5.33. Eletroferograma de amostras amplificadas por AmpFISTR® Identifiler™ e analisadas em ABI 310 dos loci D5S818 E FGA, marcados com fluorescência PET, obtidos por análise pelo software GenoTyper, com identificação dos respectivos alelos. A: Marcador alélico do AmpFISTR® Identifiler™; B: Produto de PCR de referência alélica diluída 1:50

Quadro 5.1: Alelos das STRs presentes na referência alélica construída e resumo dos resultados da análise da PCR realizada com o sistema multiplex PowerPlex®16 e AmpFISTR® Identifilier™

STRs	Referência Alélica	PowerPlex®16	AmpFISTR® Identifilier™
CSF	7, 14	Não amplificou	Não amplificou
D13S317	12	12	Não amplificou
D16S539	15	Não amplificou	Não amplificou
D18S51	15, 16	Não amplificou	15, 16
D21S11	27,28,29,30	27,28,29,30	24*, 27, 28, 29, 30
D3S1258	15	15	15
D5S818	8,10,11,14	8,10,11,14	8, 10, 11, 14
D7S820	11, 13, 14	Não amplificou	Não amplificou
D8S1179	9,14	Não amplificou	9, 14
FGA	20, 22, 28	Não amplificou	Não amplificou
TH01	6; 9,3	6; 9,3	9,3
TPOX	9,11	Não amplificou	9, 11
VWA	15,18	15,18	25*
PENTA E(1)	-----	-----	-----
PENTA D (1)	-----	-----	-----
AMELOGENINA	-----	-----	-----
D2S1338 (2)	-----	-----	-----
D19S433 (2)	-----	-----	-----

* Alelo identificado sem a sua incorporação na referência alélica; (1) Loci presentes exclusivamente no PowerPlex®16, e (2) no AmpFISTR® Identifilier™.

6 DISCUSSÃO

A necessidade de otimização, padronização e validação de todo o processo de análise de ácidos nucleicos em identificação humana vem sendo discutida em diversos documentos e artigos científicos (THOMPSON, 1974; COMMITTEE ON DNA TECHNOLOGY IN FORENSIC SCIENCE, NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992; ISFG, 1992; NEUMAYER, 1998; FBI, 1999 e 2001; INTERPOL, 2001; BRETTELL et al, 2005; SENASP, 2005), principalmente para assegurar a reprodutibilidade e a robustez da técnica (ARONSSON et al, 1978; BELK & SUNDERMAN, 1986; KLOSTERMAN, 2001; BLICK & PASSEY, 2003; PNCQ, 2006).

Apesar de existirem diversos grupos que realizam exercícios colaborativos para controle de qualidade (SCHNEIDER et al, 1991; BJERRE, 1997; CARRACEDO et al, 1998; SCHNEIDER et al, 1999; CARRACEDO et al, 2001; HALLENBERG, 2001; GOMÉZ et al, 2004; PETERSON et al, 2003; BENDER, 2004; SCHNEIDER et al, 2004; KLINE et al, 2005) e testes de proficiência no mundo (PETERSON & MARKHAM, 1995 a e b; ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 1994; DNA ADVISORY BOARD, 2000; BARKER, 2002; PETERSON et al, 2003), no Brasil ainda não existe um grupo nacional que os realize. Os laboratórios brasileiros participam somente de exercícios colaborativos para controle de qualidade organizado por grupos americanos (PETERSON et al, 2003), europeus (GOMEZ e tal, 2004, GARCIA-HIRSCHFELD et al, 2005), e, também, pela Sociedade Latino Americana de Genética Forense – SLAGF (PENACINO et al, 2006), não existindo teste de

proficiência para laboratórios nacionais que realizam caracterização de vínculo genético.

No Brasil, diversos documentos são utilizados como parâmetros para a normatização da análise do DNA em identificação humana. Apesar de serem normativas internas, podem servir de parâmetro para laboratórios de análises clínicas e de pesquisas científicas. Tais iniciativas são de extrema importância, pois no Brasil ainda não há normas de coleta e análise de material biológico para identificação humana pelo DNA (BONACCORSO, 2005). A Resolução SSP-SP 194 de 2 de junho de 1999 (SÃO PAULO, 1999), o manual da INTERPOL (2001) e do FBI (1999, 2001) demonstram a preocupação em garantir a preservação da amostra biológica para a extração e análise do DNA em identificação humana.

Uma das recomendações presentes, nos documentos citados anteriormente, é o cuidado com a contaminação com DNA externo. Evitou-se essa contaminação tomando todos os cuidados descritos, desde a análise do perfil genético até a elaboração das referências alélicas contendo os plasmídeos recombinantes. Tal fato pode dificultar ou até mesmo impossibilitar a análise do DNA, principalmente porque a utilização da PCR possibilita inclusive a amplificação do DNA de amostras biológicas mesmo estando degradadas (ISFH, 1992; BURGER et al, 1999; HOFF-OLSEN et al, 1999; ALVES, 2000; INTERPOL, 2001; HAGELBERG et al, 2001; ANZAI et al, 2001; ANDREASSON & ALLEN, 2003).

A obtenção de DNA para a construção das referências alélicas foi inicialmente realizada pela saliva total, sendo sua coleta não invasiva ao compará-la com a de sangue. No entanto, no método otimizado para a extração de DNA de saliva (ANZAI et al, 2001) utiliza-se solvente orgânico perigoso, como o fenol, que

necessita de cuidados específicos para a sua manipulação e para o descarte. Dessa maneira, optou-se em extrair DNA de amostras de sangue.

A metodologia de extração de sangue utilizada foi preconizada pelo nosso laboratório (SALAZAR et al, 1998), que possui a vantagem de não utilizar solventes orgânicos perigosos como o fenol e o clorofórmio, ou como enzimas e reagentes caotrópicos, o que acontece em outros métodos (RAND et al, 1991; ALVES, 2001; ANZAI et al, 2001; BONACCORSO, 2005; BUTLER, 2005). A recuperação de DNA de sangue coagulado ou mesmo congelado é realizado por procedimentos não enzimáticos e não tóxicos, facilitando o descarte do material utilizado e dos reagentes contaminados com material biológico, característica recomendada para a escolha de métodos para pesquisa científica e laboratorial (HIRATA, 2001).

A correta escolha e a adequada realização da extração também minimizam a presença de inibidores da enzima polimerase que pode impossibilitar a PCR, assim como sua correta preservação (BURGER et al, 1999; BENDER, 2004).

Mesmo tendo conhecimento que os iniciadores são específicos para humanos, a quantificação desses DNA anteriormente a PCR é importante devido ao estabelecimento ideal da relação enzima substrato na otimização adequada da reação. Após a extração, a quantificação do DNA das amostras deve ser realizada por espectrofotometria (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) ou por outros métodos quantitativos já disponíveis na literatura e até no comércio. A quantidade média de DNA total obtido na presente pesquisa foi de 6458,14µg, valor condizente à quantidade descrita nos artigos originais (SALAZAR et al, 1998; ANZAI et al, 2001), assim como a razão 260/280 nm com uma média de 1,81. A análise de sua

integridade (**Figura 5.1 e 5.2**) também foi realizada para verificar a possibilidade de degradação do DNA (JUNGE et al, 1991; HOFF-OLSEN et al, 1999).

A quantificação por *dot blot* é específica para a quantificação de DNA humano, característica importante em uma análise de DNA extraído de amostras forenses, pois a extração de DNA não é única para o humano e para outros tipos, como a de bactérias (WALSH et al., 1992; ANDERSEN, 1998). Entretanto, essa metodologia não foi utilizada não somente por ser mais demorada – 1,5 horas – mas, também, porque se utilizaram amostras em grande quantidade – 1,0mL – para a realização da extração previamente padronizada. Essa técnica necessita de uma quantidade de DNA no mínimo cinco vezes maior (5µL) do que para a quantificação pela espectrofotometria (1µL) (WAYE et al, 1989; WALSH et al. 1992; HOFF-OLSEN et al, 1999; MANDREKAR et al, 2001; SCHNEIDER et al, 2004; BUTLER, 2005)

O método de análise quali e quantitativa do DNA extraído, empregando-se PCR em tempo real (ANDREASSON, 2003), não foi utilizado nessa pesquisa apesar de dispormos do equipamento, porque não se analisou DNA de amostras degradadas ou em quantidades ínfimas como as forenses, e sim DNA obtido de amostras conhecidas e em grande quantidade.

Todos os cuidados preconizados por Kwok e Higuchi (1989) para a realização da PCR foram cuidadosamente incorporados com a finalidade de se evitar ao máximo a contaminação de DNA externo. Os cuidados não se restringem somente ao operador, mas dependem de uma infra-estrutura apropriada para a sua elaboração, compreendendo espaços físicos devidamente apropriados – salas de extração de DNA, RNA, pré-PCR e pós-PCR; contendo equipamentos e reagentes adequados para cada tipo de procedimento.

Algumas variáveis da PCR (ciclagem e concentração de iniciadores) foram otimizadas para obtenção de melhores resultados, como descreveu Bender (2004) e Sambrook & Rossel (2001). O iniciador possibilita a amplificação de uma específica seqüência-alvo do DNA, no entanto, para que isso ocorra, a reação da PCR deve ser previamente otimizada. A otimização inadequada, ou mesmo a sua ausência, implica na amplificação de outras regiões de DNA, ou mesmo a não amplificação. Portanto, tal procedimento foi realizado para todos os iniciadores utilizados nessa pesquisa, podendo observar o produto da PCR após a migração eletroforética em gel de agarose (**figura 5.3**).

As STRs escolhidas para a construção das referências alélicas foram aqueles descritos pelo CODIS do FBI (BUDOWLE & MORETTI, 1999) (**quadro 2.1**), por se tornarem referência mundial em caracterização de vínculo genético (SUN et al, 2003). Essas STRs foram amplamente estudadas (HAMMOND et al.,1994; LI et al, 1993; MOLLER et al, 1994; URQUHART et al, 1994 e 1995; HUANG et al, 1995; BARBER et al,1996; JIN et al,1997) e possuem características recomendadas para a utilização em identificação humana, tais como maior polimorfismo, menor tamanho amplificado, baixa freqüência de mutações e elevado índice de discriminação e heterozigose (EDWARDS et al, 1991).

Como controle de qualidade interno da PCR, para análise do perfil genético e PCR dos alelos para clonagem, utilizou-se a linhagem de célula k562 (BJERRE et al, 1999, FBI, 2001; INTERPOL, 2001), ao invés de uma amostra previamente validada pelo laboratório (LAFOUNTAIN et al, 2001; KRENKE et al, 2002; LEVEDAKOU et al, 2002; SCHLENK et al, 2004). E como controle negativo se empregou somente os reagentes para a PCR sem DNA.

Após a análise do perfil genético dos indivíduos (**tabela 5.1**), observou-se que os alelos que não foram encontrados possuem frequência alélica abaixo de 0,004 para a população brasileira, segundo Whittle et al (2004). Sendo, assim, necessária uma amostragem maior para a detecção desses alelos e conseqüente incorporação na referência alélica. Mas isso não impede que futuramente esses alelos sejam incorporados na referência, utilizando-se a mesma metodologia empregada nessa pesquisa.

Em identificação humana, é imprescindível a verificação da significância do resultado, na qual a importância da evidência de DNA é dada por meio da probabilidade de que a casualidade tenha ocorrido (EVETT & WEIR, 1998), utilizando-se da frequência alélica das STRs analisadas para cada população (OZAKI, 1999; CORTE-REAL et al, 2000; BARROS DE CASTRO et al, 2000; RUITBERG et al, 2001; MOURA-NETO & BUDOWLE, 1997; SOARES-VIEIRA et al, 2000 e 2001; OLIVEIRA et al, 2001; WHITTLE et al, 2004). Nessa pesquisa não foi realizada essa verificação, pois não se objetivou caracterizar o vínculo genético de algum indivíduo ou amostra, ou mesmo demonstrar a frequência desses alelos na população. Entretanto, é indispensável que essa análise seja realizada para a correlação entre amostras, após a visualização dos fragmentos amplificados, sejam eles pertencentes à filho, mãe e suposto pai, ou das amostras encontradas na cena do crime, em corpos ou vítimas (INTERPOL, 2001; BUTLER, 2005).

Para a construção da referência alélica, optou-se em utilizar o plasmídeo comercial linearizado pGEM-T easy vector (**figura 4.1**), que é ligado ao inserto pela terminação timina, presente no plasmídeo, e adenina, incorporada ao fragmento durante a PCR pela Tth e Taq polimerase (CLARCK, 1988). Tal característica facilita a reação de ligação do inserto com o vetor (plasmídeo), pois em outros métodos

existentes há a necessidade de uma reação de restrição prévia para clivagem do vetor e do inserto (PROMEGA, 2005). Analisou-se, a eficiência da clonagem, obtendo-se resultados concordantes com aqueles descritos no sistema comercial, que determina no mínimo a porcentagem de 60% de colônias brancas e de 100 colônias a cada 100 mL de bactérias recombinantes presentes em 1000 mL de meio de cultura LB líquido.

Apesar de o plasmídeo conter seqüências de restrição (**figura 4.1**), optou-se em confeccionar iniciadores sítio dirigido, visando a possibilidade de total remoção do seu fragmento. Para isso, analisou-se a seqüência dos iniciadores, que foram elaborados previamente com fluorescência Cy5 para a análise do perfil genético (**quadro 4.1**), para detectar a ausência do sítio de restrição escolhido em outras regiões da seqüência amplificada, não possibilitando a clivagem das mesmas. Estudaram-se as variações polimórficas de todas as STRs, para, em seguida, escolher o sítio de restrição EcoR1 para a clivagem total do fragmento. Otimizaram-se todas as PCR para esses iniciadores com sítio de restrição para que amplificação seja ótima (quadro 4.4 e quadro 4.5), como recomenda Findlay et al. (1997).

Inicialmente foi realizada uma mistura de produtos de PCR de amostras contendo alelos diferentes para uma determinada STR, utilizando-se esses iniciadores para a realização da clonagem. Tal procedimento almejava a ligação dos insertos aos vetores e após sua expansão em *E. coli*, estimava-se que os plasmídeos recombinantes fossem utilizados com DNA alvo para a PCR. Após digestão e eletroforese em gel de agarose, confirmou-se os tamanhos dos insertos.

Realizando a análise das STRs em ABI 310 no Laboratório Álvaro (**figuras 5.20 a 5.23**), observou-se a amplificação homogênea dos fragmentos, assim como houve amplificação inespecífica em algumas regiões.

Objetivando a construção da referência alélica indicada para controle de qualidade, decidiu-se clonar no mínimo dois alelos distintos de cada STR separada ou concomitantemente. Tal procedimento facilitou a quantificação e análise eletroforética dos fragmentos obtidos na restrição enzimática dos plasmídeos recombinantes extraídos das bactérias (**figuras 5.8 a 5.13**).

O gel de agarose possui menor poder de resolução do que géis de poliacrilamida (HOLMES et al, 1991; SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Com isso, após a eletroforese em gel de agarose para primária visualização dos insertos (**figuras 5.8 a 5.13**), realizou-se outra eletroforese em géis de poliacrilamida 8% com o mesmo produto de restrição (**figuras 5.14 a 5.19**), para a escolha dos plasmídeos que possuíam insertos distintos. Para a observação da característica desses dois métodos, observa-se na **figura 5.8**, na STR D21S11, uma única banda referente ao inserto liberado. Quando o mesmo produto de restrição é analisado em gel de poliacrilamida, observa-se a presença de duas bandas distintas na **figura 5.14**.

Os dois sistemas multiplex distintos – PowerPlex®16 (KRENKRE et al, 2002) e AmpFISTR® Identifilier™ (COLLINS et al, 2004) (**figura 4.4**) – que são os mais utilizados atualmente (BUTLER, 2005; PENACINO et al, 2006), foram empregados em dois equipamentos de eletroforese. Sendo que, um foi realizado em gel de poliacrilamida (ABI377) e outro em capilar (ABI310), permitindo a análise e a discussão de diversos fatores que podem interferir na descrição do potencial de aplicação das referências alélicas. Ambos os equipamentos realizam a detecção das

fluorescências presentes no produto de PCR por lasers (SULLIVAN et al, 1992), sendo o método mais utilizado mundialmente pelos laboratórios (BUTLER, 2005). As eletroforeses nesses equipamentos são realizadas com o produto da PCR submetido às condições desnaturantes para a visualização de fitas simples de DNA (PRINTZ et al, 1996), ao contrário dos géis de agarose e poliacrilamida utilizados para a análise dos fragmentos resultantes da restrição enzimática.

Foi feita a identificação prévia de determinados alelos para a clonagem, que serviu de parâmetro para a seleção dos plasmídeos que seriam incorporados na referência. Após a análise das referências pelos laboratórios (**figuras 5.24 a 5.33**), observou-se que os alelos clonados foram amplificados pelos conjuntos multiplex, sendo imprescindível a discussão de alguns tópicos a seguir.

Conforme recomendações de diversos autores (FUJII et al, 2000; ZANG et al, 2001; HOU et al, 2001; LAFOUNTAIN et al, 2001; WATSON et al, 2001; LEVEDAKOU et al, 2002; KRENKE et al, 2002; WALLIN et al, 2002; POTTER, 2003; COLLINS et al, 2004; FUJII et al, 2004; SCHLENK et al, 2004; DENG et al, 2005;), utilizou-se marcadores alélicos para a análise eletroforética (**linhas A das figuras 5.24 a 5.33**). Além disso, utilizaram-se padrões de tamanho, dos sistemas multiplex, marcados com fluorescência CXR no PowerPlex®16 e LIZ no AmpFISTR® Identifilier (**figura 4.4**). Ao serem incorporados juntamente com a amostra, migraram concomitantemente durante a eletroforese, minimizando qualquer interferência na separação eletroforética, seja em gel ou em capilar (LEVEDAKOU et al, 2002; KRENKE et al, 2002; WALLIN et al, 2002; COLLINS et al, 2004).

Entretanto, há algumas considerações a serem feitas com relação à essa análise. Os alelos amplificados por PowerPlex® 16 (**figura 5.24 a 5.29**) foram

condizentes com aqueles incorporados nos plasmídeos presentes na referência alélica (**quadro 5.1**). No entanto, na **figura 5.25**, os alelos da STR TH01 possuem variações entre a referência C e a referência D. Na primeira, observa-se a presença de picos menores antes e depois do pico principal para os alelos 6 e 9.3, característica não observada na segunda. Esse artefato pode estar relacionado com a adenilação das seqüências, que ocorre principalmente pela taq polimerase (CLARCK et al, 1988; BUTLER, 2005). O que resultou em picos menores equivalentes à não adenilação das duas fitas de DNA (pico anterior) e à adenilação das duas fitas (pico posterior). Segundo Butler (2005), essa adenilação também pode ocorrer pelo excesso de DNA alvo, fato que pode ser demonstrado no esferograma da mesma STR para a amostra diluída 1:50 (**figura 5.25, linha D**).

O mesmo aconteceu com a STR VWA (**figura 5.29**), possibilitando uma melhor visualização dos picos em duplicata relacionados ou não à adenilação, devido à alta quantidade de DNA. Situação inversa ocorre na **figura 5.27, linhas C e D**. Não ocorreram às presenças desses picos na referência (C) e ocorreu na referência diluída (D). A amostra diluída foi amplificada com índices muito baixos, fato observado ao se comparar as escalas presentes no lado direito da figura: na linha C a escala foi de 4000 e na linha D, de 100. O produto amplificado está bem próximo à linha de base que comumente apresenta esses artefatos, como se pode visualizar por toda a extensão da linha. Na **figura 5.25**, observa-se a ausência do alelo 27 da STR D21S11 na linha D, que, provavelmente, está relacionada com a pouca quantidade de DNA desse plasmídeo, que estava presente nessa amostra diluída (WALSH, 1998; KOBAYASHI e tal, 2004).

Os eletroferogramas, resultantes da análise do produto da PCR obtido pelo sistema AmpFISTR® Identifiler™, demonstraram que o locus D5S818 (**figura 5.33**)

identificou os mesmos alelos que o sistema PowerPlex®16. Para o locus D21S11, (**figura 5.30**) apesar de identificar os mesmos alelos, observa-se a presença do alelo 24. No entanto, ao analisarmos a escala, verifica-se que todos os alelos que deveriam ser amplificados – 27, 28, 29, 30 - estão bem acima de 4000 RFU (Unidade de Fluorescência Relativa), e o alelo 24 abaixo de 1000 RFU. Isso demonstra a alta quantidade de DNA plasmidial, podendo resultar na amplificação inadequada dos alelos (BULLER, 2005). A alta quantidade de plasmídeo também pode ser observada no locus D3S1358 (**figura 5.31**), pois além do alelo 15 com RFU acima de 6000, há a presença de picos bem menores abaixo de 2000 RFU. Tal característica pode ser minimizada alterando as concentrações de DNA plasmidial presente na referência alélica, mesmo havendo a incorporação inicial de quantidades homogêneas de plasmídeo.

O alelo 6 da STR TH01 não foi amplificado pelo AmpFISTR® Identifilier™ (**figura 5.31**), provavelmente, pela pouca quantidade de plasmídeo recombinante contendo esse alelo. A STR VWA (**figura 5.32**) não teve os alelos identificados, havendo até a amplificação do alelo 25 que não foi clonado e nem analisado previamente. Possivelmente, caracteriza-se por amplificação não específica que deve ser melhor estudada e devidamente eliminada da referência alélica.

Apesar de a referência alélica ser construída uma única vez, homogeneizada e devidamente aliquotada em partes iguais para serem encaminhadas para análise, houve essas diferenças em sua amplificação, principalmente com o emprego do sistema AmpFISTR® Identifilier™, havendo a necessidade de outras otimizações para esse método.

Os loci presentes no PowerPlex®16 e AmpFISTR® Identifilier™ que não foram amplificados, provavelmente possuem região de amplificação maior que a região clonada, não permitindo que os iniciadores se hibridizassem com o fragmento. Será desenvolvido outros iniciadores para construção de outros insertos para clonagem, almejando a possibilidade de completar os loci para a construção integral da referência alélica, tanto para o uso no PowerPlex® 16 como para o AmpFISTR® Identifilier®. Também, avalia-se a futura possibilidade de incorporar outros alelos encontrados na população brasileira, incluindo microvariações alélicas.

A referência alélica, desenvolvida nesse trabalho, demonstra a possibilidade de construir controles positivos e até marcadores alélicos adaptáveis a diversos tipos de equipamentos utilizados para a detecção dos fragmentos.

7 CONCLUSÕES

A referência alélica contendo alelos dos 13 STRs clonadas em plasmídeos recombinantes foi construída e devidamente caracterizada.

A análise e a validação foram realizadas por dois métodos distintos em 2 laboratórios demonstrando o seu potencial de aplicação como controle positivo para 8 loci.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAIJ, C.; BORST, P. The gel electrophoresis of DNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 269, f. 2, p. 192-200, may, 1972.

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**. 2000. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ANDERSEN, J. Quantification of DNA by slot-blot analysis. In: Lincoln PJ, Thompson J. **Methods in molecular biology, vol. 98: Forensic DNA profiling protocols**. Totowa: Humana Press; 1998. p. 19 – 26.

ANDREASSON, H.; ALLEN, M. Rapid quantification and sex determination of forensic evidence materials. **Journal of Forensic Science**, v.48, f. 6, p. 1280-7, nov. 2003.

ANZAI, E.K.; OZAKI, A.; NUNES, F.D.; HIRATA, M.; OLIVEIRA, R.N. Extração de DNA de saliva humana depositada sobre a pele e sua aplicabilidade aos processos de identificação individual. **Odontologia e Sociedade**, 2001; 3(1-2): 5-7, 2001

APPLIED BIOSYSTEMS. **ABI PRISM 310 Genetic Analyser – User’s manual**. 1998.

APPLIED BIOSYSTEMS. **ABI PRISM 377 DNA Sequencer – User’s manual**. 2000

APPLIED BIOSYSTEMS. **AmpF/STR® Identifiler® PCR Amplification Kit – User’s manual**. 05/2005.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Quantifiler® Human DNA Quantification Kits – User’s Manual**. 2006

BARKER, P.E; WATSON, M.S.; TICEHURST, J.R.; COLBERT, J.C.; O’CONNELL, C.D. NIST physical standards for DNA-based medical testing. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.16, f.1, p. 5-10, 2002.

BASSAM, B.J; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 196, f. 1, p. 80-3, jul. 1991.

* De acordo com a norma NBR 6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).

BELK, W.; SUNDERMAN, F.W. A survey of the accuracy of chemical analyses in clinical laboratories. By William P. Belk and F. William Sunderman, 1947. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v. 113, f. 4, p. 320-6, abr.1988.

BENDER, K.; FARFAN, M.J.; SCHNEIDER, P.M. Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. **Forensic Science International**, v. 139, f. 2-3, p. 135-40, jan. 2004.

BJERRE, A.; COURT, D.S.; LINCOLN, P.; MORLING, N. A report of the 1995 and 1996 Paternity Testing Workshop of the English Speaking Working Group of the International Society for Forensic Haemogenetics. **Forensic Science International**, v. 90, f. 1-2, p. 41-55, 10 nov. 1997.

BLICK, K.E.; PASSEY, R.B. Quality Control for the Clinical Laboratory. In: LA Kaplan, AJ Pesce, and S Kazmierczak. **Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation**. 4th Edition: Theory, Analysis, Correlation, Philadelphia: Mosby. 2003.

BONACCORSO, S.N. **Aplicação do exame de DNA na elucidação de crimes**. 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Forense) – Faculdade de Direito, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005

BRETTELL, T.A.; BUTLER, J.M.; SAFERSTEIN, R. Forensic Science. **Analytical Chemistry**. v. 77, f. 12, p. 3839-60, 15 jun. 2005.

BUDOWLE, B.; BAECHTEL, F.S.; SMERICK, J.B.; PRESLEY, K.W.; GIUSTI, A.M.; PARSONS, G.; ALEVY, M.C.; CHAKRABORTY, R. D1S80 population data in African Americans, Caucasians, southeastern Hispanics, southwestern Hispanics, and Orientals. **Journal of Forensic Science**, v. 40, f. 1, p. 38-44, jan. 1995

BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI, A.M.; EISENBERG, A.J.; ALLEN, R.C. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. **American Journal of Human Genetics**. v. 48, f. 1, p. 137-44, jan. 1991.

BUDOWLE, B.; MORETTI, T.R. Genotype profiles for six population groups at the 13 codis short tandem repeat core loci and other PCR based loci. **Forensic Science Communication** [periódico online]. v. 1, f. 2, jul. 1999. Disponível em <<http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july1999/budowle.htm>> Acesso em 2002 nov. 10.

BURGER, J.; HUMMEL, S.; HERMANN, B.; HENKE, W. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. **Electrophoresis**, v. 20, f. 8, p. 1722-8, jun. 1999.

BUTLER, J.M. **Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers**. Elsevier Academic Press: New York, 688 p., 2005.

CARRACEDO, A.; BECKMANN, A.; BENGIS, A.; BRINKMANN, B.; CAGLIA, A.; CAPELLI, C.; GILL, P.; GUSMAO, L.; HAGELBERG, C.; HOHOFF, C.; et al. Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding the reproducibility and robustness of the Y-chromosome STRs DYS19, DYS389 I and II, DYS390 and DYS393 in a PCR pentaplex format. **Forensic Science International**, v. 119, f. 1, p. 28-41, 1 jun. 2001.

CARRACEDO, A.; D'ALOJA, E.; 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 Science International**, v. 97, f. 2-3, p. 165-70, 9 nov. 1998.

CLARCK J.M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. **Nucleic Acids Research**, v. 16, f. 20, p. 9677-86, out. 1988.

COLLINS, P.J.; HENNESSY, L.K.; LEIBELT, C.S.; ROBY, R.K.; REEDER, D.J.; FOXALL, P.A. Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433, and amelogenin: the AmpFISTR Identifiler PCR Amplification Kit. **Journal of Forensic Science**, v. 49, f. 6, p. 1265-77, nov. 2004.

COMMITTEE ON DNA TECHNOLOGY IN FORENSIC SCIENCE, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **DNA technology in forensic science**. Washington DC: National Academy Press; 1992.

CORTE-REAL, F.; ANDRADE, L.; ANJOS, M.J.; CARVALHO, M.; VIEIRA, D.N.; CARRACEDO, A.; VIDE, M.C. Population genetics of nine STR loci in two populations from Brazil. **Journal of Forensic Science**, v. 45, f. 2, p. 432-35, mar 2000.

CROUSE, C.A.; ROGERS, S.; AMIOTT, E.; GIBSON, S.; MASIBAY, A. Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems. **Journal of Forensic Science**, v. 44, f. 1, p.87-94, jan 1999.

DENG J.Q., YING B.W., SHI M.S., YAN J., JIA Z.J., LI Y.B., WU J., ZHANG J., HOU Y.P. Constructing standard allelic ladders for four short tandem repeat loci and employing them in a population study on Han Nationality of Chengdu in China. **Chinese Journal of Medical Genetics**, v. 22, f. 1, p. 49-53, fev. 2005.

DNA ADVISORY BOARD. Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories. **Forensic Sci Communucation**, v. 2, f. 3, jul. 2000. Disponível em <<http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2000/codis2b.htm>> Acesso em 10 jun. 2005.

DUPUY, B.M.; OLAISEN, B. dedicated internal standard in fragment length analysis of hyperpolymorphic short tandem repeats. **Forensic Science International**, v. 86, f. 3, p. 207, mai. 1997.

EDWARDS M.C., GIBBS R.A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. **PCR Methods Applications**, v. 3, f. 4, p. S65-75, fev. 1994.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A.; CASKEY, C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, V.49, f. 4, p. 746-56, out. 1991

EDWARDS, A.; HAMMOND, H.A.; JIN, L.; CASKEY, C.T.; CHAKRABORTY, R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics**, V. 12, f. 2, p. 241-53, feb. 1992.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. Lei, 103-322, H.R. 3355, 13 set. 1994. Violent Crime Control and Law Enforcement Act of 1994. Title XXI—State and Local Law Enforcement, Subtitle C—DNA Identification. **U.S. Government Printing Office**. Washington, DC, p. 270-1. Disponível em <<http://usinfo.state.gov/usa/infousa/laws/majorlaw/gun94.pdf>>. Acesso em 27/05/2006.

EVETT, I.W.; WEIR, B.S. **Interpreting DNA evidence**. Sunderland: Sinauer Associates; 1998.

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION (FBI). **Handbook of forensic services** [manual online]. 2003. Disponível em <<http://www.fbi.gov/hq/lab/handbook/forensics.pdf>> Acesso em 18 mai. 2006

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION (FBI). Quality assurance audit for forensic DNA and convicted offender DNA databasing laboratories. **Forensic Science Communication**, Jan 2001. Disponível em <<http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/jan2001/dnaaudit.htm>> Acesso em 18 05 2006.

FRANK, R.; KOSTER, H. DNA chain length markers and the influence of base composition on electrophoretic mobility of oligodeoxyribonucleotides in polyacrylamide-gels. **Nucleic Acids Research**, v.6, f. 6, p. 2069-87, 1979.

FRÉGEAU, C.J.; FOURNEY, M. DNA Typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. **Biotechniques**, v. 15, f. 1, p. 100-19, jul. 1993.

FUJII, K.; SEKIGUCHI, K.; SHIMIZU, K.; KASAI, K. A new sequenced allelic ladder marker for D1S80 typing. **Journal of Human Genetics** v. 49, f. 3, p. 169-71, 26 fev 2004.

FUJII, K.; SENJU, H.; YOSHIDA, K.; SEKIGUCHI, K.; IMAIZUMI, K.; KASAI, K.; SATO, H. Multiplex PCR amplification of TH01, D9S304, and D3S1744 loci. **Journal of Human Genetics**, v. 45, f. 5, p. 303-4, 2000.

GARCIA-HIRSCHFELD, ALONSO, A.; GARCIA, O.; AMORIM, A.; GOMEZ, J. 2004–2005 GEP proficiency testing programs: Special emphasis on the interlaboratory analysis of mixed stains. **International Congress Series**, v. 1288, p. 855– 857, 2006.

GE HEALTHCARE – AMERSHAM BIOSCIENCES. **GFX Micro Plasmid Prep Kit**. Cat. No. 24-9006 -01 e 02, ed. AA, 2002.

GILL, P.; KIMPTON, C.P.; URQUHART, A.; OLDROYD, N.; MILLICAN, E.S.; WATSON S.K., DOWNES, T.J. Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework – a strategy for the future. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1543-52, set. 1995.

GLOCK, B.; SCHWARTZ, D.W.M.; SCHWARTZ-JUNGL, E.M.; MAYR, W.R. Sequence determination of an allelic ladder for the STR polymorphism at the CD4 locus and application of the ladder in testing an Austrian Caucasian population sample. **Forensic Science International**, v. 78, p. 125-30, 1995.

GÓIS, C.C.; MARTINS, J.A.; PEREIRA, G.A.; FRESCHI, A.; PANETO, G.G.; ALVARENGA, V.L. et al. Genetic population data of 12 STR loci of the PowerPlex® Y system in the state of Sao Paulo population (Southeast of Brazil). application of the ladder in testing an Austrian Caucasian population sample. **Forensic Science International**, [in press] 2007.

GOMÉZ, J.; GARCIA-HIRSCHFELD, J.; GARCIA O.; CARRACEDO, A. GEP proficiency testing program in forensic genetics: 100 years of experience. **International Congress Series**, v. 1261, p. 124-6, 2006.

GRIFFITHS, R.A.L.; BARBER, M.D.; JOHNSON, P.E.; GILLBARD, S.M.; HAYWOOD, M.D.; SMITH, C.D.; ARNOLD, J.; BURKE, T.; URQUHART, A.J.; GILL, P. New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. **International Journal of Legal Medicine**, v. 111, p. 267, 1998.

GROSS, A.M.; HARRIS, K.A.; KALDUN, G.L. The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. **Journal of Forensic Science**, v. 44, f. 4, p. 837-40, jul. 1999.

HAGELBERG, E.; GRAY, I.C.; JEFFREYS, A.J. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. **Nature**, v. 352, p. 427-9, 1 ago. 1991.

HALLENBERG, C.; MORLING, N. A report of the 1997, 1998 and 1999 paternity testing workshops of the English Speaking Working Group of the International Society for Forensic genetics. **Forensic Science International**, v. 116, p. 23-33, 2001.

HAMMOND, H.A.; JIN, L.; ZHONG, Y.; CASKEY, C.T.; CHAKRABORTY, R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. **American Journal of Human Genetics**. v. 55, f.1, p. 175-89, jul.1994.

HIRATA M.H. O LABORATÓRIO DE ENSINO E PESQUISA E SEUS RISCOS In: HIRATA, MH, MANCINI-FILHO, J. **Manual de Biossegurança**, Editora Manole, cap 1, 2002, p.1 A 19.

HOCHMEISTER, M.N. PCR analysis of DNA from fresh and decomposed bodies and skeletal remains in medicolegal death investigations. In: Lincoln PJ, Thompson J. **Methods in molecular biology**, vol. 98: **Forensic DNA profiling protocols**. Totowa: Humana Press; 1998. p. 19 – 26.

HOCHMEISTER, M.N.; BUDOWLE, B.; RUDIN, O.; GEHRIG, C.; BORER, U; THALI, M.; DIRNHOFER, R. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. **Journal of Forensic Science**, v. 44, f. 5, p. 1057-60, set. 1999.

HOFF-OLSEN, P.; MEVAG, B.; STAALSTROM, E.; HOVDE, B.; EGELAND, T.; OLAISEN, B. Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. **Forensic Science International**, v. 105, f. 3, p. 171-83, nov.1999.

HOU, Y.P.; ZHANG, J.; LI, Y.B.; WU, J.; ZHANG, S.Z.; PRINZ, M. Allele sequences of six new Y-STR loci and haplotypes in the Chinese Han population. **Forensic Science International**. v. 118, f. 2-3, p. 147-51, 15 mai. 2001.

HUANG, N.E.; SCHUMM, J.W.; BUDOWLE, B. Chinese population data on three tetrameric short tandem repeat loci--HUMTH01, TPOX, and CSF1PO--derived using multiplex PCR and manual typing. **Forensic Science International**, v. 71, p. 131-6, 1995.

INTERNACIONAL CRIMINAL POLICE ORGANIZATION (INTERPOL). **INTERPOL handbook on DNA data exchange and practice**. [manual online] 1ª edição. 2001 June. Disponível em <<http://www.interpol.int/Public/Forensic/dna/HandbookPublic.pdf>> Acesso em 22/05/2006.

INTERNACIONAL SOCIETY FOR FORENSIC HAEMOGENETICS (IFSH). Recommendations of the DNA commission of the international society for forensic haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms [Editorial]. **Forensic Science International**, v. 55, p. 1-3, 1992.

INTERPOL. **Interpol handbook on DNA data exchange and practice : recommendations from the Interpol DNA Monitoring Expert Group**.- 1.ª ed., Lyon : OIPC-Interpol, 70 p., 2001. Disponível em: <<http://www.interpol.int/Public/Forensic/dna/HandbookPublic.pdf>>. Acesso e 25/05/2006

INVITROGEN® LIFE TECHNOLOGIES. **100bp DNA ladder**. Cat. No. 15629-019. Doc. Rev. 102501. 2007

INVITROGEN® LIFE TECHNOLOGIES. **10bp DNA ladder**. Cat. No. 10821-015. Doc. Rev. 0101001. 2007

INVITROGEN® LIFE TECHNOLOGIES. **1Kb Plus DNA ladder**. Cat. No. 10787-018. Doc. Rev. 021802. 2007

INVITROGEN® LIFE TECHNOLOGIES. **50bp DNA ladder**. Cat. No. 10416-014. Doc. Rev. 110901. 2007

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Individual-specific 'fingerprint' of human DNA. **Nature**, v. 316, p. 76-9, 4 jul. 1985.

JIN, L.; UNDERHILL, P.A.; BUONCRISTIANI, M.R.; ROBERTSON, J.M. Defining microsatellite alleles by genotyping global indigenous human populations and non-human primates. **Journal of Forensic Science**, v. 42, f. 3, p. 496-9, may.1997.

JUNG, J.M.; COMEY, C.T.; BAER, D.B.; BUDOWLE, B. Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ alpha gene. **International Journal of Legal Medicine**, v. 104, f. 3, p. 145-8, 1991.

KIMPTON, C.P.; OLDROYD, N.J.; WATSON, S.K.; FRAZIER, R.R.; JOHNSON, P.E.; MILLICAN, E.S.; URQUHART, A.; SPARKES, B.L.; GILL, P. Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individual identification. **Electrophoresis**, v. 17, f. 8, p. 1283-93, ago. 1996.

KLINE, M.C.; DUEWER, D.L.; REDMAN, J.W.; BUTLER, J.M. Results from the NIST 2004 DNA Quantitation Study. **Journal of Forensic Science**. v. 50, f. 3, p. 570-8, maio. 2005.

KLOOSTERMAN, A.D. Credibility of forensic DNA typing is driven by stringent quality standards. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement, v. 6, p.409-14, 2001.

KOBAYASHI, R.; SATO, K.; TAKAHASHI, K.; ITOH, Y. The risk of missing one allele with very low DNA quantities using PCR. **Progress in Forensic Genetics**, v.10, p. 634-636, 2004.

KRENKE, B.E.; TEREBA, A.; ANDERSON, S.J.; BUEL, E.; CULHANE, S.; FINIS, C.J.; TOMSEY, C.S.; ZACHETTI, J.M.; MASIBAY, A.; RABBACH, D.R.; AMIOTT, E.A.; SPRECHER, C.J. Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. **Journal of Forensic Science**, v. 47, f. 4, p. 773-85, jul. 2002.

KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, London, v. 339, p. 237-8, 18 mai. 1989.

LAFOUNTAIN, M.J.; SCHWARTZ, M.B.; SVETE, P.A.; WALKINSHAW, M.A.; BUEL, E. TWGDAM validation of the AmpFISTR Profiler Plus and AmpFISTR COfiler STR multiplex systems using capillary electrophoresis. **Journal of Forensic Science**, v. 46, f. 5, p 1191, set. 2001.

LEVEDAKOU, E.N.; FREEMAN, D.A.; BUDZYNSKI, M.J.; EARLY, B.E.; DAMASO, R.C.; POLLARD, A.M.; et al. Characterization and validation studies of powerPlex 2.1, a nine-locus short tandem repeat (STR) multiplex system and penta D monoplex. **Journal of Forensic Science**, v. 47, f. 4, p. 757-72, jul. 2002.

LI, H.; SCHMIDT, L.; WEI, M.H.; HUSTAD, T.; LERMAN, M.I.; ZBAR, B.; TORY, K. Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352, D3S1358, D3S1359. **Hum Molecular Genetics**, v. 2. p. 1327, ago. 1993.

- LIU, C.; HARASHIMA, N.; KATSUYAMA, Y.; OTA, M.; ARAKURA, A.; FUKUSHIMA, H. ACTB2 gene frequency distribution and sequencing of the allelic ladder and variants in the Japanese and Chinese populations. **International Journal of Legal Medicine**, v. 110, p. 208-12, 1997.
- MANDREKAR, M.N.; ERICKSON, A.M.; KOPP, K.; KRENKE, B.E.; MANDREKAR, P.V.; NELSON, R, *et al.* Development of a human DNA quantitation system. **Croat Med J**, Zagreb, v. 42. f. 3, p. 336-9, jun. 2001.
- MESQUITA, R.A.; ANZAI, E.K.; OLIVEIRA, R.N.; NUNES, F.D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para a amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15. f. 4, p. 314-19, out./dez. 2001.
- MICKA, K.A.; AMIOTT, E.A.; HOCKENBERRY, T.L.; SPRECHER, C.J.; LINS, A.M.; RABBACH, D.R., *et al.* TWGDAM validation of a nine-locus and a four-locus fluorescent STR multiplex system. **Journal of Forensic Science**, v. 44, f.6, p. 1243-57, nov.1999.
- MISCICKA-SLIWKA, D.; GRZYBOWSKI, T. High microvariation sequence polymorphism at short tandem repeat loci: human beta-actin related pseudogene as an example. **Electrophoresis**, v. 18, f. 9, p. 1613-9, ago. 1997.
- MOLLER, A.; WIEGAND, P.; GRUSCHOW, C.; SEUCHTER, S.A.; BAUR, M.P.; BRINKMANN, B. Population data and forensic efficiency values for the STR systems HumVWA, HumMBP and HumFABP. **International Journal of Legal Medicine**, v. 106, p. 183-9, 1994.
- MOURA-NETO, R.S.; BUDOWLE, B. Fixed bin population data for the VNTR loci D1S7, D2S44, D4S139, D5S110, D10S28 and D14S13 in a population sample from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Forensic Science**, v. 42, f. 5, p. 926-8, set. 1997.
- MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, v. 48, f. 8, p. 579-82, 1990.
- NADIR, E.; MARGALIT, H.; GALLILY, T.; BEN-SASSON, S.A. Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, f. 13, p. 6470-5, jun. 1996.
- NAKAMURA, Y.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P.; WOLFF, R.; HOLM, T.; CULVER, M *et al.* Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, v. 235, f. 4796, p. 1616-22, 27 mar. 1987.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)**. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>> Acesso 22/05/2007.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). **Short Tandem Repeat DNA Internet Database**. [banco de dados on line]. Disponível em <<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/index.htm> > Acesso em 22/05/2006.

NEUMAIER, M.; BRAUN, A.; WAGENER, C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. **Clinical Chemistry**, v. 44, f. 1, p. 12-26, jan 1998.

OLIVEIRA, R.N.; NUNES, F.D.; ANZAI, E.K.; DARUGE, E.; MESQUITA, R.A.; OZAKI, A.N.; HIRATA, R.D.; HIRATA, M.H. Population studies of the Y-chromosome of loci DYS390, DYS391 and DYS393 in Brazilian subjects and its use in human identification. **The Journal of Forensic Odonto-stomatology**, v. 20, f. 1, p. 6-9, jun. 2002.

OWCZARZY, R.; VALLONE, P.M.; GALLO, F.J.; PANER T.M.; LANE M.J.; BENIGHT, A.S. Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers. **Biopolymers**, 1997;44(3):217-39.

OZAKI, N.A. **Determinação da frequência de genes de algumas regiões hipervariáveis do genoma humano para estudo do vínculo genético familiar em caucasianos brasileiros**. 1999. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

PENA SD. Razões para banir o conceito de raça da medicina Brasileira. **História, ciências, saúde--Manguinhos**. v. 12, f.2,fp. 321-49, mai-ago 2005.

PENACINO, G.; ALVAREZ, M.; ARCE, V.; AREVALO, J.; ARRIETA, G.; BARRETTO, R; et al. Control de calidad 2004/2005 de la sociedad latinoamericana de genetica forense. **Revista de Ciências Forenses**. V. 1, f. 1, p. 69-71, 2006.

PETERSON, J.L.; LIN, G.; HO, M.; CHEN, Y.; GAENSSLEN, R.E. The feasibility of external blind DNA proficiency testing. I. Background and findings. **Journal of Forensic Science**, v. 48, f. 1, p. 21-31, jan. 2003.

PETERSON, J.L.; MARKHAM, P.N. (b). Crime laboratory proficiency testing results, 1978-1991, II: Resolving questions of common origin. **Journal of Forensic Science**, v. 40, f. 6, p. 1000-29, nov. 1995.

PETERSON, J.L.; MARKHAM, P.N.(a). Crime laboratory proficiency testing results, 1978-1991, I: Identification and classification of physical evidence. **Journal of Forensic Science**, v. 40, f. 6, p. 994-1008, nov. 1995.

PIMENTA, J.R.; ZUCCHERATO, L.W.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.; SOARES, R.P.; MOURA-NETO, R.S.; et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. **Human Heredity**, v. 62, f. 4, p. 190-5, 2006.

POTTER, T. Co-amplification of ENFSI-loci D3S1358, D8S1179 and D18S51: validation of new primer sequences and allelic distribution among 2874 individuals. **Forensic Science International**, v. 138, f. 1-3, p. 104-10, dez. 2003 Dec.

PRINZ, M.; SCHMITT, C.; STAAK, M.; BAUM, H. Resolution of apolipoprotein B repeat unit position variants on agarose, denaturing, and native polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 17, f. 7, p. 1190-3, jul. 1996.

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE. **Manual do participante do Programa Nacional de Controle de Qualidade**. 54P. 2006. Disponível em < http://www.pncq.org.br/pdfs/manual_pncq.pdf>. Acesso em 25/05/2006.

PROMEGA. **PowerPlex®16 System**. TMD012, revised1/07.

PUERS, C.; HAMMOND, H.A.; CASKEY, C.T.; LINS, A.M.; SPRECHER, C.J.; BRINKMANN, B.; SCHUMM, J.W. Allelic ladder characterization of the short tandem repeat polymorphism located in the 5' flanking region to the human coagulation factor XIII A subunit gene. **Genomics**, v. 23, f. 1, p. 260-4, set. 1994.

RAMOS, C.F.; MAGNA, L.A.; DE MELLO, M.P.; SILVA, R.; DE MOURA-NETO, R.S. Genetic variation and relationships at six VNTR loci in two distinct sample populations in Brazil. **Annals of human biology**, v. 31, f. 6, p. 660-8, nov-dez 2004.

RAND, S.; WIEGAND, P.; BRINKMANN, B. Problems associated with the DNA analysis of stains. **International Journal of Legal Medicine**, v.104, f. 5, p. 293-7, 1991.

RUITBERG, C.M.; REEDER, D.J.; BUTLER, J.M. STRbase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. **Nucleic Acids Research**, v. 29, f. 1, p. 320-2, 2001.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, f. 4732, p. 1350-4, 20 dez. 1985.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, A.S.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 44, f. 8 pt 1, p. 1748-50, ago. 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning** 3ª Ed. (3 vol.) New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SÃO PAULO. Secretaria da Segurança Pública. Resolução SSP-194, de 02 de junho de 1999. **Diário Oficial do Estado**. 3; seção 1:104. 1999

SCHLENK, J.; SEIDI, S.; BRAUNSCHWEIGER, G.; BETZ, P. Development of a 13-locus PCR multiplex system for paternity testing. **International Journal of Legal Medicine**, v. 118, p. 55-61, 2004.

SCHNEIDER, P.M. **Recovery of high-molecular-weight DNA from blood and forensic specimens**. In: Lincoln PJ, Thompson J. *Methods in molecular biology*, vol. 98: Forensic DNA profiling protocols. Totowa: Humana Press; 1998. p. 1-7.

SCHNEIDER, P.M.; BENDER, K.; MAYR, W.R.; PARSON, W.; HOSTE, B.; et al. STR analysis of artificially degraded DNA – results of a collaborative European exercise. **Forensic Science International**, v. 139, p. 123-134, 2004.

SCHNEIDER, P.M.; D'ALOJA, E.; DUPUY, B.M.; ERIKSEN, B.; JANGBLAD, A.; KLOOSTERMAN, A.D et al. Results of collaborative study regarding the standardization of the Y-linked STR system DYS385 by the European DNA Profiling (EDNAP) group. **Forensic Science International**, v. 102, f. 2-3, p. 159-65, 28 jun. 1999.

SCHNEIDER, P.M.; FIMMERS, R.; WOODROFFE, S.; WERRETT, D.J.; BAR, W.; BRINKMANN, B et al. Report of a European collaborative exercise comparing DNA typing results using a single locus VNTR probe. **Forensic Science International**, v. 49, f. 1, p. 1-15, jan-fev. 1991.

SECRETARIA NACIONAL DE SEGURANÇA PÚBLICA (SENASP) **Padronização de Exames de DNA em Perícias Criminais**. Disponível em <http://www.mj.gov.br/senasp/SUSP/pericias/Padronização_Exames.pdf>. Acesso em 25/05/2006.

SILVA, R.; MOURA-NETO, R.S. Allelic frequency distribution for three VNTR markers--D6S132, D7S467, D17S26--in Rio de Janeiro population, Brazil. **Forensic Science International**, v. 94, f. 1-2, p. 33-8, 8 jun.1998.

SOARES-VIEIRA, J.A.; BILLERBECK, A.E.; IWAMURA, E.S.; MUNOZ, D.R.; OTTO, P.A. Allele and genotype frequencies for D1S80 locus in a Brazilian population sample. **Journal of Forensic Science**, West Conshohocken, v. 45, f. 3, p. 696-7, mai. 2000.

SOARES-VIEIRA, J.A.; MUNOZ, D.R.; IWAMURA, E.S.; BILLERBECK, A.E.; OTTO, P.A. Allele frequency distribution of three STR loci (CSF1PO, TPOX, and TH01) in a Brazilian population sample. **Journal of Forensic Science**, v. 46, f. 4, p. 996-7, jul. 2001.

SOUTHERN, E.M. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 100, f. 2, p. 319-23, dez. 1979.

SULLIVAN, K.M; POPE, S.; GILL, P.; ROBERTSON, J.M. Automated DNA profiling by fluorescent labeling of PCR products. **PCR Methods Applications**, V. 2, f. 1, p. 34-40, ago. 1992.

SUN DH, HOU YP, LI YB, WU J, MAO J, WANG H, ZHANG J, DING Y. Allele frequencies for two STR loci D9S1118 and D20S161 in Chinese Han ethnic group in Chengdu **Journal of Forensic Science**, v. 48, f. 4, p. 905, jul. 2003.

SUN, G.; MCGARVEY, S.T.; BAYOUMI, R.; MULLIGAN, C.J.; BARRANTES, R.; RASKIN, S.; et al. Global genetic variation at nine short tandem repeat loci and implications on forensic genetics. **European Journal of Human Genetics**, v. 11, p. 39, 2003.

THOMPSON, M.A. Bias and quality control in forensic science: a cause for concern. **Journal of Forensic Science**, v. 19, f. 3, p. 504-7, jul.1974.

URQUHART, A., KIMPTON, C.P.; DOWNES, T.J.; GILL, P. Variation in short tandem repeat sequences--a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. **International Journal of Legal Medicine**, v. 107, p. 13-20, 1994.

URQUHART, A.; OLDROYD, N.J.; KIMPTON, C.P.; GILL, P. Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. **Biotechniques**, v. 18, p. 116-21, 1995.

WALLIN, J.M.; HOLT, C.L.; LAZARUK, K.D.; NGUYEN, T.H.; WALSH, P.S. Constructing universal multiplex PCR systems for comparative genotyping. **Journal of Forensic Science**, v. 47, f. 1, p. 52-65, jan. 2002.

WALSH, O.S.; VARVARO, J.; REYNOLDS, R. A rapid chemiluminescent method for quantification of human DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 20, f. 19, p. 5061-5, 1992.

WALSH, P.S.; FIELDS, N.J.; REYNOLDS, R. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. **Nucleic Acids Research**, v. 24, f. 14, p. 2807-12, jul.1996.

WATSON, S.; ALLSOP, R.; FOREMAN, L.; KELSEY, Z.; GILL, P. Sequenced allelic ladders and population genetics of a new STR multiplex system. **Forensic Science International**, v. 115, f. 3, p. 207-17, jan. 2001.

WAYE, J.S.; PRESLEY, L.A.; BUDOWLE, B.; SHUTLER, G.G.; FOURNEY, R.M. A simple and sensitive method for quantifying human genomic DNA in forensic specimen extracts. **Biotechniques**, v. 7, f. 8, p. 852-5, set. 1989.

WHITTLE, M.R.; ROMANO, N.L.; NEGREIROS, V.A. Updated Brazilian genetic data, together with mutation rates, on 19 STR loci, including D10S1237. **Forensic Science International**, v. 139, f. 2-3, p. 207-10, jan. 2004.

WILLOTT, G.M.; GRIFFITHS, M. A new method for locating saliva stains-spotty paper for spotting spit. **Forensic Science International**, v. 15, f. 1, p. 79-83, jan-fev. 1980.

WYMAN, A.R.; WHITE, R. A highly polymorphic locus in human DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, f. 11, p. 6754-58, nov. 1980.

ZHANG, N.; YEUNG, E.S. Genetic typing by capillary electrophoresis with the allelic ladder as an absolute standard. **Analytical Chemistry**. v.98, f. 17, p. 2927 – 31, 1 set. 1996.

ANEXOS

Anexo 1: Cópia da aprovação do CEP-FCFUSP para realização da pesquisa **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 108

São Paulo, 01 de outubro de 2003.

Ilmo(a) Sr(a).
Evelyn Kuroki Anzai

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa do FCF/USP, em reunião realizada em 29 de setembro passado, **APROVOU** o projeto "Caracterização e desenvolvimento de sistemas de referências alélicas de loci de STR para controle de qualidade em identificação humana por ácidos nucleicos" (Protocolo nº 184) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USPOrientador: Prof. Mário Hiroyuki Hirata
FBC

Anexo 2: Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos doadores de saliva

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO COLABORADOR DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. Responsável Legal:.....
Documento de Identidade Nº :.....Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....
Nº:.....Apto:.....Bairro:.....Cidade:.....
Estado:CEP:.....
Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....
Documento de Identidade Nº :.....Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....
Nº:.....Apto:.....Bairro:.....Cidade:.....
Estado:CEP:.....
Telefone:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **Título do Protocolo de Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE REFERÊNCIAS ALÉLICAS DE LOCI DE STR PARA CONTROLE DE QUALIDADE EM IDENTIFICAÇÃO HUMANA PELOS ÁCIDOS NUCLÉICOS.

2. **Pesquisadores:** Doutoranda: Evelyn Kuroki Anzai
Orientador: Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

1. **Avaliação do Risco da Pesquisa**

Sem Risco (X) Risco Mínimo () Risco Médio ()
Risco Baixo () Risco Maior ()

4. **Duração da Pesquisa:** Junho/2003 a dez/2006.

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO COLABORADOR DA PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

- Justificativa e os objetivos da pesquisa:**
O objetivo da pesquisa é analisar genes que são utilizados em testes de identificação humana.
- Procedimentos a serem seguidos:**
A saliva será cuspidada em potes plásticos esterilizados apropriados para a realização dos testes laboratoriais para a análise dos genes.
O estudo não envolve a administração de medicamentos.
- Desconfortos e riscos esperados;**
Esses genes não estão relacionados a algum tipo de doença presente ou que o colaborador possa ter no futuro. O gene não será comparado com outras amostras, não havendo a possibilidade de verificar identificação como paternidade e maternidade. Dessa maneira, os resultados dos testes laboratoriais e da pesquisa não causarão nenhum risco ao colaborador da pesquisa.
- Benefícios que poderão ser obtidos;**
Os benefícios da pesquisa serão para a coletividade (sociedade), auxiliando na melhoria dos testes de identificação humana.

5. Gastos adicionais

Você não pagará nada pelos testes de laboratório relacionados com a investigação.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação.

V – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO**COLABORADOR DA PESQUISA**

1. Os pesquisadores acima citados comprometem-se ainda, à prestação de esclarecimentos advindos de eventuais dúvidas que o colaborador da pesquisa possa ter durante o andamento do projeto.
2. O colaborador tem liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo de relacionamento profissional, pessoal ou perda de direito pré-existente. Caso o voluntário retire o seu consentimento junto aos pesquisadores, o material biológico será inativado e descartado, para que não seja utilizado em outras pesquisas.
3. A confidencialidade, o sigilo e privacidade serão resguardados pelos pesquisadores, dessa maneira, a identidade não será divulgada em nenhuma hipótese.
4. Os voluntários que por ventura tiverem despesas de transporte ou outros para a participação na pesquisa serão ressarcidos.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Evelyn Kuroki Anzai e Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata
Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 bloco 17,
Laboratório de Biologia Molecular aplicado ao diagnóstico.
Butantã, São Paulo – SP.
Tel: 3091 3660.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

O indivíduo não poderá ter submetido a transfusão de sangue nos últimos 4 meses ou transfusão de medula.

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
Evelyn Kuroki Anzai

Anexo 3: Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos doadores de sangue

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO COLABORADOR DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. Responsável Legal:.....
Documento de Identidade Nº :.....Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....
Nº:.....Apto:.....Bairro:.....Cidade:.....
Estado:CEP:.....
Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....
Documento de Identidade Nº :.....Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....
Nº:.....Apto:.....Bairro:.....Cidade:.....
Estado:CEP:.....
Telefone:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE REFERÊNCIAS ALÉLICAS DE Loci DE STR PARA CONTROLE DE QUALIDADE EM IDENTIFICAÇÃO HUMANA PELOS ÁCIDOS NUCLÉICOS.

2. Pesquisadores: Doutoranda: Evelyn Kuroki Anzai
Orientador: Prof. Assoc. Mário Hiroyuki Hirata
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

2. Avaliação do Risco da Pesquisa

Sem Risco () Risco Mínimo (X) Risco Médio ()
Risco Baixo () Risco Maior ()

O sangue será coletado atendendo todos os procedimentos de biossegurança tais como antisepsia, tubo e agulha estéreis. O único risco que o indivíduo possa sofrer estaria relacionado ao extravasamento de sangue do vaso durante a coleta, podendo ocasionar um hematoma local, que desaparecerá em alguns dias.

4. Duração da Pesquisa: Junho/2003 a dez/2006.

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO COLABORADOR DA PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

6. Justificativa e os objetivos da pesquisa:
O objetivo da pesquisa é analisar genes que são utilizados em testes de identificação humana.
7. Procedimentos a serem seguidos:
O sangue será coletado em tubos esterilizados apropriados para a realização dos testes laboratoriais para a análise dos genes.
O estudo não envolve a administração de medicamentos.
8. Desconfortos e riscos esperados;

Esses genes não estão relacionados a algum tipo de doença presente ou que o colaborador possa ter no futuro. O gene não será comparado com outras amostras, não havendo a possibilidade de verificar identificação como paternidade e maternidade. Dessa maneira, os resultados dos testes laboratoriais e da pesquisa não causarão nenhum risco ao colaborador da pesquisa.

9. Benefícios que poderão ser obtidos;

Os benefícios da pesquisa serão para a coletividade (sociedade), auxiliando na melhoria dos testes de identificação humana.

10. Gastos adicionais

Você não pagará nada pelos testes de laboratório relacionados com a investigação.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação.

V – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO COLABORADOR DA PESQUISA

5. Os pesquisadores acima citados comprometem-se ainda, à prestação de esclarecimentos advindos de eventuais dúvidas que o colaborador da pesquisa possa ter durante o andamento do projeto.
6. O colaborador tem liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo de relacionamento profissional, pessoal ou perda de direito pré-existente. Caso o voluntário retire o seu consentimento junto aos pesquisadores, o material biológico será inativado e descartado, para que não seja utilizado em outras pesquisas.
7. A confidencialidade, o sigilo e privacidade serão resguardados pelos pesquisadores, dessa maneira, a identidade não será divulgada em nenhuma hipótese.
8. Os voluntários que por ventura tiverem despesas de transporte ou outros para a participação na pesquisa serão ressarcidos

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Evelyn Kuroki Anzai e Prof. Assoc. Márlo Hiroyuki Hirata
Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 bloco 17,
Laboratório de Biologia Molecular aplicado ao diagnóstico.
Butantã. São Paulo – SP.
Tel: 3091 3660.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

O indivíduo não poderá ter submetido a transfusão de sangue nos últimos 4 meses ou transfusão de medula.

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
Evelyn Kuroki Anzai

Anexo 4: Extração de DNA de saliva (Protocolo adaptado por Anzai et al., 2001)

A amostra de saliva coletada colocada em tubo estéril foi submetida à centrifugação para a separação das células de sua parte aquosa, removendo-a. As pontas contendo o algodão dos swabs que continham a saliva coletada sobre a pele foram colocadas em um tubo estéril sendo imediatamente iniciado o processo de extração, sem algum preparo prévio.

Em seguida, foram adicionados 700µL do tampão de lise para saliva (10mM TRIS pH 8,0; 10mM EDTA; 0,1 M NaCl; 2% SDS) e posteriormente adicionaram-se 35µL de Proteinase K 20mg/mL. Após agitação, a sua tampa do tubo foi vedada com Parafilm® e incubada por uma noite a 56°C.

A seguir, a Proteinase K foi inativada a 95°C por 10 minutos, adicionou-se 700µL de fenol tamponado, com pH 8,0 e homogeneizou-se com movimentos manuais leves por 5 minutos. Centrifugou-se e o sobrenadante foi transferido para outro tubo utilizando uma micropipeta com ponteira estéril. Acrescentou-se fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1) na mesma quantidade do sobrenadante removido, homogeneizou-se, centrifugou-se e removeu-se o sobrenadante novamente para outro tubo. Adicionou-se ao sobrenadante cerca de 2 ou 3 vezes o volume recuperado, álcool 100% e 10% do volume em acetato de sódio 5M. Incubou-se durante 30 minutos a -20°C. No terceiro dia de extração, centrifugou-se a mistura. Dispensou-se o etanol, e ao precipitado adicionou-se 1mL de etanol 70%, homogeneizando-se cuidadosamente. Centrifugou-se e novamente foi removido o álcool. Secou-se totalmente o "pellet". Ressuspendeu-se o "pellet" com 100µL de T.E. (Tris-base 100mM, pH 7,6; EDTA 10mM, pH 8,0).

Anexo 5: Extração de DNA de sangue (Salazar et al, 1998)

As amostras de sangue foram submetidas à lise celular com 1000µL do tampão Tris-1 (Tris HCl 10mM pH 8,0, KCl 10mM, MgCl₂ 10mM EDTA 2mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2.5%. Após a centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220µL do tampão Tris-2 (Tris-HCl 10mM pH8,0, KCl 10 mM, Mg Cl₂ 10mM, EDTA 2mM pH 8,0, NaCl 0,4 M) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100% seguindo de lavagem etanol 70%, por 3 vezes. Posteriormente o DNA foi ressuspendido em 100µL do tampão TE (Tris-HCl 10 mM e 1mM EDTA, pH 8,0) e mantidos a -20°C.

Anexo 6: Preparo dos reagentes utilizados para a clonagem (Sambrook e Rossel, 2001).

1. Preparo do meio Luria-Bertani (LB) líquido

Adicionou-se em água destilada 1% de bacto-triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl em um erlenmeyer e ajustou-se o pH a 7,0 com NaOH 1N. Foram distribuídos 5mL do meio em tubos de vidro limpos, sendo fechados com algodão hidrofóbico e autoclavados. No momento do uso, acrescentou-se 10µl de ampicilina 50mg/mL.

2. Preparo do meio Luria-Bertani (LB) agar

Adicionou-se em água destilada 1% de bacto-triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl e 1,5% de ágar em um erlenmeyer, dissolveu-se os componentes em microondas e ajustou-se o pH a 7,0 com NaOH 1N. O erlenmeyer foi fechado com algodão hidrofóbico e autoclavado. Após esfriar até 60°C, acrescentou-se 20µL de ampicilina 50mg/mL para cada 20mL de meio. O meio foi distribuído nas placas, sendo que após polimerização, foram vedadas com filme plástico tipo Magipack e guardadas invertidas na geladeira até o momento do uso.

3. Preparo do meio SOB e SOC

Para a formulação do meio SOB, adicionou-se 2% de bacto-triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10mM de NaCl, 250µM KCl em água deionizada estéril e em seguida foi autoclavada, e armazenada a -20°C. O meio SOC é produzido a partir do meio SOB, acrescentando-se a 970µL de meio SOB, 10µL de MgCl₂ 1 M e 20µL de glicose 1M.

4. Preparo das células competentes pelo CaCl₂

Anteriormente a realização da clonagem, preparou-se as células *Escherichia coli* DH5α para se tornarem competentes. Após crescer uma alçada de *E.coli* DH5α em meio LB Agar sem ampicilina durante uma noite a 37°C, selecionou-se uma colônia isolada da placa e promoveu seu crescimento em 2 erlenmeyers com 25 mL de LB líquido a 37°C com agitação vigorosa (maior que 250 ciclos por minuto), monitorando o crescimento a cada hora pela determinação da D.O._{600 nm} em

um espectrofotômetro. A correlação entre $D.O._{600\text{ nm}}$ é o número de células viáveis por mililitro. Para uma transformação eficiente é essencial que o número de células viáveis não exceda 10^8 células/mL. Quando a D.O. chegou a 0,5, aproximadamente após 6 horas, resfriou-se a cultura até 0°C , deixando os tubos em gelo por 10 minutos. Transferiu-se as células assepticamente e em banho de gelo para um tubo Falcon de 50 mL. Coletaram-se as células por centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos à 4°C . O sobrenadante foi descartado e o pellet foi posteriormente ressuscitado com auxílio de uma pipeta em 5 mL de solução de CaCl_2 50 mM gelada. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos, e centrifugados a 4.000 rpm por 5 minutos a 4°C . Retirou-se o sobrenadante e manteve os tubos invertidos por 1 minuto. Ressuspende-se as células em 2 mL de solução de CaCl_2 50 mM gelada. Adicionou-se 70 μL de DMSO à solução obtida, e manteve as células no gelo por 15 minutos. Adicionou-se mais 70 μL de DMSO e realizaram-se alíquotas de 200 μL da solução de células, mantendo-as a -70°C (Sambrook et al, 2001)