



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TIAGO MORETI

IDENTIFICAÇÃO HUMANA:

**Uma proposta metodológica para obtenção de DNA
de ossos e implementação de banco de dados de
frequências alélicas de STRs autossômicos na população
de Santa Catarina**

FLORIANÓPOLIS

2009

TIAGO MORETI

IDENTIFICAÇÃO HUMANA:

Uma proposta metodológica para obtenção de DNA
de ossos e implementação de banco de dados de
frequências alélicas de STRs autossômicos na população de
Santa Catarina

UFSC
2009

TIAGO MORETI

IDENTIFICAÇÃO HUMANA:

**Uma proposta metodológica para obtenção de DNA
de ossos e implementação de banco de dados de
frequências alélicas de STRs autossômicos na população
de Santa Catarina**

Dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Área de concentração em Genômica e Proteômica aplicadas à Biotecnologia

ORIENTADORA: Dra. Ilíada Rainha de Souza

FLORIANÓPOLIS

2009

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

M845 Moreti, Tiago

Identificação humana [dissertação] : uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina / Tiago Moreti ; orientadora, Iliada Rainha de Souza. - Florianópolis, SC, 2009.

142 f.: il., tabs., grafs., mapas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Inclui bibliografia

1. Biotecnologia. 2. Banco de dados - Santa Catarina. 3. Genética forense - Santa Catarina. 4. Ossos. 5. DNA datiloscopia - Santa Catarina. I. Souza, Iliada Rainha de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23

“Identificação Humana: Uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina”

por

TIAGO MORETI

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pela Orientadora e membros da Comissão Examinadora.

Orientadora:



Ilíada Rainha de Souza

(Profa. Dra. BEG/CCB/Universidade Federal de SC)

Comissão Examinadora:



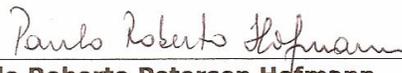
Marcelo Malaghini

(Dr. LGMF/Instituto de Criminalística do Paraná)



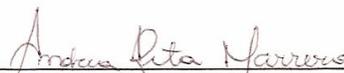
Edmundo Carlos Grisard

(Prof. Dr. MIP/CCB/ Universidade Federal de SC)



Paulo Roberto Petersen Hofmann

(Prof. Dr. BEG/CCB/ Universidade Federal de SC)



Andréa Rita Marrero

(Profa. Dra. BEG/CCB/ Universidade Federal de SC)



Andréa Carla de Souza Góes

(Profª. Dra. Universidade do Estado do Rio de Janeiro)



Prof. Dr. Edmundo C. Grisard
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia - UFSC

Florianópolis, Abril de 2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu apoio, maior e melhor companheiro, muito obrigado por estar presente em todos os dias da minha vida, nas pequenas e grandes coisas, nunca se afastando de mim, mesmo quando eu me afastava dele;

Ao meu amor, minha esposa Gimena, pelo carinho, compreensão, incentivo, paciência e pelo amor que nunca deixou faltar em qualquer momento; pela ajuda singular de ditar frequências de STR do Brasil todo, corrigindo a dissertação e acompanhado sua produção, e por tantas vezes, ouvindo sem reclamar, a frase “tenho que trabalhar na dissertação”;

Aos meus pais, pelo amor da vida inteira;

Aos meus irmãos, meus melhores amigos;

Aos meus sogros, pelo apoio incondicional;

À prof^a. Dra. Ilíada Rainha de Souza, por toda orientação conferida nestes 5 anos, desde o primeiro trabalho na graduação com sistema sanguíneo ABO até o desenvolvimento desta dissertação. Obrigado por sua amizade, pelas várias horas de boa conversa, pela confiança, pelo crescimento profissional e por compartilhar inúmeros valores que vão além do conhecimento acadêmico que proporcionaram também crescimento pessoal;

À perita Química-Legista Sandra Regina Rachadel Torres, pelo acolhimento, pelo exemplo de dedicação, alto nível de exigência, por proporcionar treinamento em DNA forense no Laboratório de Genética Forense do Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina. Pela confiança, amizade e tudo que me ensinou sobre análise de DNA na Genética Forense;

À perita Química-Legista Tânia Streck Sauerbier pela amizade e pela participação efetiva no desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do LAPOGE, por enriquecerem o dia-a-dia com suas colaborações e com suas amizades;

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e todos os seus professores, por transmitirem conhecimentos imensuráveis e auxílio sobre quaisquer situações ao longo do curso, pela paciência e o bom humor sempre presentes não importando o local ou a hora em que eu viesse com uma dúvida;

À gerente do Instituto de Análises Laboratoriais (IAL/IGP) Elisabete Francelina Mafra Abreu, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho, disponibilizando conhecimento científico na área da Genética Forense e assegurando o acesso às instalações e equipamentos requeridos à realização deste trabalho nas dependências do Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina;

Aos peritos químicos-legistas Odilon de Souza e Nelson Biacchi Junior, por todo o apoio; Aos professores, Dr. Edmundo Carlos Grisard, Dr. Paulo Roberto Petersen Hofmann, Dr. Marcelo Malaghini, Dra. Andréa Carla de Souza Góes, e Dra. Andréa Rita Marrero, por aceitarem participar da banca de defesa desta Dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa;

À Joice, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, principalmente pela paciência, bom humor e exemplo de competência e pelo auxílio em todas as situações que eu trazia à sua mesa;

À CAPES pelo apoio financeiro;

A todos que de alguma forma contribuíram para que mais esta conquista fosse alcançada, MUITO OBRIGADO!

*“Os homens sempre precisam estar pesquisando,
sempre aprendendo; contudo,
há um infinito além.”*

Ellen G. White

*“O teste em DNA é para a justiça como o
telescópio é para as estrelas; não uma lição de
bioquímica, não uma exposição das maravilhas
de uma lente, mas a maneira de ver as coisas
como elas realmente são...”*

**Barry Scheck and Peter Neufeld,
Actual Innocence**

RESUMO

MORETI, T. **IDENTIFICAÇÃO HUMANA: Uma proposta metodológica para obtenção de DNA em ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina.** Florianópolis, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

Nos casos forenses, cadáveres ou suas partes são encontrados em diferentes estágios de decomposição, sendo nestes casos o tecido ósseo quase sempre o melhor material biológico disponível para a identificação pelo DNA. Devido às baixas concentrações de DNA endógeno, a recuperação deste é um grande desafio perante aos danos ambientais, bacteriano e pós-morte que a molécula sofre, assim como a presença potencial de inibidores co-extraídos. Várias metodologias têm sido empregadas para obtenção de DNA a partir dos ossos, sendo que o uso do equipamento como o Moinho Criogênico e da coluna concentradora Microcon são os procedimentos-padrão mais utilizados e difundidos, porém, demorados e de custos elevados. Devido à baixa qualidade e à exiguidade destas amostras biológicas que rotineiramente aportam em um laboratório de DNA forense, a metodologia aplicada é baseada na análise de STR. Nos casos de identificação utilizando STR, o laboratório deve possuir uma base de dados de frequências alélicas própria da população a qual presta serviços. Esta base de dados deve ter sido produzida com as mesmas técnicas usadas pelo laboratório em sua rotina e com a mesma população. O objetivo é ampliar as condições técnico-científicas no cenário estadual, pois se pretende, através de técnicas utilizadas em Biologia Molecular, testar e padronizar um novo método econômico e rápido para a obtenção de DNA de ossos e a implementação de um banco de frequências alélicas STR para maior confiabilidade dos resultados gerados. Para nosso estudo, selecionou-se 19 ossos, fornecidos pelo IGP-SC e compreendem casos recebidos durante os anos de 2005 e de 2006. Comparou-se a eficiência e os custos de nove métodos de extração de DNA, mostrando que o método “substitutivo” é o que possui maior custo-benefício entre todos eles. A extração por este método conduziu a uma quantidade aumentada de DNA amplificado (36,84%) quando comparado ao protocolo de fenol-clorofórmio-microcon (12,28%), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,0240$). Sendo assim, sugere-se que o procedimento “substitutivo” seja a escolha mais acertada quando o material biológico sejam ossos. Em relação à criação da base de dados STR, utilizou-se as frequências alélicas para os 15 marcadores STR incluídos no *kit AmpFISTR Identifiler (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51,*

D5S818, e *FGA*). A amostra constitui-se de 452 indivíduos não relacionados do estado de Santa Catarina, representando uma população tri-híbrida, composta pela mistura de indivíduos euro-descendentes, africanos-subsarianos e ameríndios. As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio Hardy-Weinberg. As frequências alélicas foram comparadas às existentes em outros estados brasileiros, sendo encontradas diferenças significativas em pelo menos um loco em relação a todos os estados analisados. O poder de exclusão combinado é estimado em 0,99999682066 e o poder da discriminação combinado é de 0,999999999999999828465. Finalmente, os parâmetros forenses calculados mostraram que o banco de dados de frequências alélicas de Santa Catarina é uma ferramenta útil para a identificação pessoal, justificando seu uso para a população de nosso estado.

Palavras-chave: Banco de dados, DNA degradado, extração de DNA, frequências alélicas, Genética Forense, ossos, *post mortem*, Santa Catarina, STR.

ABSTRACT

In the forensic cases, human remains or its parts are found on the land in different periods of training of decomposition, under the ground for determined periods of time or immersed in the water. In this cases, bone sample are often the only, and almost always the best, biological material available for DNA typing. Due to low levels of endogenous DNA, because environmental, bacterial, and postmortem DNA damage, as well as the potential presence of environment-born inhibitors that co-extract with DNA, the recovery of DNA data from degraded specimens can still pose a significant challenge. A large number of different protocols for the efficient isolation of highly purified DNA from bone cells are extant. Being that, the use of the equipment Cryogenic Mill and of the concentrator column Microcon is procedures standard more used and spread out. The joint use of these two methodologies is, however, delayed and of high cost. Due to low quality and to the puny of these biological samples that routinely arrive in a forensic laboratory of DNA, the applied methodology is based on the STR analysis. In the case of identification for STR, the laboratory must have constructed a data base of the population frequencies of the used genetic systems for it. This data base must to have been gotten with the same used techniques for the laboratory in its routine and using the same population. The general objective of this project is to extend the technician-scientific conditions in the state scene, therefore it is intended through techniques used in Molecular Biology, to test and to standardize a new economic and efficient method for the attainment of DNA of bones for forensic studies and the creation of a data base STR for better trustworthiness of the generated results. For our study, we selected 19 challenging bone samples, they had been supplied by the IGP-SC and they understand cases received during the years of 2005 and 2006. We have compared efficiency and costs of nine methods of extraction DNA, showing that the “substitute” method is the more cost-benefit of the methods. “Substitute” extraction resulted in an increased amount of amplified DNA (36.84%) when compared to phenol-chloroform-Microcon (12.28%), and that difference are statistically significant ($p=0.0240$). In our hands, the “substitute” extraction procedure is an obvious choice when the biological material available is decomposed human bone. In relation the creation of the data base STR, allele frequencies for 15 STR markers included in the *AmpFISTR Identifiler kit* (*D8S1179*, *D21S11*, *D7S820*, *CSF1PO*, *D3S1358*, *TH01*, *D13S317*, *D16S539*, *D2S1338*, *D19S433*, *vWA*, *TPOX*, *D18S51*, *D5S818*, and *FGA*) were obtained from a sample of 452 unrelated individuals from the state of Santa Catarina.

This population represents a trihybrid population composed of individuals presenting an admixture of Caucasian, African, and Native American. In the present study, the distributions of the genotypes are in Hardy–Weinberg equilibrium. The data were compared to others Brazilian states. Differences were found at 5% significance level between distributions the allele frequencies in all states analyzed. The combined power of exclusion is estimated as 0.99999682066 and the combined power of discrimination is 0.999999999999999828465. Finally, the calculated forensic parameters showed that the Santa Catarina allelic frequencies databases are useful tool for personal identification, justifying their use for the population our state.

Key words: Allele frequencies, degraded DNA, extraction of DNA, Forensic Genetics, genetic data, human remains, loci frequencies, *post mortem*, Santa Catarina, STR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Estrutura do osso.....	27
FIGURA 2A. Corte grosso de um osso seco.....	28
FIGURA 2B. Esquema ilustrativo da composição do tecido ósseo compacto e esponjoso...28	
FIGURA 2C. Característica macroscópica de osso em região posterior a mandíbula.....	28
FIGURA 2D. Corte transversal realizado em diáfise femural.....	28
FIGURA 3. Principais células encontradas nos tecidos ósseos.....	29
FIGURA 4. Esquema de ossificação intramembranosa.....	30
FIGURA 5A. Variabilidade genética do tipo microsatélite.....	36
FIGURA 5B. Variabilidade genética do tipo SNP.....	36
FIGURA 6. Sequência do loco vWA (von Willebrandt)	39
FIGURA 7. Distribuição dos 13 locos polimórficos e mais dois para determinação do sexo recomendados pelo Forensic Bureau Investigation.....	40
FIGURA 8. Dois passos cruciais na análise genética de amostras <i>post mortem</i>	41
FIGURA 9. Corte em região mandibular com o auxílio de serra manual.....	46
FIGURA 10. Fragmento de osso obtido a partir de uma ulna, processado e limpo.....	46
FIGURA 11. Desenho esquemático, mostrando todas as etapas do processo de extração de DNA.....	58
FIGURA 12. Representação esquemática dos locos STRs incluídos no conjunto comercial <i>Profiler Plus</i> TM da Applied Biosystems.....	59
FIGURA 13. Escada alélica presente no conjunto comercial <i>Profiler Plus</i> da Applied Biosystems.....	61
FIGURA 14. Índices de densidade demográfica e número de indivíduos genotipados das seis mesorregiões do estado de Santa Catarina.....	62

FIGURA 15. Espectro de emissão dos 4 corantes fluorescentes componentes do sistema de amplificação <i>multiplex identifiler</i>	66
FIGURA 16. Separação dos sinais fluorescentes por gradiente de difração e seus respectivos STRs do sistema Identifiler.....	66
FIGURA 17. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração Sílica-DNAzol.....	68
FIGURA 18. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração Sílica-NaI.....	69
FIGURA 19. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração Sílica-NaCl.....	69
FIGURA 20. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração Acetato de Sódio.....	69
FIGURA 21. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração fenol-clorofórmio-microcon.....	70
FIGURA 22. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração pelo Dextran Blue.....	70
FIGURA 23. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração com fenol-clorofórmio e precipitação alcoólica.....	71
FIGURA 24. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração Dextran Blue-orgânica.....	71
FIGURA 25. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração sem pulverização (substitutivo).....	72
FIGURA 26. Quantidade e porcentagem de DNA abundante encontrado nas amostras que foram extraídas com sucesso.....	74
FIGURA 27. Amplificação total para os 9 locos STRs e o loco amel do sistema <i>Profiler Plus</i> para o osso do tipo metatarso (amostra “6”) extraído pelo método substitutivo...	81
FIGURA 28. Amplificação parcial para o osso do tipo metatarso (amostra “6”) extraído pelo método fenol-clorofórmio-microcon.....	81
FIGURA 29. Diferentes concentrações de ácidos húmicos nas amostras de ossos.....	83

FIGURA 30. Método de extração Fenol-Clorofórmio com a concentração do DNA sendo realizada por tubo microcon.....	87
FIGURA 31. Método Fenol-Clorofórmio com precipitação alcoólica segundo SAMBROOK; RUSSEL, (2001).....	87
FIGURA 32. Eletroferograma da amostra ulna 1, extraída pelo método sílica-NaCl.....	89
FIGURA 33. Eletroferograma da amostra ulna 1, extraída pelo método sílica- DNazol.....	89
FIGURA 34. Eletroferograma da amostra ulna 1 extraída pelo método sílica-NaI.....	90
FIGURA 35. Amplificação total da amostra ulna 1 extraída pelo método acetato de sódio...	91
FIGURA 36. Amplificação parcial da amostra fêmur 4 extraída pelo método acetato de sódio.....	91
FIGURA 37. Eletroferograma da amostra ulna 1 extraída pelo método Dextran Blue, exibindo ausência de amplificação para todos os locos do sistema <i>Profiler Plus</i>	93
FIGURA 38. Eletroferograma da amostra ulna 1 extraída pelo método Dextran Blue-orgânica, exibindo amplificação total dos locos	93
FIGURA 39. Amplificação total dos 9 locos STRs e o loco amelogenina para a amostra ulna 1 submetida a extração de DNA pelo método Substitutivo.....	94
FIGURA 40 A. Resultados obtidos empregando a metodologia fenol-clorofórmio-microcon para a obtenção de DNA dos 19 ossos obtidos neste trabalho.....	100
FIGURA 40 B. Resultados obtidos empregando um novo método de extração de DNA em ossos, o qual utiliza a pulverização do mesmo.....	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Características e funções de alguns reagentes utilizados na técnica de extração de DNA em diferentes tipos de amostras.....	32
TABELA 2.	Os 13 STRs autossômicos integrados ao sistema CODIS, com suas respectivas sequências repetitivas e variações alélicas.....	40
TABELA 3.	Classificação das amostras disponibilizadas pelo IGP-SC para o presente estudo.	44
TABELA 4.	Programa do termociclador para o ciclo de amplificação com o <i>kit AmpFlSTR® Profiler Plus™</i>	60
TABELA 5.	Programa do termociclador para o ciclo de amplificação com o <i>kit AmpFlSTR® Identifier™</i>	65
TABELA 6.	Quantidade de DNA em nove diferentes métodos de extração.....	73
TABELA 7.	Comparação dos valores encontrados para a quantificação do DNA através da eletroforese em gel de agarose e espectrofotômetro UV	76
TABELA 8.	Valores encontrados na quantificação por espectrofotometria de luz UV em relação à leitura 260/230nm.....	77
TABELA 9.	Valores encontrados na quantificação por espectrofotometria de luz UV em relação à leitura 260/280nm.....	78
TABELA 10.	Sucesso e insucesso para a amplificação das amostras para cada método de extração e procedimento de descalcificação.....	80
TABELA 11.	Resultados estatísticos demonstrando a diferença significativa entre o método fenol-clorofórmio-microcon e todos os outros métodos de extração de DNA utilizados neste trabalho, em relação à leitura das razões entre as densidades ópticas de 260/230nm.....	95
TABELA 12.	Resultados estatísticos demonstrando a diferença significativa entre o método fenol-clorofórmio-microcon e os outros métodos de extração de DNA utilizados neste trabalho, em relação à leitura das razões entre as densidades ópticas de 260/280nm	95
TABELA 13.	Resultados estatísticos demonstrando a diferença significativa entre o método substitutivo e o método fenol-clorofórmio-microcon em relação ao número de sucessos de amplificações em cada método.....	96
TABELA 14.	Comparação entre os métodos fenol-clorofórmio-microcon e a metodologia sem pulverização apresentados neste trabalho.....	100

TABELA 15. Frequências alélicas da população de Santa Catarina para os 15 locos STRs do conjunto comercial <i>Identifiler</i>	101
TABELA 16. Parâmetros forenses investigados na população de Santa Catarina.....	102
TABELA 17. Resultados obtidos para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg, na população de Santa Catarina.....	104
TABELA 18. Diferenças entre as frequências genotípicas dos 15 locos STRs pesquisados neste estudo e outras publicações de populações brasileiras.....	106
TABELA 19. Coeficiente de verossimilhança em uma análise teórica levando-se em conta um indivíduo modelo, cujo genótipo para os 15 STRs autossômicos estudados neste trabalho, sejam todos heterozigotos e os alelos existentes sejam os mais frequentes da população.....	109
TABELA 20. Comparação entre os valores de verossimilhança para o mesmo caso utilizando-se dois bancos de dados diferentes.....	110
TABELA 21. Cálculos estatísticos para testes de vinculação de paternidade, utilizando-se dois bancos de dados diferentes.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
Amel	Amelogenina
BA	Bahia
BRA	População brasileira
BSA	Albumina sérica bovina
C	Citosina
CL	Tratamento com clarificação
CODIS	<i>Combined DNA Index System</i>
Cols.	Colaboradores
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Tetracético Etilenodiamino
EGTA	Ácido Tetracético Etilenoglicol
FBI	<i>Federal Bureau of Investigation</i>
G	Guanina
g	Grama
GO	Goiás
GuHCl	Hidrocloreto de guanidina
GuSCN	isotiocianato de guanidina
h	Hora
hab	habitantes
HCl	Ácido clorídrico
Hz	Frequência medida em Hertz
HW	Hardy-Weinberg
IAA	Álcool isoamílico
IGP-SC	Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina
IPT	Índice de Paternidade Típico
KCl	Cloreto de potássio
km ²	Quilômetro quadrado

kV	Tensão elétrica medida em Kilovolts
l	Litro
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
m	Metro
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligramas
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MS	Mato Grosso do Sul
n	Número de repetições
NaCl	Cloreto de sódio
NaI	Iodeto de sódio
ng	Nanogramas
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
nm	nanômetros
nM	Nanomolar
PA	Pará
PB	Paraíba
pb	Pares de base
PC	Probabilidade de Coincidência
PC''1''	Probabilidade de Coincidência expressa em 1 em...
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Poder de Discriminação
PE	Pernambuco
PEX	Poder de Exclusão
PF	Parâmetros Forenses
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIC	Conteúdo de Informação do Polimorfismo
PVP	Polivinil pirrolidona
RFLP	Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição

RFU	Unidade de Fluorescência Relativa
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucléico
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
seg	Segundo
SENASP	Secretaria Nacional de Segurança Pública
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SP	São Paulo
SSP	Secretaria de Segurança Pública
STR	Repetição Curta em <i>Tandem</i> ou Microsatélite
T	Timina
TBE	Solução tampão de Tris/Ácido Bórico/EDTA
T.E	Solução tampão de Tris/EDTA
TM	Marca registrada
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TT	Total
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta
VNTR	Repetição em Tandem de Número Variável ou Minissatélite
χ^2	Qui-quadrado
xg	Força centrífuga medida em unidades de gravidade

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
α	Alfa
β	Beta
\pm	Mais ou menos
μ	Micro
®	Produto registrado
=	Igual
<	Menor que

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	23
I.1 IDENTIFICAÇÃO DE RESTOS CADAVÉRICOS.....	24
I.2 ESTRUTURA E FORMAÇÃO DO OSSO.....	27
I.3 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE OSSOS.....	31
I.4 MARCADORES GENÉTICOS DE INTERESSE FORENSE	35
I.5 VANTAGENS DOS LOCOS STRs SOBRE OUTROS MARCADORES GENÉTICOS.....	37
I.6 ANÁLISE GENÉTICA ATRAVÉS DOS MARCADORES STRs.....	38
II – JUSTIFICATIVA	42
III – OBJETIVOS	43
III.1 OBJETIVO GERAL	43
III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
IV - MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
IV.1 ANÁLISE LABORATORIAL <i>POST MORTEM</i> ATRAVÉS DE OSSOS.....	44
IV.1.1 Recuperação e limpeza do material biológico.....	45
IV.1.2 Pulverização do material biológico.....	47
IV.1.3 Descalcificação vs. não descalcificação do material biológico pulverizado.....	47
IV.1.4 Procedimento de descalcificação do material biológico pulverizado.....	48
IV.1.5 Extração e purificação do material genômico em ossos pulverizados.....	48
IV.1.6 Extração e purificação do material genômico em fragmentos de ossos não pulverizados	55
IV.1.7 Controles utilizados para a extração de DNA.....	57
IV.1.8 Quantificação do DNA genômico obtido dos ossos.....	58

IV.1.9	Reação em cadeia da polimerase (PCR) para os locos <i>STR</i> nas amostras <i>post mortem</i> ..	59
IV.1.10	Análise e tratamento dos dados obtidos na etapa de análise laboratorial.....	61
IV.2	VALORIZAÇÃO BIOESTATÍSTICA DOS RESULTADOS – BANCO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA.....	62
IV.2.1	Amostra estudada.....	62
IV.2.2	Conservação do material biológico	63
IV.2.3	Extração e purificação do material genômico.....	63
IV.2.4	Locos analisados.....	64
IV.2.5	Reação em cadeia da polimerase (pcr) para os 15 marcadores STRs	65
IV.2.6	Análise estatística do banco de frequências alélicas.....	66
V	– RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
V.1	ANÁLISES DAS EXTRAÇÕES EM OSSOS POR QUANTIFICAÇÃO EM GEL DE AGAROSE.....	68
V.2	ANÁLISES DAS EXTRAÇÕES EM OSSOS POR QUANTIFICAÇÃO EM ESPECTROFOTOMETRIA DE LUZ UV.....	75
V.3	AMPLIFICAÇÃO DO DNA <i>POST MORTEM</i>	79
V.4	VARIAÇÕES NAS TAXAS DE SUCESSO DOS STRs NOS DIFERENTES ELEMENTOS ÓSSEOS.....	82
V.5	DESCALCIFICAÇÃO VS. NÃO DESCALCIFICAÇÃO.....	85
V.6	COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO UTILIZADOS.....	86
V.7	RELAÇÃO CUSTO BENEFÍCIO DOS MÉTODOS EMPREGADOS	97
V.8	ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA E PARÂMETROS FORENSES NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	101
V.9	ANÁLISE DO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	103
V.10	COMPARAÇÃO COM OUTROS DADOS DA LITERATURA.....	106
V.11	APLICABILIDADE DO BANCO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE SANTA CATARINA.....	108

VI. CONCLUSÕES	112
VII. REFERÊNCIAS	114
VIII. ANEXOS	123
ANEXO A – INFORMAÇÕES AO DOADOR	124
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	126
ANEXO C – QUESTIONÁRIO PESSOAL.....	127
ANEXO D – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>D8S1179</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS...	128
ANEXO E – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>D21S11</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS...	129
ANEXO F – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>D7S820</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS...	130
ANEXO G – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>CSF1PO</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS...	131
ANEXO H – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>D3S1358</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS...	132
ANEXO I – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>TH01</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS.....	133
ANEXO J – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>D13S317</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS...	134
ANEXO L – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>D16S539</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS...	135
ANEXO M – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>D2S1338</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS...	136
ANEXO N – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>D19S433</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS..	137
ANEXO O – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>vWA</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS.....	138

ANEXO P – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>TPOX</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS.....	139
ANEXO Q – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>D18S51</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS...	140
ANEXO R – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>D5S818</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS...	141
ANEXO S – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO STR <i>FGA</i> NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA E EM OUTRAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS.....	142

I. INTRODUÇÃO

A introdução das técnicas de Biologia Molecular na análise para identificação humana é um avanço recente na área de identificação dos indivíduos. A técnica de identificação pelo ácido desoxirribonucléico (DNA) foi desenvolvida na segunda metade da década de 80, pelo Prof. Alec Jeffreys que utilizou essa descoberta na resolução de um problema de imigração na Inglaterra e descreveu certas regiões do genoma humano que apresentavam um padrão único para cada indivíduo, podendo ser utilizadas como “impressões digitais” do DNA desse indivíduo (JEFFREYS, 1985). Um ano após, esta mesma técnica se aplicou pela primeira vez em um caso criminal, para identificar o verdadeiro estuprador e assassino de duas jovens, mortas em 1983 e 1986, no condado de Leicester no Reino Unido. Neste caso, a prova de DNA não apenas contribuiu para a identificação do criminoso, mas também, para demonstrar que a confissão do indivíduo inicialmente detido e acusado dos crimes, era falsa (GILL; WERRETT, 1987).

A partir deste caso, a análise genética do DNA substituiu, em curto espaço de tempo as análises sorológicas do polimorfismo de proteínas e grupos sanguíneos, tornando-se uma ferramenta fundamental ao sistema judiciário, sendo atualmente um dos principais pilares das ciências forenses no que diz respeito ao apoio à investigação criminal, ao estabelecimento de laços de parentesco e à identificação individual de pessoas.

A identificação humana por DNA fundamenta-se na individualização biológica que cada ser humano representa e fundamenta-se na exclusividade do seu perfil genético e na igualdade e invariabilidade deste em todas as células do organismo ao longo da vida, exceto nos casos envolvendo gêmeos monozigóticos. O perfil genético, do ponto de vista médico-legal, pode ser definido como sendo o conjunto de características hereditárias ou padrões fenotípicos que um indivíduo possui, para um determinado número de marcadores genéticos, detectável em qualquer amostra biológica que lhe pertença (PINHEIRO, 2004).

As metodologias referentes à tipagem de regiões polimórficas do DNA em amostras biológicas coletadas *in vivo* estão bem estabelecidas. Por outro lado, amostras biológicas coletadas *post mortem* podem apresentar limitações à análise do DNA, tendo em vista os diferentes graus de degradação da macromolécula, relacionados com o tempo decorrido após a morte do indivíduo e às condições ambientais e climáticas em que o cadáver estiver exposto.

I.1 IDENTIFICAÇÃO DE RESTOS CADAVÉRICOS

Desastres em massa, como os ocorridos nas Torres Gêmeas nos Estados Unidos (2001), a Tsunami do Oceano Índico (2004), ou ainda a enchente no Vale do Itajaí no estado de Santa Catarina, ocorrida no final do ano de 2008, são um desafio para os setores de Biologia Molecular encarregados da identificação das vítimas e dos restos mortais. Entretanto, todo esse aparato molecular não está restrito aos casos envolvendo catástrofes. Devido à dinâmica social das grandes metrópoles, existe sempre uma família procurando uma pessoa desaparecida. Em adição a estes casos, nos últimos anos, também tem ocorrido o aumento nas solicitações para a coleta de material biológico em casos de exumação destinados a investigações de paternidade em processos civis (IWAMURA; SOARES-VIEIRA; MUÑOZ, 2004).

Usualmente, não existem dificuldades em se identificar um cadáver recente. Feições do rosto, cor dos cabelos, impressões digitais promovem provas. No entanto, a identificação de cadáveres humanos em avançado estado de decomposição, restando apenas o esqueleto ou alguns fragmentos deste, em casos como, por exemplo, afogado, esquartejado, ocultado sob condições diversas, expostos ao tempo e a ação de animais, ou carbonizados, fica extremamente prejudicada uma vez que os elementos utilizados pelos médicos legistas, odontos legistas e/ou papiloscopistas para tal identificação, podem estar alterados a ponto de impossibilitar qualquer conclusão (PINHEIRO, 2004). Desta forma, sem as impressões digitais; identificação do sexo; compleição física; grupo étnico; estatura e arcada dentária, a única possibilidade de identificação é através da análise genética por DNA (GRAW; WEISSER; LUTZ, 2000).

Nos casos forenses, geralmente, cadáveres ou suas partes são encontrados sobre a terra em diferentes estágios de decomposição, sob o solo por determinados períodos de tempo ou imersos na água. Como na maioria dos casos a coleta de sangue encontra-se prejudicada, o material biológico viável são os músculos ou ossos. Nos casos *post mortem*, onde o tempo decorrido é maior que dois anos, o material biológico de escolha são os ossos, uma vez que os tecidos moles já desapareceram, os dentes se perdem facilmente e, os cabelos, se ainda existirem, possuem quantidades exíguas e degradadas de DNA (PINHEIRO, 2004).

A extração de DNA a partir de tecidos duros oferece resultados mais satisfatórios, pois se constitui de um depósito natural de ácidos nucléicos protegido do meio ambiente

(COOPER, 1997). O DNA torna-se estável após a esqueletização, já que este processo torna o tecido ósseo desidratado, deixando-o protegido de danos hidrolíticos. Por outro lado, o DNA de tecidos moles desidratados continua a ser severamente danificado por oxidações (TUROSS, 1994). A degradação de tecidos moles é particularmente evidente após curtos intervalos de tempo, consequência do rápido aumento bacteriano natural de corpos em decomposição, especialmente daqueles que estão expostos a temperaturas elevadas em países tropicais como o Brasil (IWAMURA; SOARES-VIEIRA; MUÑOZ, 2004). Além disso, o osso é o material biológico que tem a maior falta de líquidos e enzimas, consequentemente, as células existentes no osso teoricamente sofrem menos com processos de autólise e provavelmente, ficam mais bem protegidas contra influências de diagênese que outros tecidos (BAUBLIENÉ; DAUGNORA; MICEKIENÉ, 2003). Apesar de ser o melhor tecido para extração de DNA *post mortem*, existem dois obstáculos principais para a recuperação do DNA a partir dos ossos: A degradação do material molecular, que diminui a quantidade de material possível de amplificação, e materiais orgânicos co-extraídos com o DNA, que inibem a reação em cadeia da polimerase (PCR) (O'ROURKE; HAYES; CARLYLE, 2000).

Dentro das células vivas, a integridade da molécula de DNA é continuamente mantida através dos processos com enzimas de reparo. Após a morte do organismo, não existe mais o balanceamento do processo de reparo e danos progressivamente vão se acumulando, até que o DNA perde a sua integridade (PÄÄBO et al., 2004). Os compartimentos celulares normalmente se degradam pela invasão de enzimas catabólicas e, como consequência o DNA é rapidamente degradado por enzimas como as nucleases lisossomais. Adicionalmente, o DNA sofre uma degeneração por microorganismos (bactérias, fungos, protozoários) que conseguem desmineralizar os ossos, produzindo vários tipos de destruição histológica, como túneis e perfurações, e degradando as macromoléculas existentes (GOODWIN; LINACRE; HADI, 2007).

Ácidos nucléicos gradualmente são degradados durante o período de morte através de processos de hidrólise e oxidação. A hidrólise acarreta a quebra das pontes N-glicosil entre o açúcar e as bases na presença de água. As bases púricas, guanina e adenina, são 20 vezes mais suscetíveis à remoção (depuração) do que as pirimídicas, citosina e timina (depirimidinação). Já a oxidação é um processo no qual a água, derivada de hidroxilas ou radicais superóxidos, modifica as bases ou distorce a hélice do DNA. Este e outros eventos degenerativos se acumulam continuamente no período *post mortem*, resultando em sítios abásicos, modificações de base ou açúcar que rapidamente desestabilizam a molécula,

produzindo quebras na fita e outros tipos de danos degenerativos (O'ROURKE; HAYES; CARLYLE, 2000).

A degradação do DNA pode parti-lo em fragmentos menores, geralmente entre 100 e 500 pb. Quando genotipada, essa amostra apresentará um eletroferograma característico, representado pela visualização de locos de menor tamanho e uma perda de amplificação dos marcadores de maiores dimensões (BUTLER, 2005). A degradação pressupõe a não obtenção de resultados e nunca o aparecimento de um genótipo distinto daquele que corresponderia à amostra (processo de contaminação) (PINHEIRO 2004). O DNA é mais estável do que outros marcadores convencionais, como as proteínas, e, por isso, vem sendo utilizado, especialmente pela técnica da PCR, proporcionando a obtenção de bons resultados (PÄÄBO et al., 2004).

O DNA geralmente é degradado por nucleases endógenas após a morte do organismo. Sob condições ótimas, como rápida dessecação, baixas temperaturas ou altas concentrações de sais, as nucleases podem ser destruídas ou inativadas antes dos ácidos nucleicos se reduzirem a mononucleotídeos. Estima-se que a molécula teria uma vida longa, se fosse mantida em um ambiente frio, seco, anóxico e longe de microrganismos (MAROTA; ROLLO, 2002). Assumindo-se um ambiente hipotético, com concentrações de sais fisiológicos, pH neutro e temperatura em torno de 15°C, levaria aproximadamente cerca de 100.000 anos para que danos hidrolíticos destruíssem todo DNA, sendo que dentro deste período ele ainda poderia ser razoavelmente recuperado (BAUBLIENÉ; DAUGNORA; MICEKIENÉ, 2003). A obtenção e qualidade do material genético parecem estar relacionados com a preservação e o estado do osso, e não diretamente correlacionado com a idade deste, e sim ao ambiente onde esse está localizado (HOLLAND et al., 2003).

BUCKLETON; TRIGGS; CLAYTON (2005) classificam em quatro as categorias de decomposição cadavérica, segundo o grau de decomposição do material biológico.

Categoria 1: partes que apresentam relativamente poucos sinais de decomposição, onde tecidos moles não foram afetados.

Categoria 2: partes que apresentam decomposição parcial, onde os tecidos moles exibem sinais de putrefação em sua superfície.

Categoria 3: partes que apresentam avançado estado de decomposição, onde os tecidos moles perdem a maioria da sua integridade e vestígios de medula.

Categoria 4: partes que apresentam esqueletização total, pela ação da microbiota com destruição dos tecidos, restando apenas o esqueleto, cabelos e dentes (3 anos).

I.2 ESTRUTURA E FORMAÇÃO DO OSSO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado pela íntima associação de fibras protéicas e cristais minerais (TRUEMAN; MARTILL, 2002) (Figura 1). A fase protéica, formada principalmente de colágeno, provê flexibilidade e forma a matriz, aonde, dentro, os cristais minerais vão se desenvolvendo. A matriz óssea é composta por uma parte orgânica, principalmente fibras colágenas (35%, representa a flexibilidade do osso), e uma parte inorgânica (65%, representa a rigidez e resistência do osso), aonde os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio que formam cristais de hidroxiapatita. Os cristais de hidroxiapatita são formados por fosfato de cálcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e representam um depósito de 99% do cálcio corporal (TRUEMAN; MARTILL, 2002). O cálcio e o colágeno são os mais importantes inibidores de PCR presentes neste tipo de amostra (BESSETTI, 2007). A extrema rigidez do tecido ósseo é resultado da interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz (TRUEMAN; MARTILL, 2002).

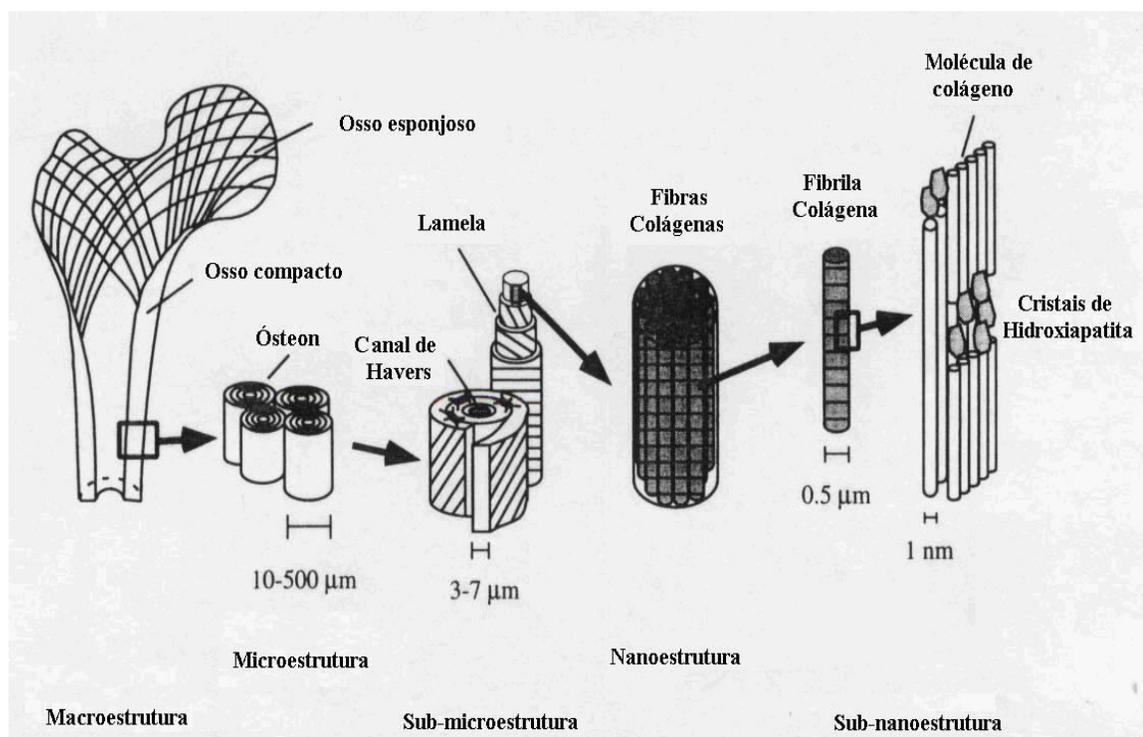


Figura 1. Estrutura do osso, demonstrando que o componente principal da matriz é composto por fibras colágenas com cristais de hidroxiapatita, que se formam nos espaços entre as fibras. Fonte: AFARENSIS (2008).

Observando-se superficialmente um osso serrado, verifica-se que ele é formado por tecidos sem cavidades visíveis, o osso compacto, e por partes com muitas cavidades intercomunicantes, o osso esponjoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) (Figuras 2A, B, C, D).

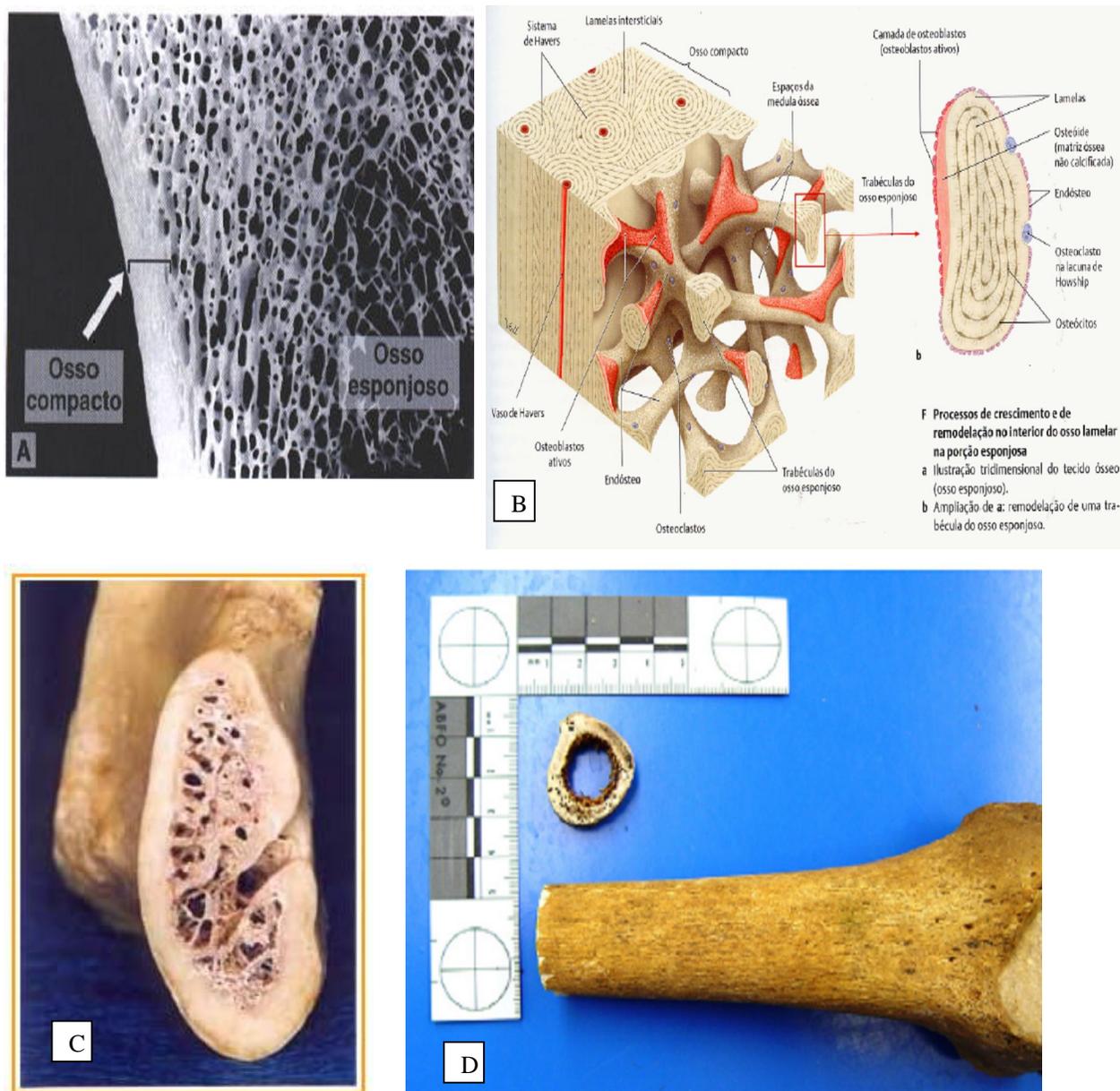


Figura 2A. Corte grosso de um osso seco ilustrando o osso cortical compacto e o osso esponjoso. B. Esquema ilustrativo da composição do tecido ósseo compacto e esponjoso. C. Característica macroscópica de osso em região posterior a mandíbula, mostrando na periferia o tecido compacto e ao centro o tecido esponjoso. D. Corte transversal realizado em diáfise femoral demonstrando que a

região de tecido compacto é mais resistente, sendo que o tecido esponjoso que se localiza em regiões mais centrais pode ser facilmente removido com a ajuda de um bisturi. Fontes A e B: JUNQUEIRA; CARNEIRO, (2004). C: Presente Trabalho. D: KAISER et al. (2008).

Ambos os tecidos apresentam o mesmo tipo de célula e de substância intercelular, diferindo entre si apenas na disposição de seus elementos e na quantidade de espaços medulares. As células ósseas podem ser de três tipos: **osteoblastos**, **osteócitos** e **osteoclastos**. Não há grandes diferenças entre esses tipos, que são, na realidade, mudanças da forma de uma mesma célula, em diferentes estágios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) (Figura 3).

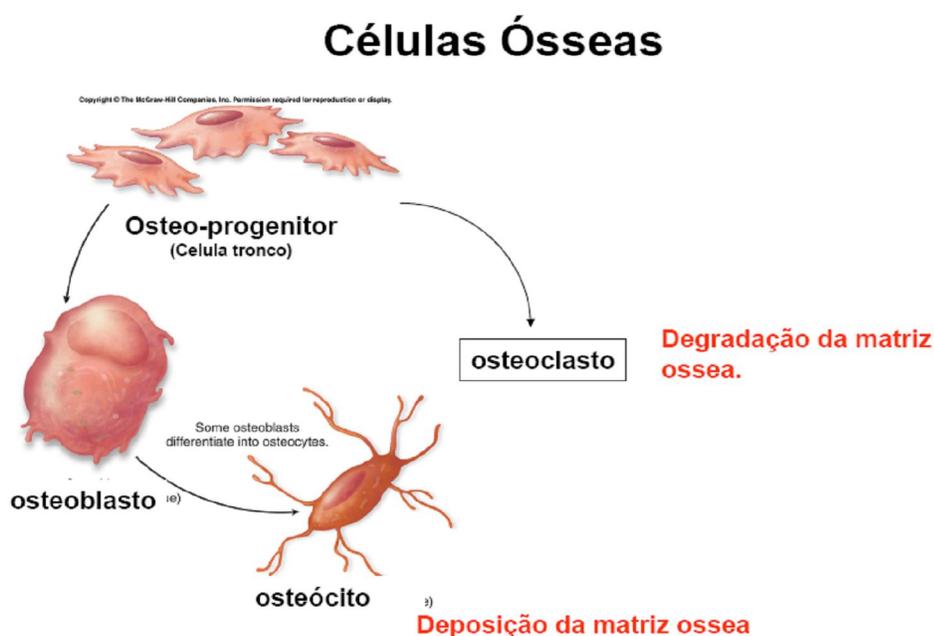


Figura 3. Principais células encontradas nos tecidos ósseos. Fonte: GARCIA (2008).

Os osteoclastos originam-se pela fusão de células mononucleares da medula óssea, que em contato com o tecido ósseo, unem-se para formar os osteoclastos multinucleados com a função de fazer a reabsorção da matriz e a regeneração do tecido ósseo após fraturas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoblastos são células jovens com intensa atividade metabólica e responsáveis pela produção da parte orgânica da matriz. São encontradas na superfície do osso, perioste (membrana fina que reveste o osso). Durante a formação óssea, à medida que se dá a calcificação da matriz óssea, esta se deposita ao redor do corpo da célula e de seus

prolongamentos e os osteoblastos acabam ficando em lacunas, aprisionados pela matriz recém sintetizada (Figura 4) , diminuem sua atividade metabólica e passam a ser **osteócitos**, células adultas que atuam na manutenção dos componentes químicos da matriz .

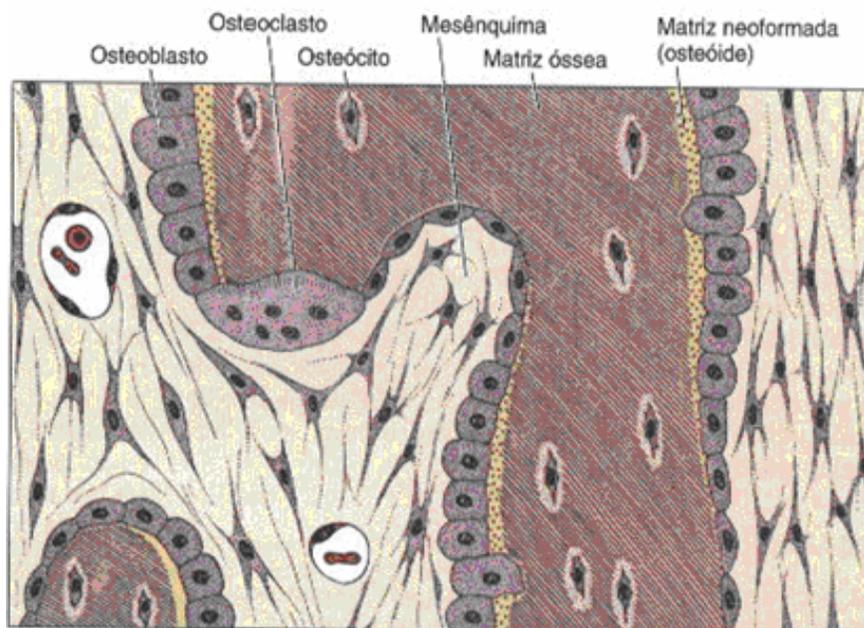


Figura 4. Esquema de ossificação intramembranosa: a matriz do osso é secretada pelos osteoblastos, que se localizam na superfície da matriz existente e depositam camadas de osso sobre ela. Alguns dos osteoblastos permanecem livres na superfície, enquanto outros se tornam gradualmente embutidos na sua própria secreção. Uma vez aprisionado na matriz dura, a célula original formadora de osso, agora chamada de osteócito, não tem oportunidade de se dividir embora continue a secretar mais matriz em pequenas quantidades em torno de si mesma. Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO (2004).

Após a morte do indivíduo, o DNA está melhor preservado dentro dos grãos de cristais agregados que não se desagregam nem quando a matriz de colágeno se degrada (SALAMON et al., 2005). Dessa forma, as células mais bem protegidas são os osteócitos, já que estes estão depositados sob fosfato de cálcio, aprisionados em cristais de hidroxiapatita, e ainda resguardados pela cobertura de colágeno produzida por eles mesmos, que foi solidificada com fosfato de cálcio, ficando muito mais protegidos, sendo uma fonte com DNA melhor conservado que os osteoblastos e osteoclastos que se localizam em uma camada na superfície do osso. O DNA se encontra escasso, na matriz dura e calcificada, requerendo procedimentos especiais para sua obtenção e purificação.

I.3 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE OSSOS

É a etapa mais dificultosa, devido à escassez e degradação do material biológico através de contaminações por fungos, bactérias, ácidos húmicos e fúlvicos e sujeito à exposição da luz solar e intempéries. Os ácidos húmicos e fúlvicos são componentes de uma família de moléculas abundantes no solo que podem ser co-extraídas com o DNA causando a inibição da reação de PCR (BESSETTI, 2007; SUTIOVIC; GOJANOVIC; ANDELINOVIC, 2007). Nesta etapa, são gastos dias ou às vezes, semanas. É esta dificuldade que vai diferenciar a análise de DNA, realizada em um laboratório de DNA forense, daquelas desenvolvidas em laboratórios privados, voltadas à investigação de paternidade, onde o material biológico utilizado é o sangue em grande quantidade e em ótimo estado de conservação.

Em linhas gerais, o objetivo de qualquer protocolo de extração consiste em obter DNA de alta qualidade, em quantidade suficiente, de forma rápida e eficiente. Geralmente, os protocolos de extração de DNA a partir de ossos apresentam duas fases: na primeira, pretende-se quebrar as células e solubilizar o DNA, e na segunda, eliminar, por métodos enzimáticos e/ou químicos, as proteínas, o RNA e outras macromoléculas.

Antes da etapa de extração de DNA, deve-se realizar a limpeza dos ossos para remover da superfície das amostras possíveis contaminantes e o excesso de solo. Nesta etapa podem ser utilizados materiais como amoladores (ANDELINOVIC et al., 2005), bisturi (BUDIMLIJA et al., 2003), lixa (HOLLAND et al., 2003; IWAMURA et al., 2005), rápida irradiação por luz ultravioleta (KALMAR et al., 2000; O'ROURKE; HAYES; CARLYLE, 2000), jateamento de óxido de alumínio (HAGELBERG; CLEGG, 1991), imersão em hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (BUDIMLIJA et al., 2003; KEMP, SMITH, 2005) ou etanol 70% (O'ROURKE; HAYES; CARLYLE, 2000) e 100% (IWAMURA et al., 2005). Consecutivamente, segue-se para o processamento do osso, que em geral consiste na redução do osso em pó, através de pulverização mecânica: sonicadores (BUDIMLIJA et al., 2003), moedores de café (IMAZUMI et al., 2004), brocas (IWAMURA et al., 2005; RENNICK; FENTON; FORAN, 2005), almofariz/pistilo (SALAMON et al., 2005; EDSON et al., 2004), liquidificadores especiais (HOLLAND et al., 2003; NELSON; MELTON, 2007) e aparelhos que utilizam nitrogênio líquido como o moinho criogênico (GOTHERSTROM et al; 2002; VALLE, RODRÍGUEZ, ESPINOZA, 2004). O objetivo desta etapa é criar um aumento da superfície da área do osso para entrar em contato com os reagentes e enzimas provenientes do tampão de extração.

As amostras de ossos também podem ser reduzidas quimicamente, com o osso já pulverizado, através de um processo de descalcificação, para a retirada do cálcio da amostra. Geralmente o agente descalcificador é o ácido tetracético etilenodiamino (EDTA) 0,5M (HAGELBERG; CLEGG, 1991; IMAIZUMI et al., 2004; ANDELINOVIC, et al., 2005), no entanto descalcificações com ácido clorídrico (HCl) 0,6M (NICHOLSON, 1998; GOTHERSTROM, et al; 2002) e com ácido tetracético etilenoglicol (EGTA) 0,6M (VALENTIN, 2007) encontram-se referidas na literatura. Esse processo geralmente dura 72 horas, sendo o agente descalcificante trocado a cada 24 horas (HAGELBERG; CLEGG, 1991; IMAIZUMI et al., 2004; ANDELINOVIC et al., 2005).

Posterior à etapa de descalcificação, segue o processo de extração de DNA propriamente dito, descrito em um grande número de procedimentos utilizados pela comunidade científica para extração de DNA em ossos e uma variedade de reagentes que podem ser utilizados em cada etapa do processo (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Características e funções de alguns reagentes utilizados na técnica de extração de DNA em diferentes tipos de amostras. Fonte: SAMBROOK; RUSSEL (2001).

Reagente	Característica	Função
Tris	Tampão biológico	Estabiliza o pH da solução entre 7,0 e 8,0.
EDTA	Agente quelante	Quela os íons magnésio presentes na solução evitando a ação de enzimas que degradam o DNA.
Cloreto de Sódio	Sal	Em altas concentrações solubiliza o DNA.
Cloreto de Potássio	Sal	Equilibra as forças iônicas da solução.
Acetato de Sódio	Sal	Precipita o DNA.
Fenol	Solvente orgânico	Desnatura proteínas.
Clorofórmio	Solvente orgânico	Desnatura proteínas.
SDS	Detergente aniônico	Solubiliza proteínas e membranas.
Lauril sarcosina	Detergente aniônico	Inibe hexoquinases e solubiliza proteínas e membranas.
CTAB	Detergente catiônico	Solubiliza polissacarídeos.
Triton X – 100	Detergente	Solubiliza proteínas e membranas.
β - Mercaptoetanol	Antioxidante	Inativa proteínas por redução das pontes dissulfetos.
DTT	Antioxidante	Reduz os grupos sulfato das proteínas.
Álcool isoamílico	Álcool	Diminui a formação de espuma da solução.
Polivinil Pirrolidona	Detergente	Elimina compostos fenólicos que podem inibir a atividade de enzimas.
Etanol	Álcool	Precipita ácidos nucleicos.
Isopropanol	Álcool	Precipita ácidos nucleicos.
RNase	Enzima	Degrada RNA.

De modo geral, os métodos de extração de ossos consistem dos seguintes passos:

a) liberação de componentes celulares num tampão de lise da membrana (Tris-HCl; sais como NaCl, MgCl₂ ou KCl; e EDTA), detergentes e surfactantes (dodecil sulfato de sódio, brometo de cetiltrimetilamonio, Tween20, Triton-X, Igepal, lauril sarcosina, isotiocianato de guanidina, entre outros). As enzimas presentes no detergente desestruturam as moléculas de lipídios presentes nas membranas celulares. O tampão de extração deve possuir pH entre 8 e 9, desfavorável à ação de nucleases. Além disso, uma digestão através de uma protease (proteínase-K), durante algumas horas em temperaturas moderadas (40-60°C) para desnaturar as proteínas que protegem as moléculas de DNA ao longo do cromossomo.

b) neutralização de nucleases e oxidações por esses detergentes e agentes quelantes como o EDTA. O EDTA imobiliza cátions de Mg⁺², que são cofatores para várias endonucleases. A emulsificação da mistura de tampão e tecido com fenol ou clorofórmio leva à desnaturação das proteínas. A PVP (polivinil pirrolidona), o DTT (Ditiotreitol) e BSA (albumina sérica bovina), por possuírem efeitos antioxidantes, são adicionados para evitar a oxidação de polifenóis. O agente redutor 2-mercaptoetanol inibe a atividade de peroxidases e polifenoloxidasas.

c) remoção dos resíduos celulares e precipitação das proteínas é a principal etapa no processo de extração de DNA. Na comunidade científica, o método mais utilizado de desproteinização é realizado através de um tratamento com fenol e clorofórmio, pois esses solventes orgânicos desnaturam as proteínas e enzimas, e são separadas após centrifugação, permanecendo na interface entre a fase aquosa (superior) contendo os ácidos nucléicos e a fase orgânica (inferior). Os grupos hidrofóbicos podem romper interações intramoleculares estabilizantes da estrutura da proteína. Um volume elevado de solvente orgânico reduz a concentração efetiva da água, deixando menos moléculas de água para hidratação da proteína.

Existem várias alternativas ao método orgânico descrito na literatura forense. Alguns protocolos incorporam proteases (proteínase K) para facilitar a separação do DNA das proteínas da cromatina. Outros sugerem que, para maior rendimento nos processos de extração de DNA de ossos, recomenda-se seguir protocolos especiais, como a utilização de métodos baseados em ligação de DNA à sílica (TUROSS, 1994). Hoss e Paabo (1993) ainda demonstraram ser a sílica capaz de remover inibidores do DNA extraído de equinos de 25.000 anos de idade. De acordo com Yang et al. (1998), o método de extração com sílica

mostrou-se mais eficaz que a purificação orgânica em colunas concentradoras, propiciando a amplificação de locos minissatélites de ossos de 5.000-15.000 anos de idade.

Outro método bastante descrito na literatura envolve a resina chelex, cujo processo de extração se dá levando a amostra a 100°C, seguido do resgate do DNA do sobrenadante. A resina Chelex-100, como método de extração de DNA, é aniônica, composta de copolímeros de divinilbenzeno estireno, contendo pares de íons iminodiacetato que agem quelando grupos com íons metálicos polivalentes como o magnésio. Como o magnésio é cofator para nucleases, sua remoção inativa catalisadores na quebra do DNA (WALSH et al., 1991), por isso previne a degradação do DNA em presença de íons metálicos a altas temperaturas e em condições de baixa força iônica (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004).

Outros estudos demonstraram que a combinação de acetato de sódio e isopropanol (CATTANEO, 1997) proporciona resultados melhores na amplificação e aumenta em três vezes a quantidade de DNA obtido desses materiais em relação à técnica de fenol-clorofórmio. Além disso, existem métodos rápidos, que não envolvem solventes orgânicos ou várias enzimas digestivas, utilizando-se uma combinação de isopropanol com iodeto de sódio, testada com ótima eficiência por SASAKI et al. (1997).

Recentemente, foi proposto um método simples e efetivo de extração de DNA de amostras antigas. Esse método é baseado na precipitação alcoólica com a adição da dextrana azul (reagente comercializado com o nome de “Dextran Blue”) que, seletivamente e eficientemente, liga-se ao DNA que se encontra em baixas concentrações, e é mais eficiente que outros métodos de extração, demonstrando isso em ossos humanos de 700 a 1500 anos atrás (KALMAR, 2000).

d) Recuperação dos ácidos nucléicos totais por precipitação em álcool (etanol, isopropanol, butanol). Os álcoois desidratam a molécula de DNA que expõe as cargas negativas de seus grupos fosfatos. Assim, a precipitação alcoólica só ocorre mediante a existência de cátions suficientes para neutralizar as cargas repulsoras que foram geradas entre as cadeias polinucleotídicas. Os sais mais utilizados são o acetato de amônia, o cloreto de lítio, o cloreto de sódio e o acetato de sódio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Dessa forma, quando o sal é adicionado à solução, os íons com carga positiva do sal são atraídos pelas cargas negativas do DNA, neutralizando a carga elétrica. Isto permite que as moléculas de DNA se juntem em vez de se repelirem. A adição do álcool em baixas temperaturas precipita o DNA, uma vez que este é insolúvel em concentrações elevadas de sal e álcool. O DNA precipita-se na camada alcoólica enquanto as outras substâncias celulares permanecem dissolvidas na solução.

I.4 MARCADORES GENÉTICOS DE INTERESSE FORENSE

O genoma humano é constituído de 3 bilhões de pares de bases, sendo que apenas 2% dele é codificante. Os 98% restantes constituem DNA não codificante ao que se atribui entre outras funções desconhecidas, uma função estrutural e reguladora. E é nesta parte do DNA onde se encontra a maior parte da variabilidade genética entre os indivíduos, já que as mutações não estão submetidas a uma pressão seletiva tão forte como a que ocorre no DNA codificante (ESPUNY, 2005).

A variabilidade humana em termos de DNA é enorme. Dois genomas humanos, escolhidos ao acaso, diferem em, aproximadamente, um a cada 500 nucleotídeos, sendo assim, em virtude do amplo tamanho do genoma humano, isso implica em seis milhões de diferenças. Certamente, essa enorme variação poderia ser completamente elucidada e caracterizada se fosse realizado o sequenciamento completo dos dois genomas e estes comparados (PENA, 2005).

Entretanto, isto não é necessário porque a abundância de variação é tal que a simples amostragem de um determinado número de regiões variáveis do DNA permite caracterizar confiavelmente a individualidade humana. As regiões escolhidas para a análise do DNA são aquelas que apresentam maior variação individual e facilidade de estudo. Essas regiões são denominadas de marcadores genéticos ou moleculares. Os marcadores moleculares podem ser utilizados para caracterizar o DNA de um indivíduo em um padrão ou perfil de fragmentos que lhe é particular. Neste caso, são utilizados marcadores polimórficos, cujos alelos são definidos como variações na sequência genética que ocorrem na população com uma frequência igual ou superior a 1% (SHASTRY, 2002).

A variação existente no DNA se dá de duas formas principais. Uma variabilidade correspondente ao tamanho de fragmentos repetidos em *tandem*, que perfaz quase metade da constituição do DNA não codificante, constituída por uma determinada sequência que se repete uma ao lado da outra, variadas vezes. Dependendo do tamanho da unidade de repetição, estas sequências podem ser denominadas de DNA satélite (unidade de repetição entre 100 e 10.000 nucleotídeos), DNA minissatélite (unidade de repetição entre 10 e 100 nucleotídeos) e DNA microsatélites ou STR (cuja unidade de repetição contém de 2 a 9 nucleotídeos) (BUTLER, 2005) (Figura 5a).

Como visto, além da variabilidade de tamanho existente no DNA, há uma variabilidade de sequência, sendo esta a forma mais frequente de variação, onde ocorre à

substituição de um único nucleotídeo por outro, denominado, polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (Figura 5b). Os SNPs são mais comuns do que qualquer outro tipo de polimorfismo e ocorrem com uma frequência de aproximadamente 1 em 1000 pares de bases em todo o genoma (SHASTRY, 2002).

(a) Variabilidade de tamanho de fragmentos repetidos (microssatélite)



(b) Variabilidade de Sequência (SNP)



Figura 5. Comparação entre a variabilidade de tamanho do DNA (a. representada pelos microssatélites) e a variabilidade de sequência do DNA (b. representados pelos SNPs). Fonte: BUTLER (2005).

O primeiro polimorfismo de um único nucleotídeo foi detectado nos anos 60, através do advento de enzimas de restrição com capacidade de produzir clivagens em sequências específicas do DNA. A amplitude desta ferramenta foi sensacional, sendo possível fragmentar o DNA de forma reprodutível possibilitando inferir diferenças e trechos na sequência de DNA. Os polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), e as metodologias congêneres permitiram identificar diferenças individuais nos genomas, com diversas aplicações (THE FUTURE OF FORENSIC DNA TESTING, 2008).

Na década de 80, os primeiros dados sobre marcadores genéticos utilizados na genética forense foram publicados sobre o uso de fragmentos de DNA minissatélites, também chamados VNTRs (número variável de repetições em *tandem*) que seriam utilizados como ferramentas de identificação individual Os VNTRs são regiões do DNA altamente polimórficas que, quando estudadas em conjunto, podem formar um perfil genético único para um indivíduo (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985).

Durante a década 1985–1995, uma técnica revolucionária e inovadora começou a se tornar mais extensamente usada em Biologia Molecular, tornando-se quase universal. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. A maior aplicação desta metodologia foi a amplificação de uma determinada sequência do DNA sem a necessidade do uso das tradicionais técnicas de

clonagem molecular. Uma simples cópia de uma sequência específica dentro de um genoma pode ser amplificada para alguns microgramas, partindo-se de quantidades mínimas, como picogramas de DNA total. Isso tornou ser possível detectar e analisar pequenas quantidades de DNA deixadas em uma cena de crime ou em amostras biológicas já degradadas pelo tempo (THE FUTURE OF FORENSIC DNA TESTING, 2008). Conseqüentemente, novas sequências com características similares aos VNTRs, porém de tamanho menor e com cerne de repetição mais curto, foram descobertas. Estas sequências foram denominadas de microssatélites ou STRs (sequências curtas de repetições em *tandem*) (JOBBLING; GILL, 2004).

I.5 VANTAGENS DOS LOCOS STRs SOBRE OUTROS MARCADORES GENÉTICOS

Em relação ao uso dos microssatélites (STRs) nos estudos de vínculo genético, algumas vantagens em relação às VNTRs podem ser citadas, incluindo a rapidez e a facilidade da técnica, a pouca concentração de DNA requerida para o teste (0.1ng a 1ng), a possibilidade de estudar um maior número de locos numa única mistura de reação (PCR *multiplex*) obtendo um nível de discriminação excelente e a ótima reprodutibilidade (BUTLER, 2005).

Dada à baixa qualidade e à exiguidade das amostras biológicas que rotineiramente aportam em um laboratório de DNA forense, a metodologia preferencialmente aplicada é baseada na análise de STR. A exposição ao ambiente (umidade, tipo de solo, radiação solar, agentes químicos) degrada as moléculas de DNA, fragmentando-as em pequenos pedaços (CAPELLI; TSCHENTSCHER; PASCALI, 2003). Neste caso, a análise de regiões VNTR em DNA degradado torna-se bastante comprometida. Devido ao curto tamanho, as regiões STR podem ser analisadas com maior chance de sucesso já que as modificações sofridas pelos tecidos em degradação não afetam a estabilidade destes marcadores, sendo isso crucial para a segurança e confiabilidade destas análises (ROEPER, REICHERT, MATTERN; 2007).

Em relação aos SNPs, a principal vantagem dos marcadores microssatélites é devido à grande variabilidade que este tipo de marcador exhibe. Geralmente um loco do tipo SNP é bialélico, podendo conter três ou no máximo até quatro alelos, sendo um problema para análises de mistura em um caso forense. O pequeno número de alelos acarreta também um

pequeno poder de discriminação, sendo necessário um vasto número de locos existentes a serem analisados. Já os marcadores microssatélites variam em um loco numa quantidade de 7 a 30 alelos em função do número em que a unidade de repetição é encontrada ao longo daquela região do DNA, obtendo dessa forma um grande poder discriminatório por loco.

Os fatores responsáveis pela popularização dos STRs como sistemas de escolha em casos de paternidade ou identificação de indivíduos no contexto forense são: a sua abundância no genoma humano, o seu elevado grau de polimorfismo, a possibilidade de estudar vários microssatélites em uma única reação (*multiplex*) e o desenvolvimento de plataformas para análise automatizada. Tais aspectos proporcionam o aumento do poder de discriminação e a diminuição do tempo de análise, bem como das quantidades de DNA e de reagentes utilizados (PINHEIRO, 2004).

I.6 ANÁLISE GENÉTICA ATRAVÉS DOS MARCADORES STRs

A análise de DNA não identifica um único indivíduo, mas sim fornece a probabilidade, estatisticamente comprovada de sua inclusão. A análise estatística em casos forenses é realizada para determinar a frequência de ocorrência do perfil obtido, que representa o número de vezes que um determinado perfil ocorre na população. A frequência com que cada alelo ocorre na população é determinada previamente por uma amostragem da população de estudo e armazenada em um banco de dados (PINHEIRO, 2004).

Atualmente existem milhares de locos STRs identificados e se calcula que no genoma humano exista um STR a cada 10.000 pares de bases (ESPUNY, 2005), fornecendo uma variedade para a escolha dos locos para testes de identificação. Os primeiros relatos da utilização da PCR para estudos de microssatélites em análises forenses, foram realizadas com unidades de repetição com apenas dois nucleotídeos [(CA)*n*], por TAUTZ et al. (1989) na Alemanha e por Weber e May (1989) e Litt e Luty (1989) nos Estados Unidos. Ficou evidente que esses microssatélites escolhidos exibiam dificuldades de tipagem, pela proximidade dos diferentes alelos (apenas dois pares de base de diferença) e pelo fato que na PCR eram consistentemente geradas pequenas “bandas fantasma” por causa do deslizamento das fitas do DNA durante a síntese (PENA, 2005).

Ambos os problemas podiam ser solucionados pelo uso de microssatélites com unidades de repetições maiores, especialmente de quatro nucleotídeos. Os primeiros sucessos foram de Yandell e Dryja (1989) com um microssatélite de repetição (CTTT)*n* e, em 1990,

por Peake et al. com um microsatélite no gene do fator de von Willebrandt (Figura 6). Com o aperfeiçoamento desta técnica para um grande número de locos de tetranucleotídeos, estes passaram a ser comumente usados com finalidade forense, apresentando vantagem frente àqueles com repetições menores, já que possuem uma melhor resolução entre alelos de tamanho próximo em indivíduos heterozigotos, além de uma redução na formação de bandas do tipo “stutter” (BUTLER, 2005).

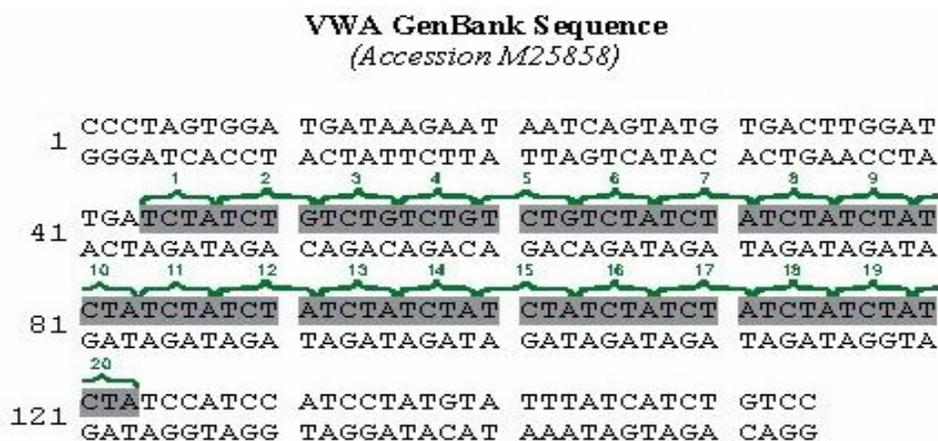


FIGURA 6. Sequência do loco vWA (von Willebrandt). As chaves indicam as repetições em *tandem* do loco. Fonte: Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) (2007).

Estes marcadores fazem parte de várias pesquisas por todo o mundo e os resultados geram um rico banco de dados sobre populações de diferentes continentes. Suas sequências são amplamente conhecidas e disponíveis em alguns bancos de dados na Internet como pode ser encontrado no Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST).

Para que haja um intercâmbio e comparação de resultados efetivos e distintos, é necessária a utilização de uma série de marcadores genéticos comuns, existindo-se critérios na seleção dos marcadores STRs a serem aplicados na identificação humana: devem possuir um alto poder de discriminação, alta frequência de heterozigosidade, localização em distintos cromossomos para evitar a ligação entre marcadores, reprodutibilidade em reações *multiplex*, baixa taxa de mutação e tamanho entre 90 e 500 pares de bases (GILL; BUCKLETON, 2005).

Atualmente os marcadores mais utilizados mundialmente são os 13 STRs autossômicos integrados ao sistema CODIS (*Combined DNA Index System*) estabelecido em

1997 pelo *Federal Bureau of Investigation* (FBI) para a criação de um banco de dados nacional (Figura 7, Tabela 2).

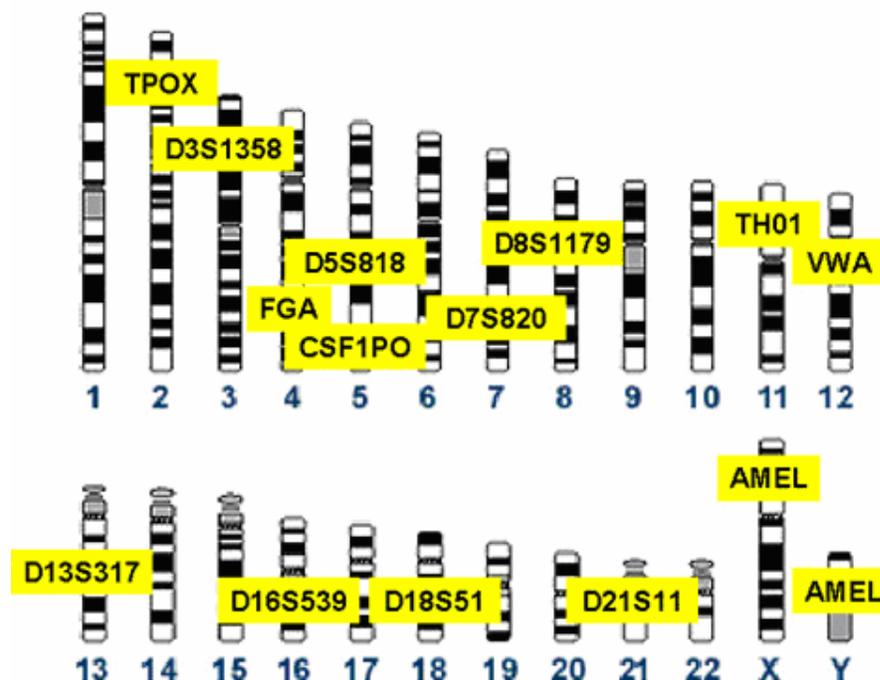


Figura 7. Distribuição dos 13 locos polimórficos e mais dois para determinação do sexo recomendados pelo Federal Bureau of Investigation e sua posição no cromossomo. Fonte: NIST (2007).

Tabela 2. Os 13 STRs autossômicos integrados ao sistema CODIS, com suas respectivas sequências repetitivas e variações alélicas. Fonte: BUTLER (2006).

Loco	Unidade de Repetição	Varição Alélica	Número de alelos existentes
<i>D8S1179</i>	[TCTA] [TCTG]	7 – 20	15
<i>D21S11</i>	[TCTA] [TCTG]	12 – 41.2	89
<i>D7S820</i>	GATA	5 - 16	30
<i>CSF1PO</i>	TAGA	5 - 16	20
<i>D3S1358</i>	[TCTG] [TCTA]	8 – 21	25
<i>TH01</i>	TCAT	3 – 14	20
<i>D13S317</i>	TATC	5 - 16	17
<i>D16S539</i>	GATA	5 - 16	19
<i>VWA</i>	[TCTG] [TCTA]	10 - 25	29
<i>TPOX</i>	GAAT	4 – 16	15
<i>D18S51</i>	AGAA	7 – 39.2	51
<i>D5S818</i>	AGAT	7 - 18	15
<i>FGA</i>	CTTT	12.2 – 51.2	80

A probabilidade de coincidência ao acaso entre indivíduos não relacionados, mediante a análise destes 13 marcadores estabelecidos no CODIS, é superior a um em um trilhão (THE FUTURE OF FORENSIC DNA TESTING, 2000). Atualmente existe uma grande quantidade de conjuntos comerciais que permitem o estudo dos STRs indicados pelo CODIS, o que favorece uma maior padronização em relação ao sistema de justiça e um maior intercâmbio entre os laboratórios de genética forense existentes nas diferentes partes do mundo.

Para se ter um uso correto e uma melhor interpretação dos resultados das análises dos marcadores STRs na Genética Forense, é necessária a existência de um banco de dados de frequências alélicas para a população onde os sistemas serão utilizados. No caso deste trabalho, informações genéticas obtidas a partir do DNA extraído de restos mortais (ossos - amostra questionada) devem ser comparadas com informações genéticas obtidas a partir do DNA doado pelos parentes da pessoa desaparecida (amostra referência) em meio a um banco de dados destes marcadores STR cujas frequências dos alelos em cada loco STR devem ser conhecidas na população para que haja a probabilidade de se calcular a combinação genotípica do perfil STR obtido na amostra questionada (Figura 8).

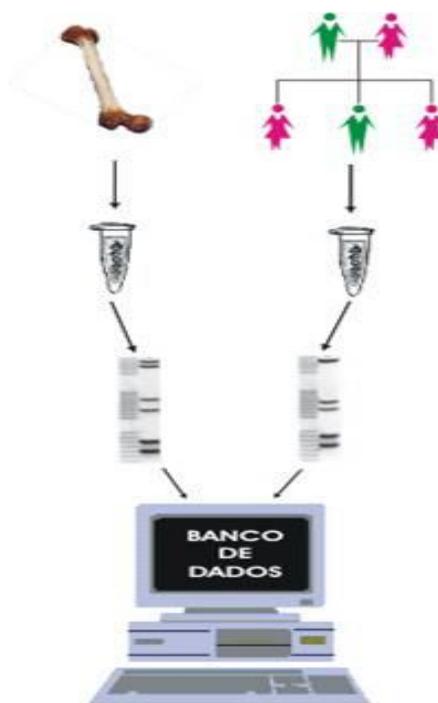


Figura 8. Dois passos cruciais na análise genética de amostras *post mortem*. Primeiro passo, sucesso na extração do DNA de osso com conseqüente amplificação dos locos marcadores. Segundo, comparação dos perfis genéticos da amostra questionada e amostra referência com um banco de dados genéticos que deve ser próprio de cada população. Fonte: UFAL (2008).

II. JUSTIFICATIVA

É indiscutível o valor da identificação humana *post mortem*. As relações sociais, exigências civis, administrativas, comerciais e penais reclamam essa forma de reconhecimento (FRANÇA, 2001). Quando impressões digitais, exames de arcos dentários e exames antropométricos já estabelecidos são inviáveis de serem realizados em uma identificação humana devido à decomposição, fragmentação, incineração ou inexistência de dados comparativos *antemortem*; a análise de DNA se faz necessária.

Aproximadamente 30 casos envolvendo ossadas de cadáveres são encaminhados ao Laboratório de Genética Forense do Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina (IGP-SC) por ano para identificação através do DNA. Esta quantidade de cadáveres necessita de análises moleculares eficazes para sua identificação tanto no âmbito legal, pois na ausência de uma identificação positiva não existe a imputação do crime quando o caso for de homicídio, como no âmbito familiar, dado que familiares das vítimas aguardam uma resolução dos casos em que seus aparentados estiveram envolvidos. Além disso, no Laboratório de Genética Forense do IGP-SC, atualmente, há a necessidade de identificar ossadas anteriormente armazenadas, devido a uma demanda reprimida de casos para análise através do DNA anteriores ao ano de sua criação. Observa-se, portanto, a necessidade de acesso a uma tecnologia de obtenção de DNA para estudos forenses, que seja além de eficaz, econômica e rápida, no intuito de auxiliar e agilizar a resolução das pendências, bem como atender a crescente demanda do laboratório.

Extrações de DNA em tecidos ósseos são de grande importância na identificação humana *post mortem*, mas são particularmente difíceis e possuem vários problemas metodológicos, sendo que os protocolos frequentemente empregados, especialmente utilizando a técnica de fenol-clorofórmio, nem sempre são satisfatórios (CATTANEO et al., 1995).

Como os marcadores moleculares STR são atualmente os mais utilizados nas análises forenses, há necessidade da implementação de um banco de dados de frequências alélicas para estes locos na população do estado de Santa Catarina. Já que a comparação dos perfis genéticos da amostra questionada e amostra referência com um banco de frequências alélicas da população em estudo permite resultados estatísticos mais confiáveis.

III. OBJETIVOS

III.1 OBJETIVO GERAL

Os resultados oriundos deste trabalho visaram atender aos interesses do Convênio de Cooperação entre o Laboratório de Polimorfismos Genéticos da Universidade Federal de Santa Catarina e o Laboratório de Genética Forense do Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina, com o objetivo de desenvolver conhecimento que atenda às necessidades de avanço na linha de investigação da Genética Forense.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver metodologias que possibilitem a tipagem fidedigna de regiões polimórficas de DNA extraídos de tecidos duros (ossos) *post mortem*, objetivando a diminuição de custos e tempo de execução, propondo uma metodologia padrão para a identificação em ossos humanos.

- Avaliar diferentes métodos de extração de DNA em fragmentos ósseos de cadáveres, bem como analisar a quantidade e a qualidade do DNA extraído, de modo a determinar os melhores procedimentos para serem utilizados na rotina do Laboratório de Genética Forense do Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina.

- Construção de um banco de dados de frequências alélicas de regiões polimórficas do tipo STR, através da tipagem de mais de 400 indivíduos não relacionados da população do estado de Santa Catarina.

- Estimar as frequências alélicas dos 13 locos STRs que integram o sistema CODIS na população de Santa Catarina, avaliando parâmetros estatísticos de interesse forense relacionados aos exames de identificação nestes marcadores.

- Avaliar o equilíbrio genotípico, postulado pela lei de Hardy-Weinberg, e comparar as frequências alélicas obtidas com dados de populações de outras regiões do Brasil, com a finalidade de verificar se há diferenças significativas entre elas.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

A perícia médico-legal no âmbito da Genética Forense, seja investigação de filiação, criminalística biológica ou identificação, desenrola-se em duas fases: análise laboratorial e análise bioestatística dos resultados.

Neste trabalho a análise laboratorial foi realizada em 19 ossos de sete indivíduos.

Para se realizar a análise bioestatística em qualquer investigação envolvendo Genética Forense, deve se estudar os marcadores genéticos a usar, na população relacionada, no nosso caso, na população catarinense.

IV.1 ANÁLISE LABORATORIAL *POST MORTEM* ATRAVÉS DE OSSOS

As amostras biológicas dos tecidos ósseos foram fornecidas pelo IGP-SC. Todo o trabalho utilizando esse material obedeceu às normativas determinadas pela PORTARIA Nº. 504/GABS/SSP de 01 de Agosto de 2006 (SANTA CATARINA, 2006) e pelo parecer consubstanciado do projeto 105/02 aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os 19 ossos analisados (Tabela 3) fazem parte da rotina do laboratório de Genética Forense do IGP-SC e compreendem casos recebidos durante os anos de 2005 e 2006.

Tabela 3. Classificação das amostras disponibilizadas pelo IGP-SC para o presente estudo. Os 19 ossos são pertencentes a sete indivíduos diferentes (amostras). De cada amostra foi coletado o mínimo de 1 osso e máximo de 10 ossos (sub-amostras). (continua)

Amostras	Sub-amostras	Estado de Degradação (BUCKLETON; TRIGGS; CLAYTON, 2005).	Local em que se encontrou a peça óssea
Amostra 1	Ulna	Categoria 3: Avançado estado de decomposição	Sobre a terra, próximo à rodovia
Amostra 2	Mandíbula Fêmur	Categoria 4: Esqueletizado	Exumação
Amostra 3	Clavícula Vértebra (áxis) Rádio	Categoria 4: Esqueletizado	Mangue
Amostra 4	Fêmur	Categoria 4: Esqueletizado	Exumação

Tabela 3. Classificação das amostras disponibilizadas pelo IGP-SC para o presente estudo. Os 19 ossos são pertencentes a sete indivíduos diferentes (amostras). De cada amostra foi coletado o mínimo de 1 osso e máximo de 10 ossos (sub-amostras). (conclusão)

Amostras	Sub-amostras	Estado de Degradação (BUCKLETON; TRIGGS; CLAYTON, 2005).	Local em que se encontrou a peça Óssea
Amostra 5	Costela Crânio (frontal) Ílio Ísquio e Púbis Úmero Rádio Tíbia Fíbula Escápula Ulna		Sobre a terra, coberto por matéria orgânica (folhas e grama), ambiente úmido (mata).
Amostra 6	Tarso e Metatarso	Categoria 2: Decomposição parcial	Ambiente marinho
Amostra 7	Sacro	Categoria 4: Esqueletizado	Sobre a terra, próximo à rodovia

IV.1.1 RECUPERAÇÃO E LIMPEZA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Estes ossos foram processados em cabina de fluxo laminar vertical, e de cada sub-amostra obteve-se dez fragmentos cortados através de uma serra manual (Figura 9). Foram processados (limpeza) e pulverizados antes da etapa de extração, exceto um pedaço de cada sub-amostra que permaneceu em fragmento para uma técnica especial de extração em osso não pulverizado.



Figura 9. Corte em região mandibular com o auxílio de serra manual, mostrando o tecido ósseo esponjoso (ao centro) e tecido ósseo compacto (nas extremidades já lixadas). Fonte: Presente trabalho.

Antes da etapa de pulverização da amostra, as superfícies externas (parte externa do osso) e internas (substância óssea esponjosa) dos ossos são retiradas através de raspagem por lixa de papel e bisturi para remover e excluir contaminações (Figura 10).



Figura 10. Fragmento de osso obtido a partir de uma ulna (amostra 1), processado e limpo. Retira-se ao máximo a quantidade de tecido ósseo esponjoso, ficando apenas o tecido ósseo compacto, onde o DNA está mais bem preservado. Fonte: Presente trabalho.

IV.1.2 PULVERIZAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os fragmentos de cada osso foram pulverizados por golpes e resfriamento com nitrogênio líquido no aparelho Moinho Criogênico, Modelo MA-775 (Marconi equipamentos para laboratórios). O equipamento realiza moagens a temperaturas criogênicas, de modo a impedir a elevação de temperatura dos materiais durante o processo, evitando desta forma, alterações nas características do material biológico.

Os cilindros de policarbonato utilizados para pulverizar as amostras (Figura 18A) foram previamente autoclavados e irradiados com luz ultravioleta, seguido pelo acréscimo de pequenos fragmentos ósseos juntamente com a barra moedora que pulveriza os ossos. Após o acondicionamento dos cilindros no moinho criogênico, foi utilizado o seguinte programa: 15min de pré-resfriamento, e quatro ciclos de pulverização a 10Hz/seg durante 3min. Cada ciclo de pulverização foi intercalado por 1min de resfriamento da amostra, sendo cada sub-amostra pulverizada separadamente. A partir da obtenção do material ósseo pulverizado, este foi fracionado em alíquotas de $360\text{mg}\pm 10\text{mg}$ em microtubos de 2ml.

IV.1.3 DESCALCIFICAÇÃO VS. NÃO DESCALCIFICAÇÃO DO MATERIAL PULVERIZADO

Para cada método de extração, foram separadas de cada sub-amostra, três alíquotas de osso pulverizado ($360\text{mg}\pm 10\text{mg}$ cada), para dois tratamentos de descalcificação antes do início da etapa de extração do DNA.

Dessa forma, uma alíquota recebeu um tratamento com adição de EDTA a 0,5M, a segunda alíquota recebeu um tratamento contendo EGTA a 0,5M como agente descalcificante. A terceira alíquota não recebeu nenhum tipo de reagente com a finalidade de descalcificação do material, ficando dessa forma conservada no freezer até a etapa de extração de DNA, servindo como tratamento testemunha (controle), para se avaliar a eficiência da descalcificação.

IV.1.4 PROCEDIMENTO DE DESCALCIFICAÇÃO DO MATERIAL PULVERIZADO

Nas alíquotas destinadas a descalcificação, foram adicionados nos respectivos tubos, EDTA a 0,5M e EGTA a 0,5M ambos em pH 8,0, até completar o volume de 2ml e a amostra ficou incubada sob agitação durante 72h. A cada 24h a solução descalcificante era trocada após precipitação do material ósseo pulverizado com centrifugação a 600xg por 5min. Após as 72h, com a última remoção do agente descalcificante, o material ósseo pulverizado foi lavado três vezes com água ultra pura-estéril nas mesmas condições de centrifugação descritas anteriormente (HAGELBERG; CLEGG, 1991).

IV.1.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÔMICO EM OSSOS PULVERIZADOS.

Para as alíquotas de ossos pulverizados foram testados oito protocolos diferentes, incluindo-se o método de extração atualmente utilizado pelo IGP-SC nos procedimentos de extração de DNA em ossos. Os protocolos de cada método de extração empregados no presente trabalho seguem abaixo:

Método I - Protocolo de extração com Fenol-Clorofórmio-Microcon (FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION 1996 modificado pelo Protocolo de Granada), utilizado atualmente pelo IGP-SC, na extração de DNA em ossos.

1. 360mg do material ósseo pulverizado são incubados em um microtubo contendo 600µl de tampão de extração pH 7,5 (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, SDS a 2%), 24µl de proteinase-K e 48µl de DTT.
2. Homogeneizar bem. Incubar a 56°C, por 2h e adicionar mais 20µl de proteinase-K. Incubar 12h a 56°C.
3. Adicionar 600µl de fenol-clorofórmio-IAA (se necessário, dividir o volume em 2 tubos) e homogeneizar até a formação de uma emulsão leitosa.
4. Centrifugar por 7min a 9.700xg.

5. Passar a fase aquosa (sobrenadante) para um novo microtubo.
6. Passar a fase aquosa para o tubo Microcon™-100 contendo 100µl de água ultra pura.
7. Centrifugar a 500xg até que o volume tenha sido filtrado.
8. Descartar o líquido filtrado e adicionar 500µl de água ultra-pura na membrana.
9. Centrifugar novamente a 500xg até que todo volume seja filtrado.
10. Repetir passos 8 e 9.
11. Adicionar 50µL de água estéril (a temperatura ambiente) ou de T.E no Microcon™-100 e pipetar várias vezes, tendo o cuidado de não romper a membrana.
12. Inverter o Microcon™-100 em um tubo novo e centrifugar por 7min a 1.000xg.
13. Incubar 95°C por 10min.
14. DNA extraído, armazenar a -20°C.

Método II - Protocolo de extração com Fenol-Clorofórmio e precipitação alcoólica (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

1. 360mg do material ósseo pulverizado são incubados em um microtubo contendo 600µl de tampão de extração pH 7.5 (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, SDS a 2%), 24µl de proteinase-K e 48µl de DTT.
2. Homogeneizar bem. Incubar 56°C, por 12h e adicionar 24µl de proteinase-K, 2h antes de reiniciar a extração.
3. Adicionar 600µl de fenol-clorofórmio-IAA (se necessário, dividir o volume em 2 tubos) e homogeneizar até a formação de uma emulsão leitosa.
4. Centrifugar por 7min a 9.700xg.
5. Passar a fase aquosa (sobrenadante) para um novo microtubo.
6. Estimar a quantidade de sobrenadante transferido e adicionar a mesma quantidade de clorofórmio a cada amostra e homogeneizar por 15seg.
7. Centrifugar por 7min a 9.700xg.
8. Passar a fase aquosa (sobrenadante) para um novo microtubo, cuidando para não interagir com a interface (camada de proteínas entre as fases da solução).
9. Estimar a quantidade de sobrenadante transferido e adicionar 1/10 ou 10% do volume transferido de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e isopropanol bem gelado na mesma quantidade em que foi estimado o volume do sobrenadante transferido.
10. Misturar bem devagar, invertendo o microtubo manualmente durante 90seg.

11. Deixar as amostras em repouso no freezer a -20°C (pelo menos 2h) ou a -80°C (30min).
12. Centrifugar por 10min a velocidade máxima, a 0°C .
13. Remover o álcool (sobrenadante).
14. Lavar o precipitado com $350\mu\text{l}$ de etanol 70%.
15. Deslocar o precipitado do fundo do microtubo e homogeneizar durante 15 seg.
16. Centrifugar por 2min a velocidade máxima, a 4°C .
17. Repetir os passos 13, 14, 15, 16.
18. Remover o álcool (sobrenadante) e deixar o microtubo com a tampa aberta no banho seco a 70°C , para eliminar os resíduos de álcool (em torno de 20min).
19. Ressolubilizar as amostras em $60\mu\text{l}$ de T.E, deixar as amostras atingirem a temperatura ambiente e armazenar a -20°C .

Método III - Protocolo de extração com Acetato de Sódio (CATTANEO et al., 1995).

1. 360mg do material ósseo pulverizado são incubados em um tubo cônico de 10ml, contendo 2ml de solução tampão (10mM Tris-HCl (pH 7.6), 10mM Na_2EDTA , 50mM NaCl) com adição de $25\mu\text{l}$ de proteinase-K (20mg/ml) e $50\mu\text{l}$ de SDS a 10%, durante 12h a 42°C .
2. Adicionar 1ml de acetato de sódio saturado (5M) ao tubo e homogeneizar manualmente por 30seg e centrifugar a 4.000xg por 10min.
3. Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um novo tubo cônico de 10ml e adicionar 4ml de isopropanol a 100% e homogeneizar por 10min, seguido de centrifugação de 4.000xg por 10min.
4. Descartar o sobrenadante, e suspender o precipitado (coloração amarelada) em $250\mu\text{l}$ de etanol 70%.
5. Transferir a solução para um novo microtubo e centrifugar a velocidade máxima por 10min.
6. Remover o álcool (sobrenadante) e deixar o microtubo com a tampa aberta no banho seco a 70°C para eliminar os resíduos de álcool (em torno de 20min).
7. Ressolubilizar as amostras em $60\mu\text{l}$ de T.E, deixando as amostras atingirem a temperatura ambiente e armazenar a -20°C .

Método IV - Protocolo de extração com Sílica (Modificado de ROHLAND; HOFREITER, 2007).

1. 360mg do material ósseo pulverizado foram incubados em um microtubo contendo 1ml de DNAzol, 24µl de proteinase-K (20mg/ml) e 1,3% TRITON-X,
2. Homogeneizar e incubar a 56°C por 12h.
3. Centrifugar a 6.000xg por 5min.
4. Transferir o sobrenadante para um tampão de ligação contendo 5M de NaCl (50mM), Tris-HCl (pH=8,0) e 40µl de suspensão de sílica preparada conforme (BOMM et al.,1990).
5. Incubar por 1h sobre agitação em temperatura ambiente.
6. Homogeneizar e centrifugar em velocidade máxima por 1min.
7. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado em 5M de NaCl, 50mM Tris-HCl (pH=8,0).
8. Homogeneizar, centrifugar em velocidade máxima por 1min e descartar sobrenadante.
9. Lavar o precipitado em solução contendo etanol gelado a 50%, 0,1M NaCl, 1mM EDTA (pH=8,0), 10mM Tris-HCl (pH=8.0). Homogeneizar e centrifugar a velocidade máxima por 1min e descartar sobrenadante.
10. Repetir passo 9.
11. Deixar o microtubo com a tampa aberta no banho seco a 56°C por 15min secando.
12. Ressuspender o precipitado em 50µl de T.E, homogeneizar e incubar no banho seco por 15min a 56°C.
13. Recolher o sobrenadante evitando o precipitado de sílica ainda restante e armazenar em novo tubo, deixando as amostras atingirem a temperatura ambiente e armazenando a -20°C

Método V - Protocolo de extração com Sílica. Método 2C de Rohland e Hofreiter (2007).

1. 360mg de material ósseo pulverizado são incubados em um microtubo contendo 1,5ml de tampão de extração (0,45M EDTA pH=8,0, 1,3% TRITON-X, 1% PVP, 50mM ácido nitrobenzóico e 24µl de proteinase-K a 20mg/ml).
2. Homogeneizar e incubar a 37°C por 12h.
3. Centrifugar a 6.000xg por 5minutos.

4. Transferir o sobrenadante para um tampão de ligação contendo 5M de NaCl, e 40 μ l de suspensão de sílica preparada conforme (BOMM et al.,1990) e incubar por 1h sobre agitação em temperatura ambiente.
5. Homogeneizar e centrifugar a velocidade máxima por 1min.
6. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado novamente em 5M de NaCl.
7. Homogeneizar, centrifugar a velocidade máxima por 1min e descartar o sobrenadante.
8. Lavar o precipitado em solução contendo etanol gelado a 50%, 0,1M NaCl, 1mM EDTA (pH=8,0), 10mM Tris-HCl (pH=8.0).
9. Homogeneizar, centrifugar a velocidade máxima por 1min e descartar sobrenadante.
10. Repetir passos 8 e 9.
11. Deixar o microtubo com a tampa aberta no banho seco a 56°C por 15 min secando.
12. Ressuspender o precipitado em 50 μ l de T.E, homogeneizar e incubar no banho seco por 15min a 56°C.
13. Recolher o sobrenadante evitando o precipitado de sílica ainda restante e armazenar em novo tubo, deixando as amostras atingirem a temperatura ambiente e armazenar a -20°C.

Método VI - Protocolo de extração com Sílica. Método 2A de Rohland e Hofreiter (2007).

1. 360mg do material ósseo pulverizado são incubados em um microtubo contendo 1,5ml de tampão de extração (0,45M EDTA pH=8,0,1% Tween 20, 50mM mercaptoetanol e 24 μ l de proteinase-K a 20mg/ml).
2. Homogeneizar e incubar a 60°C por 3h.
3. Centrifugar a 6.000xg por 5min.
4. Transferir o sobrenadante para um tampão de ligação contendo 6M de Iodeto de Sódio e 40 μ l de suspensão de sílica preparada conforme (BOMM et al.,1990) e incubar por 1 h sobre agitação em temperatura ambiente.
5. Homogeneizar, centrifugar a velocidade máxima por 1 min e descartar o sobrenadante
6. Lavar o precipitado com 6M de NaI. Homogeneizar, centrifugar a velocidade máxima por 1min e descartar o sobrenadante.

7. Lavar o precipitado em solução contendo etanol gelado a 50%, 0,1M NaCl, 1mM EDTA (pH=8,0), 10mM Tris-HCl (pH=8.0), Homogeneizar, centrifugar a velocidade máxima por 1 min e descartar o sobrenadante.
8. Repetir passo 7.
9. Deixar o microtubo com a tampa aberta no banho seco a 56°C por 15 min secando.
10. Ressuspender o precipitado em 50µl de T.E, homogeneizar e incubar no banho seco por 15min a 56°C.
11. Recolher o sobrenadante evitando o precipitado de sílica ainda restante e armazenar em novo tubo, deixando as amostras atingirem a temperatura ambiente e armazenar a -20°C

Método VII - Protocolo de extração com Dextran Blue (KALMAR et al., 2000).

1. 360mg do material ósseo pulverizado são incubados em um microtubo contendo 1ml de tampão de extração (0,1M EDTA pH=8,0, 0,5% Sarcosina-Na e 25µl de proteinase-K a 20mg/ml).
2. Homogeneizar e incubar a 37°C por 12h.
3. Centrifugar a 14.000xg por 10min.
4. Transferir 350µl do sobrenadante a um novo microtubo e adicionar 3,5µl de Dextran Blue (1µg/µl), mais 350µl de acetato de amônio 4M e 700µl de etanol 96%.
5. Homogeneizar durante 10seg.
6. Deixar as amostras em repouso em freezer a -80°C durante 7min para a precipitação do DNA.
7. Centrifugar por 15min a velocidade máxima, a 4°C.
8. Remover o álcool (sobrenadante) e deixar o microtubo com a tampa aberta no banho seco a 70°C, para eliminar os resíduos de álcool (em torno de 20 minutos);
9. Resselubilizar as amostras em 50µl de T.E, deixar as amostras atingirem a temperatura ambiente e armazenar a -20°C.

Método VIII - Protocolo de extração Dextran Blue – Orgânica

Nada mais é do que a junção dos protocolos do Dextran-Blue de Kalmar et al. (2000) e a extração orgânica com precipitação alcoólica de Sambrook e Russel (2001), com a modificação de um único passo, no qual a precipitação não se faz mais com acetato de sódio 3M (pH 5,2) como no método do Fenol-Clorofórmio com precipitação alcoólica, mas sim com acetato de amônio 2M.

1. 360mg do material ósseo pulverizado são incubados em um microtubo contendo 1ml de tampão de extração (0,1M EDTA pH=8,0, 0,5% Sarcosina-Na e 25µl de proteinase-K a 20mg/ml).
2. Homogeneizar e incubar a 37°C por 12h.
3. Centrifugar a 14.000xg por 10min.
4. Transferir 350µl do sobrenadante a um novo microtubo e adicionar 3,5µl de Dextran Blue (1µg/µl), mais 350µl de acetato de amônio 4M e 700µl de etanol 96%.
5. Homogeneizar durante 10seg.
6. Deixar as amostras em repouso em freezer a -80°C durante 7 min para a precipitação do DNA.
7. Centrifugar por 15min a velocidade máxima, a 4°C.
8. Remover o álcool (sobrenadante) e deixar o microtubo com a tampa aberta no banho seco a 70°C, para eliminar os resíduos de álcool (em torno de 20 minutos);
9. Ressolubilizar as amostras em 200µl de T.E.
10. Adicionar 350µL de fenol-clorofórmio-IAA e homogeneizar até a formação de uma emulsão leitosa.
11. Centrifugar por 7 minutos a 9.700xg.
12. Passar a fase aquosa (sobrenadante) para um novo tubo.
13. Estimar a quantidade de sobrenadante transferido e adicionar a mesma quantidade de Clorofórmio a cada amostra e homogeneizar por 15seg.
14. Centrifugar por 7min a 9.700xg.
15. Passar a fase aquosa (sobrenadante) para um novo microtubo, cuidando para não interagir com a interface (camada de proteínas entre as fases da solução).

16. Estimar a quantidade de sobrenadante transferido e adicionar 1/10 ou 10% do volume transferido de acetato de amônio 2M e colocar isopropanol gelado na mesma quantidade que foi estimada o volume do sobrenadante transferido.
17. Homogeneizar bem devagar, invertendo o tubo manualmente durante 90seg.
18. Deixar as amostras em repouso no freezer a -20°C (pelo menos 2h) ou a -80°C (por 30 min).
19. Centrifugar por 10min a velocidade máxima, a 0°C.
20. Remover o álcool (sobrenadante).
21. Lavar o precipitado com 350µl de etanol a 70%.
22. Deslocar o precipitado do fundo do microtubo e homogeneizar a amostra durante 15seg.
23. Centrifugar por 2min a velocidade máxima, a 4°C e remover o sobrenadante.
24. Repetir os passos 21, 22 e 23.
25. Deixar o microtubo com a tampa aberta no banho seco a 70°C, para eliminar os resíduos de álcool (em torno de 20min).
26. Ressolubilizar as amostras em 60µl de T.E, deixar as amostras atingirem a temperatura ambiente e armazenar a -20°C.

IV.1.6 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA EM FRAGMENTOS DE OSSOS NÃO PULVERIZADOS

Como dito anteriormente, após o corte dos ossos em fragmentos menores, partes desses fragmentos (cerca de 1,5g) foram separados para uma técnica de extração de DNA em ossos não pulverizados.

Para a realização deste tipo de extração sem pulverização, os fragmentos ósseos foram colocados em tubos cônicos de 50ml não sendo realizado nenhum procedimento de descalcificação.

O protocolo utilizado é uma junção dos protocolos do Dextran Blue de Kalmar et al., (2000) com Fenol-Clorofórmio e precipitação alcoólica (“Orgânico”) de Sambrook e Russel (2001), semelhante àquele realizado para a extração de material ósseo pulverizado pelo método Dextran Blue-Orgânica. No entanto existem modificações neste protocolo, denominado “método substitutivo”, como a clarificação da amostra, a maior quantidade de

reagentes que utiliza nas etapas iniciais e o maior tempo de incubação da amostra no tampão de extração.

Método IX – Protocolo de extração sem pulverização através do Método Substitutivo

1. 1,5g do material ósseo não pulverizado são colocados em um tubo cônico de 50ml.
2. Clarificar a amostra, adicionando 30ml de clorofórmio no tubo cônico de 50ml com agitação vigorosa durante 30min a 10°C.
3. Centrifugar a 1.000xg durante 7min e remover o clorofórmio do tubo.
4. Adicionar água-ultra-pura-estéril ao tubo para a remoção de traços de clorofórmio dos fragmentos ósseos.
5. Centrifugar a 1.000xg durante 7min e remover o líquido do tubo.
6. Repetir passos 4 e 5.
7. Incubar a peça em 50ml de tampão (0,1M EDTA pH=8,0, 0,5% Sarcosina-Na e 150µl de proteinase-K a 20mg/ml), durante 3 dias no escuro a 40°C sob agitação constante.
8. Centrifugar a 1.500xg durante 5 minutos e transferir 25ml do sobrenadante para um novo tubo cônico de 50ml.
9. Adicionar a este novo tubo, 9ml de acetato de amônio 4M, 19 ml de álcool isopropílico e 6ml de Dextran Blue na concentração de 20ug/ml).
10. Homogeneizar durante 15seg.
11. Deixar as amostras em repouso em freezer a -80°C durante 30min para a precipitação do DNA.
12. Centrifugar por 15min a velocidade máxima, a 4°C.
13. Remover o álcool (sobrenadante) e transferir o precipitado para um microtubo de 1,5ml deixar o tubo com a tampa aberta no banho seco a 70°C, para eliminar os resíduos de álcool (em torno de 20min).
14. Ressolubilizar as amostras em 200µl de T.E.
15. Adicionar 350µl de fenol-clorofórmio-IAA e homogeneizar até a formação de uma emulsão leitosa.
16. Centrifugar por 7min a 9.700xg.
17. Passar a fase aquosa (sobrenadante) para um novo tubo.
18. Estimar a quantidade de sobrenadante transferido e adicionar a mesma quantidade de clorofórmio a cada amostra e homogeneizar por 15seg.
19. Centrifugar por 7min a 9.700xg.

20. Passar a fase aquosa (sobrenadante) para um novo microtubo, cuidando para não interagir com a interface (camada de proteínas entre as fases da solução).
21. Estimar a quantidade de sobrenadante transferido e adicionar 1/10 ou 10% do volume transferido de acetato de amônio 2M e colocar isopropanol gelado na mesma quantidade que foi estimada o volume do sobrenadante transferido.
22. Homogeneizar bem devagar, invertendo o tubo manualmente durante 90seg.
23. Deixar as amostras em repouso no freezer a -20°C (pelo menos 2h) ou a -80°C (por 30 min).
24. Centrifugar por 10min a velocidade máxima, a 0°C .
25. Remover o álcool (sobrenadante).
26. Lavar o precipitado com 350 μl de etanol a 70%.
27. Deslocar o precipitado do fundo do microtubo e homogeneizar a amostra durante 15seg.
28. Centrifugar por 2min a velocidade máxima, a 4°C e remover o sobrenadante.
29. Repetir os passos 26, 27 e 28.
30. Deixar o microtubo com a tampa aberta no banho seco a 70°C , para eliminar os resíduos de álcool (em torno de 20min).
31. Ressolubilizar as amostras em 60 μl de T.E, deixar as amostras atingirem a temperatura ambiente e armazenar a -20°C .

IV.1.7 CONTROLES UTILIZADOS PARA A EXTRAÇÃO DE DNA

Tanto para os métodos de extração em ossos pulverizados como para os não pulverizados, utilizou-se para controle positivo, sangue periférico colhido recentemente por punção venosa e para controle negativo água ultra pura-estéril para verificar possíveis contaminações na etapa de extração de DNA.

Um resumo dos procedimentos realizados, incluindo todos os métodos de extração de DNA, pode ser observado na figura 11.

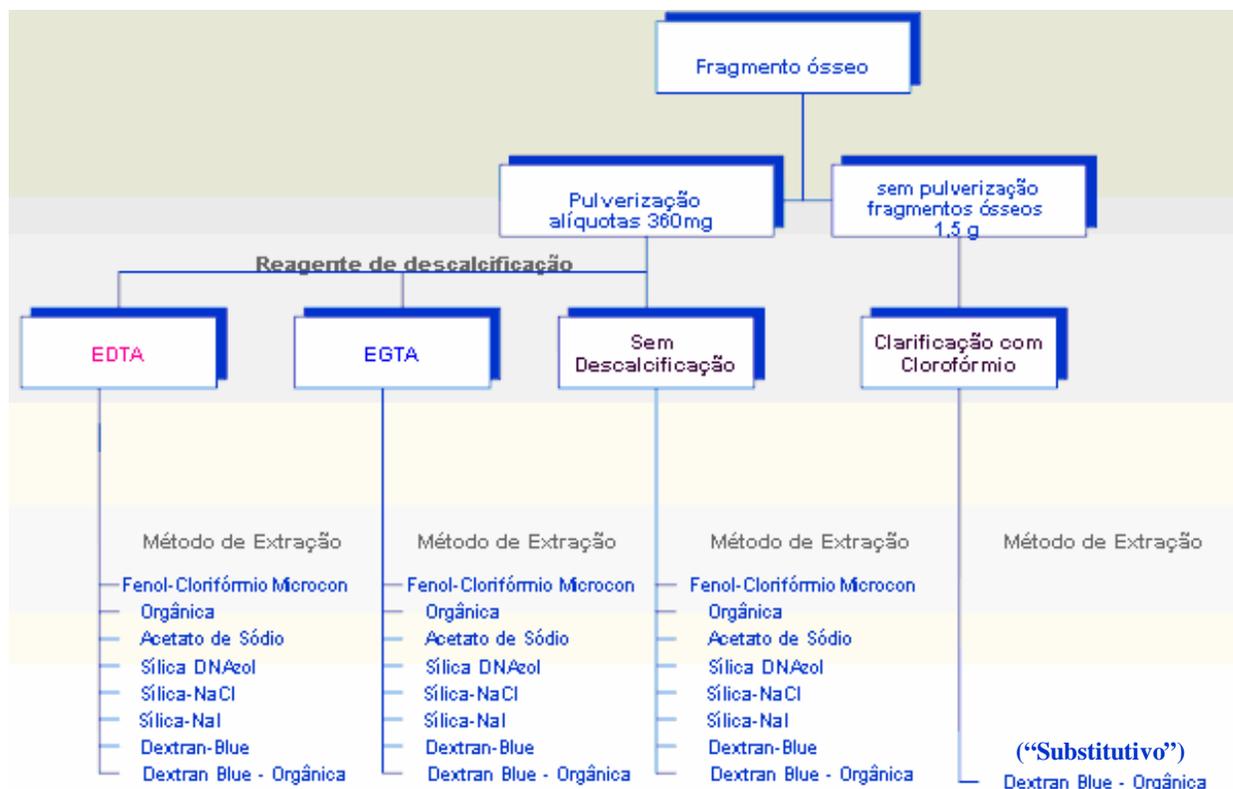


Figura 11. Desenho esquemático, mostrando todas as etapas do processo de extração de DNA, desde a obtenção do fragmento ósseo já processado até os diferentes protocolos utilizados para a obtenção do DNA extraído.

IV.1.8 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO OBTIDO DOS OSSOS

Para verificar a eficiência da extração de DNA genômico foi realizada a quantificação pela leitura da densidade óptica (DO) do DNA pelo espectrofotômetro Modelo Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech) por absorvância a 260nm, (utilizou-se para esta quantificação, 5µl de DNA de cada amostra e 45µl de T.E). A estimativa da pureza do extrato é dada através da razão entre a DO_{260}/DO_{280nm} e DO_{260}/DO_{230nm} , sendo que a existência de contaminações por fenóis ou proteínas acarreta em uma relação DO muito menor que 1,8 (solução pura de DNA) fornecendo informações importantes sobre o estado de pureza do DNA extraído (NICKLAS; BUEL, 2003).

A quantificação através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE também foi realizada (utilizou-se para a corrida, 4µl de DNA de cada amostra e 1µl de azul de bromofenol a 0,25%), uma vez que a espectrofotometria nem sempre garante dosagens confiáveis, por existirem compostos contaminantes como os ácidos húmicos e fúlvicos, que

absorvem no comprimento de onda de 230nm co-extraídos com o DNA de restos mortais resultando em falsas concentrações do DNA extraído (NICKLAS; BUEL, 2003).

A quantidade de DNA foi estimada comparando-se a intensidade e posição da banda corada em brometo de etídio (0,5 µg/ml) com aquelas de alíquotas de concentrações conhecidas de DNA também aplicadas ao gel como escadas alélicas e o controle K562 (Promega) na concentração de 10ng/µl, sendo visualizadas e capturadas as imagens através do transiluminador de luz ultravioleta, aparelho BIN-PRO (Bio Imaging Systems) e estimadas através do programa Gelquant (Bio Imaging Systems). A intensidade de fluorescência emitida por amostras de DNA coradas com brometo de etídio é proporcional à massa total de DNA (NICKLAS; BUEL, 2003).

IV.1.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA OS LOCOS STRs NAS AMOSTRAS *POST MORTEM*

Após a etapa de quantificação, o extrato obtido das amostras foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems). Os marcadores genéticos utilizados foram: *D3S1358*, *vWA*, *FGA*, *Amelogenina*, *D8S1179*, *D21S11*, *D18S51*, *D5S818*, *D13S317*, *D7S820* (9 STRs autossômicos integrados ao sistema CODIS mais o determinador de gênero amelogenina) utilizando o kit *AmpFℓ STR® Profiler Plus™ ID PCR Amplification*.

Os locos STR amplificados para as amostras *post mortem* com suas respectivas faixas de tamanho e fluorescência encontram-se na figura 12.

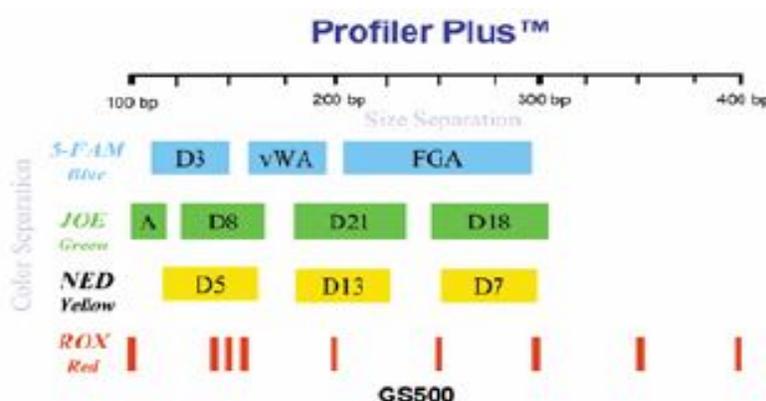


Figura 12. Representação esquemática dos locos STR incluídos no conjunto comercial *Profiler Plus™* da Applied Biosystems. O conjunto utiliza três fluoróforos (azul, verde e amarelo) para a detecção dos alelos e um fluoróforo (vermelho) como padrão interno de fragmentos de peso molecular de tamanho conhecido. Fonte: RUITBERG; REEDER; BUTLER (2000).

O processo de amplificação foi realizado em reações de PCR com volume total de 50µl, contendo 20µl de DNA 0,10ng/µl e 30µl de “Mix” de reação contendo 21µl de tampão de reação *AmpFl STR® PCR Reaction Mix*, 11µl de oligonucleotídeos iniciadores *AmpFl STR® Profiler Plus Primer Set* e 1µl de enzima *Ampli Taq Gold® DNA Polymerase* na concentração de 5U/µl (esta mistura reacional fornece uma quantidade um pouco acima dos 30µl necessários, para prevenir a perda que ocorre durante o processo de pipetagem), no termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems).

Na PCR se utilizou um controle negativo, que apresentava todos os reagentes, exceto o DNA genômico, com o objetivo de detectar possíveis contaminações por DNA exógeno. Utilizou-se também, um controle positivo de DNA de linhagem celular humana feminina *AmpFl STR® Control DNA 9947A* na concentração de 0,10ng/µl e 1,5µl da escada alélica *AmpFlSTR® Profiler Plus Allelic Ladder*. As condições de temperatura e o ciclo de amplificação para a reação de PCR estão listados na tabela 4.

Tabela 4. Programa do termociclador para o ciclo de amplificação com o *kit AmpFlSTR® Profiler Plus™*

Tempo Inicial de Incubação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Passo Final
Espera	Ciclagem (28 ciclos)			Espera	Espera
95°C	94 °C	59 °C	72 °C	60 °C	25 °C
11 min	1 min	1 min	1 min	60 min	(Término)

Fonte: Applied Biosystems (2006).

Os produtos amplificados foram misturados (1,5µl de produto de PCR) a um MIX contendo 9,7µl de Formamida Hi-Di™ e 0,2µl de *ROX GS 500 Size Standard*, desnaturados a 95°C por 3min e separados em eletroforese capilar durante 45min para cada 4 amostras (4 capilares) em uma corrente de 15kV (120-160mA) a 60°C e simultaneamente detectados no analisador genético / sequenciador automático ABI 3130 (ABIPRISM-Applied Biosystems) e transferidos para o programa *GeneMapper ID v3.2* que primeiro determina o tamanho dos picos em pares de base, o que inclui a detecção do pico e a determinação do seu tamanho através de comparação com um padrão de tamanho (*Size Standard*). A seguir, o programa realiza a nomeação dos alelos automaticamente através de comparação com uma escada alélica (nesse caso do sistema *Profiler Plus*) (Figura 13). Uma vez completa a análise, o

programa apresenta os resultados incluindo os valores de qualidade, e armazena os resultados no seu banco de dados.

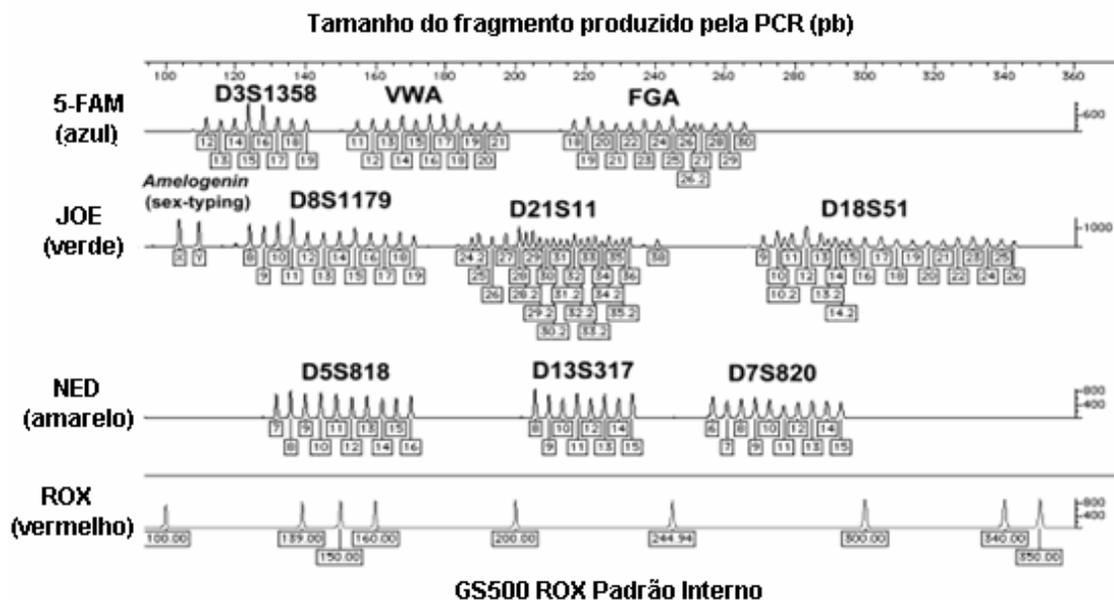


Figura 13 – Escada alélica presente no conjunto comercial *Profiler Plus* da Applied Biosystems. Fonte: BUTLER et al. (2004).

IV.1.10 ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS OBTIDOS NA ETAPA DE ANÁLISE LABORATORIAL

As frequências relacionadas ao sucesso (quatro ou mais locos com visualização do genótipo) e insucesso (menos de quatro locos visualizados) foram estimadas por contagem direta dos locos que apresentaram os picos de seus alelos acima de 100 RFU's ("threshold"). O tratamento estatístico se deu primeiramente pelo teste do Qui-quadrado (X^2) para verificar se as frequências observadas em cada tipo de extração se diferenciam significativamente umas das outras com $\alpha = 0,05$. Após, verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os métodos de extração empregados, foi realizado o teste exato de Fischer, para analisar os métodos de extração um contra o outro.

IV.2 VALORIZAÇÃO BIOESTATÍSTICA DOS RESULTADOS – BANCO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS STRs DA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA

IV.2.1 AMOSTRA ESTUDADA

Quando se tem como objetivo realizar a tipagem por DNA, torna-se necessário identificar a frequência alélica da população em estudo, por meio de uma amostra representativa. Desta forma, para a realização de um banco de dados de frequências alélicas de STRs na população de Santa Catarina, foi realizada a tipagem de 452 indivíduos, não aparentados, de várias localidades das 6 mesorregiões do estado de Santa Catarina. A quantidade de indivíduos pesquisados diferiu entre os locos, devido ao insucesso da reação em cadeia da polimerase para alguns locos, na mesma amostra. O número de indivíduos selecionados se deu pelo índice de densidade demográfica de cada mesorregião (Figura 14).

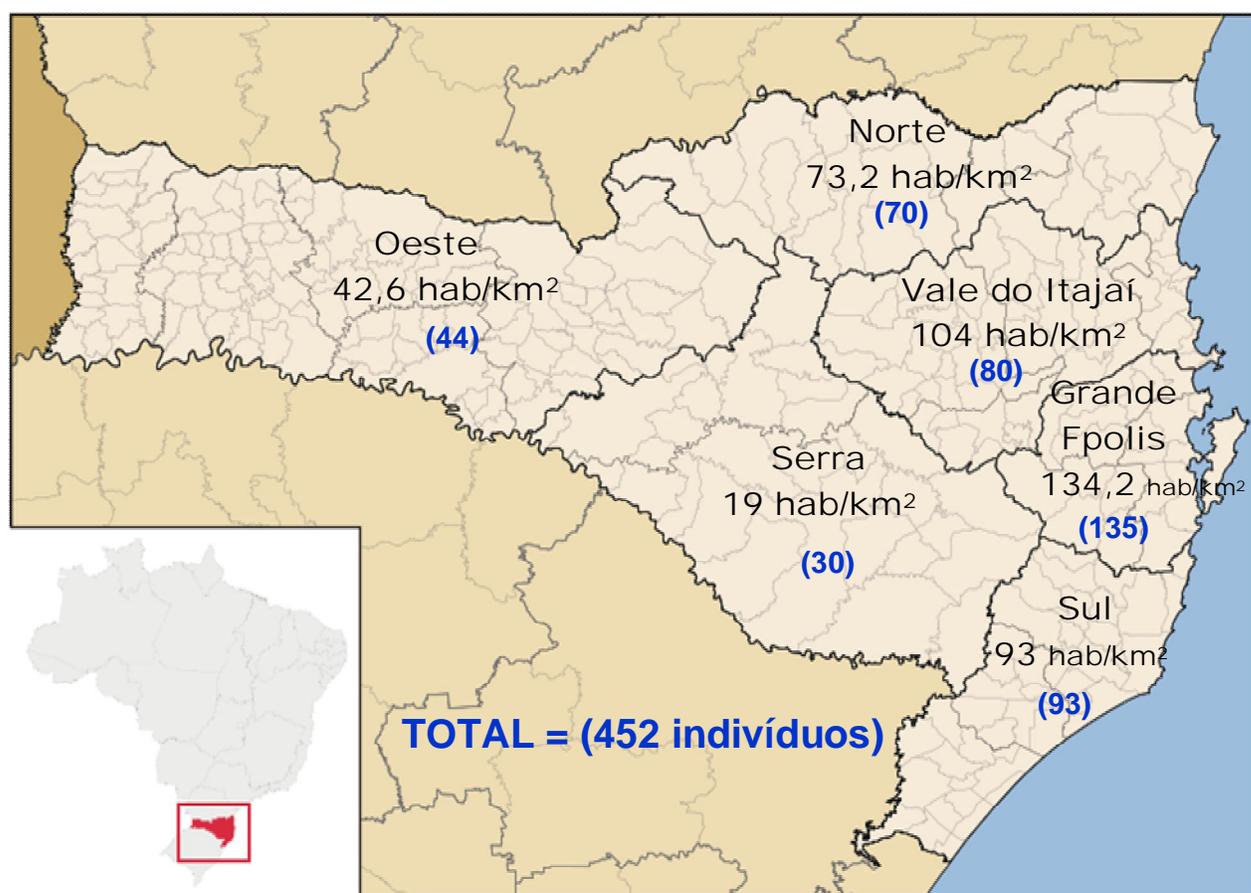


Figura 14. Índices de densidade demográfica das seis mesorregiões do Estado de Santa Catarina. Fonte: MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO (2006). Em parênteses o número real de indivíduos genotipados de cada mesorregião que compuseram a amostra.

As coletas foram realizadas nos Centros de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), com a retirada de 10ml de sangue periférico de doadores de sangue e armazenados em tubos estéreis contendo EDTA. Após a coleta do sangue, os tubos devidamente identificados foram mantidos em recipiente contendo gelo e transportados para o Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), onde foram rotulados e mantidos a 4°C até o momento da separação do material biológico. Todos os indivíduos participantes do projeto assinaram um termo de consentimento livre e antes de terem suas amostras coletadas foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e sigilo de suas informações pessoais (ANEXOS A, B e C), sendo que todo procedimento ocorreu dentro das condições aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina para pesquisa em seres humanos, submetido sob número do processo 105/02.

IV.2.2 CONSERVAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de sangue transportadas para o laboratório foram submetidas à centrifugação a 1.000xg durante 15min; o sobrenadante (plasma) foi estocado em microtubos de 1,5ml a -20°C. A camada de leucócitos (*buffy coat*) foi utilizada para a extração de DNA e as hemácias foram desprezadas.

IV.2.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM AMOSTRA

REFERÊNCIA

As amostras biológicas foram submetidas ao método de extração orgânico de fenol-clorofórmio com precipitação alcoólica (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

1. Adicionar 330µl de tampão de extração pH 7,5 (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, SDS a 2%) num tubo de 1,5ml e 50µl de camada de leucócitos.
2. Adicionar 7,5µl de Proteinase K (20mg/ml) e homogeneizar por 10 seg.
3. Incubar a 56 °C por 12h.
4. Adicionar 350µl de fenol-clorofórmio-IAA e homogeneizar até a formação de uma emulsão leitosa.
5. Centrifugar por 7min a 9.700xg.
6. Passar a fase aquosa (sobrenadante) para um novo tubo.

7. Estimar a quantidade de sobrenadante transferido e adicionar a mesma quantidade de clorofórmio a cada amostra e homogeneizar por 15seg.
8. Centrifugar por 7min a 9.700xg.
9. Transferir a fase aquosa (sobrenadante) para um novo tubo, cuidando para não interagir com a interface (camada de proteínas entre as fases da solução).
10. Estimar a quantidade de sobrenadante transferido e adicionar 1/10 ou 10% do volume transferido de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e adicionar isopropanol gelado na mesma quantidade que foi estimado o volume do sobrenadante transferido.
11. Homogeneizar bem devagar, invertendo o tubo manualmente durante 90seg.
12. Deixar as amostras em repouso no freezer a -20°C (pelo menos 2h) ou a -80°C (30min).
13. Centrifugar por 10min a velocidade máxima, a 0°C .
14. Remover o álcool (sobrenadante).
15. Lavar o precipitado com 350µl de etanol 70%.
16. Deslocar o precipitado do fundo do microtubo e homogeneizar durante 15seg.
17. Centrifugar por 2min a velocidade máxima, a 4°C.
18. Repetir os passos 14, 15, 16 e 17.
19. Remover o álcool (sobrenadante) e deixar o microtubo com a tampa aberta no banho seco a 70°C, para eliminar os resíduos de álcool (em torno de 20min).
20. Ressolubilizar as amostras em 60µl de T.E, deixar as amostras atingirem a temperatura ambiente e armazenar a -20°C.

Após a extração, realizou-se a quantificação pela leitura da densidade óptica do DNA pelo espectrofotômetro Modelo Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech) por absorvância a 260nm e foram produzidas soluções de uso na concentração de 1ng/µl, armazenadas a -20°C e constituem um banco de DNA organizado a partir do número de matrícula dos indivíduos.

IV.2.4 LOCOS ANALISADOS

O banco de dados foi construído através da análise de 13 locos STR autossômicos integrados ao sistema CODIS: *CSF1PO*, *FGA*, *TPOX*, *TH01*, *VWA*, *D3S1358*, *D5S818*, *D7S820*, *D8S1179*, *D13S317*, *D16S539*, *D18S51*, *D21S11*. E como informação adicional, mais os locos STRs autossômicos *D2S1338*, *D19S433* e o determinador de gênero amelogenina nos locos sexuais, utilizando o conjunto comercial AmpF ℓ STR[®] *Identifiler*[™] PCR Amplification.

IV.2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA OS 15 MARCADORES STR

O processo de amplificação foi realizado em reações de PCR com volume total de 25µl, contendo 10µl de DNA 0,10ng/µl e 15µl de “Mix” de reação contendo 10,5µl de tampão de reação *AmpFl STR® PCR Reaction Mix*, 5,5µl de oligonucleotídeos iniciadores *AmpFlSTR® Identifiler Primer Set* e 0,5µl de enzima *Ampli Taq Gold® DNA Polymerase* na concentração de 5U/µl (esta mistura reacional fornece uma quantidade um pouco acima dos 15µl necessários, para prevenir a perda que ocorre durante o processo de pipetagem), no termociclador GeneAmp PCR System (Applied Biosystems).

Na PCR se utilizou um controle negativo, que apresentava todos os reagentes, exceto o DNA genômico, com o objetivo de detectar possíveis contaminações por DNA exógeno. Utilizou-se também, um controle positivo de DNA de linhagem celular humana feminina *AmpFl STR® Control DNA 9947^a* na concentração de 0,10ng/µl e 1,0µl da escada alélica *AmpFlSTR® Identifiler™ Allelic Ladder*. As condições de temperatura e o ciclo de amplificação para a reação de PCR estão listados na tabela 5.

Tabela 5. Programa do termociclador para o ciclo de amplificação com o *kit AmpFlSTR® Identifiler™*

Tempo Inicial de Incubação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Passo Final
Espera	Ciclagem (28 ciclos)			Espera	Espera
95°C 11 min	94 °C 1 min	59 °C 1 min	72 °C 1 min	60 °C 60 min	25 °C (Término)

Fonte: Applied Biosystems (2006).

Os produtos amplificados foram misturados (1,0µl de produto de PCR) a um *Mix* contendo 8,7µl Formamida Hi-Di™ e 0,3µl de *Genescan™ 500 Liz™ Size Standard*, desnaturados a 95°C por 3min e separados em eletroforese capilar durante 45min para cada 4 amostras (4 capilares) em uma corrente de 15kV (120-160mA) a 60°C e simultaneamente detectados no analisador genético / sequenciador automático ABI 3130 (ABIPRISM-Applied Biosystems) e analisados com o programa *GeneMapper ID v3.2*.

Diferentemente do sistema *Profiler Plus*, são utilizados 4 fluoróforos aos invés de apenas 3, (Figura 15), sendo que para ambos os sistemas existe alguma sobreposição no

espectro de emissão entre eles. No entanto durante a coleta de dados os sinais fluorescentes são separados em um padrão de espaçamento previamente definido (Figura 16).

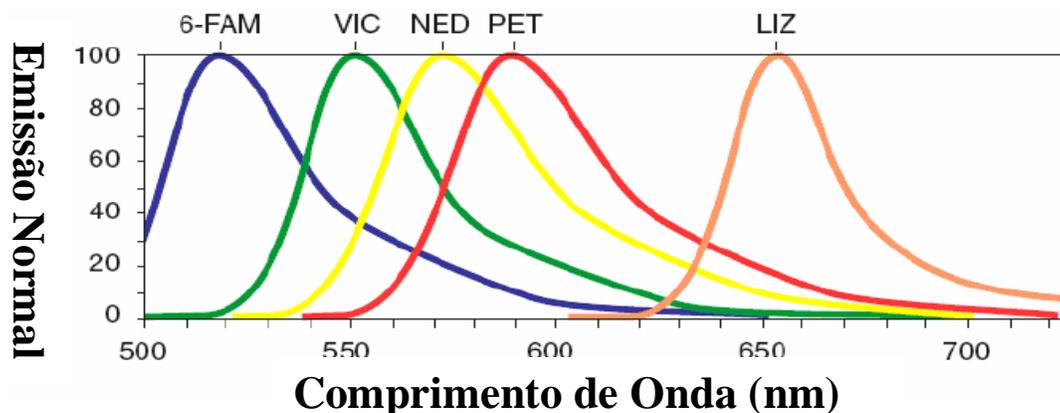


Figura 15. Espectro de emissão dos fluoróforos componentes do sistema de amplificação *multiplex* identifiier. O quinto fluoróforo (LIZ) é usado para marcar o padrão de tamanho. Fonte: APPLIED BIOSYSTEMS (2006).



Figura 16. Separação dos sinais fluorescentes por gradiente de difração e seus respectivos STRs do sistema Identifiier. O fluoróforo 6-FAM, emite no menor comprimento, de onda e é mostrado como azul, seguido pelos fluoróforos VIC(verde), NED(amarelo), PET(vermelho) e LIZ (laranja). Fonte: APPLIED BIOSYSTEMS (2006).

IV.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO BANCO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

Em relação ao banco de dados, as frequências alélicas e os parâmetros de interesse forense foram calculados através do programa Power Stats V12.X1s (TEREBA, 1999).

Os parâmetros de interesse forense analisados foram:

Probabilidade de coincidência (PC) – Indica a raridade do perfil genotípico de um indivíduo. É obtido através do produto das frequências genotípicas de todos os locos tipados (CHAKRABORTY; STIVERS, 1996). É o número de indivíduos que podem ser estudados para que se possa encontrar o mesmo padrão de DNA, em indivíduos selecionados ao acaso.

Poder de exclusão (PEX) – é a probabilidade, em média de um indivíduo selecionado ao acaso em um caso de paternidade típico de um par mãe-criança, ser excluído da paternidade (CHAKRABORTY; STIVERS, 1996). Quando se analisam vários marcadores, a probabilidade de que um indivíduo falsamente acusado seja excluído é maior, sendo este índice denominado poder de exclusão acumulado. É dado por: $1 - [(1 - PE1) \cdot (1 - PE2) \cdot (1 - PE3) \cdot \dots \cdot (1 - PE_n)]$, onde n é o total de locos estudados.

Poder de discriminação (PD) – refere-se à probabilidade de que dois indivíduos amostrados de forma aleatória de uma mesma população tenham genótipos diferentes, indicando a capacidade do loco para fazer a discriminação entre indivíduos (FISHER, 1951). Considerando os vários locos estudados, o poder de discriminação acumulado é dado por: $1 - [(1 - PD1) \cdot (1 - PD2) \cdot (1 - PD3) \cdot \dots \cdot (1 - PD_n)]$, onde n é o total de locos estudados.

Conteúdo de informação do polimorfismo (PIC) – é uma medida do grau de polimorfismo de um loco e é dependente do número e da frequência dos alelos. Quando o valor é superior a 0,5 significa que o sistema é bastante informativo. Para valores entre 0,25 e 0,5, considera-se o sistema como razoavelmente informativo e valores menores que 0,25 corresponde a sistemas poucos informativos (BOTSTEIN et al., 1980).

Índice Típico de Paternidade (IPT) – indica quantas vezes é mais provável de a pessoa testada ser o pai biológico, ao invés de um indivíduo selecionado ao acaso (HUSTON, 1998).

Além dos parâmetros forenses, foi realizado também o teste do Qui-quadrado (X^2) para verificar se as frequências genotípicas observadas se desviam das esperadas pela teoria de Hardy-Weinberg, o cálculo da homozigose e heterozigose esperados e observados, foram realizados com o programa Genepop (RAYMOND; ROUSSET, 1999).

Todos os locos foram comparados com estudos publicados para outras populações brasileiras, sendo que os cálculos para comparação foram realizados através do programa Arlequin3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

Para determinar a eficiência do banco de dados produzido neste trabalho, foi utilizado o programa Famílias 1.81 (EGELAND et al., 2000) para calcular a probabilidade da presença de alelos comuns em casos de paternidade e o programa Patcan (RIANCHO; ZARRABEITIA, 2003) para realizar os cálculos de verossimilhança.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 ANÁLISES DAS EXTRAÇÕES EM OSSOS POR QUANTIFICAÇÃO EM GEL DE AGAROSE

Na primeira etapa através da quantificação em gel de agarose, estimou-se a quantidade de DNA extraído das amostras forenses para avaliar a eficiência dos diferentes métodos de extração de DNA. Uma preparação contendo DNA de boa qualidade resulta em uma banda compacta, enquanto DNA degradado é visualizado como um rastro no gel. A desvantagem deste método é que apesar de existir um programa que quantifica a intensidade da banda, esta é calculada subjetivamente, além de que o DNA total detectado pode ser uma mistura de DNA humano e microbiológico, levando a super-estimações da concentração do DNA deste tipo de amostra (GOODWIN; LINACRE; HADI, 2007).

Nossos resultados demonstram que os métodos de extração de DNA baseados em sílica não foram eficientes em extrair DNA das amostras forenses (Figuras 17, 18 e 19). Os métodos utilizando acetato de sódio e fenol-clorofórmio-microcon obtiveram DNA extraído; no entanto, como visualizado nas figuras 20 e 21, as amostras provenientes dessas extrações apresentaram poucas bandas que indicassem DNA íntegro (alto peso molecular). Os melhores resultados foram obtidos com os protocolos que utilizam o Dextran-Blue (Figura 22), fenol-clorofórmio com precipitação alcoólica (Figura 23) e Dextran Blue-Orgânica, que combina ambos os protocolos (Figura 24).

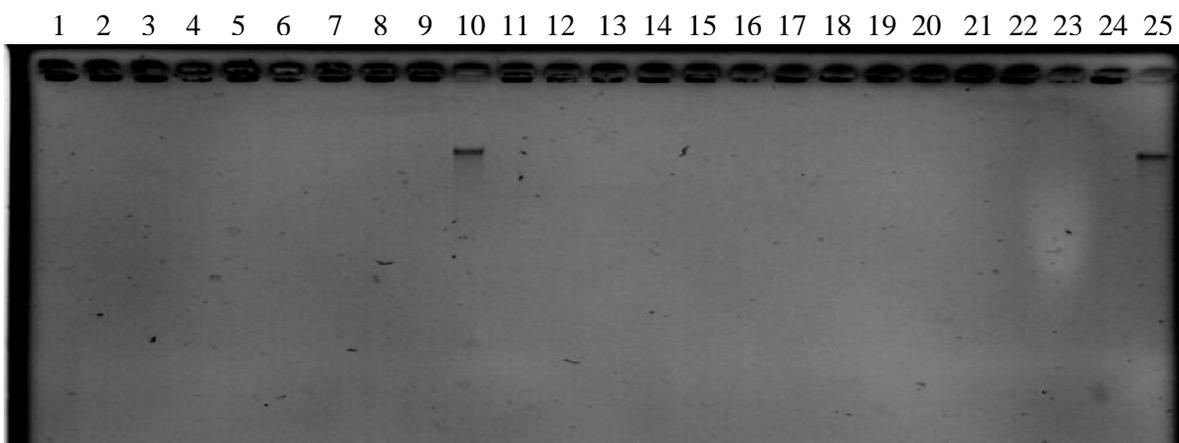


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração Sílica-DNAzol. Apenas as bandas pertencentes aos controles positivos é que aparecem (colunas 10 e 25).



Figura 18. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração Sílica-NaI. Apenas as bandas pertencentes aos controles positivos é que aparecem (colunas 1 e 8).

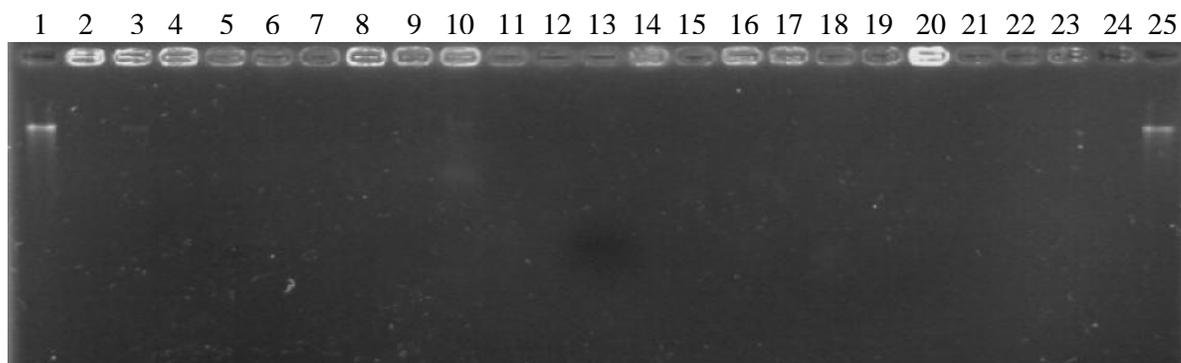


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração Sílica-NaCl. As bandas pertencentes aos controles positivos aparecem na primeira e última coluna. Além dessas, aparece um rastro com pequena banda proveniente das amostras biológicas nas colunas 3 e 10.

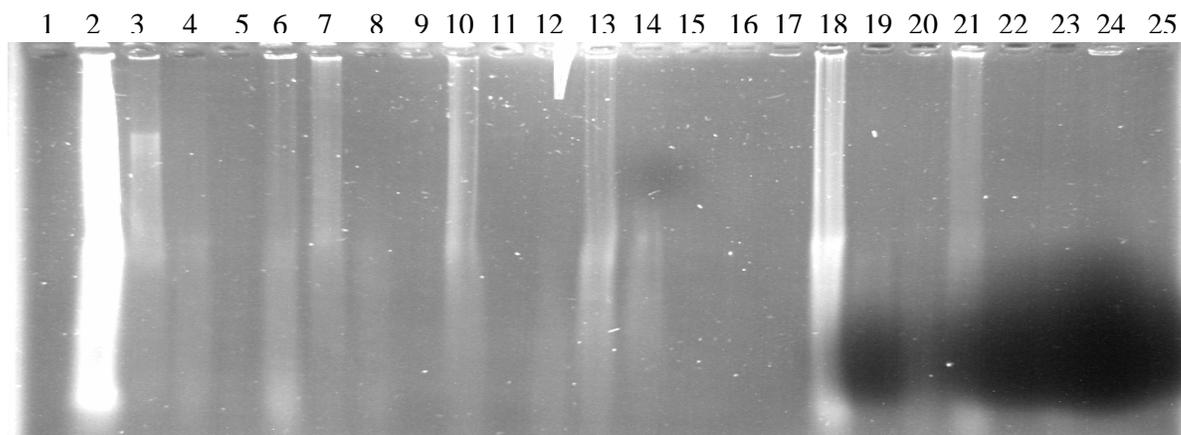


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração Acetato de Sódio. Notam-se vários rastros e poucas bandas que demonstrariam DNA íntegro.

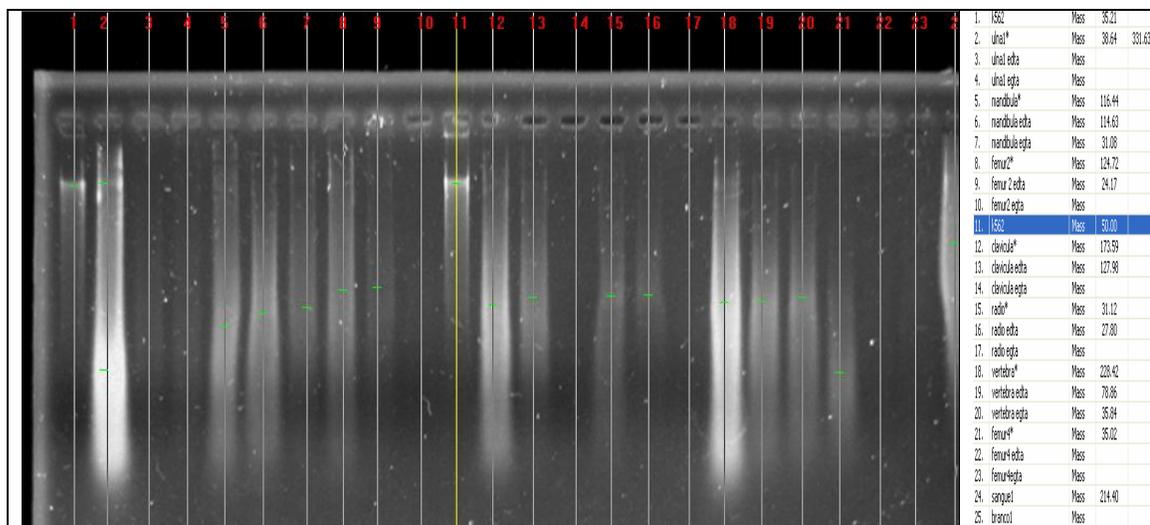


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração fenol-clorofórmio-microcon. Nas colunas 1 e 11 são os controles positivos (K562), apresentando-se as únicas colunas com DNA íntegro através da visualização da formação de uma banda na porção próxima ao topo do gel, nas outras colunas apenas rastros de DNA.

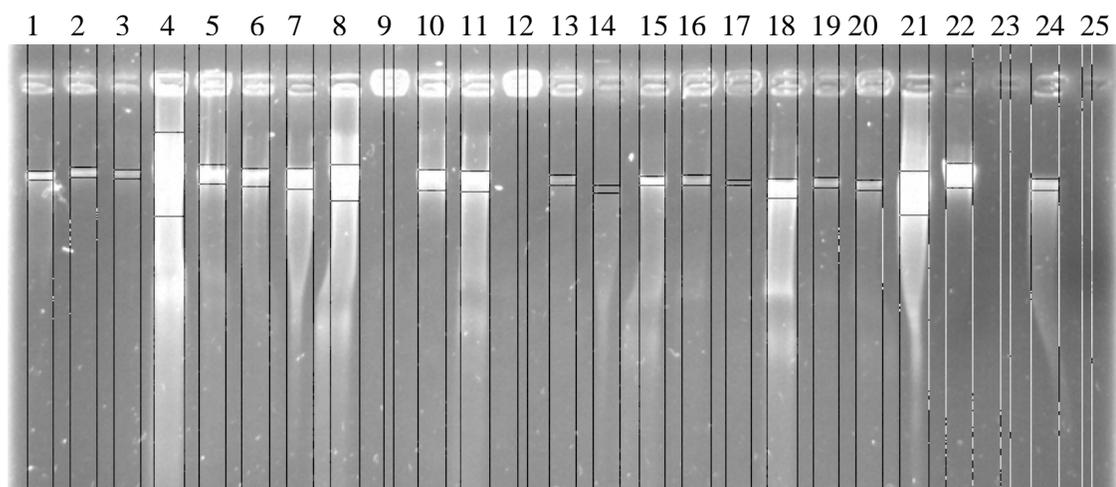


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração pelo Dextran Blue (KALMAR et al., 2000). Quase todas as colunas apresentam rastro de DNA e algumas com a presença de bandas que acusam que o DNA encontra-se quase íntegro.

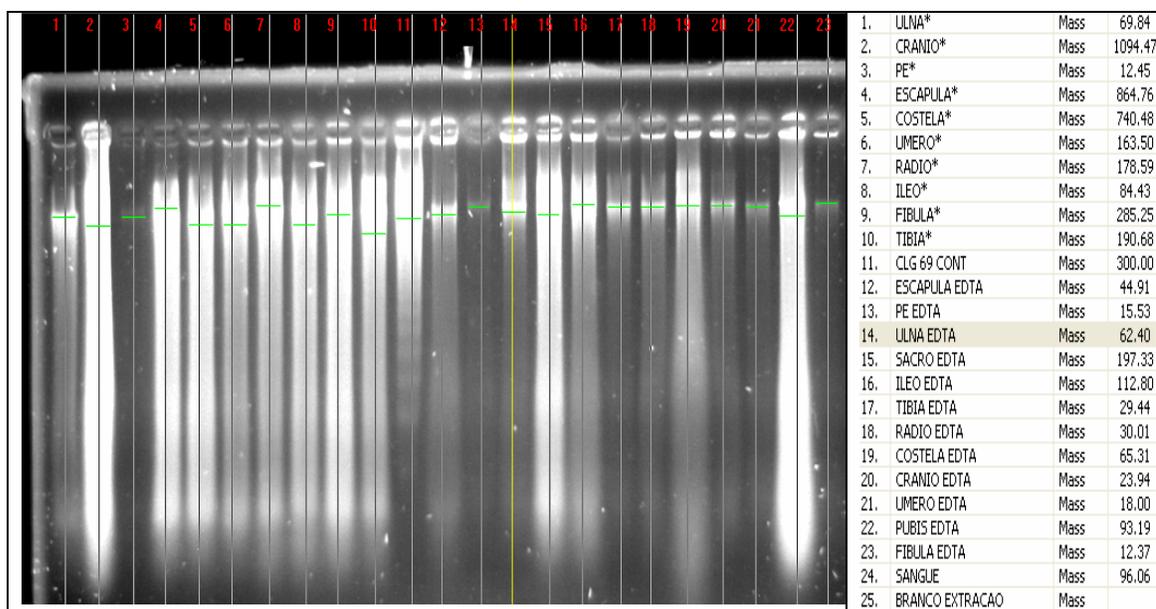


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração com fenol-clorofórmio e precipitação alcoólica. Todas as amostras presentes apresentam rastro de DNA e grande parte delas apresentam bandas bem definidas.

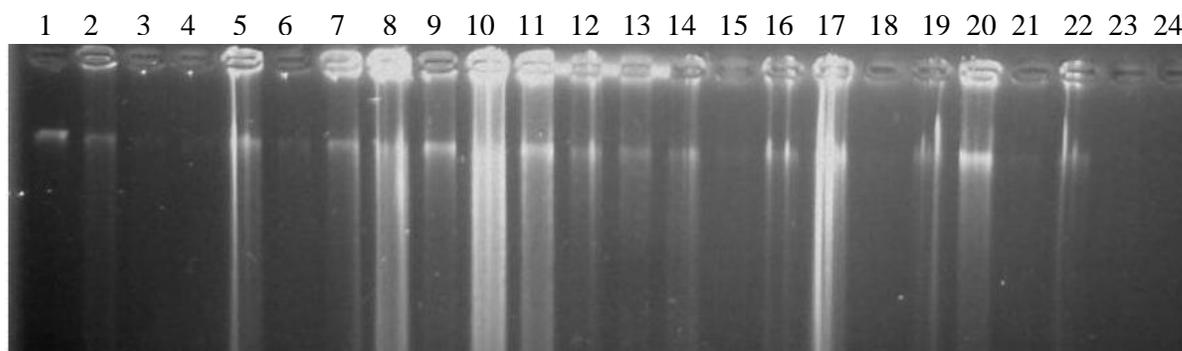


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração Dextran Blue-orgânica, com a combinação dos protocolos de Kalmar et al. (2000) e Sambrook; Russel (2001). Algumas amostras apresentam rastro de DNA e bandas bem definidas. E outras apresentam muito mais DNA íntegro e pouco rastro de DNA degradado (colunas 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11 e 20).

O método sem pulverização (substitutivo), conseguiu obter DNA de quase todas as amostras, no entanto, a maioria do DNA detectado não se apresentou íntegro (Figura 25).

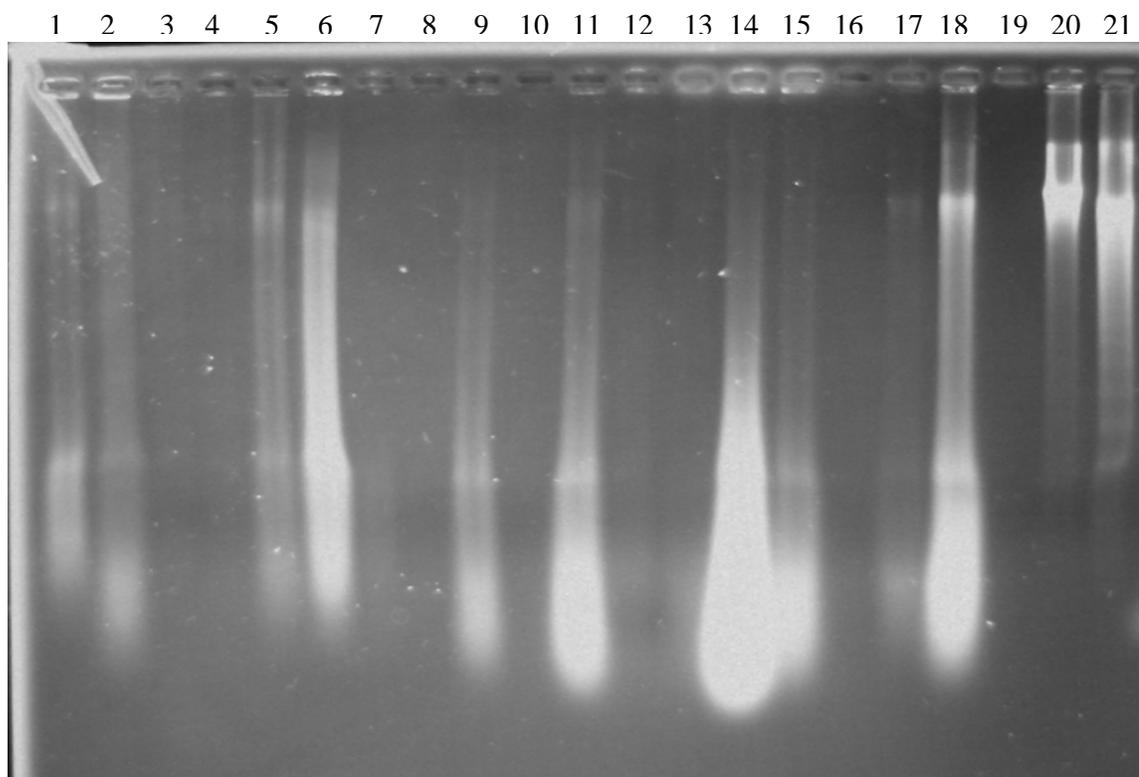


Figura 25. Eletroforese em gel de agarose para a quantificação das amostras submetidas ao método de extração sem pulverização (substitutivo) com a combinação dos protocolos de Kalmar et al. (2000) e Sambrook; Russel (2001). Todas as amostras apresentam rastro de DNA, no entanto, poucas mostraram bandas bem definidas (colunas 17, 18, 20 e 21). E outras apresentam muito mais DNA degradado (colunas 6, 9 e 11). Coluna 19 – controle negativo de extração.

No experimento, com o uso do MicroconTM-100, obteve-se uma concentração inferior de DNA, quando comparado ao uso do fenol com precipitação através do isopropanol, avaliados em eletroforese em gel de agarose. Da mesma forma, quando comparada com os métodos de extração Dextran-Blue e sem pulverização, estes apresentaram quantidades de DNA mais abundantes (Tabela 6).

Tabela 6. Quantidade de DNA em nove diferentes métodos de extração.

Método de extração	Fenol Microcon			Fenol alcoólica			Dextran Blue			Acetato de sódio			Sílica DNAzol			Sílica NaCl			Sílica NaI			Dextran Fenol			Sem Pó*	TT
	T	D	G	T	D	G	T	D	G	T	D	G	T	D	G	T	D	G	T	D	G	T	D	G	CL.	TT
1-ulna	A	D	D	D	D	-	D	D	-	D	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	11
2-mandíbula	D	D	D	D	D	D	A	A	A	-	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	12
2-fêmur	D	D	-	D	D	D	A	D	-	D	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	-	D	12
3-rádio	D	D	-	A	A	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	D	7
3-vértebra	A	A	A	D	D	D	A	A	A	D	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	A	D	15
3-clavícula	D	D	-	D	D	-	A	A	A	D	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	D	-	D	13
4-fêmur	D	-	-	D	-	D	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	5
5-tíbia	D	-	D	A	A	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	D	-	D	9
5-fíbula	D	D	-	A	A	-	A	A	A	-	A	A	-	-	-	-	-	D	-	-	-	A	-	A	D	11
5-escápula	D	D	-	D	A	-	A	A	A	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	D	12
5-crânio	D	D	-	D	A	D	A	-	A	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	A	D	11
5-úmero	D	D	D	A	A	D	A	-	A	-	A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	A	-	A	A	13
5-costela	D	D	-	A	A	D	A	A	A	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	D	13
5-fleco	D	D	D	A	A	D	A	A	A	-	A	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	D	15
5-púbis	-	D	D	A	A	D	A	A	A	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	D	13
5-ulna	D	D	D	A	A	-	A	A	A	D	A	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	12
5-rádio	D	D	-	A	A	-	A	A	A	-	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	D	13
6-metatarso	-	-	-	A	A	D	-	-	-	D	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	7
7-sacro	D	D	D	A	A	D	A	A	A	D	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	D	A	16
TOTAL	17	16	9	19	18	11	16	14	13	9	15	10	0	0	0	0	1	1	0	0	0	14	9	10	19	220
TOTAL	42			48			43			34			0			2			0			33			19	220
Frequência Relativa	73,68%			84,21%			75,43%			59,65%			0%			3,50%			0%			57,89%			100%	

Tratamento: T – Testemunha (controle) / D – Descalcificação com EDTA / G – Descalcificação com EGTA/ CL – Clarificação.

(Abundante): Apresentou bandas uniformes e bem definidas, apresentando ou não rastros;

D (Detectável): Apresentou apenas rastros;

- (Não Detectável): Não apresentou nem bandas e nenhum rastro.

* Sem Pó – Método Substitutivo (Sem Pulverizar)

TT: Total de vezes que a amostra apareceu no gel, sob a forma abundante ou detectável

Nossos resultados demonstraram que o método de extração sem pulverização obteve DNA extraído em todas as amostras (abundante e detectado). As amostras extraídas pelo método orgânico de Sambrook; Russel (2001) tiveram o segundo maior aproveitamento de DNA extraído (84,21%), sendo que todas as amostras que não passaram pelo processo de descalcificação apresentaram DNA na quantificação através de gel de agarose para esta técnica de extração.

Ainda, a figura 26, demonstra a eficiência dos métodos de extração em relação a obtenção de DNA de alto peso molecular, os quais apresentaram uma banda compacta no gel de agarose, e teoricamente possuem DNA mais íntegro. Dos métodos que obtiveram sucesso em extrair DNA, o método do Dextran-Blue foi o que conseguiu manter o extrato mais

íntegro possível. 40 dos 43 ossos que acusaram a presença de DNA apresentaram DNA íntegro. O método Dextran Blue/Orgânico foi o segundo melhor método em obtenção de DNA íntegro. Todos os outros métodos tiveram quedas bruscas em relação à taxa de DNA íntegro/DNA extraído.

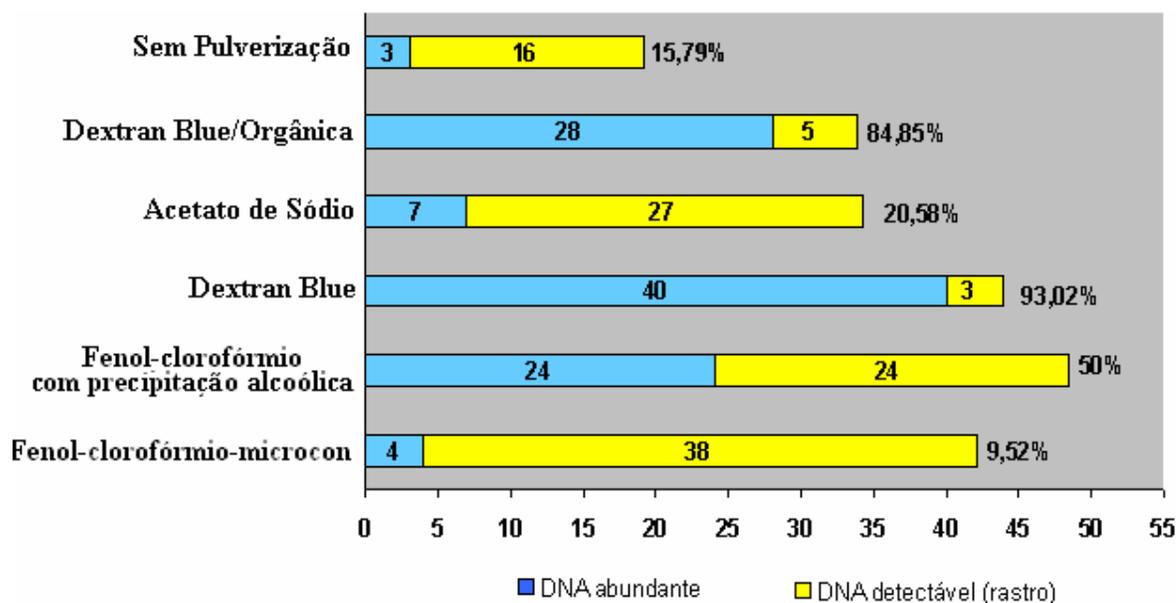


Figura 26. Quantidade e porcentagem de DNA abundante encontrado nas amostras que foram extraídas com sucesso.

A explicação para a baixa quantidade de amostras com DNA abundante no método fenol-clorofórmio-microcon provavelmente é devido ao tratamento drástico do material com fenol e clorofórmio adicionalmente as várias centrifugações e lavagens que o DNA sofre no processo de se manter aderido a membrana concentradora.

O método de fenol-clorofórmio com precipitação alcoólica também apresentou uma diminuição no número de amostras que apresentaram DNA íntegro quando comparado ao número de amostras extraídas com sucesso. Provavelmente devido ao tratamento drástico do material com fenol e clorofórmio. A técnica que emprega o Dextran Blue antes da purificação orgânica não teve grandes perdas, pois o Dextran se liga muito fortemente com o DNA e precipita suas moléculas, deixando todas agrupadas.

A técnica com acetato de sódio não é uma técnica com muitas lavagens e

homogeneizações em vórtex, consiste apenas em solubilizar impurezas que coprecipitam com o DNA, o qual é extraído parcialmente através deste procedimento.

O método sem pulverização provavelmente não conseguiu extrair DNA mais íntegro, uma vez que teoricamente os reagentes não conseguiram penetrar em abundância e capturar o DNA de grande parte das células existentes na amostra, sendo que a quantidade encontrada não era abundante.

V.2 ANÁLISES DAS EXTRAÇÕES EM OSSOS POR QUANTIFICAÇÃO EM ESPECTROFOTOMETRIA DE LUZ UV.

O método mais utilizado para determinar a quantidade de DNA é o ensaio espectrofotométrico. As bases nitrogenadas da dupla fita de DNA apresentam uma absorção máxima no comprimento de onda de 260nm. No entanto, para analisar amostras provenientes de ossos, este método não é o mais indicado para a quantificação de DNA extraída deste tipo de amostra.

Assim como na quantificação através de eletroforese em gel de agarose, a espectrofotometria apresenta a desvantagem que a quantificação não é específica para DNA, mas para ácidos nucléicos em geral como RNA. Além disso, a espectrofotometria não é específica para ácidos nucléicos provenientes de humanos, sendo que além de material genético microbiológico, alguns ácidos provenientes deste tipo de amostra, interferem na detecção real da estimativa de DNA desta amostra (GOODWIN; LINACRE; HADI, 2007). Em publicação sobre DNA antigo, em 1989, Paabo, Higuchi e Wilson, também estimam concentrações de DNA em gel de agarose corado com brometo de etídio. Eles afirmam que é impossível determinar concentrações de DNA por absorvância a 260nm devido a um componente marrom, provavelmente constituído de ácidos húmicos que exibe pico de absorção a 215nm. Desta forma, se a absorvância por ultravioleta for utilizada para estimar a quantidade de DNA, traços de ácidos húmicos contidos na amostra nos darão estimativas errôneas do conteúdo de DNA da amostra analisada. Dessa mesma forma, nosso estudo corrobora esses dados, pois em geral nossas preparações de DNA de ossos que apresentam cor marrom, apresentaram por espectrofotometria, concentrações aproximadamente três vezes maiores que as estimada em gel de agarose (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação dos valores encontrados para a quantificação do DNA através da eletroforese em gel de agarose (calcula pelo programa Gelquant) e através do espectrofotômetro UV (Ultrspec 3000). Valores de concentração expressos em ng/ μ l.

Método de Extração	Fenol Microcon		Fenol Alcoólica		Dextran Blue		Dextran/ orgânica	
	Gel*	Esp*	Gel*	Esp*	Gel*	Esp*	Gel*	Esp*
1-ulna	7,73	50,25	62,10	48,50	-	62,00	-	15,50
2-mandíbula	23,28	18,50	58,00	41,50	13,73	94,50	-	66,50
2-fêmur	24,00	91,00	9,81	15,50	9,29	36,50	26,77	54,00
3-rádio	34,70	76,50	15,68	23,50	-	7,50	17,70	25,50
3-vértebra	6,00	159,50	98,00	119,00	14,70	72,00	23,86	71,50
3-clavícula	34,70	142,00	24,16	46,55	6,87	65,00	9,79	81,00
4-fêmur	6,5	82,50	20,76	54,50	-	123,50	-	-
5-tíbia	3,00	47,50	31,70	53,00	10,77	47,50	12,21	12,00
5-fíbula	14,00	59,50	47,50	84,50	22,00	73,50	46,76	51,50
5-escápula	33,80	91,50	144,12	191,00	11,18	35,00	10,80	22,50
5-crânio	3,05	30,00	102,40	123,50	28,75	11,50	43,37	60,50
5-úmero	3,01	55,00	27,25	67,50	17,90	65,00	19,54	59,50
5-costela	26,00	59,50	123,41	192,00	22,20	56,50	27,64	73,50
5-íleo	30,00	119,50	14,07	67,00	12,00	77,50	16,39	80,50
5-púbis	-	102,50	15,50	340,50	25,27	143,50	28,22	98,00
5-ulna	3,71	67,50	11,64	92,50	11,60	23,50	21,95	14,00
5-rádio	6,00	64,50	5,00	41,00	10,90	16,50	6,75	60,50
6-Tarso/metatarso	-	60,00	2,08	22,50	-	84,50	-	22,50
7-sacro	52,00	159,00	32,80	261,00	98,75	179,50	57,58	57,60

As amostras listadas são provenientes de extrações que não tiveram tratamento com agente descalcificante

*Gel – Quantificação em gel de agarose 1%.

*Esp – Quantificação em espectrofotometria de luz UV, relação de leitura de 260/280nm.

- Significa que a amostra não apresentou valores de concentração que pudessem ser medidos pela técnica.

Neste trabalho realizou-se a quantificação de DNA através de absorvância a 260nm não para se obter valores sobre a concentração de DNA extraído, uma vez também que a quantidade de DNA bacteriano e fúngico em extratos de materiais ósseos frequentemente excedem o DNA humano e a quantificação direta dos ácidos nucléicos totais, por medidas espectrofotométricas, faz pouco sentido. Mas sim, para avaliar a provável presença de ácidos húmicos e fúlvicos nestas preparações de DNA extraídos (relação de leitura de 260/230nm) (Tabela 8) e avaliar também se os métodos de extração empregados eram eficazes para a remoção de resíduos protéicos (relação de leitura de 260/280nm) (Tabela 9), já que aminoácidos aromáticos (especialmente resíduos de triptofano) absorvem ao máximo, luz no comprimento de onda de 280nm (WALKER; RAPLEY, 1999).

Tabela 8. Valores em contrados na quantificação por espectrofotometria de luz UV em relação à leitura 260/230nm. Em destaque as amostras que obtiveram sucesso na amplificação.

Método de Extração	Fenol Microcon		Fenol Alcoólica		Dextran Blue		Acetato de Sódio		Silica DNazol		Silica NaCl		Silica NaI		Dextran Orgânica		Sem *Pó								
	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G		CL							
*Tratamento	1,46	1,28	1,62	0,74	0,44	0,52	1,20	1,05	1,14	0,89	0,54	0,53	0,54	0,37	0,41	0,09	0,15	0,27	0,03	0,05	0,02	1,80	1,80	0,98	1,72
1-ulna	2,20	0,89	0,89	1,14	0,59	0,64	1,08	0,97	0,88	0,65	0,51	0,47	0,81	0,67	0,24	0,08	0,20	0,52	0,06	0,55	0,05	1,40	0,90	0,88	0,85
2-mandíbula	0,79	1,03	1,36	1,00	0,34	0,54	1,19	0,79	1,18	0,50	0,18	0,47	0,57	0,43	0,29	0,04	0,21	0,03	0,08	0,15	0,04	0,78	0,41	0,45	0,90
2-fêmur	1,42	1,15	1,16	0,90	0,37	1,60	1,15	1,03	0,82	0,47	0,17	0,24	0,70	0,41	0,64	0,03	0,17	0,03	0,10	0,04	0,04	1,30	0,80	----	2,0
3-radio	1,42	1,08	0,91	1,58	0,86	0,90	1,18	1,22	1,33	0,63	0,41	0,58	0,46	0,40	0,38	0,08	0,21	0,31	0,09	0,11	0,06	1,60	1,20	1,35	1,12
3-vértebra	1,47	1,26	1,24	0,72	0,64	0,47	1,22	1,36	1,33	0,53	0,41	0,51	0,44	0,33	0,53	0,04	0,22	0,05	0,10	0,06	0,07	0,93	1,00	0,15	1,42
3-clavícula	1,84	1,14	1,08	1,26	0,48	0,80	1,12	1,03	1,20	0,59	0,33	0,40	0,85	0,48	0,88	0,04	0,01	0,10	0,07	0,15	0,06	1,15	0,52	1,08	1,18
4-fêmur	1,06	0,45	1,02	1,10	0,47	0,43	1,15	1,23	1,11	1,10	0,80	0,97	0,21	0,55	0,44	0,22	0,22	0,08	0,10	0,08	0,05	1,10	0,84	----	1,12
5-tíbia	1,07	0,70	1,20	1,04	0,34	0,24	1,40	1,20	1,13	0,40	1,08	0,58	0,28	0,57	0,30	0,04	0,11	0,37	0,05	0,07	0,28	1,50	0,84	1,16	----
5-fíbula	1,52	1,16	1,68	0,91	0,40	0,54	1,10	0,90	1,22	0,27	0,47	0,53	0,13	0,37	0,41	0,05	0,14	0,08	0,07	0,08	0,09	0,90	0,98	1,16	1,67
5-escápula	0,73	0,71	1,70	0,87	0,49	0,50	1,27	1,10	1,27	0,23	0,43	0,53	0,31	0,11	0,15	0,10	0,05	0,20	0,09	0,07	0,08	1,46	0,85	1,08	----
5-crânio	1,54	1,44	1,44	1,04	0,45	0,42	1,09	0,92	1,17	0,30	0,17	0,37	0,21	0,21	0,17	0,02	0,19	0,11	0,07	0,08	0,11	1,24	0,83	1,18	1,25
5-úmero	1,26	0,79	1,30	0,87	0,74	0,65	1,15	1,32	1,22	0,08	0,44	0,29	0,19	0,22	0,13	0,01	0,01	0,01	0,07	0,07	0,07	1,24	1,07	0,74	1,08
5-costela	1,62	1,30	1,47	0,83	0,55	0,41	1,32	1,26	1,13	0,36	0,51	0,49	0,28	0,35	0,48	0,12	0,21	0,15	0,08	0,09	0,10	1,14	0,88	0,92	1,55
5-íleo	1,72	1,48	1,00	1,11	0,86	0,74	1,27	1,06	1,16	0,48	0,54	0,51	0,30	0,64	0,32	0,16	0,15	0,20	0,10	0,01	0,02	1,14	0,97	1,46	1,42
5-púbis	1,42	1,24	1,04	1,16	0,66	0,36	1,35	1,47	----	0,19	0,46	0,58	0,26	0,51	0,31	0,02	0,09	0,07	0,08	0,08	0,04	----	----	----	0,76
5-ulna	1,45	1,38	1,08	1,20	0,51	0,29	1,29	1,20	1,11	0,47	0,25	0,57	0,32	0,13	0,25	0,05	0,01	0,16	0,06	0,04	0,08	0,90	0,97	1,12	1,28
5-rádio	1,06	----	1,35	0,60	0,43	0,33	0,92	1,10	1,00	0,59	0,17	0,35	0,50	0,36	0,30	0,08	0,40	0,57	0,10	0,07	0,05	0,94	0,98	0,85	0,94
6-metatarso	1,37	1,11	1,40	1,07	0,78	0,68	1,27	1,17	1,43	0,73	0,22	0,05	0,25	0,09	0,29	0,10	0,24	0,42	0,07	0,08	0,05	1,90	0,80	1,90	1,21
7-sacro	1,39	1,09	1,26	1,01	0,55	0,58	1,20	1,13	1,16	0,50	0,43	0,47	0,40	0,38	0,36	0,07	0,16	0,20	0,08	0,10	0,07	1,25	0,92	1,03	1,26
Média	1,25			0,71			1,16			0,47			0,38			0,14			0,08			1,07			1,26
Mediana	1,26			0,65			1,17			0,47			0,35			0,10			0,07			0,99			1,21

*Tratamento: T – Testemunha (controle) / D – Descalcificação com EDTA / G – Descalcificação com EGTA/ CL – Clarificação.

* Sem Pó – Método Substitutivo (Sem Pufferizar)

---- A amostra não apresentou valores de relação de leitura de 260/230nm.

Tabela 9. Valores em contrados na quantificação por espectrofotometria de luz UV em relação à leitura 260/280nm. Em destaque as amostras que obtiveram sucesso na amplificação.

Método de Extração	Fenol Microcon		Fenol Alcoólica		Dextran Blue		Acetato de Sódio		Silica DNazol		Silica NaCl		Silica NaI		Dextran Orgânica		Sem *Pó								
	T	D	T	D	T	D	T	D	T	D	T	D	T	D	T	D		CL							
*Tratamento	1,42	1,32	1,62	1,32	1,10	1,10	1,56	1,30	1,48	1,24	1,06	1,10	1,05	1,09	1,08	1,03	1,15	1,06	2,35	1,78	2,60	1,40	1,60	1,12	1,35
1-ulha	1,48	1,44	1,12	1,20	1,10	1,00	1,62	1,40	1,44	1,00	0,99	0,98	1,01	1,02	1,03	1,50	0,98	1,05	6,30	1,98	3,55	1,27	0,85	1,25	1,21
2-mandíbula	1,60	1,42	1,58	1,10	1,10	0,85	1,22	1,08	1,14	0,98	1,10	0,96	1,10	1,05	1,03	1,90	1,14	1,22	6,80	9,80	2,65	1,22	---	1,08	0,82
2-fêmur	1,48	1,57	1,46	1,10	1,00	1,08	1,40	1,46	1,35	1,02	1,00	1,15	0,96	1,01	0,93	1,42	1,06	1,18	3,75	2,18	1,20	1,16	1,15	1,05	1,15
3-rádio	1,34	1,33	1,10	1,32	1,15	1,22	1,68	1,65	1,70	1,01	1,02	1,00	0,97	1,01	1,04	2,00	1,40	1,03	4,40	1,27	2,80	1,36	1,40	1,25	1,28
3-vértebra	1,62	1,60	1,44	1,10	1,16	1,03	1,78	1,52	1,60	1,10	1,04	0,97	0,97	1,00	1,05	---	1,25	1,40	7,20	3,50	6,20	1,18	1,12	0,95	1,30
3-clavícula	1,64	1,80	1,28	1,52	1,05	1,09	1,78	1,48	1,54	0,86	0,90	1,02	1,01	0,97	0,88	0,35	---	1,18	2,68	3,75	2,08	1,30	1,15	1,05	1,25
4-fêmur	1,44	1,50	1,50	1,34	1,20	0,97	1,58	1,48	1,40	1,08	1,00	0,95	0,93	1,00	1,01	1,20	1,03	1,06	4,65	2,25	3,15	1,20	1,12	1,20	1,15
5-tíbia	1,58	1,21	1,46	1,47	1,00	1,03	1,52	1,24	1,25	0,92	1,02	1,02	0,98	0,98	1,02	1,24	1,22	0,87	5,60	4,80	3,25	1,22	1,12	1,40	1,40
5-fíbula	1,58	1,22	1,50	1,34	1,10	1,05	1,65	1,18	1,52	1,00	1,05	1,02	1,10	1,05	1,00	1,70	1,55	1,20	4,25	3,14	4,15	1,55	1,30	1,80	1,60
5-escápula	1,50	1,37	1,48	1,34	1,07	1,10	1,50	1,40	1,35	0,98	1,02	1,00	0,96	0,84	0,96	1,90	1,40	1,16	3,95	1,49	2,62	1,28	0,85	1,35	1,20
5-crânio	1,54	1,45	1,43	1,34	1,06	1,05	1,54	1,85	1,30	0,96	1,03	1,01	1,02	0,97	0,96	1,28	1,08	1,00	2,78	4,50	5,25	1,40	0,40	1,60	1,54
5-úmero	1,62	1,25	1,42	1,22	1,00	1,06	1,72	1,20	1,35	1,06	1,09	1,07	1,21	1,06	1,14	1,90	1,48	1,65	4,05	3,10	3,50	1,54	1,70	1,20	1,25
5-costela	1,55	1,44	1,66	1,22	1,12	1,09	1,66	1,45	1,36	1,02	1,10	1,06	1,01	1,02	1,03	1,45	1,19	1,04	5,28	2,25	3,40	1,44	---	1,45	1,16
5-fleco	1,56	1,45	1,30	1,36	1,24	1,10	1,66	1,42	1,46	1,02	1,17	1,04	1,02	1,00	1,03	1,50	1,10	1,06	6,60	1,14	2,20	1,58	2,20	1,52	1,49
5-púbis	1,54	1,54	1,32	2,10	1,24	1,03	1,80	1,25	---	0,90	1,08	1,02	1,10	1,04	1,04	1,26	1,26	2,00	4,10	5,00	3,30	1,20	1,00	1,04	1,08
5-ulha	1,50	1,58	1,52	1,52	1,13	1,03	1,50	1,48	1,30	1,00	1,00	1,10	1,07	1,15	0,87	1,24	1,12	1,00	3,65	3,50	3,40	1,20	---	1,60	1,20
5-rádio	1,64	1,67	1,51	1,05	1,06	0,96	1,35	1,68	1,45	0,97	0,96	0,98	1,04	1,01	0,96	1,18	1,04	1,01	3,46	3,02	2,55	1,60	1,24	1,80	1,17
6-metatarso	1,64	1,40	1,50	1,22	1,11	1,08	1,60	1,71	1,42	1,10	1,08	1,06	1,01	0,98	1,02	1,18	0,93	1,65	3,65	3,55	1,30	1,72	1,40	1,14	1,39
7-sacro	1,54	1,45	1,43	1,33	1,10	1,05	1,59	1,43	1,41	1,01	1,04	1,03	1,03	1,01	1,00	1,40	1,18	1,20	4,50	3,26	3,11	1,36	1,23	1,31	1,26
Média	1,47			1,16			1,48			1,03			1,01			1,26			3,63			1,30			1,26
Mediana	1,50			1,10			1,48			1,02			1,01			1,19			3,46			1,25			1,25

*Tratamento: T – Testemunha (controle) / D – Descalcificação com EDTA / G – Descalcificação com EGTA/ CL – Clarificação.

* Sem Pó – Método Substitutivo (Sem Puverizar)

----- A amostra não apresentou valores de relação de leitura de 260/280nm.

A relação 260/230nm, entre 1,8 e 2,0 é característica de pureza de soluções de DNA, enquanto que uma diminuição desta relação pode se relacionar com contaminantes que absorvem radiações de 230nm, como é o caso dos ácidos húmicos e fúlvicos e permitem supor a presença de degradação das moléculas de DNA (VALLE; RODRÍGUEZ; ESPINOZA, 2004).

Os nossos resultados demonstraram que a absorção no comprimento de onda em 230nm, geralmente era sempre elevada, sendo muito próxima ou até mesmo superior que os valores encontrados no comprimento de onda 260nm, resultando assim, em baixa relação 260/230nm, até mesmo valores menores que 1,0. Os valores mais próximos de 1,8 foram encontrados para as amostras extraídas com fenol-clorofórmio-microcon (melhor média) e o método sem pulverização (substitutivo), ambos com 1,26, seguida da técnica Dextran Blue (1,16). Quando a extração orgânica foi utilizada posteriormente com a técnica Dextran Blue para ossos pulverizados a média do OD reduziu em relação à técnica utilizando apenas Dextran Blue. Já a relação 260/280nm, mantinha-se quase sempre superior a 1,0, e relativamente próxima de 1,8 para quase todas as técnicas de extração, exceto Sílica com Iodeto de Sódio, que apresentou valores muito maiores que 2,0. Em geral, quase todos os protocolos de extração foram eficazes na remoção das proteínas, sendo que os melhores que se apresentaram foram o Dextran Blue (1,48) e fenol-clorofórmio-microcon (1,47). Soma-se a isso, o fato de que nesses dois métodos não se encontrou nenhuma proporção abaixo ou igual a 0,6, valor que corresponde à presença única de proteínas apenas (VALLE; RODRÍGUEZ; ESPINOZA, 2004).

Nossos resultados encontram-se de acordo com a literatura, uma vez que extrações em ossos, que utilizam o protocolo com filtração em tubos concentradores, apresentam valores para relação 260/280nm um pouco abaixo do esperado para concentrações puras de DNA, resultando geralmente em valores próximos de 1,6. E quando se utiliza o protocolo de extração orgânica com precipitação alcoólica, esta geralmente apresenta baixa relação 260/280nm, com valor próximo de 1,2 (RENNICK; FENTON; FORAN, 2005). Dessa forma, novamente quando se adicionou a extração orgânica ao protocolo de Dextran Blue a média das razões na relação 260/280nm diminuíram.

V.3 Amplificação do DNA *POST MORTEM*

Dos 475 procedimentos realizados, 47 apresentaram sucesso na amplificação (mais de 4 locos amplificados), sendo que os restantes, apresentaram perfil STR baixo (1-3 locos amplificados) ou nenhum loco amplificado em relação a tipagem de regiões nucleares polimórficas do tipo microsatélite utilizando o conjunto comercial *Profiler Plus* (Applied Biosystems) (Tabela 10). Os resultados obtidos com sucesso na etapa de amplificação demonstraram desde a tipagem ótima, todos os locos amplificados, (Figura 27) até o limite inferior de sucesso (Figura 28), fato que é evidenciado na literatura, por grande número de experimentos que demonstram que existe uma relação inversa entre o tamanho do loco e o sucesso na amplificação do PCR em amostras contendo DNA degradado, típicas de cadáveres em estado de decomposição avançado (BUTLER, 2005).

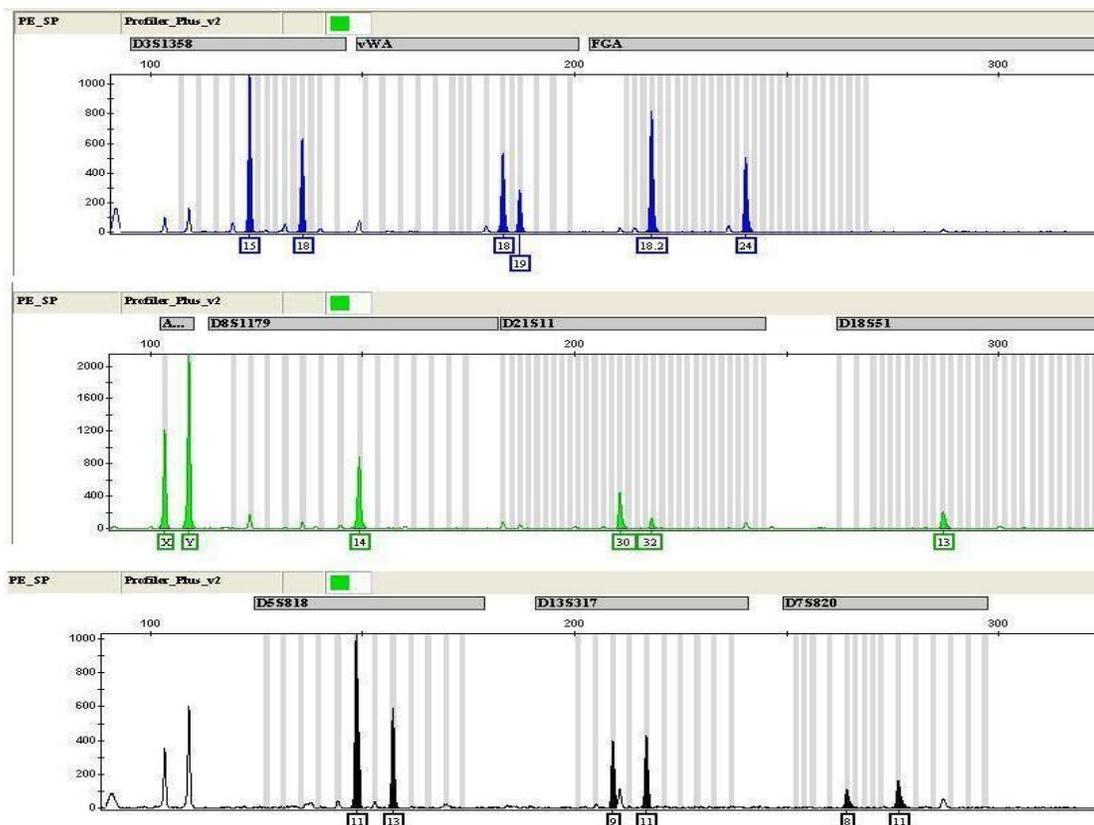


Figura 27. Amplificação total dos 9 locos STR e o loco amel do sistema *Profiler Plus* para o osso do tipo metatarso (amostra “6”) extraído pelo método substitutivo.

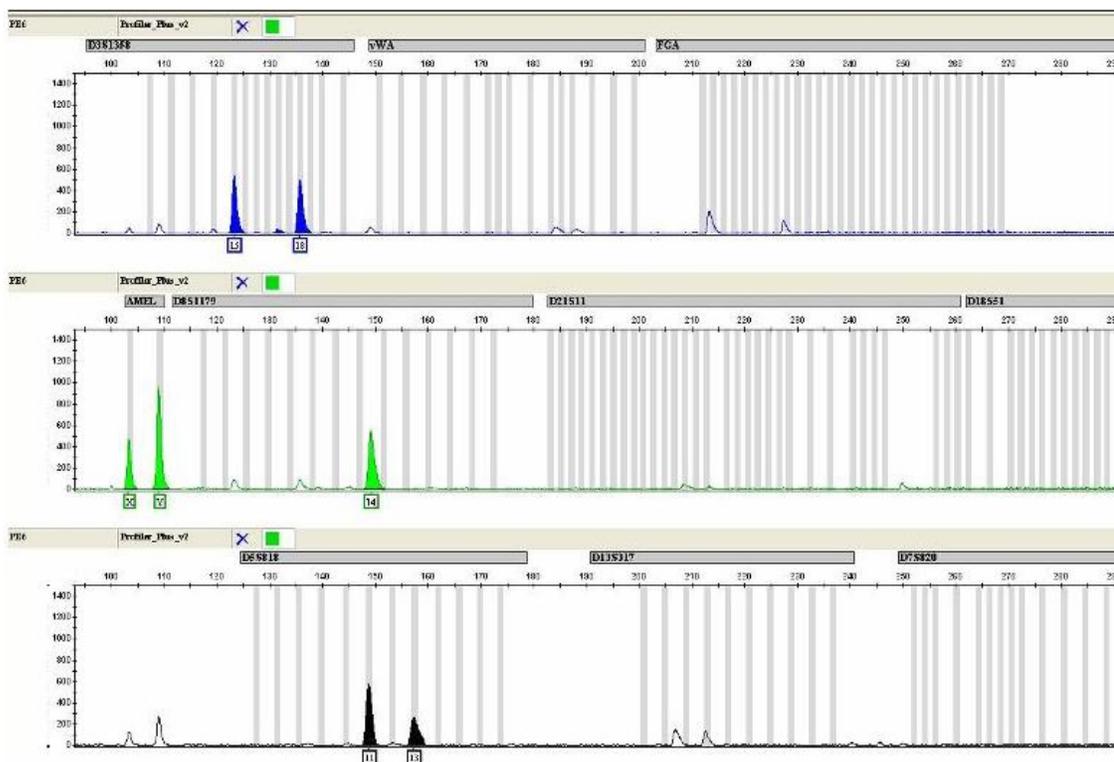


Figura 28. Amplificação parcial para o osso do tipo metatarso (amostra “6”) extraído pelo método fenol-clorofórmio-microcon, sendo apenas os locos de menor tamanho amplificados.

V.4 VARIAÇÕES NAS TAXAS DE SUCESSO DOS STRs NOS DIFERENTES ELEMENTOS ÓSSEOS

No estado de Santa Catarina, as identificações nos casos envolvendo cadáveres são usualmente de dois tipos: a) cadáveres ou suas partes encontradas em diferentes locais e estágios de degradação e b) exumados de cemitérios públicos ou privados. Em ambos os casos o estado de preservação é muito variável, porém os ossos continuam preservados com pouco ou sem tecido mole presente. Dessa forma, como os ossos são rígidos e, portanto, menos suscetíveis a degradação (HOFF-OLSEN et al., 2001), são os tecidos de escolha para a tipagem por DNA.

Em estudos *post mortem*, considera-se a importância do ambiente em que se encontrava o cadáver, principalmente devido à deposição de compostos húmicos na amostra, dificultando assim sua amplificação. A maior taxa de insucessos na amplificação foi verificada nas amostras “3” e “5”, provavelmente pelo local onde os cadáveres foram depositados. A amostra “3” foi encontrada no mangue, um ambiente rico em matéria orgânica e a amostra “5” foi encontrada em uma mata úmida abaixo de uma cobertura de folhas, local com grande decomposição de matéria orgânica e rica em microorganismos e insetos de solo.

Excepcionalmente, ossos bem preservados são encontrados em ambientes úmidos ou molhados, com sedimentos ricos em matéria orgânica ou excrementos. Nesses ambientes ricos em matéria orgânica e umidade, mas não com a imersão completa do material em água, existe a deposição contínua de matéria orgânica que usualmente leva a uma decomposição acelerada do material, com o desenvolvimento de comunidades bacterianas e fúngicas, com o aumento da temperatura no micro ambiente onde se encontra a amostra (NICHOLSON, 1998).

Além disso, nesses ambientes onde os cadáveres “3” e “5” foram encontrados, existe a grande presença de substâncias fenólicas: ácido húmico, ácido fúlvico e o húmus, contaminantes da PCR (GOODYEAR; BLACK, 1994). O material húmico no solo tem tamanho similar e carga característica do DNA resultando em suas co-extrações, principalmente em cadáveres encontrados sob essas condições, evidenciado pela quantidade de cor marrom nas extrações (YEATS et al., 1998) (Figura 29). Estas substâncias constituem-se em uma mistura de um complexo polifenólico formado pelo processo de degradação de substâncias orgânicas através da ação de microorganismos e vermes presentes no solo. Possuem características como: terem grande habilidade em reter grandes quantidades de

água, são polipeptídios, quelam íons metálicos sob condições alcalinas, são ricas em substâncias minerais e orgânicas e possuem extrema capacidade de troca iônica. No estudo sobre bioquímica do DNA proveniente de ossos, Tuross (1994) demonstrou que a adição de 100ng de ácido fúlvico inibia completamente a amplificação por PCR de DNA lambda.

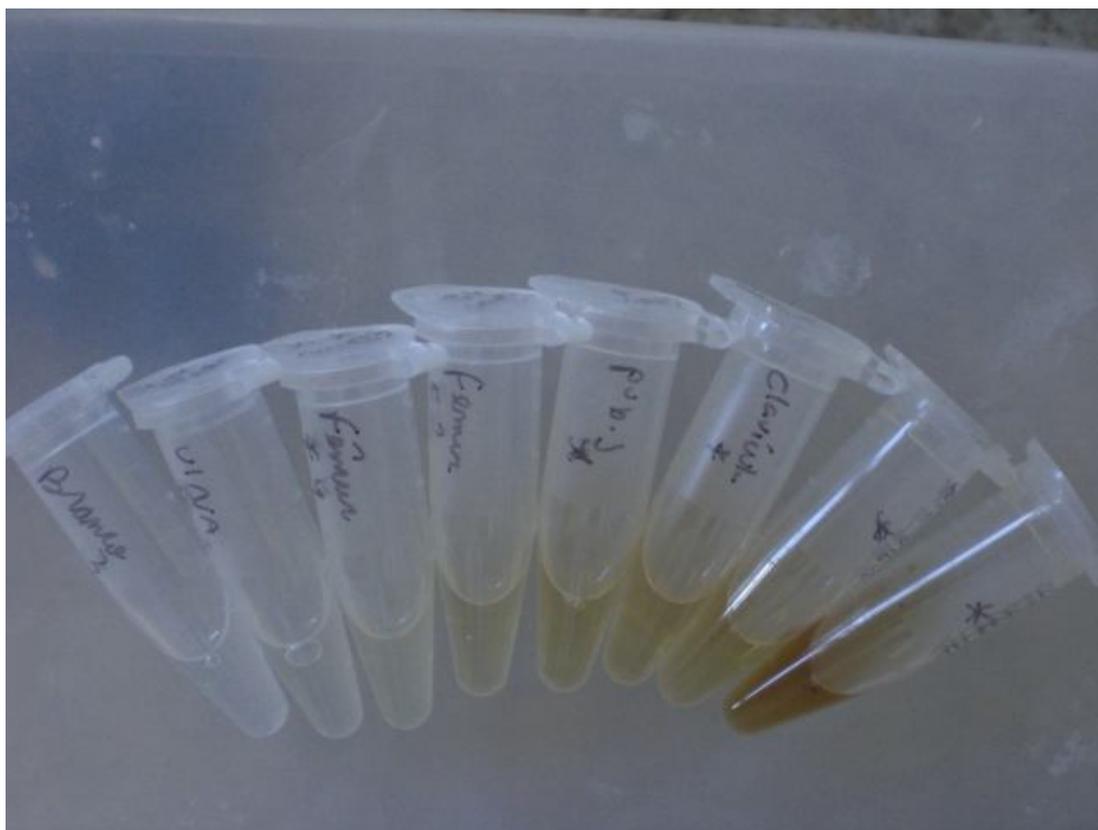


Figura 29. Diferentes concentrações de ácidos húmicos nas amostras de ossos. Na esquerda a mais transparente (controle), à direita mais escura (maior quantidade de compostos fenólicos). Da esquerda para direita, controle (água-ultra pura estéril), ulna 1, fêmur 4, fêmur 2, púbis 5, clavícula 3, costela 5, vértebra 3. Quanto mais escura a amostra maior é a presença de ácidos húmicos. As amostras “3” e “5” foram as que apresentaram maior quantidade de ácidos húmicos.

Ambientes desprovidos de umidade e matéria orgânica acumulada apresentam reduzida atividade bacteriana e favorecem os fenômenos de dessecação e putrefação, situação que conserva mais o DNA, e possui mais chance de amplificação como no caso da amostra “1”. Além disso, diferentemente da amostra “5”, que se encontrava em uma floresta úmida, a amostra “1” dificilmente será coberta casualmente pela natureza, com serrapilheira, material vegetal, sedimentos ricos em matéria orgânica provenientes de lama, os quais em uma floresta podem chegar até 80cm e favorecem a ação de microorganismos de solo (NICHOLSON, 1998).

A amostra “7”, apesar de ser encontrada nas mesmas condições que a amostra “1”, não apresentou a mesma taxa de sucesso de amplificação que ela, no entanto esse fato se deve ao tipo de osso e ao estado de decomposição mais avançado em que a amostra “7” foi encontrada e não ao local onde ambos foram encontrados. O sacro é um osso mais chato e mais esponjoso, sendo que a obtenção de DNA desse tipo de amostra é muito mais difícil (EDSON et al., 2004).

Apesar dos cristais de apatita serem vulneráveis a dissolução quando retirados de condições de equilíbrio fisiológico, eles estão organizados numa estrutura juntamente com o colágeno, que proporciona proteção a superfície dos agregados de cristais, sendo que os cristais dos ossos de cadáveres recentes ou suas partes não se dissolvem na água do mar (TRUEMAN; MARTILL, 2002). Em locais inundados ou em ambientes marinhos, a situação do ambiente referente à preservação do cadáver é similar a ambientes secos, com pouca atividade microbiológica (PENACINO, 1999), além de que os fenômenos cadavéricos que aparecem em uma semana ao ar livre, demoram duas semanas na água para aparecerem e oito semanas em sepultamento normal (BUTLER, 2005), por isso também o maior sucesso de amplificação da amostra “6”.

Os resultados obtidos com a amplificação do material mostraram que a amplificação do material é mais amplamente dependente do estado de conservação da amostra. De acordo com a literatura (MILOS et al., 2007), o tempo considerado do osso depositado em um determinado ambiente não é o principal fator, e sim, certamente mais significativo as condições ambientais experimentadas por este osso durante o tempo em que ele se encontra ali. No nosso estudo, os dois fatores parecem ter sido relevantes, uma vez que as amostras “1” e “6” não apresentavam decomposição do tipo esqueletizado, demonstrando estarem em estado de decomposição mais recentes e pelo tipo de ambiente em que foram encontrados, que proporcionava poucos danos por ataques de bactérias e fungos, e conseqüentemente proporcionaram o maior número de sucesso nas amplificações, 14 e 10 respectivamente.

O interessante, é que alguns ossos que foram amplificados, no entanto, não foram detectados na quantificação em gel de agarose não apresentando banda ou “rastros” de DNA na coluna onde se correu a respectiva amostra, como no caso da amostra “6” nos métodos de extração fenol-clorofórmio-microcon e substitutivo e a amostra “1” no método Dextran Blue-orgânica. Isso se deve ao fato de que as bandas ou “rastros” contidos no gel foram corados com brometo de etídio a baixa concentração, que colore por intercalar-se na dupla-fita de DNA, sendo que concentrações menores que 1ng de DNA não podem ser visualizadas por exame direto em gel na luz ultravioleta (HILLIS; MORTIS, 1990). Dessa forma, estas

amostras poderiam apresentar quantidades menores que 1ng, não sendo detectadas através da eletroforese em gel de agarose, mas amplificadas e detectadas através de eletroforese capilar que tem capacidade de detectar amostras cuja concentração esteja em torno de 0,1ng.

V.5 DESCALCIFICAÇÃO VS. NÃO DESCALCIFICAÇÃO

A degradação do material cadavérico é um processo de muitas fases que envolvem alteração da porção orgânica da matriz óssea, mudanças nos componentes minerais nos níveis moleculares ou nos níveis de agregados de cristais, aumento na produção de fosfato e infiltração nos espaços vasculares pelos minerais provenientes do solo (TRUEMAN; MARTILL, 2002).

Segundo IMAIZUMI (2005), estudos prévios mostraram que o tratamento a partir da descalcificação melhora na recuperação e tipagem do DNA devido à remoção dos íons cálcio que interferem na amplificação do DNA. A hidroxiapatita, maior constituinte do osso, pode interferir na extração do DNA, pois o cálcio presente em sua constituição tem uma alta afinidade pelos grupos fosfatos do esqueleto de DNA. De fato, processos de descalcificação são rotineiramente utilizados com extrações de DNA no campo da antropologia (LATHAM; RITKE 2002; DUGAN et al., 2007).

A descalcificação se faz principalmente pela adição de EDTA junto à amostra já pulverizada. O EDTA é um quelante inespecífico de cátions divalentes, usado com a finalidade de quelar cálcio. Devido a sua inespecificidade o EDTA quela também o magnésio, cofator crítico para a atividade da DNA polimerase, levando a inibição desta enzima na reação da PCR. Desta forma, o presente estudo irá empregar como agente de descalcificação além do EDTA, o EGTA (ácido tetracético etilenoglicol), um quelante específico para cálcio, a fim de obter amostras puras e livres de interferentes, próprias para o uso na PCR e nas análises de genética humana.

Essa etapa seguiu o protocolo padrão de Hagelberg e Clegg (1991), no entanto existem diversos protocolos descritos na literatura que deixam os ossos desde um pequeno período de 12h ou até mesmo 12 dias nesse processo de descalcificação. Dessa forma para estabelecer o protocolo padrão para a nossa etapa de extração foram feitos alguns experimentos em amostras-testes para ver o tempo de remoção do cálcio da amostra.

Após serem adicionados nos respectivos tubos, EDTA a 0,5M e EGTA a 0,5M a amostra ficou incubada sob agitação por um período de 24h. Depois desse tempo, as amostras foram submetidas ao processo de centrifugação, descartado o sobrenadante e

acrescido novamente mais reagente descalcificante. O sobrenadante descartado era submetido a um teste no qual se adicionava algumas gotas de oxalato de amônio saturado. Verificou-se que nos primeiros dois dias após a adição de oxalato de amônio, o sobrenadante descartado ficava com uma coloração escura, devido ao fato que este apresentava uma grande quantidade de cálcio que é insolúvel em oxalato (LATHAM; RITKE 2002). No primeiro dia a cor escura era bem evidenciada, e no segundo dia apenas uma coloração turva. Após três dias, o sobrenadante descartado não apresentava mais a coloração característica de cálcio insolúvel quando adicionado oxalato de amônio. Estes testes foram realizados ao longo de sete dias, sendo que do terceiro ao sétimo dia, não houve diferença nas colorações obtidas. Os resultados foram validados tanto para o EDTA como o EGTA, e a descalcificação de 72h foi adotada como padrão neste trabalho.

A completa descalcificação do osso não implica necessariamente no sucesso da extração de DNA, na verdade em muitos casos reduzem a quantidade de DNA. Entretanto esta etapa é útil também para remover contaminantes solúveis, reduzindo a coloração marrom da amostra pulverizada (HAGELBERG; CLEGG; 1991).

Em relação à descalcificação, os resultados obtidos sem descalcificação, ou com descalcificação a partir de EDTA ou EGTA, não se demonstraram significativamente diferentes, ($X^2_{(2)}= 2,850$, $p=0,2405$).

V.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO UTILIZADOS

A capacidade de isolar DNA com quantidade, qualidade e integridade suficientes representa um requisito essencial em praticamente todas as análises envolvendo Biologia Molecular. Métodos para extrair e isolar o DNA são numerosos e variam em complexidade de acordo com os requisitos da aplicação final.

Os métodos que utilizam fenol e clorofórmio são muito utilizados na literatura, uma vez que o fenol por ser um forte desnaturador de proteínas, facilita a remoção destas dos extratos celulares, tornando-as insolúveis à fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucléicos. O clorofórmio é adicionado ao fenol, pois este além de ser um desnaturador de proteínas, possui também a propriedade de estabilizar a interface celular, reduzindo a quantidade da fase aquosa retida na fase orgânica e aumentando desta maneira a densidade das misturas e facilitando a remoção de lipídios e contaminantes protéicos presentes na fase orgânica, deixando somente os ácidos nucléicos na fase aquosa. O álcool isoamílico (IAA) misturado ao fenol-clorofórmio previne a formação de espuma na solução durante agitação

no vórtex, além de reter proteínas desnaturadas na interface e melhorar a separação das fases (UFRGS, 2007).

No método que utiliza o tubo microconcentrador, o resgate da molécula de DNA se dá através de uma pequena membrana, onde o DNA por seu tamanho maior não consegue atravessar a membrana e fica retido até o final da extração quando o tubo é invertido e o DNA eluído em T.E e centrifugado (Figura 30). Já no protocolo com precipitação (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), o DNA é precipitado através de uma combinação de uma alta concentração de sal e álcool (Figura 31). O isopropanol foi o álcool escolhido para a etapa de precipitação, pois moléculas de DNA muito pequenas (<250pb) são precipitadas ineficientemente por etanol (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

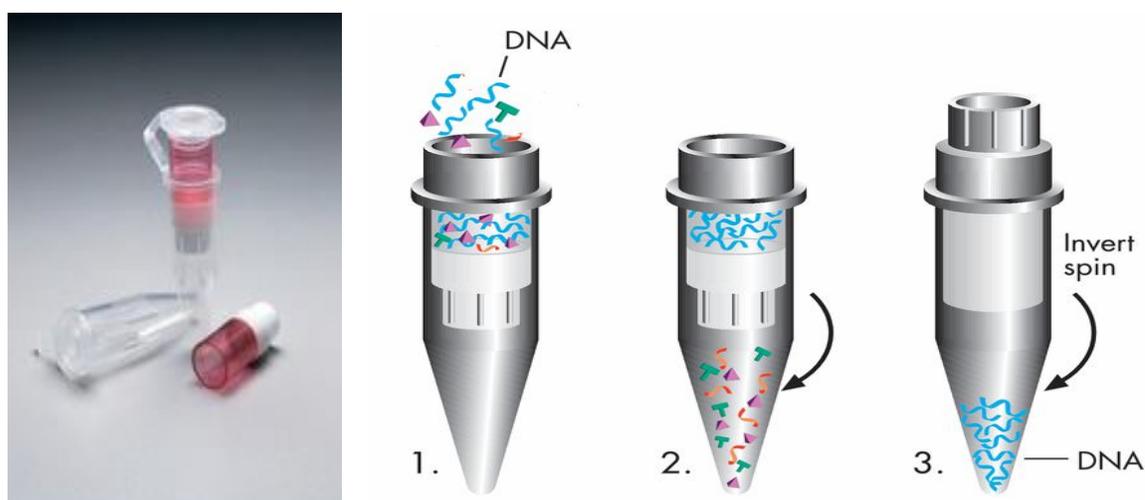


Figura 30. Método de extração Fenol-Clorofórmio com a concentração do DNA sendo realizada por tubo microcon.

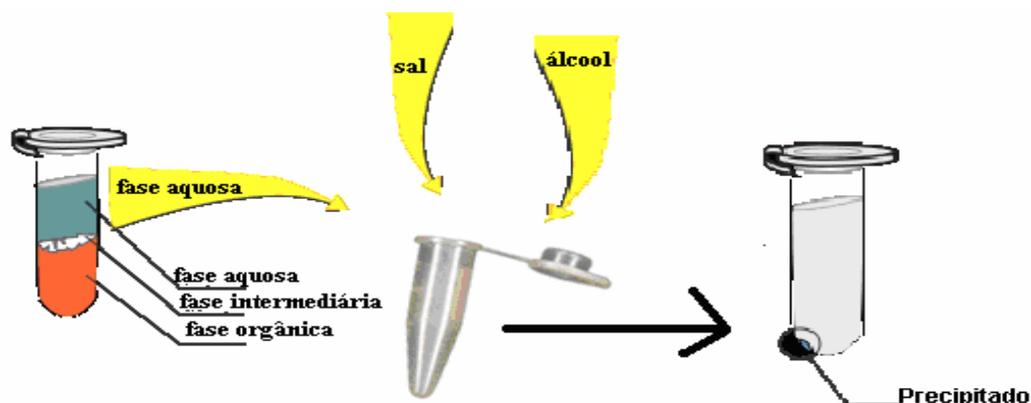


Figura 31. O método fenol-clorofórmio com precipitação alcoólica segundo SAMBROOK; RUSSEL, (2001), é um dos métodos mais comuns de recuperação do DNA e emprega a solubilidade diferencial de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, no solvente orgânico desproteinizante de fenol.

Neste trabalho, não houve diferenças significativas em relação à amplificação, entre os métodos utilizando o tubo microconcentrador e o método com precipitação alcoólica ($p=0,1575$; teste exato de Fischer). No entanto, deve-se preferir a utilização do método com precipitação alcoólica, que tem um procedimento mais fácil e de maior rapidez. Além disso, possui a vantagem, econômica, pois em relação aos custos de material, o método utilizado atualmente pelo IGP-SC tem custo maior, pois apenas a membrana do tubo microcon, tem um custo de aproximadamente R\$ 12,00, por unidade.

Os métodos que utilizam sílica são baseados nas propriedades de inativação de nucleases através de agente caotrópicos (GuSCN, GuHCl, NaI, NaCl, uréia, etc.) junto com as propriedades de ligação de ácido nucléico às partículas de sílica na presença deste agente. Uma substância caotrópica rompe as pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas, aumentando o distúrbio na molécula de DNA.

O método que utiliza sílica e isotiocianato de guanidina é um método rápido e sensível, possuindo grande aceitação na comunidade científica que estuda amostras arqueológicas (HOSS; PAABO, 1993; TUROSS, 1994; YANG et al., 1998). O isotiocianato de guanidina tem-se mostrado um poderoso agente de purificação e detecção do DNA devido seu potencial de lisar células combinado com seu potencial de inativar nucleases. A desvantagem deste método é o alto custo destes reagentes, principalmente do sal, o qual é utilizado em grandes quantidades. Desta forma, o presente trabalho testou três tipos diferentes de agentes caotrópicos em substituição ao isotiocianato de guanidina. O método que utiliza sílica-DNAzol é baseado na lise e nas propriedades de inativação de nucleases do agente caotrópico isotiocianato de guanidina (GUSCN) junto com as propriedades de ligação de ácido nucléico às partículas de sílica na presença deste agente. O DNAzol é um reagente específico formulado para o isolamento de DNA de sangue total. É um método caotrópico, que utiliza o sal isotiocianato de guanidina, que é capaz de romper as membranas celulares e liberar os ácidos nucléicos. A substituição do isotiocianato de guanidina pelo DNAzol neste estudo se deve pelo fato do DNAzol ser um produto comercial de fácil disponibilidade com controles de qualidade bem definidos e com um baixo custo por análise.

Além do DNAzol, foram testados como agentes caotrópicos, o cloreto de sódio e o iodeto de sódio em altas concentrações. A desvantagem destes protocolos, é que quantidades mínimas de partícula de sílica são potentes inibidores da reação de PCR. Os resultados dos protocolos baseados em sílica não foram satisfatórios (figuras 32, 33 e 34), a exemplo de outros casos descritos na literatura onde não houve amplificação de amostras provenientes de ossos da região de Santa Catarina (ARRUDA, 2002).

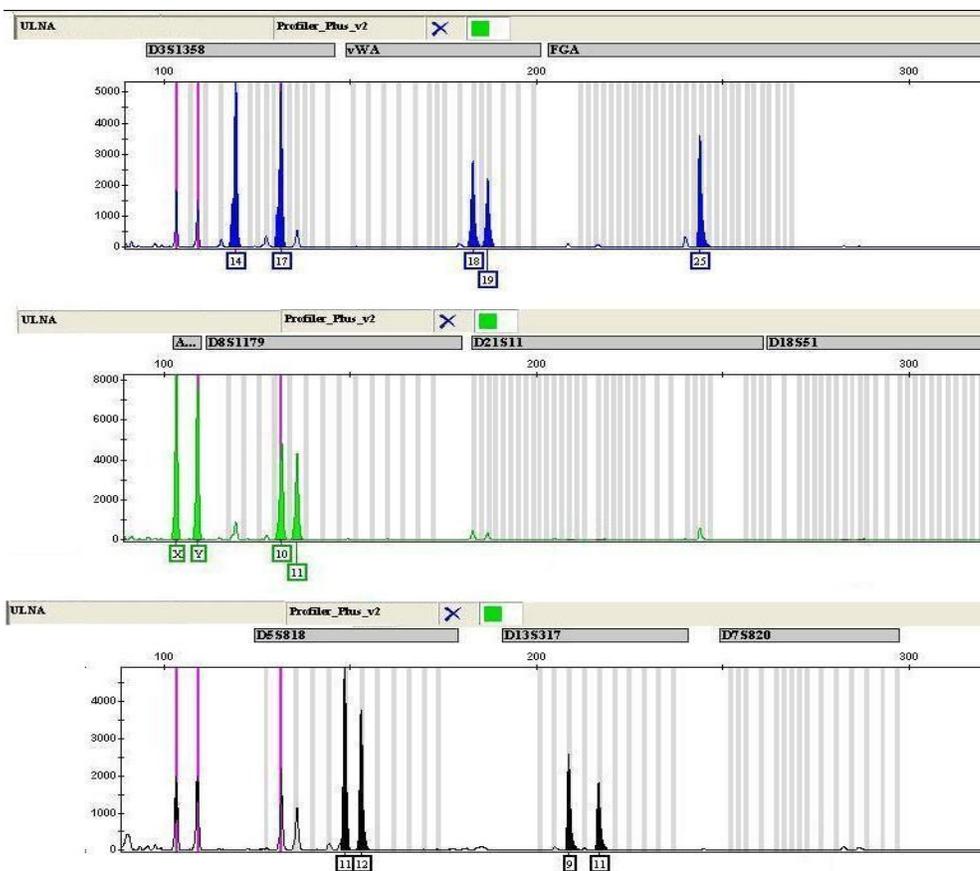


Figura 32. Eletroferograma da amostra ulna 1, extraída pelo método sílica-NaCl. Única amostra que apresentou sucesso na amplificação de 4 ou mais locos para este método de extração.

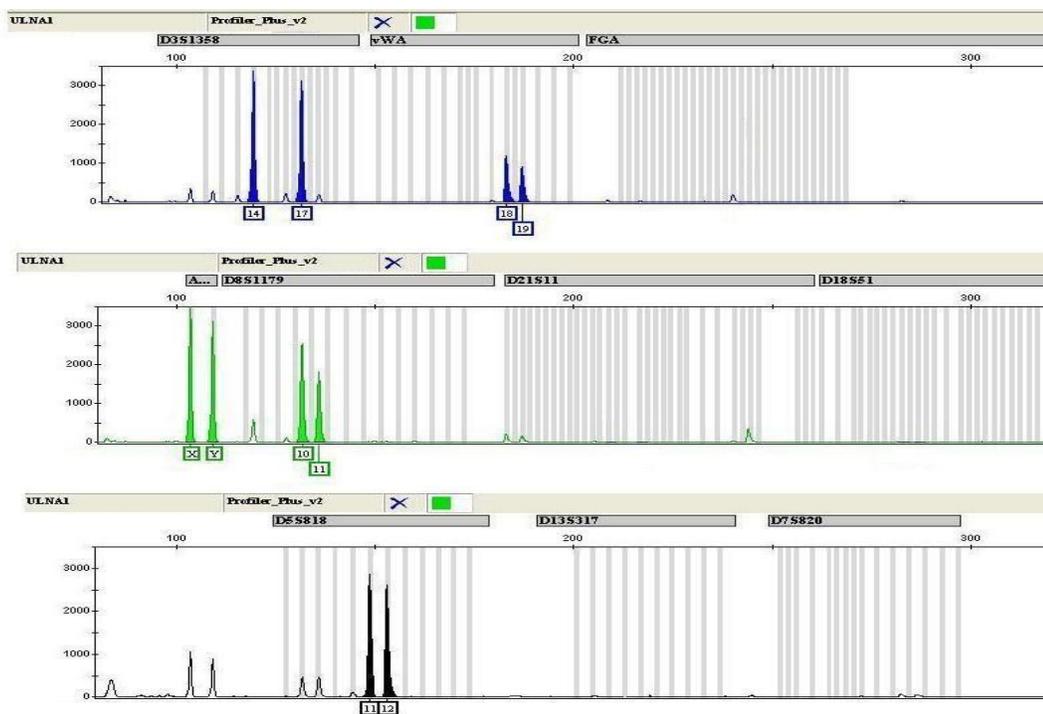


Figura 33. Eletroferograma da amostra ulna 1, extraída pelo método sílica-DNAzol. Única amostra amplificada com sucesso para este método de extração.



Figura 34. Eletroferograma da amostra ulna 1 extraída pelo método sílica-NaI. Nenhuma das amostras submetidas a este método de extração apresentou amplificação para algum loco.

No método de extração proposto por Cattaneo et al. (1997), o acetato de sódio saturado é utilizado para remover quaisquer materiais que não seja ácido nucléico, antes da precipitação com isopropanol. No entanto nestes extratos, frequentemente são encontrados inibidores de PCR (CATANEO, 1997), o que explica o baixo índice de sucesso de amplificação por este método que foi capaz de amplificar apenas as amostras “1” e “4”(Figuras 35 e 36).

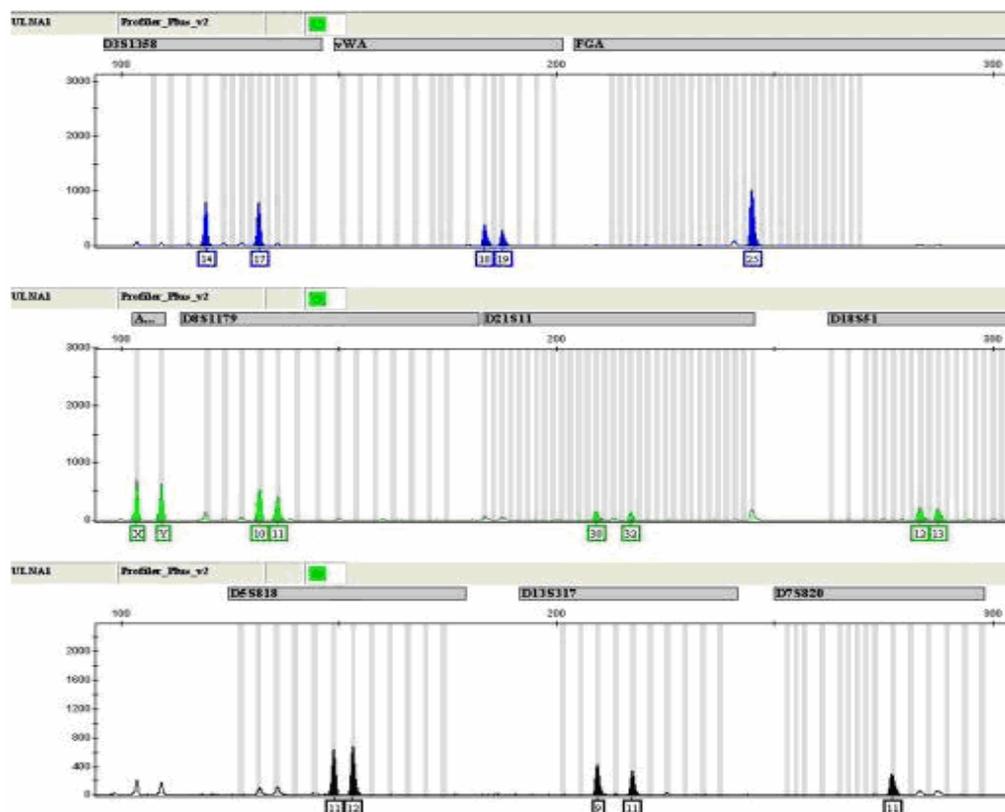


Figura 35. Amplificação total da amostra ulna 1 extraída pelo método acetato de sódio.

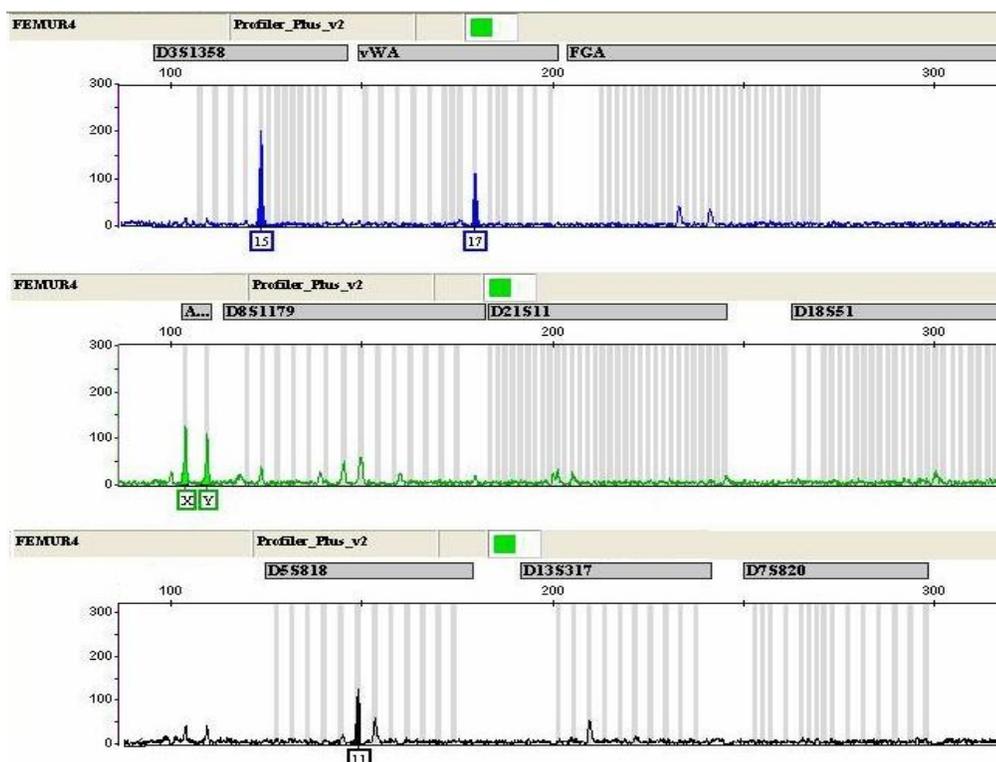


Figura 36. Amplificação parcial da amostra fêmur 4 extraída pelo método acetato de sódio.

A dextrana azul é um reagente utilizado em protocolos recentes de extração de DNA. O “Dextran Blue”, nome comercial do reagente, é extraído do fungo *Leuconostoc mesenteroides* e purificado. É uma molécula de alto peso molecular (2000 daltons), que se precipita facilmente em líquidos. Quantidades mínimas deste reagente diluídos em água já resultam em uma solução de coloração azul, acarretando desta forma, uma vantagem em relação aos métodos de precipitação nos quais a porção precipitada fica invisível. Já foi demonstrado o alto poder de precipitação de ácidos nucleicos através da dextrana azul. Matysiak-Scholze, Dimmeler, Nehls, (1996), demonstraram que a adição de 20µg de Dextran-Blue a 1ng de pUC18 radioativa digerida por *MspI* em 200µl de acetato de sódio a 0.3M e 2,5 volumes de etanol precipitam mais de 90% deste marcador molecular, enquanto na ausência da dextrana azul, nenhuma quantidade de precipitação foi encontrada. O único cuidado que se deve ter, é que amostras de DNA contendo dextrana azul em concentrações acima de 125µg/ml, não são amplificadas pela PCR (MATYSIAK-SCHOLZE, DIMMELER, NEHLS, 1996). Kalmar et al. em 2000, utilizando um protocolo com dextrana azul e precipitação com isopropanol, demonstrou uma técnica eficiente em amplificar DNA de fragmentos ósseos antigos, de baixo custo e sem a utilização de solventes orgânicos danosos como o fenol-clorofórmio. Neste trabalho, reproduziu-se o protocolo de Kalmar et al. (2000), no entanto, houve apenas amplificação em uma amostra de osso (vértebra sem descalcificação) e nas amostras controles provenientes de sangue fresco, descartando a hipótese de que não houve amplificação por adição excessiva de dextrana azul nas amostras.

Dessa forma, o insucesso nas amplificações dos ossos provavelmente ocorreu, pela precipitação conjunta de contaminantes do DNA que já estavam ligados a molécula, antes da adição da dextrana a amostra. Dessa maneira, uma etapa de purificação foi acrescentada ao protocolo descrito por Kalmar et al. (2000).

O procedimento de purificação de escolha foi o método fenol-clorofórmio com precipitação alcoólica proposto por Sambrook e Russel (2001), e já descrito neste trabalho, com apenas uma modificação. Na precipitação alcoólica, posterior à fase de extração orgânica, o sal utilizado foi o acetato de amônio 2M em substituição ao acetato de sódio, uma vez que poderia ainda existir traços de acetato de amônio na amostra provenientes do protocolo anterior. Os resultados demonstraram uma melhora significativa, amplificando 13 amostras a mais ($p=0,0002$; teste exato de Fischer), em relação ao método utilizando apenas a dextrana azul (Figuras 37 e 38). Sendo que este protocolo modificado, amplificou mais amostras que o método fenol-clorofórmio-microcon, apesar de não ser estatisticamente significativo ($0,0730$; teste exato de Fischer).



Figura 37. Eletroferograma da amostra ulna 1 extraída pelo método Dextran Blue, exibindo ausência de amplificação para todos os locos do sistema *Profiler Plus*.

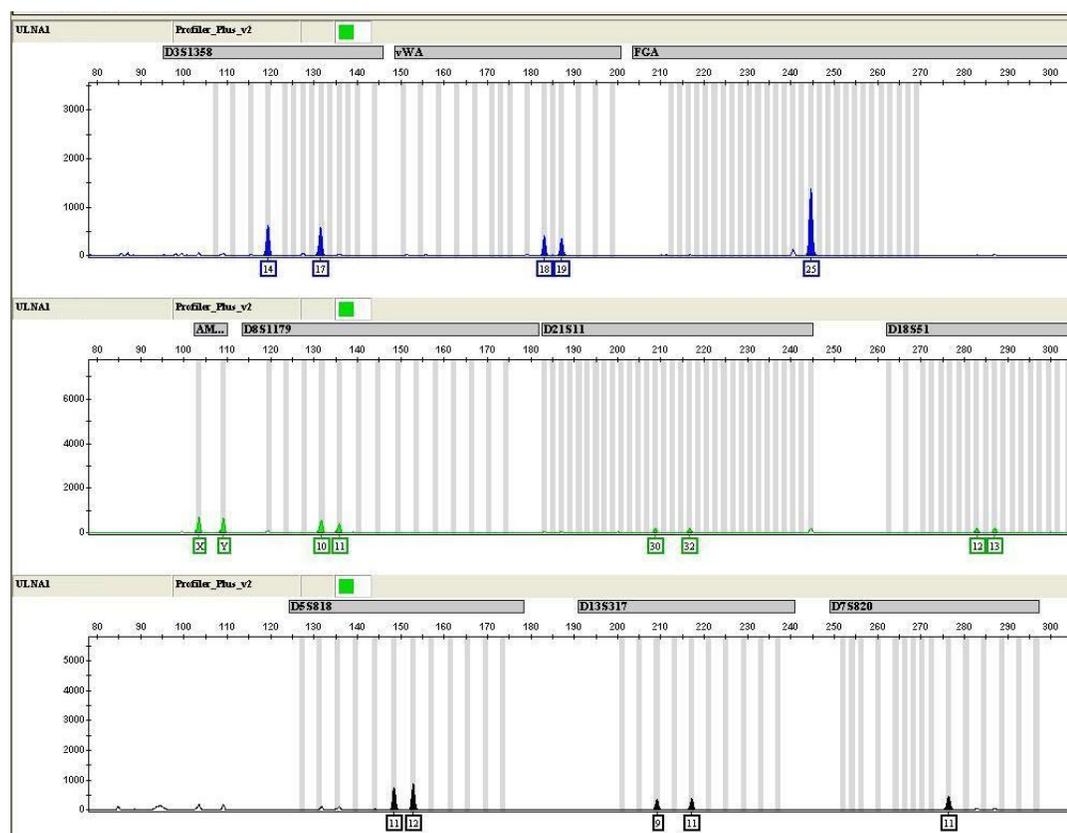


Figura 38. Eletroferograma da amostra ulna 1 extraída pelo método Dextran Blue-orgânica, exibindo amplificação total dos locos e demonstrando a eficiência da etapa de purificação deste método.

Como visto, já existe um grande número de procedimentos utilizados pela comunidade forense para extração de DNA em ossos, e todos eles empregando nitrogênio líquido e métodos de pulverização dos fragmentos ósseos. Assim, neste trabalho foi realizada a extração de DNA de material não pulverizado. A pulverização é uma técnica que consome tempo e oferece um risco de contaminação cruzada, pois os frascos onde são colocadas as amostras são reutilizados, além do custo e da disponibilidade de nitrogênio líquido.

Neste tipo de extração foi realizada uma etapa distinta dos outros métodos: a clarificação. A clarificação é um método muito utilizado em procedimentos que visam à extração de DNA viral de águas muito contaminadas ou solos lodosos. O seu objetivo é reter as partículas maiores, encontradas nesses ambientes, além de retirar o excesso de bactérias e fungos da amostra. O protocolo utilizado neste trabalho foi descrito por MIGNOTTE; MAUL; SCHWARTZBROD (1999), com o objetivo de reduzir a quantidade de solo e outros contaminantes da superfície dos fragmentos ósseos. O protocolo de extração adotado (método substitutivo) foi o mesmo que o descrito anteriormente, uma junção dos protocolos de Kalmar et al. (2000) e Sambrook e Russel (2001) modificado. A extração por este método conduziu ao maior percentual de amostras amplificadas, apresentando até mesmo, ampliações para todos os locos testados em algumas amostras (Figura 39).

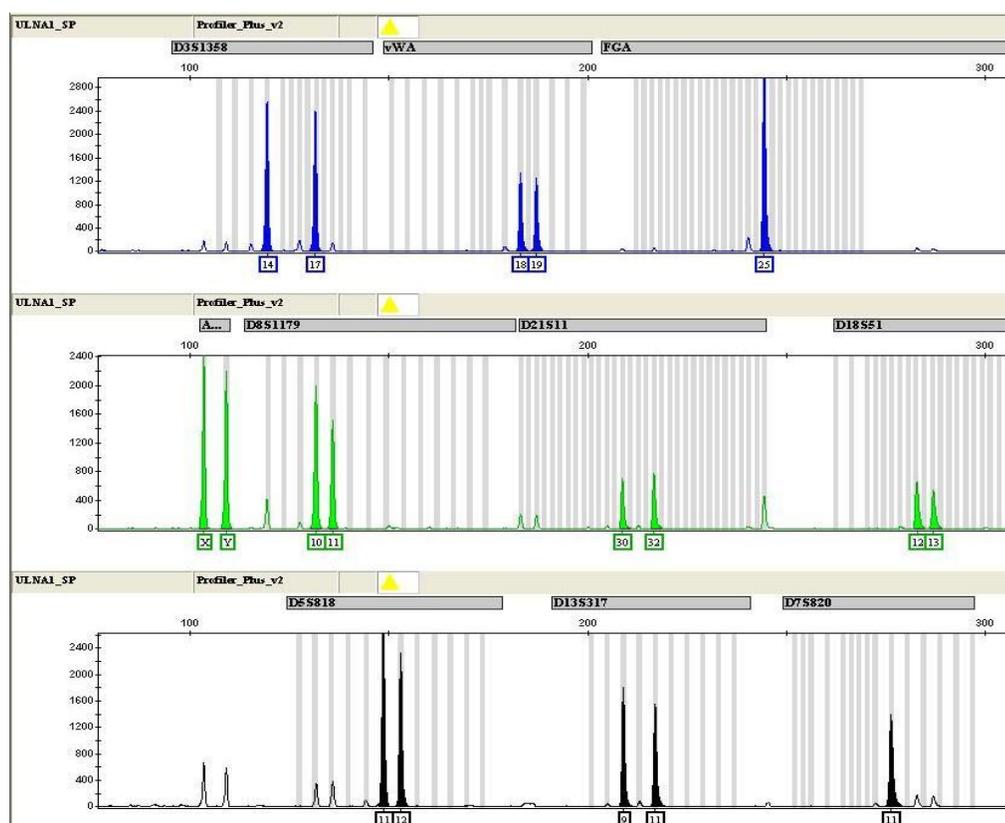


Figura 39. Amplificação total dos 9 locos STRs e o loco amelogenina para a amostra ulna 1 submetida a extração de DNA pelo método Substitutivo.

As amostras processadas com MicroconTM-100 obtiveram os melhores resultados em relação a pureza do DNA extraído dentre as amostras que mais amplificaram (fenol-clorofórmio-microcon; fenol-clorofórmio com precipitação alcoólica; acetato de sódio; Dextran Blue-orgânica e método substitutivo), tanto nas densidade ópticas (DO) de 260/280nm quanto na de 260/230nm. No entanto não foram diferentemente significativas do método substitutivo em relação à leitura em DO de 260/230nm (Tabela 11). Sendo que o método fenol-clorofórmio-microcon se mostrou superior e se diferenciou estatisticamente dos outros métodos em relação à leitura na DO de 260/280nm (Tabela 12).

Tabela 11. Resultados estatísticos demonstrando a diferença significativa entre o método fenol-clorofórmio-microcon e os outros métodos de extração de DNA utilizados neste trabalho, exceto quando comparado ao método sem o procedimento de pulverização da amostra (método substitutivo) em relação à leitura das razões entre as densidades ópticas de 260/230nm.

Métodos em questão que obtiveram mais ampliações comparação leitura 260/230nm	Valor de t (teste t independência)	Valor de p bilateral	Possuem diferença estatística
fenol alcoólica x microcon	9,0339	p<0,0001	SIM
dextran-orgânica x microcon	2,8070	0,0059	SIM
acetato de sódio x microcon	15,2418	p<0,0001	SIM
substitutivo x microcon	0,1556	0,8768	NÃO
substitutivo x fenol alcoólica	6,2414	p<0,0001	SIM
substitutivo x dextran-orgânica	1,9971	0,0498	SIM
dextran-orgânica x fenol alcoólica	5,5443	p<0,0001	SIM
dextran-orgânica x acetato de sódio	10,5325	p<0,0001	SIM
fenol alcoólica x acetato de sódio	4,8442	p<0,0001	SIM
substitutivo x acetato de sódio	9,2387	p<0,0001	SIM

Tabela 12. Resultados estatísticos demonstrando a diferença significativa entre o método fenol-clorofórmio-microcon e os outros métodos de extração de DNA utilizados neste trabalho, em relação à leitura das razões entre as densidades ópticas de 260/280nm.

Métodos em questão que obtiveram mais ampliações comparação leitura 260/280nm	Valor de t (teste t independência)	Valor de p bilateral	Possuem diferença estatística
fenol alcoólica x microcon	10,1572	p<0,0001	SIM
dextran-orgânica x microcon	4,0192	0,0001	SIM
acetato de sódio x microcon	22,004	p<0,0001	SIM
substitutivo x microcon	5,3424	p<0,0001	SIM
substitutivo x fenol alcoólica	2,0961	0,0394	SIM
substitutivo x dextran-orgânica	0,6853	0,04962	SIM
dextran-orgânica x fenol alcoólica	3,0709	0,0028	SIM
dextran-orgânica x acetato de sódio	6,9244	p<0,0001	SIM
fenol alcoólica x acetato de sódio	5,0785	p<0,0001	SIM
substitutivo x acetato de sódio	5,6785	p<0,0001	SIM

Dessa maneira o método substitutivo demonstrou ser, juntamente com o método fenol-microcon, o melhor método para remover as substâncias húmicas presentes nas amostras extraídas, retirando desta forma, a principal fonte de inibição da reação em cadeia da polimerase deste tipo de amostra.

Em relação aos métodos de extração e a taxa de sucesso de sua amplificação, houve diferenças significativas entre os métodos de extração, quando analisados todos os métodos que tiveram pelo menos uma amplificação (excluiu-se apenas o método sílica-NaI). Os valores encontrados no teste do qui-quadrado foram $X^2_{(7)} = 44,612$; $p < 0,0001$ e no teste-G foram $X^2_{(7)} = 45,0623$; $p < 0,0001$.

Sendo assim, foram selecionados apenas os testes que apresentaram mais de uma amplificação (fenol-clorofórmio-microcon; fenol-clorofórmio com precipitação alcoólica; acetato de sódio; Dextran Blue-orgânica e método substitutivo) sendo que estes ainda apresentaram diferenças entre eles no teste do qui-quadrado $X^2_{(4)} = 12,610$; $p = 0,0133$ e no teste-G foram $X^2_{(4)} = 12,8085$; $p = 0,0123$

Desta forma, foi realizada através do teste exato de Fischer, uma comparação entre estes métodos um a um, para ver quais métodos se diferenciavam um do outro (Tabela 13).

Tabela 13. Resultados estatísticos demonstrando a diferença significativa entre o método substitutivo e o método fenol-clorofórmio-microcon em relação ao número de sucessos de amplificações em cada método.

Métodos em questão	Valor de p (Fischer)	Possuem diferença estatística
Fenol alcoólica x microcon	0,1575	NÃO
Dextran/fenol x microcon	0,0730	NÃO
Acetato de sódio x Microcon	0,2639	NÃO
Substitutivo x microcon	0,0240	SIM
Substitutivo x fenol alcoólica	0,1425	NÃO
Substitutivo x dextran/fenol	0,2267	NAO
Dextran fenol x fenol orgânico	0,4119	NÃO
dextran/fenol x Acetato de sódio	0,0094	SIM
Fenol alcoólica x acetato de sódio	0,0283	SIM
Substitutivo x acetato de sódio	0,0039	SIM

Em relação à amplificação, a falta de pureza das amostras nos métodos fenol-clorofórmio com precipitação alcoólica, Dextran Blue-orgânica e Substitutivo, em relação à densidade óptica 260/280nm parece ter sido compensada pela maior quantidade de material (demonstrado através da quantificação em gel de agarose), uma vez que houve um maior número de sucessos de amplificações nestes métodos de extração.

Os resultados demonstram que o método de extração fenol-clorofórmio-microcon não se diferencia significativamente do método que utiliza apenas acetato de sódio, enquanto todos os outros métodos acima destacados se diferenciam deste.

Também se verifica que o único método que se diferencia significativamente do atual procedimento de extração estabelecido pelo IGP-SC (fenol-clorofórmio-microcon) é o método Substitutivo (sem pulverização).

V.7 RELAÇÃO CUSTO BENEFÍCIO DOS MÉTODOS EMPREGADOS

Várias metodologias são empregadas para obtenção de DNA a partir de ossos e dentes, e todos eles empregando nitrogênio líquido e métodos de pulverização dos fragmentos ósseos. Algumas utilizam o moinho mineralógico (HÖSS et al., 1993, VERNESI et al., 2001), ou pulverização com nitrogênio líquido em cadinho e pistilo autoclavados (SIVAGAMI et al., 2000, MURAKAMI et al., 2000), ou incisão e pulverização com broca dentária ou broca de furadeira (GILBERT et al., 2004). O IGP-SC utiliza o moinho criogênico como outros trabalhos descritos na literatura (ALONSO et al., 2001, Meyer et al., 2000), no entanto todas estas metodologias ou são muito caras ou pouco práticas.

Primeiro considerando os valores: o moinho criogênico custa aproximadamente R\$ 80.000,00, um valor alto para os laboratórios de perícias públicos e consomem um alto volume de nitrogênio líquido. Se colocarmos que o valor de nitrogênio líquido de menor custo encontrado é de R\$4,50 o litro e sendo que em cada processo de moagem se gasta em média 8 litros de nitrogênio líquido, a cada processo de moagem são gastos 36 reais só em nitrogênio líquido. Acrescenta-se a isto, o fato que a entrega deste nitrogênio líquido com o menor custo é realizado apenas uma vez ao mês, deve-se encher o tanque de armazenamento que têm capacidade para 50 litros, acarretando 225 reais por mês em despesas com nitrogênio líquido, sendo que sua ausência acarreta em casos de urgência parados nesta etapa por falta deste material. O uso alternativo de equipamentos dentários de pulverização por alta-rotação tem também alto custo.

Segundo, em relação à praticidade: o moinho criogênico utiliza frascos específicos para o seu aparelho. Juntamente com o aparelho padrão, vem 4 tubos completos (frasco, tampa superior, tampa inferior e barra moedora). Após cada ciclo de moagem, que pode moer no máximo 4 amostras diferentes, deve-se esterilizar o material, para retirar o material biológico e contaminantes da amostra anterior, acarretando em uma perda de tempo, para o

profissional que poderia pulverizar mais amostras. Podem-se adquirir mais tubos para o processo de moagem, enquanto um jogo de tubos estiver esterilizando, o segundo jogo de tubos é colocado no aparelho. No entanto, o custo para se obter um jogo de tubos sobressalentes (4 frascos completos) é de R\$ 14.000,00. Se não fossem apenas esses fatores, existe um terceiro item a ser considerado. Os frascos criogênicos são estreitos, sendo que fragmentos de ossos muito largos não podem ser colocados inteiros, devendo ser fragmentados em pedaços menores, pois existe o risco da barra moedora ficar presa durante o processo, devido a fragmentos grandes colocados no tubo e o processo de pulverização não ser concretizado. Pouco prático também são os métodos alternativos que utilizam pistilo e o cadinho, que possuem baixo custo, mas ainda que possa ser autoclavado, é passível de contaminação por ser muito poroso e espalha pó no ambiente de extração, o que para um laboratório forense, não é recomendável. Dessa forma em relação aos custos e a praticidade, comparou-se o uso do moinho criogênico com o método substitutivo descrito no trabalho.

O moinho criogênico apresenta a vantagem de aumentar a área da amostra para receber os reagentes provenientes da extração através da pulverização. No entanto, como analisado anteriormente possui algumas desvantagens que podem ser resolvidas com este método substitutivo.

No método sem pulverização fragmentos inteiros podem ser colocados em tubos cônicos de 50ml, que são tubos mais largos que os tubos criogênicos, diminuindo assim, o esforço manual para se obter fragmentos ósseos cada vez menores para caber no tubo criogênico.

A segunda vantagem, é que os tubos cônicos de plástico são descartáveis e de baixo custo, após a sua utilização em uma amostra ele pode ser descartado, sendo as amostras seguintes acondicionadas em novos tubos, excluindo-se possíveis contaminações.

Uma terceira vantagem deste método substitutivo é que ele pode ser realizado no momento que o profissional deseja, não dependendo da entrega do nitrogênio líquido, ou se os tubos já foram esterilizados após uma utilização anterior.

A quarta grande vantagem é em relação ao custo, imaginando-se o valor a ser empregado na compra do moinho criogênico (R\$80.000,00) e um jogo de tubos sobressalentes (14.000,00), sem contar o custo mensal em nitrogênio líquido, a quantidade de reagentes que podem ser adquiridos para uma maior otimização deste método substitutivo. Para se ter um verdadeiro parâmetro disto, é só considerar os reagentes utilizados neste trabalho para este método substitutivo. Foram empregados apenas reagentes de utilização básicos em etapas de extrações e tubos cônicos simples que já produziram resultados

melhores dos que apresentados pelo método que utiliza a pulverização e a obtenção de DNA por tubos microconcentradores. Se fosse investido um bom valor realmente nisto em parcerias com as Universidades, com certeza métodos substitutivos já demonstrariam resultados mais eficientes, do que os obtidos neste trabalho.

A quinta vantagem é a redução do número de etapas antes da extração do DNA. Enquanto no método com pulverização, além da obtenção dos fragmentos através da serragem do osso, o profissional ainda deve obter fragmentos menores a partir dos fragmentos anteriores, pulverizar a amostra e realizar a esterilização do material utilizado, enquanto no método substitutivo deve apenas realizar a obtenção dos fragmentos através da serragem do osso.

Ao analisarmos os quatro métodos que produziram mais ampliações (fenol-clorofórmio-microcon, fenol-clorofórmio com precipitação alcoólica, Dextran Blue-orgânica e método substitutivo), o que possuiu a maior porcentagem de sucesso em ampliações foi o método substitutivo com 36,84%, seguido do mesmo protocolo, mas com o acréscimo da etapa de pulverização 24,56%, o método orgânico com precipitação 21,05% e por último, o método fenol-clorofórmio microcon 12,28%.

Se formos levar em conta que o método substitutivo não teve o procedimento de descalcificação, e analisarmos junto com os três métodos acima também se levando em conta somente as amostras sem descalcificação, o método sem pulverização teve um maior número de ampliações (7 em 19 amostras) contra 6/19 do método dextran-fenol, 5/19 do método fenol-clorofórmio com precipitação e 2/19 do método fenol-microcon. Mesmo os resultados obtidos não sejam diferentemente significantes $X^2_{(3)} = 3,800$; $p = 0,2839$ e no teste-G foram $X^2_{(3)} = 4,2082$; $p = 0,2398$; a não pulverização do material, demonstra ser o método com o melhor custo benefício deste trabalho, principalmente quando comparado ao atual método de extração utilizado pelo IGP-SC (Tabela 14), o qual apresentou diferenças significativas quando comparadas ao método Substitutivo (Figuras 40A, B).

Tabela 14. Comparação entre os métodos fenol-clorofórmio-microcon e a metodologia sem pulverização apresentados neste trabalho.

Metodologia	Metodologia Atual	Metodologia sem pulverização (Substitutivo)
Equipamento/ Material Requerido	<ul style="list-style-type: none"> ● Moinho Criogênico ● Nitrogênio Líquido ● Tubos Microcon e microtubos simples 	<ul style="list-style-type: none"> ● Tubos Cônicos de 50ml ● Microtubos simples
Passos Típicos do Processo	<ul style="list-style-type: none"> ● Serrar o osso em fragmentos ● Obtenção de fragmentos menores ● Pulverização ● Aliquotar o material ósseo pulverizado ● Incubação ● Extração do DNA* 	<ul style="list-style-type: none"> ● Serrar o osso em fragmentos ● Incubação ● Extração do DNA*
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> ● Aumento da área de contato da amostra 	<ul style="list-style-type: none"> ● Baixo custo ● Fácil manuseamento ● Baixo risco de contaminação externa ● Eficiência ● Economia de tempo ● Rápida reprodutibilidade

*Apesar de possuir mais etapas, o protocolo de extração do método substitutivo possui menos gastos em relação aos métodos que utilizam Fenol-Clorofórmio-IAA, pois utiliza metade dos volumes deste reagente quando comparado ao protocolo do FBI (1996). Além disso, o principal reagente deste método, a dextrana azul é utilizada em quantidades diminutas (solução estoque 20µg/ml), sendo que seu preço no comércio é de R\$115,58 por 10g do produto (SIGMA).

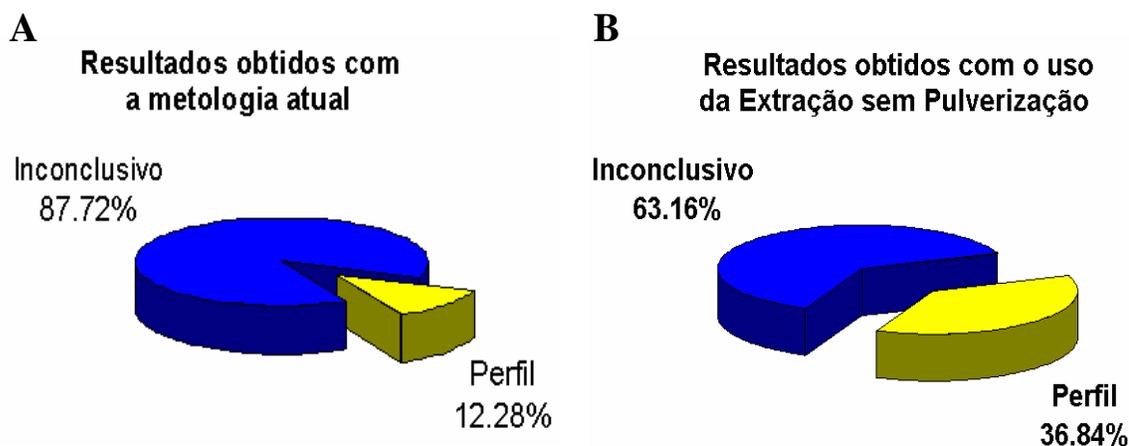


Figura 40 **A.** Resultado, empregando a metodologia fenol-clorofórmio-microcon (atualmente utilizada pelo IGP-SC, na resolução de identificações em ossos) para a obtenção de DNA dos 19 ossos obtidos neste trabalho. **B.** Resultado obtido empregando um novo método de extração de DNA em ossos, o qual não utiliza a pulverização dos mesmos.

V.8 – ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA E PARÂMETROS FORENSES DO ESTADO DE SANTA CATARINA

As frequências alélicas observadas na população de Santa Catarina são apresentadas abaixo, na tabela 15 e os parâmetros forenses desta população na tabela 16.

Tabela 15. Frequências alélicas da população de Santa Catarina para os 15 locos STRs do conjunto comercial *Identifiler*.

(continua)

Alelo (N)	D8S1179 (452)	D21S11 (450)	D7S820 (445)	CSF1PO (445)	D3S1358 (451)	TH01 (451)	DI3S317 (450)	DI6S539 (448)	D2S1338 (432)	DI9S433 (437)	vWA (452)	TPOX (448)	DI8S51 (447)	D5S818 (450)	FGA (449)
5								0,001				0,002			
6				0,001		0,205		0,001				0,011			
7			0,017	0,006		0,194	0,003	-				0,003		0,021	
8	0,008		0,124	0,010		0,139	0,132	0,016				0,496		0,003	
9	0,012		0,128	0,019		0,143	0,087	0,137				0,098	0,001	0,034	
9,3	-		-	-		0,305	-	-				-	-	-	
10	0,083		0,272	0,293		0,014	0,061	0,090		0,002		0,069	0,007	0,067	
11	0,077		0,253	0,309	0,003		0,269	0,292		0,011	0,003	0,273	0,011	0,319	
12	0,150		0,161	0,298	-		0,287	0,290		0,093	-	0,046	0,121	0,371	
12,2	-		-	-	-		-	-		0,009	-	-	-	-	
13	0,291		0,039	0,052	0,002		0,104	0,155		0,302	0,002	0,001	0,101	0,168	
13,2	-		-	-	-		-	-		0,026	-	-	-	-	
14	0,235		0,007	0,012	0,104		0,056	0,015	0,001	0,244	0,112		0,191	0,013	
14,2	-		-	-	-		-	-	-	0,026	-	-	-	-	
15	0,116				0,279		0,001	0,002	0,002	0,181	0,115		0,155	0,003	
15,2	-				-				-	0,043	-		-		
16	0,019				0,248				0,042	0,046	0,243		0,125		
16,2	-				-				-	0,011	-		-		
17	0,009				0,225				0,263	0,002	0,229		0,133	0,003	
17,2					-				-	0,001	-		-	-	
18					0,126				0,091	-	0,211		0,053	0,008	
18,2					-				-	0,001	-		-	0,006	
19					0,009				0,117		0,067		0,053	0,079	
19,2					-				-	-	-		-	0,001	
20					0,002				0,135		0,013		0,036	0,116	
21									0,021		0,003		0,006	0,161	
21,2									-		-		-	0,003	
22									0,061				0,006	0,165	
22,2									-				-	0,003	
23									0,112				0,001	0,155	
23,2									-				-	0,001	
24									0,071				0,001	0,158	
24,2		0,001							-					-	

Tabela 15. Frequências alélicas da população de Santa Catarina para os 15 locos STRs do conjunto comercial *Identifiler*.

															(conclusão)
Alelo (N)	<i>D8S1179</i> (452)	<i>D21S11</i> (450)	<i>D7S820</i> (445)	<i>CSFIPO</i> (445)	<i>D3S1358</i> (451)	<i>TH01</i> (451)	<i>D13S317</i> (450)	<i>D16S539</i> (448)	<i>D2S1338</i> (432)	<i>D19S433</i> (437)	<i>vWA</i> (452)	<i>TPOX</i> (448)	<i>D18S51</i> (447)	<i>D5S818</i> (450)	<i>FGA</i> (449)
25		-							0,060						0,087
26		-							0,016						0,045
27		0,037							0,005						0,004
28		0,149							-						0,002
28,2		0,001							-						-
29		0,231							0,001						0,001
30		0,229							0,001						-
30,2		0,032													-
31		0,071													-
31,2		0,097													0,001
32		0,009													
32,2		0,098													
33		0,002													
33,2		0,032													
34		-													
34,2		0,003													
35		0,007													
36		-													
37		-													
38		0,001													
Quant. alelos	<i>D8S1179</i> (10)	<i>D21S11</i> (16)	<i>D7S820</i> (8)	<i>CSFIPO</i> (9)	<i>D3S1358</i> (9)	<i>TH01</i> (6)	<i>D13S317</i> (9)	<i>D16S539</i> (10)	<i>D2S1338</i> (16)	<i>D19S433</i> (15)	<i>vWA</i> (10)	<i>TPOX</i> (9)	<i>D18S51</i> (16)	<i>D5S818</i> (9)	<i>FGA</i> (19)

Em destaque (negrito), a maior frequência alélica encontrada para cada loco.

O levantamento da distribuição alélica revelou que os locos com menor e o maior número de alelos foram, respectivamente, o *TH01* com 6 alelos e o *FGA* com 19 alelos. A maior frequência observada foi a do alelo 8, do loco *TPOX*, com o valor de 0,496.

Tabela 16. Parâmetros forenses investigados na população de Santa Catarina.

loco *PF	<i>D8S1179</i>	<i>D21S11</i>	<i>D7S820</i>	<i>CSFIPO</i>	<i>D3S1358</i>	<i>TH01</i>	<i>D13S317</i>	<i>D16S539</i>	<i>D2S1338</i>	<i>D19S433</i>	<i>vWA</i>	<i>TPOX</i>	<i>D18S51</i>	<i>D5S818</i>	<i>FGA</i>
PD	0,937	0,957	0,931	0,881	0,921	0,922	0,936	0,919	0,968	0,938	0,937	0,840	0,969	0,882	0,967
PIC	0,79	0,83	0,77	0,68	0,75	0,75	0,78	0,75	0,85	0,78	0,79	0,62	0,86	0,68	0,85
PC	0,063	0,043	0,069	0,119	0,079	0,078	0,064	0,081	0,032	0,062	0,063	0,160	0,031	0,118	0,033
PC"1"	15,8	23,2	14,5	8,4	12,7	12,9	15,6	12,3	30,9	16,2	15,9	6,2	32,2	8,5	30,4
PEX	0,630	0,649	0,603	0,406	0,536	0,536	0,539	0,525	0,658	0,531	0,630	0,291	0,704	0,456	0,675
IPT	2,72	2,88	2,53	1,59	2,13	2,13	2,14	2,07	2,96	2,10	2,72	1,25	3,44	1,77	3,12

*PF – Parâmetros forenses: (**PD** = Poder de Discriminação, **PIC** = Conteúdo de Informação do Polimorfismo, **PC** = Probabilidade de Coincidência, **PC"1"** = Probabilidade de Coincidência expressa em 1 em..., **PEX** = Poder de Exclusão, **IPT** = Índice de Paternidade Típico).

Os resultados relativos aos cálculos de poder de discriminação demonstram que os locos com maior poder de discriminação são o *DI8S51* (96,9%), *D2S13* (96,8%) e o *FGA* (96,7%). O loco com menor poder de discriminação é o *TPOX*, com 84%. O poder de discriminação acumulado para os 15 locos STR analisados foi de $1 - 1,71535^{-18} = 0,9999999999999999828465$. O poder de discriminação é proporcional às frequências alélicas, sendo os locos com maior poder de discriminação aqueles que apresentam alelos com baixa frequência e conseqüentemente o loco *TPOX* que apresentou alelos com alta frequência (alelo 8), possui o menor valor de poder de discriminação.

Os cálculos dos parâmetros forenses revelaram que a probabilidade de coincidência variou entre 1 em 6,2 (*TPOX*) e 1 em 32,2 (*DI8S51*).

Em relação ao índice de conteúdo de polimorfismo todos os locos apresentaram valores significativos (maiores que 0,5), demonstrando-se bastantes informativos. O maior polimorfismo indicado pelo PIC foi observado para o loco *DI8S51* (PIC = 0,86) e o loco menos polimórfico foi o *TPOX* com um PIC = 0,62.

Os resultados dos cálculos dos parâmetros forenses em relação à paternidade indicam o loco *DI8S51* como o loco com maior poder de exclusão, 0,704 e maior índice típico de paternidade, 3,44.

O poder de exclusão está relacionado diretamente ao grau de polimorfismo do loco e conseqüentemente, também com distribuição das frequências alélicas. Dessa forma, o loco *TPOX* apresentou o menor valor de poder de exclusão, 29,1%. Esta é a chance de um indivíduo falsamente acusado de uma paternidade ser incluído neste loco. O poder de exclusão acumulado para os 15 locos STR analisados foi de 0,99999682066.

V.9 – ANÁLISE DO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

O equilíbrio de Hardy-Weinberg fornece uma simples representação matemática da relação genotípica e da frequência alélica dentro de uma população ideal (STERN, 1943) e prevê a estabilidade das frequências alélicas e genotípicas de uma geração para a próxima. Entretanto, populações naturais usualmente violam este equilíbrio e em alguma intensidade provocam mudanças nas frequências alélicas ao longo das gerações. O equilíbrio de Hardy-Weinberg conjectura casamentos aleatórios em populações infinitas onde não existe migração ou mutações para a introdução de novos alelos, além da não existência de seleção natural para o favorecimento de determinados genótipos. Todas as premissas, que certamente não existem em uma população humana real (BUTLER, 2005). No entanto, o teste fornece

informações importantes sobre a indicação de excessos de homozigotos na amostra, auxilia na detecção da presença de alelos nulos, além da perfeita independência dos alelos testados nos locos existentes na população sob análise, servindo como garantia de qualidade para o banco de dados cujas frequências encontram-se em equilíbrio (BUTLER, 2005).

A heterozigosidade esperada é equivalente à quantidade de heterozigotos esperada em uma população panmítica e fornece uma idéia do nível de variação genética em uma população (NEI, 1987).

Dessa forma, foi verificado se o banco de frequências alélicas construído neste trabalho encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 17).

Tabela 17. Resultados obtidos para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg, na população de Santa Catarina.

Loco	Homozigose Observada	Homozigose Esperada	Homozigose Observada %	Heterozigose Observada	Heterozigose Esperada	Heterozigose Observada %	Valor p	Desvio
<i>D8S1179</i>	83	85,1484	18,4	369	366,8516	81,6	0,3516	0,0244
<i>D21S11</i>	78	69,5506	17,3	372	380,4494	82,7	0,3251	0,0311
<i>D7S820</i>	88	87,3622	19,8	357	357,6378	80,2	0,5551	0,0213
<i>CSFIPO</i>	140	121,3240	31,5	305	323,6761	68,5	0,8175	0,0174
<i>D3S1358</i>	106	97,6138	23,5	345	353,3862	76,5	0,9939	0,0022
<i>TH01</i>	106	95,4539	23,5	345	355,5461	76,5	0,3910	0,0172
<i>D13S317</i>	105	88,3448	23,3	345	361,6552	76,7	0,2165	0,0234
<i>D16S539</i>	108	98,7318	24,1	340	349,2681	75,9	0,5679	0,0256
<i>D2S1338</i>	73	58,6779	16,9	359	373,3221	83,1	0,6917	0,0272
<i>D19S433</i>	104	85,9633	23,8	333	351,0367	76,2	0,1591	0,0244
<i>vWA</i>	83	84,0144	18,4	369	367,9857	81,6	0,1612	0,0232
<i>TPOX</i>	179	150,6413	40,0	269	297,3586	60	0,0977	0,0145
<i>D18S51</i>	65	55,8611	14,5	382	391,1389	85,5	0,1391	0,0213
<i>D5S818</i>	127	122,8643	28,2	323	327,1357	71,8	0,9577	0,0072
<i>FGA</i>	72	58,6299	16,0	377	390,3701	84	0,3951	0,0399
Para todos os locos $\chi^2_{(30)} = 30,603005$					p = 0,435106			

O loco *D18S51* apresentou a maior heterozigosidade e o loco *TPOX* a menor, uma vez que uma maior diversidade alélica existente significa um alto índice de heterozigose e quanto mais altas são as frequências alélicas menor é a taxa de heterozigose (BUTLER,

2005). O loco *TPOX* apresentou-se pouco distribuído em relação as suas frequências alélicas, sendo que apenas dois alelos (8 e 11) tiveram uma frequência somada de aproximadamente 80%, sendo que os sete alelos restantes apresentaram uma frequência muito abaixo das apresentadas por estes dois alelos. Já a maior frequência do loco *DISS51* foi de 0,191 e a maioria dos alelos restantes se mostrou em uma frequência bem distribuída. Apesar de não existir nenhuma população que satisfaça os critérios postulados pelo teorema de Hardy-Weinberg, para a população de Santa Catarina todos os locos apresentaram valores de p acima de 0,05, indicando que esta encontra-se em equilíbrio de HW. Dessa forma, conjectura-se as seguintes idéias para dar suporte ao resultado obtido.

A consequência de uma população com tamanho finito é que a frequências dos alelos são alterados por intermédio do processo de flutuação genética ao acaso, sendo o efeito desta mais pronunciada em pequenas populações (HELGASON, 2003). Todavia, a presente amostra é suficientemente grande para que as frequências alélicas não sejam afetadas significativamente pela flutuação genética.

Na população humana também fica claro que não existem casamentos completamente ao acaso, devido a uma série de questões culturais, sócio-econômicas e demográficas (SOUZA; CULPI, 2005). Contudo, pelos STRs forenses não apresentarem genótipos que tenham algum impacto no fenótipo do indivíduo (como altura ou inteligência), estes provavelmente não interferem na seleção sexual. Além disso, como estes marcadores não estão localizados em regiões de importância funcional do genoma, estes não possuem implicações em relação ao fenótipo e não há evidências de que estes estejam sob efeito de pressão de seleção.

Uma vez que se presume que estes marcadores estejam mais relaxados em relação à força da seleção natural, eles podem, mais facilmente, sofrer mutações e aumentar o nível de polimorfismo destes locos. Contudo, as taxas de mutações para estes marcadores forenses permanecem relativamente baixas, menores que 0,2% por geração e não tem efeito significativo nas frequências alélicas em meio ao “pool” gênico já estabelecido (GOODWIN; LINACRE; HADI, 2007).

A migração, indubitavelmente, é o fator que mais contribui para a mudança nas frequências alélicas ao longo das gerações nesta população. Desde o início da história brasileira, Santa Catarina, com sua população autóctone formada por três grupos ameríndios (kaingang, xokleng e guarani), tem sido um local de intensa imigração desde a ocorrência da colonização européia e do tráfico negreiro. No entanto, ao ocorrer esta mistura aleatória entre estas populações, esta população hibridizada pode voltar ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

após uma geração (GOODWIN; LINACRE; HADI, 2007), claro que devido a aspectos como língua, cultura e religião, a mistura na população catarinense ocorreu num processo mais longo (SOUZA, 2003). Dessa forma, após a mistura étnica através de várias gerações, as frequências genotípicas destes marcadores STR apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas sofrendo até hoje pequenas mudanças em suas frequências alélicas, uma vez que a migração é uma característica das populações.

V.10 COMPARAÇÃO COM OUTROS DADOS DA LITERATURA

Na tabela 18 são comparados os valores de frequência obtidos neste trabalho com os encontrados na literatura para diversas populações do Brasil.

Tabela 18. Diferenças entre as frequências alélicas dos 15 locos STRs pesquisados neste estudo e outras publicações de populações brasileiras.

Alelo	SC x BRA ¹	SC x BRA ²	SC x PA ³	SC x BA ⁴	SC x MS ⁵	SC x MG ⁶	SC x PB ⁷	SC x PE ⁸	SC x RJ ⁹	SC x RS ¹⁰	SC x SP ¹¹
<i>D8S1179</i>	0,74430 ±0,0433	0,71030 ±0,0572	0,80095 ±0,0229	0,55045 ±0,0224	0,70505 ±0,0201	0,03570	0,62970 ±0,0357	0,83150 ±0,0306	0,51255 ±0,0564	0,70280 ±0,0344	0,31375 ±0,0580
<i>D21S11</i>	0,99360 ±0,0036	0,99900 ±0,0008	0,00000 ±0,0000	0,99200 ±0,0026	0,46035 ±0,0333	0,97840 ±0,0123	0,04941 ±0,0173	0,00000 ±0,0000	0,34455 ±0,0716	0,00000 ±0,0000	0,95300 ±0,0087
<i>D7S820</i>	0,81210 ±0,0444	0,23535 ±0,0379	0,01780 ±0,0085	0,81130 ±0,0255	0,80300 ±0,0233	0,12345 ±0,0274	0,84895 ±0,0316	0,90825 ±0,0177	0,22960 ±0,0455	0,86555 ±0,0109	0,54430 ±0,0423
<i>CSFIPO</i>	0,86865 ±0,0198	0,88990 ±0,0168	0,83950 ±0,0248	0,86395 ±0,0151	0,23825 ±0,0533	0,21355 ±0,0396	0,49600 ±0,0337	0,66670 ±0,0283	0,35975 ±0,0194	X	0,16035 ±0,0374
<i>D3S1358</i>	0,71940 ±0,0590	0,99995 ±0,0001	0,01495 ±0,0062	0,71245 ±0,0342	0,27075 ±0,0462	0,75350 ±0,0750	X	X	0,99880 ±0,0005	0,63885 ±0,0187	0,32990 ±0,0465
<i>TH01</i>	0,07035 ±0,0226	0,33995 ±0,0353	0,00365 ±0,0027	0,11040 ±0,0264	0,02825 ±0,0107	0,00050 ±0,0006	0,19760 ±0,0536	0,01530 ±0,0073	0,01475 ±0,0061	X	0,00155 ±0,011
<i>D13S317</i>	0,44400 ±0,0473	0,76020 ±0,0518	0,14030 ±0,0322	0,22870 ±0,0380	0,13220 ±0,0261	0,00605 ±0,0035	0,33065 ±0,0442	0,04035 ±0,0214	0,12125 ±0,0229	0,73125 ±0,0181	0,28385 ±0,0313
<i>D16S539</i>	0,63575 ±0,0710	0,63910 ±0,0441	0,51625 ±0,0405	0,94420 ±0,0100	0,16050 ±0,0189	0,38725 ±0,0779	0,79380 ±0,0369	0,63605 ±0,0377	0,10225 ±0,0269	X	0,33595 ±0,0591
<i>D2S1338</i>	X	0,23785 ±0,0806	X	0,32310 ±0,0373	X	0,01675 ±0,0136	X	X	0,31995 ±0,0526	X	0,02740 ±0,0082
<i>D19S433</i>	X	0,36350 ±0,0697	X	0,87295 ±0,0220	X	0,05965 ±0,0273	X	X	0,24230 ±0,0289	X	0,02380 ±0,0091
<i>vWA</i>	0,35320 ±0,0468	0,52745 ±0,0444	0,01175 ±0,0059	0,03945 ±0,0069	0,37965 ±0,0482	0,19125 ±0,0573	0,28995 ±0,0436	0,09430 ±0,0126	0,40670 ±0,0513	0,30210 ±0,0181	0,36915 ±0,0518
<i>TPOX</i>	0,91245 ±0,0251	0,77695 ±0,0433	0,09675 ±0,0257	0,25630 ±0,0274	0,14145 ±0,0220	0,02890 ±0,0077	0,13455 ±0,0236	0,58210 ±0,0581	0,25300 ±0,0229	X	0,10750 ±0,0231
<i>DI8S51</i>	0,91810 ±0,0289	0,77840 ±0,0504	0,65855 ±0,0514	0,59865 ±0,0383	0,50035 ±0,0313	0,37270 ±0,0589	0,10700 ±0,0264	0,24180 ±0,0443	0,45805 ±0,0384	0,86320 ±0,0131	0,46400 ±0,0504
<i>D5S818</i>	0,80650 ±0,0579	0,98270 ±0,0047	0,10890 ±0,0135	0,64125 ±0,327	0,21610 ±0,0266	0,06650 ±0,0163	X	X	0,92990 ±0,0146	0,31935 ±0,0414	0,08105 ±0,0206
<i>FGA</i>	0,99600 ±0,0029	0,48475 ±0,0709	0,00000 ±0,0000	0,50825 ±0,0400	0,49670 ±0,0616	0,87280 ±0,0287	X	0,00000 ±0,0000	0,05380 ±0,0131	0,00850 ±0,0031	0,45865 ±0,0451
N pop.	16.065	791	325	150	208	19.105	323	437	300	103	561

Em negrito os valores de p significativos. X – Locus não realizados pelos presentes trabalhos da literatura. N pop.-Número de indivíduos analisados pelos presentes trabalhos da literatura. BRA - População brasileira 1 – (WHITTLE; ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 –(GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004). 9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008). **As frequências de cada população se encontram presentes nos ANEXOS deste trabalho (Anexos D a S).**

A composição étnica da população de Santa Catarina é dita tri-híbrida (europeus, ameríndios e africanos), constituída principalmente na parte européia pela mistura das etnias portuguesa, alemã e italiana. Em menor escala está formada também por poloneses, ucranianos, japoneses, ameríndios e africanos-subsaarianos (MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO, 2006).

Devido à sua estrutura étnica e à estrutura étnica dos outros estados comparados, o banco de frequências alélicas catarinense apresentou diferenças estatisticamente significativas, em pelo menos um loco, com todos os estados brasileiros. O maior número de diferenças apresentadas foi com a população do Pará, seis diferenças existentes num total de 13 locos comparados.

O banco de frequências alélicas catarinense não apresentou diferenças significativas apenas quando comparado aos dois estudos na população brasileira em geral (GRATTAPAGLIA et al., 2001, WHITTLE; ROMANO; NEGREIROS, 2004). No entanto, se observadas as comparações levando-se em conta seus desvios, em relação ao estudo da população brasileira feita por Whittle, Romanos e Negreiros (2004), a população catarinense diferencia-se desta para o loco *TH01* ao se levar em conta à variação de 0,0226 existente, com um valor de “p” entre 0,04775 e 0,09295.

Dessa forma, o único estudo que não se diferenciou da população deste trabalho foi o de Grattapaglia et al. (2001), sendo que este é atualmente o banco de dados utilizado pelo IGP-SC, em suas análises estatísticas. No entanto, para fins de estatística forense, deve-se levar em conta que o banco de dados gerado por Grattapaglia e cols. (2001), possui uma estrutura étnica diferente de Santa Catarina, sendo que os 800 indivíduos não relacionados de todo território nacional, são principalmente 40% naturais do DF, GO e MG, e como visto anteriormente, a comparação entre os bancos de dados de Santa Catarina e Minas Gerais apresentou cinco locos estatisticamente diferentes. Além disso, a comparação com o estado do Mato Grosso do Sul, localizado na região Centro Oeste do Brasil e teoricamente com uma estrutura étnica parecida com os outros estados da região (como Goiás), também apresentou diferenças estatisticamente significativas para o loco *TH01*.

V.11 APLICABILIDADE DO BANCO DE DADOS DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE SANTA CATARINA

Para a verificação da aplicabilidade deste banco de dados de frequências alélicas deve-se primeiro verificar se a quantidade de indivíduos da amostra consegue representar seguramente a população em questão. Chakraborty (1992), concluiu que de 100 a 150 indivíduos por população consegue prover uma amostra adequada para todos os locos genéticos utilizados em Genética Forense, sendo que tipagens acima de 200 indivíduos não acrescentam genótipos significativamente representativos na população. Evett e Gill (1991) chegaram a conclusões semelhantes trabalhando com perfis multilocos de DNA, chegando ao termo de que 100 a 120 indivíduos por loco, por população, são suficientes para uma estatística forense robusta. Nesse critério não existem problemas em relação ao banco de frequências alélicas catarinense, uma vez que este apresenta três vezes mais indivíduos do que um banco de frequências alélicas para análises forenses necessita.

No entanto para comprovar esta afirmação, compararam-se os resultados obtidos com o banco de dados do presente trabalho, com as análises estatísticas de casos de identificação pelo DNA já realizados pela equipe do Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina utilizando o banco de dados da população brasileira (GRATTAPAGLIA et al., 2001) em dez testes de vinculação genética, cinco do tipo paternidade e cinco do tipo verossimilhança.

Em relação à verossimilhança, o cálculo é realizado levando-se em conta a probabilidade de um indivíduo escolhido ao acaso possuir o mesmo perfil genético da amostra referência, como exemplo, uma amostra deixada na cena do crime (THE FUTURE OF FORENSIC DNA TESTING, 2000).

Sendo assim, primeiramente realizou-se um teste simples para demonstrar o poder do banco de dados construído para diferenciar entre dois indivíduos não relacionados na população. Para isso se escolheu os dois alelos de cada loco que apresentaram maior frequência, para formar um indivíduo “heterozigoto modelo” cujo perfil genético seja o mais comum para os 15 marcadores STRs deste trabalho (Tabela 19).

Tabela 19. Coeficiente de verossimilhança em uma análise teórica levando-se em conta um indivíduo modelo, cujo genótipo para os 15 STRs autossômicos estudados neste trabalho, sejam todos heterozigotos e os alelos existentes sejam os mais frequentes da população.

Loco	Alelo 1	Alelo 2	Frequência do Alelo 1	Frequência do Alelo 2	Frequência do genótipo mais comum
<i>D8S1179</i>	13	14	0,291	0,235	0,1368
<i>D21S11</i>	29	30	0,231	0,229	0,1058
<i>D7S820</i>	10	11	0,272	0,253	0,1376
<i>CSF1PO</i>	11	12	0,309	0,298	0,1842
<i>D3S1358</i>	15	16	0,279	0,248	0,1384
<i>TH01</i>	6	9.3	0,205	0,305	0,1251
<i>D13S317</i>	11	12	0,269	0,287	0,1544
<i>D16S539</i>	11	12	0,292	0,290	0,1694
<i>D2S1338</i>	17	20	0,263	0,135	0,0710
<i>D19S433</i>	13	14	0,302	0,244	0,1474
<i>vWA</i>	16	17	0,243	0,229	0,1113
<i>TPOX</i>	8	11	0,496	0,273	0,2708
<i>D18S51</i>	14	15	0,191	0,155	0,0592
<i>D5S818</i>	11	12	0,319	0,371	0,2367
<i>FGA</i>	21	22	0,161	0,165	0,0531
$3,89895 \times 10^{-14}$ ou 1 em 25.647.930.853.178,4 (25 trilhões)					

Com o resultado obtido na tabela 19, verifica-se que o perfil STR mais comum utilizando o banco de frequências alélicas catarinense ocorre com uma frequência de $3,89895 \times 10^{-14}$ ou aproximadamente 1 em 25 trilhões. Ou seja, utilizando o banco de frequências catarinense, o menor valor para o coeficiente de verossimilhança que pode ser encontrado será 1 em 25 trilhões.

A seguir, apresenta-se uma tabela (20) contendo os resultados para os casos de verossimilhança realizados pelo IGP-SC, comparando-se os valores encontrados de coeficiente de verossimilhança utilizando o banco de dados do presente trabalho e o banco de dados atualmente empregado.

Tabela 20. Comparação entre os valores de verossimilhança para o mesmo caso utilizando-se dois bancos de dados diferentes.

caso	valor do coeficiente de verossimilhança encontrado é de 1 (um) em... presente trabalho	valor do coeficiente de verossimilhança encontrado é de 1 (um) em (utilizando GRATTAPAGLIA et al., 2001)
1	1.73005E+21 aproximadamente (1 sextilhão)	3.06412E+21 aproximadamente (3 sextilhões)
2	1.97097E+21 aproximadamente (1 sextilhão)	1.61954E+20 aproximadamente (161 quintilhões)
3	2.50009E+19 aproximadamente (25 quintilhões)	8.60444E+18 aproximadamente (8 quintilhões)
4	9.95603E+18 aproximadamente (9 quintilhões)	2.78426E+20 aproximadamente (278 quintilhões)
5	1.00661E+20 aproximadamente (100 quintilhões)	1.46702E+21 aproximadamente (1 sextilhão)

Os genótipos dos indivíduos e amostras envolvidos no caso de verossimilhança e os resultados utilizando o banco de dados do presente trabalho apontam completa individualização do perfil genotípico para qualquer um dos cinco casos, já que a frequência dos perfis genotípicos obtidos estão muito acima do número de habitantes do planeta, ou seja, como o caso que registrou o menor valor (caso quatro), é aproximadamente nove quintilhões de vezes mais provável que os resultados obtidos sejam consequência das amostras terem uma origem comum do que serem oriundas de dois indivíduos diferentes e não relacionados.

Os resultados encontrados com o banco de dados deste trabalho e com o banco de dados brasileiro não demonstraram diferenças significativas ao nível de 5% ($p= 0,7618$; t de student).

Na tabela 21, encontram-se os valores obtidos para o teste de vinculação de paternidade, comparando-se os resultados obtidos utilizando-se o banco de dados do presente trabalho e o banco de dados atualmente empregado.

Tabela 21. Cálculos estatísticos para testes de vinculação de paternidade, utilizando-se dois bancos de dados diferentes.

caso	Índice de Paternidade Combinado - SC	Probabilidade a posteriori - SC	Índice de Paternidade Combinado - BRA	Probabilidade a posteriori - BRA
1	27.098.877,4579199	0.999999963098104	30.911.914,444751	0,999999967650015
2	272.068.334,482361	0.99999996324453	809.534.996,382947	0,99999998764723
3	526.623,314757288	0.999998101113124	332.944,118900893	0,999996996501996
4	14.115.083,3915837	0.999999929153807	14.101.892,9806091	0,999999929087539
5	6.979.474,83729965	0.99999856722765	3.897.916,24774371	0,999999743452737

O Índice de Paternidade é uma razão entre duas suposições mutuamente exclusivas e exaustivas, cujo resultado indica quantas vezes mais provável é a hipótese dos achados laboratoriais serem consequência de existência de vínculo biológico de paternidade entre suposto pai e requerente do que ao acaso. O Índice de Paternidade Combinado é obtido pelo produto dos Índices de Paternidade individuais de cada região analisada. Sendo que o índice de paternidade pode ser convertido para uma probabilidade posterior de acordo com o teorema de Bayes (THE FUTURE OF FORENSIC DNA TESTING, 2000). Utilizou-se $t=0,01$

Em relação ao banco de dados do presente estudo, verificou-se a vinculação genética entre o suposto pai e o indivíduo requerente em cada caso. Os resultados possibilitaram o cálculo de um índice de probabilidade de certeza de no mínimo 99,99999 (caso 3) e máximo de 99,99999999 no caso 2.

Também foi calculado o Índice de Paternidade Combinado tendo sido encontrado como valor máximo no caso 2 o resultado genético de 272.068.334 (demonstrando que é aproximadamente duzentos e setenta e dois milhões de vezes mais provável que o homem testado como suposto pai, seja o pai biológico da criança, do que qualquer outro homem selecionado ao acaso na população em questão), e o menor no caso 3; 526.623 (demonstrando que é aproximadamente quinhentos e vinte e seis mil vezes mais provável que o homem testado como suposto pai, seja o pai biológico da criança, do que qualquer outro homem selecionado ao acaso na população em questão), sendo que em nenhum dos casos acima citados, exclui-se a hipótese de que o suposto pai seja o pai biológico do requerente.

Tomando-se os valores de frequência dos alelos identificados pelos marcadores utilizados, segundo os bancos de dados específicos para a população brasileira e comparando com o banco de dados do presente estudo, ficou demonstrado por meio destes cinco casos, que não existem diferenças significativas ao utilizar quaisquer dos dois banco de dados para a análise de teste de paternidade, ($P= 0,5394$; teste t de Student).

VI. CONCLUSÕES

Conclui-se que o método de extração de DNA sem pulverizar as amostras (método substitutivo) foi o mais eficiente para a amplificação dos 9 locos STRs e o loco da amelogenina utilizando o sistema *Profiler Plus*, seguido pelos métodos com pulverização: Dextran Blue-orgânica (protocolo combinado de Kalmar et al., 2000 e Sambrook; Russel, 2001), fenol-clorofórmio com precipitação alcoólica (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e fenol-clorofórmio-microcon (FBI, 1996), os quais não apresentaram diferenças significativas entre eles.

A precipitação com isopropanol (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) foi eficaz e pode substituir o uso do MicroconTM-100, reduzindo ainda mais o custo dos procedimentos envolvendo as extrações de DNA em ossos que utilizam apenas este solvente orgânico.

Já que não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências genotípicas obtidas e esperadas, mostrou-se que o banco de dados de frequências alélicas criado encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos STR analisados.

Conclui-se, também, que o banco de dados de frequências alélicas é perfeitamente aplicável na determinação de vínculos entre indivíduos, devido aos altos índices de polimorfismo e conteúdo informativo apresentados, comprovando-se a sua eficiência através dos resultados obtidos como, por exemplo, nos casos reais de paternidade e verossimilhança.

Conclui-se que para a obtenção do perfil genético em amostras *post-mortem* do tipo ossos, a técnica sem pulverização demonstrada neste trabalho apresenta melhor custo-benefício quando comparada à metodologia atual empregada pelo laboratório de Genética Forense do Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina, sendo sugerida a sua substituição para a redução de custos, assim como para a melhor obtenção do perfil genético deste tipo de amostra. Dessa forma, os experimentos desenvolvidos neste trabalho testaram e padronizaram um novo método econômico e rápido para a obtenção de DNA em ossos para estudos forenses.

Em relação ao banco de dados produzido pelo presente trabalho, ficou demonstrado que este não possui diferenças significativas em relação ao atual banco de dados utilizado pelo IGP-SC, sugerindo-se sua substituição pelo banco de dados de Santa Catarina na casuística forense do estado. A utilização de frequências alélicas da própria população em análise, resulta em valores mais confiáveis, pois são mais próximos da realidade. Somando-se a isto, o fato de que o banco de dados utilizado atualmente pelo IGP-SC possui

majoritariamente em sua composição, indivíduos das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Nestas regiões existem estados que apresentam diferenças significativas em relação às frequências alélicas destes STRs utilizados na Genética Forense.

Com este trabalho foi possível a identificação de cadáveres criando a possibilidade de que outros Laboratórios de Perícias, ligados à rede de Laboratórios de DNA mantida pela SENASP (Secretaria Nacional de Segurança Pública) utilizem uma metodologia mais barata, rápida e tão eficiente quanto os procedimentos padrão já estipulados na literatura forense.

Enfim, o resultado deste trabalho atendeu aos interesses do Convênio de Cooperação entre o Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE-UFSC) e o Laboratório de Genética Forense do Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina (IGP-SC) no desenvolvimento de conhecimento e avanço das linhas de investigação da Genética Forense e Genômica e Proteômica aplicadas à Biotecnologia.

VII. REFERÊNCIAS

AFARENSIS. An Interesting Innovation on DNA Extraction from Fossil Bones: One From the Archives. **Disponível em:** http://scienceblogs.com/afarensis/2006/02/27/an_interesting_innovation_on_dn/ Acesso em: Julho de 2008.

ALONSO, Antonio et al. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. **Croatian Medical Journal**, v.42, p.260-266, 2001.

ANDELINOVIC, SIMUN et al. Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. **Croatian Medical Journal: Forensic Sciences**, v. 46, n. 4, p.530-539, 2005.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Manual do usuário do kit AmpFl STR® Identifier™ PCR Amplification**, (P/N 4323291 Rev. C), 2006.

ARRUDA, Daniela Gaeta. Métodos de extração de ácido desoxirribonucléico de ossos antigos visando a realização da reação em cadeia da polimerase. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BAREA, Jaqueline Alves; PARDINI, Maria Inês de Moura Campos; GUSHIKEN, Tsieko. Extração de DNA de materiais de arquivos e fontes escassas: Revisão e apontamentos sobre as possíveis aplicações. **NewsLab**, v. 63, p.96-108, 2004.

BAUBLIENÉ, Jurgita; DAUGNORA, Linas; MICEIKIENÉ, Ilona. Evaluation of the DNA extraction method from ancient animal bones. **Ekologija**, n. 1, p.8-11, 2003.

BESSETTI, Joseph. An Introduction to PCR Inhibitors. **Profiles in DNA**, v. 10, n. 1, p.9-10, 2007.

BOOM, René et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.

BOTSTEIN, David et al. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**. v.32, p 314-331, 1980.

BUCKLETON, John; TRIGGS, Christopher M.; CLAYTON, Tim. Disaster Victim Identification, identification of Missing Persons, and Immigration Cases. In: BUCKLETON, John.; TRIGGS, Christopher M.; WALSH Simon J. **Forensic DNA Evidence Interpretation**. New York, 2005. 395-438.

BUDIMLIJA, Zoran M. et al. World Trade Center Human Identification Project: Experiences with individual body identification cases. **Croatian Medical Journal: Forensic Sciences**, v. 44, n. 3, p.259-263, 2003.

BUTLER, John Marshall et al. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p.1397-1412, 2004.

BUTLER, John. Marshall. **Forensic DNA Typing: Biology and Technology Behind STR Markers** 2. ed. Portland: Academic Press; 2005. 688 p.

BUTLER, John Marshall. Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. **Journal Forensic Science**, v. 51, n. 2, p.253-265, 2006.

CAPELLI, Cristian; TSCHENTCHER, Frank; PASCALI, Vincenzo L. "Ancient" protocols for the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. **Forensic Science International**, v. 131, p.59-64, 2003.

CASTILLO, Dora Mendez Del et al. Population genetic data for 15 STR markers in the Brazilian population of Minas Gerais. **Legal Medicine**, v. 11, p.45-47, 2009.

CATTANEO, Cristina et al. A simple method for extracting DNA from old skeletal material. **Forensic Science International**, v. 74, p. 167-174, 1995.

CHAKRABORTY, Ranajit. Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. **Human Biology**, v.64, p.141-159, 1992.

CHAKRABORTY, Ranajit; STIVERS, David N. Paternity exclusion by DNA markers: effects of paternal mutations" **Journal of Forensic Sciences**, v. 41, p. 671-677, 1996.

COOPER, Alan. Reply to stoneking: Ancient DNA: how do you really know when you have it? **The American Journal of Human Genetics**, n. 60, p. 1001-1002, 1997.

DELLALIBERA, Edileine et al. Genetic analysis of 13 STR loci in the population from the State of Pernambuco, northeast Brazil. **Forensic Science International**, v. 146, p.57-59, 2004.

DUGAN, Kerri et al. Improvements in bone extraction for mtDNA analysis. **Profiles in Dna**, v. 12, p.25-32, 2007.

EDSON, Suni M. et al. Naming the Dead: Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains. **Forensic Science Review**, v. 16, n. 1, p.64-89, 2004.

EGELAND, Thore; MOSTAD, Petter; MEVÅG, Bente; STENERSEN, Margurethe. Beyond traditional paternity and identification cases. Selecting the most probable pedigree. **Forensic Science International**, v. 110, n. 1, p. 47-59, 2000.

ESPUNY, Maria José Farfán. Introducción a la tecnología del adn aplicada en el laboratorio forense. **Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla**, p. 3934-3956, 2005.

EVETT, Ian W.; GILL, Peter. Discussion of the Robustness of Methods for Assessing the Evidential Value of DNA Single Locus Profiles in Crime Investigations. **Electrophoresis**, v.12, p.226-230, 1991.

EXCOFFIER, Laurent; LAVAL, Guillaume; SCHNEIDER, Stefan. Arlequin ver 3.1: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. 2005. **Disponível em:** <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>. Acesso em dezembro de 2008.

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION. **PCR-BASED TYPING PROTOCOLS**, FBI LABORATORY, 1996.

FISCHER Ronald Aylmer. Standard calculations for evaluating a blood group system. **Heredity**, v. 5, p. 95–102, 1951.

FRANÇA, Genival Veloso. **Medicina Legal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

FRIDMAN, Cintia et al. Brazilian population profile of 15 STR markers. **Forensic Science International: Genetics**, n. 2, p. e1-e4, 2008.

GARCIA. Introdução ao estudo dos ossos, osteogênese e esqueleto. **Disponível em:** <http://www.anato.ufrj.br/material/GarciaOsteologia1.pdf>, Acesso em: Julho de 2008.

GILBERT M. Thomas P. et al. Distribution patterns of post mortem damage in human mitochondrial DNA. **American Journal of Human Genetics**, v.72, p. 32-47, 2003.

GILL Peter., WERRETT David J. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. **Forensic Science International**, v. 35, p.145-148, 1987.

GILL, Peter.; BUCKLETON, John. Biological Basis for DNA Evidence. In: BUCKLETON, John; TRIGGS, Christopher M.; WALSH Simon J. **Forensic DNA Evidence Interpretation**, New York, 2005. 1-26.

GÓES, Andréa Carla de Souza et al. Allele frequencies data and statistic parameters for 16 STR loci - D19S433, D2S1338, CSF1PO, D16S539, D7S820, D21S11, D18S51, D13S317, D5S818, FGA, PENTA E, TH01, vWA, D8S1179, TPOX, D3S1358 - in the Rio de Janeiro population, Brazil. **Forensic Science International**, v. 140, p.131-132, 2004.

GOMES, Adriana Vieira et al. 13 STR loci frequencies in the population from Paraíba, Northeast Brazil. **Forensic Science International**, v. 173, p.231-234, 2007.

GOODWIN, William; LINACRE, Adrian; HADI, Sibte. **An Introduction to Forensic Genetics**. Wiltshire: John Wiley & Sons Ltd, 2007. 151p.

GOODYEAR, P. D., BLACK, S.M. A reliable method for the removal of co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA. **BioTechniques**, v.16, n.2, p. 232-237, 1994.

GÖTHERSTRÖM, Anders et al. Bone preservation and DNA amplification. **Archaeometry**, v. 44, n. 3, p.395-404, 2002.

GRATTAPAGLIA, Dario et al. Brazilian population database for the 13 STR loci of the AmpflSTR® Profiler Plus™ and Cofiler™ *multiplex Kits*. **Forensic Science International**, v. 118, p.91-94, 2001.

GRAW Matthias., WEISSER Hans-Joachim, LUTZ Sabine. DNA typing of human remains found in damp environments. **Forensic Science International**, v. 113, p.91-95, 2000.

HAGELBERG, Erika; CLEGG, John B. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. **Proc. Royal Society London**, v. 244, p.45-50, 1991.

HELGASON, Agnar., et al. A reassessment of genetic diversity in Icelanders: Strong evidence from multiple loci for relative homogeneity caused by genetic drift. **Annals of Human Genetics**, v. 67, p. 281–297, 2003.

HILLIS, David M.; MORTIS, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**, Sunderland: Sinauer, 1990. 655p.

HOFF-OLSEN, Per et al. Microsatellite stability in human post-mortem tissues. **Forensic Science International**, v. 119, p. 273-278, 2001.

HOLLAND , Mitchell M.; CAVE, Christopher A.; HOLLAND, Charity A.; BILLE, Todd W. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. **Croatian Medical Journal: Forensic Sciences**, v. 44, n. 3, p. 264-272, 2003.

HOSS, Matthias; PAABO, Svante. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 3913-3914, 1993.

HUMMEL, Susanne. **Ancient DNA Typing : Methods, Strategies and Applications**. Berlin: Springer-Verlag; 2003. 298 p.

HUSTON, K. A. Statistical analysis of STR data. **Profiles in DNA**, v.103, p.14-15, 1998.

IMAIZUMI, Kazuhiko et al. DNA typing of bone specimens – the potential use of the profiler test as a tool for bone identification. **Legal Medicine**, v. 7, p. 31-41, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE PADRÕES E TECNOLOGIA (NIST). Disponível em <http://www.nist.gov/> - Acesso em: Maio de 2007.

IWAMURA, Edna Sandayo Miazato; SOARES-VIEIRA, José Arnaldo; MUÑOZ, Daniel Romero Human Identification and Analysis of DNA in Bones. **Revista do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 59, n.6, p. 383-388, 2004.

IWAMURA, Edna Sandayo Miazato et al. A qualitative study of compact bone microstructure and nuclear short tandem repeat obtained from femur of human remains found

on the ground and exhumed 3 years after death. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 26, n. 1, p.33-44, 2005.

JEFFREYS Alec J., BROOKFIELD John F., SEMEONOFF R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. **Nature**, v. 317, p.818-819, 1985.

JEFFREYS, Alec J.; WILSON, Victoria; THEIN, Swee Lay. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, v.314, p. 67-73, 1985.

JOBLING, Mark A.; GILL, Peter. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nature Reviews: Genetics**, v. 5, p.739-750, 2004.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**: 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488 p.

KAISER, Christina et al. Molecular study of time dependent changes in DNA stability in soil buried skeletal residues. **Forensic Science International**, v. 177, p.32-36, 2008.

KALMÁR, Tibor et al. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p.e67-e71, 2000.

KEMP, Brian M.; SMITH, David Glenn. Use of bleach to eliminating contaminating DNA from the surface of bones and teeth. **Forensic Science International**, v. 154, p.53-61, 2005.

LATHAM, Krista; RITKE, Mary K. Bone DNA purification protocols for genetic analysis. **University of Indianapolis Archeology & Forensics Laboratory**, 2002. Disponível em <http://archlab.uindy.edu>. Acessado em junho de 2007.

LEITE, Fábio Pereira Das Neves et al. STR data for 09 autosomal STR markers from Rio Grande do Sul (southern Brazil). **Forensic Science International**, v. 132, p.223-224, 2003.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.397-401. 1989.

MAROTA, Isolina; ROLLO, Franco. Molecular paleontology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 97-111, 2002.

MATYSIAK-SCHOLZE, Uta; DIMMELER, Stefanie; NEHLS, Michael. Dextran Blue as an aid for DNA precipitation and gel loading. **Technical Tips Online**, n. 1, p.14-14, 1996.

MEYER, E; WIESE, M; Bruchhaus, H; CLAUSSEN, M; KLEIN, A. Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. **Forensic Science International**, v. 113, p. 87-90, 2000.

MIGNOTTE, B.; MAUL, A.; SCWARTZBROD, Louis. Comparative study of techniques used to recover viruses from residual urban sludge. **Journal of Virology Methods**, v. 78, p.71-80, 1999.

MILOS, Ana et al. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal remains. **Croatian Medical Journal: Forensic Sciences**, v. 48, p. 486 - 493, 2007.

MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. **Estudos e pesquisas informação demográfica e sócio-econômica: síntese de indicadores sociais 2006**. Rio de Janeiro: IBGE, n. 19, 316p. 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicsoais2006/indic_sociais2006.pdf>. Acesso em: junho de 2008.

MURAKAMI et al. Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples, **Acta Medica Okayama**, v.54, p. 21-32, 2000.

NAGY, M. et al. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. **Forensic Science International**, v. 152, p.13-22, 2005.

NEI, Masatoshi. **Molecular evolutionary genetics**. New York, Columbia University Press, 1987.

NELSON, Kimberlyn; MELTON, Terry. Forensic mitochondrial DNA analysis of 116 casework skeletal samples. **Journal Forensic Science**, v.52, n.3, p. 557-561, 2007.

NICKLAS, Janice A.; BUEL, Eric. Quantification of DNA in forensic samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.376, p.1160-1167, 2003.

NICHOLSON, Rebecca A. Bone degradation in a compost heap. **Journal of Archaeological Science**, v. 25, p.393-403, 1998.

O'ROURKE, Dennis H.; HAYES, M. Geoffrey; CARLYLE, Shawn W. Ancient DNA studies in physical anthropology. **Annual Reviews Anthropology**, v. 29, p.217-242, 2000.

PAABO, Svante; HIGUCHI, Russel; WILSON, Alan. Ancient DNA and the polymerase chain reaction, *Journal Biological Chemistry*. v. 264, p. 9709-9712, 1989.

PÄÄBO, Svante et al. Genetic analyses from ancient DNA. **Annual Reviews Genetics**, v. 38, p.645-679, 2004.

PEAKE, Ian R. et al. Family studies and prenatal diagnosis in severe von Willebrand disease by polymerase chain reaction amplification of a variable number tandem repeat region of the von Willebrand factor gene. **Blood**, v.76, p.555-561, 1990.

PENA, Sérgio Danilo Junho. Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA. **Parcerias Estratégicas**, n. 20, p.447-460, 2005.

PENACINO, Gustavo Adolfo. Investigación e implementación de sistemas de identificación de individuos por técnicas de biología molecular, con especial referencia a los estudios post-mortem. **Tese de Doutorado em Genética**, Universidade de Buenos Aires, Buenos Aires, 1999.

PINHEIRO, Maria de Fátima. Genética e biologia forense, e criminalística. In: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. In: **NOÇÕES GERAIS SOBRE OUTRAS CIÊNCIAS FORENSES MEDICINA LEGAL**, 2004. 57p.

RAYMOND Michel.; ROUSSET, Francois. GENEPOP on the Web: Population genetics Software Package,1999. **Disponível em:** <http://wbiomed.curtin.edu>. Acesso em dezembro de 2008.

RENNICK, Stephanie L.; FENTON, Todd W.; FORAN, David R.. The effects of skeletal preparation techniques on DNA from human and non-human bone. **Journal Forensic Science**, v. 50, n. 5, p.1-4, 2005.

RIANCHO, José A.; ZARRABEITIA, Maria T. A Windows-based software for common paternity and sibling analyses. **Forensic Science International**, v. 135, p.232-234, 2003.

RODRIGUES, Elzemar Martins Ribeiro; PALHA, Teresinha de Jesus Brabo Ferreira; SANTOS, Sidney Emanuel Batista dos. Allele frequencies data and statistic parameters for 13 STR loci in a population of the Brazilian Amazon Region. **Forensic Science International**, v. 168, p.244-247, 2007.

ROEPER, Andrea.; REICHERT, Walter.; MATTERN, Rainer. The Achilles tendon as a DNA source for STR typing of highly decayed corpses. **Forensic Science International**, v. 173, p.103-106, 2007.

ROHLAND, Nadin.; HOFREITER, Michael. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. **BioTechniques**, v. 42, p. 343-352, 2007.

RUITBERGER, Christian M.; REEDER, Dennis J. ; BUTLER, John M.STR Base: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p.320-322, 2001.

SALAMON, Michal et al. Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n.39, p.13783-13788, 2005.

SAMBROOK, Joseph; RUSSEL, David W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 3 v.

SANTA CATARINA - PORTARIA Nº. 504/GABS/SSP de 01 de Agosto de 2006.

SANTOS, Márcia V. et al. Population genetic data for the STR loci using the AmpFISTR Identifiler *Kit* in Bahia, Brazil. **International Congress Series**, v. 1261, p.219-222, 2004.

SASAKI, M.; SHIONO, H.; FUKUSHIMA, T.; SHIMIZU, K. Human Identification by genotyping of personal articles. **Forensic Science International**, v. 90, p. 65-75, 1997.

SHASTRY, Barkur S. SNP alleles in human disease and evolution. **Journal of Human Genetics**, v. 47, p. 561-566, 2002.

SILVA, Dayse A. et al. Statistical analyses of 14 short tandem repeat loci in Brazilian populations from Rio de Janeiro and Mato Grosso do Sul states for forensic and identity testing purposes. **Forensic Science International**, v. 139, p.173-176, 2004.

SIVAGAMI, A.V.; RAO, A.R; VARSHNEY, U. A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian population, **Forensic Science International**, v. 110, p. 107-115, 2000.

SOUZA, Ilíada Rainha et al. Demographic and genetic structures of two partially isolated communities of Santa Catarina Island, southern Brazil. **Human Biology**, v.75, n.2, p. 241-253, 2003.

SOUZA, Ilíada Rainha; CULPI, Lodércio. Valongo, genetic studies on an isolated Afro-Brazilian Community. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n.3, p.402-406, 2005.

STERN, Curt. The Hardy-Weinberg law. **Science**, v. 97, n. 2510, p. 137-138, 1943.

SUTLOVIC, Davorka; GOJANOVIC, Marija Definis; ANDELINOVIC, Simun. Rapid extraction of Human DNA containing humic acid. **Croatia Chemical Acta**, v. 1, n. 80, p.117-120, 2007.

TAUTZ, Diethard. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p.6463-6471, 1989.

TEREBA, Allan. Tools for Analysis of Population Statistics. **Profiles in DNA: Technical Tips**, vol. 2, n.3 p. 14-16, 1999.

THE FUTURE OF FORENSIC DNA TESTING: Predictions of the research and development working group. Washington: National Commission on the Future of DNA Evidence, n. 183697, 2000. Disponível em: <www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/183697.pdf>. Acesso em outubro de 2008.

TRUEMAN, C. N.; MARTILL, D. M. The long-term survival of bone: The role of bioerosion. **Archaeometry**, v. 44, n. 3, p.371-382, 2002.

TUROSS, Noreen. The biochemistry of ancient bone. **Experientia**, v. 50, p.530-535, 1994.

UFAL - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS. LABORATÓRIO DE DNA FORENSE. **Disponível em** <http://www.labdnaforense.org/index2.php?endereco=bd>. Acesso em setembro de 2008.

UFRGS – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA. **Disponível em** <http://www.ufrgs.br/depbiot/discipl/rev-prat.htm>. Acesso em junho de 2007.

VALENTIM, Caitlin. DNA from Bone and Feathers. **EWU Student Research & Creative Works Symposium**. 2007.

VALLE, Christian Del; RODRIGUEZ, Anayanci; ESPINOZA, Marta. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. **Revista de Biología Tropical**, v. 52, n. 3, p.310-318, 2004.

VERNESI, Cristiano et al. Genetic characterization of the body attributed to the evangelist Luke. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 98, n. 23, p.13460-13463, 2001.

WALKER, Matthew R.; RAPLEY, Ralph. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu, 1999.

WALSH PS, METZGER DA, HIGUCHI R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechnology**, v.10, 506-513, 1991.

WEBER, J.L. and MAY, P.E. Abundant Class of Human DNA Polymorphism Which can be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p. 388-396, 1989.

WHITTLE, Martin Ritter.; ROMANO, N. L.; NEGREIROS, V. A. C.. Updated Brazilian genetic data, together with mutation rates, on 19 STR loci, including D10S1237. **Forensic Science International**, v. 139, p.207-210, 2004.

YANDEL, David W.; DRYJA, Thaddeus P. Detection of DNA sequence polymorphisms by enzymatic amplification and direct genomic sequencing. **American Journal of Human Genetics**, v. 45, p. 547-555, 1989.

YANG, D.Y.; ENG, B.; WAYE, J.S.; DUDAR, J.C.; SAUNDERS, S.R. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. **American Journal of Physical Anthropology**, v.105, 539-543, 1998.

YEATES, C; GILLINGS, M. R; DAVISON, A. D; ALTAVILLA, N; VEAL, D. A. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. **Biological Procedures**, v. 1, p.40-47, 1998.

VIII. ANEXOS



ANEXO A – INFORMAÇÕES AO DOADOR



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

INFORMAÇÕES AO DOADOR

Projeto de Pesquisa:

Implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos para fins forenses na população de Santa Catarina

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina em conjunto com o Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina (IGP-SC) estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para a implementação de um banco de dados de frequências alélicas de marcadores forenses na população de Santa Catarina. Para se realizar a análise bioestatística em qualquer investigação envolvendo Genética Forense, deve se estudar os marcadores genéticos a utilizar, na população relacionada, no nosso caso, na população catarinense. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para fazer parte do **grupo controle** e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de **DNA**. O DNA será analisado no laboratório utilizando marcadores de seqüências de DNA através do uso de conjuntos comerciais para identificação forense largamente utilizados neste tipo de exame. As regiões de DNA analisadas são não codificantes, fazendo com que o genótipo obtido não forneça a possibilidade de permitir identificações de estado de saúde ou de comportamento humano. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número **(48) 3721-9804** e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou seus orientandos.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas.

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo visa atender diretamente os indivíduos catarinenses envolvidos em processos civis que requisitaram seu direitos perante a lei e o sistema de justiça em processos criminais, cujos pedidos foram encaminhados ao IGP-SC pelo poder judiciário podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinatura:

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ___/___/_____

ANEXO B -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu,....., RG....., autorizo de livre e espontânea vontade, a coleta de material biológico para fins de extração de DNA e tipagem genética para vários marcadores moleculares, para fins de pesquisa populacional (estimativa de frequências alélicas e participação em um banco de dados), para servirem de padrão de confronto em análise de identificação humana pelo DNA.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar.

Declaro ainda, que não recebi transfusão de sangue ou transplante de medula óssea nos últimos 120 dias.

Estando ciente sobre a pesquisa **“Implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos para fins forenses na população de Santa Catarina”**, concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesma.

Doador :

Assinatura

ANEXO C - QUESTIONÁRIO

LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS - LAPOGE

FICHA PARA PAINEL DE LABORATÓRIO - CONTROLES

Código:.....

Tipo sanguíneo:..... Material colhido/Volume:.....

IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL:

Nome:.....

Endereço:.....

Cidade:..... Estado:..... CEP:.....

Telefone:..... Fax:.....

E-mail:.....

Data de nascimento:..... Sexo:..... Grupo étnico:.....

Município de nasc.:..... Estado:.....

Profissão:..... Instrução:.....

DETALHES FAMILIAIS:

Nome completo do pai:.....

Município de nasc. pai:..... Estado:.....

Origem étnica do pai:.....

Nome (solteira) completo da mãe:.....

Município de nasc. mãe:..... Estado:.....

Origem étnica da mãe:.....

Irmadade total do indivíduo:..... Vivos:.....

Sofre de alguma doença? Tem igual na família (pais, irmãos, filhos)?

.....

.....

Observações:.....

.....

.....

Averiguador:..... Data:.....

ANEXO D – Frequências alélicas do loco STR *D8S1179* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ¹	BRA ²	PA ³	BA ⁴	MS ⁵	MG ⁶	PB ⁷	PE ⁸	RJ ⁹	RS ¹⁰	Sp ¹¹
Alélio	<i>D8S1179</i> N:452	<i>D8S1179</i> N:16552	<i>D8S1179</i> N:758	<i>D8S1179</i> N:207	<i>D8S1179</i> N:150	<i>D8S1179</i> N:208	<i>D8S1179</i> N:4994	<i>D8S1179</i> N:323	<i>D8S1179</i> N:546	<i>D8S1179</i> N:300	<i>D8S1179</i> N:104	<i>D8S1179</i> N:561
8	0,008	0,00951	0,008	0,007	0,007	0,005	0,00521	0,0050	0,007	0,005	0,0000	0,004
9	0,012	0,00815	0,011	0,012	0,010	0,000	0,00741	0,0090	0,017	0,003	0,0288	0,005
10	0,083	0,07418	0,075	0,056	0,060	0,098	0,06117	0,0699	0,077	0,051	0,1010	0,061
11	0,077	0,07998	0,088	0,068	0,057	0,083	0,07639	0,0589	0,072	0,065	0,0865	0,081
12	0,150	0,12887	0,121	0,143	0,107	0,123	0,12375	0,1317	0,138	0,130	0,1010	0,121
13	0,291	0,29414	0,285	0,320	0,286	0,250	0,27633	0,2984	0,289	0,290	0,3173	0,292
14	0,235	0,23721	0,245	0,244	0,257	0,270	0,25791	0,2285	0,215	0,257	0,1971	0,260
15	0,116	0,13135	0,127	0,109	0,173	0,127	0,14818	0,1607	0,156	0,158	0,1490	0,144
16	0,019	0,02975	0,035	0,039	0,033	0,034	0,03835	0,0329	0,024	0,031	0,0144	0,028
17	0,009	0,00595	0,005	0,002	0,010	0,010	0,00491	0,0050	0,005	0,008	0,0048	0,003
18	0,000	0,00088	0,000	0,001	0,000	0,000	0,00040	0,0000	0,000	0,000	0,0000	0,001

1 – (WHITTLE, ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES, PALHA; SANTOS, 2007). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004). 9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO E – Frequências alélicas do loco STR *D21S11* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

Alelo	SC		BRA1		BRA2		PA3		BA4		MS5		MG6		PB7		PE8		RJ9		RS10		SP11	
	<i>D21S11</i> N: 450	<i>D21S11</i> N: 10300	<i>D21S11</i> N: 782	<i>D21S11</i> N: 525	<i>D21S11</i> N: 150	<i>D21S11</i> N: 208	<i>D21S11</i> N: 4568	<i>D21S11</i> N: 323	<i>D21S11</i> N: 542	<i>D21S11</i> N: 300	<i>D21S11</i> N: 102	<i>D21S11</i> N: 561												
24.2	0.001	0.00194	0.003	0.006	0.000	0.000	0.00240	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
25	0.000	0.00131	0.001	0.003	0.000	0.000	0.00069	0.0020	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000
25.2	0.000	0.00058	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00069	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000
26	0.000	0.00063	0.001	0.003	0.000	0.000	0.00057	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00057	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
26.2	0.000	0.00015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
27	0.037	0.02563	0.028	0.031	0.037	0.025	0.03880	0.0280	0.0280	0.0280	0.0280	0.0280	0.0280	0.0280	0.0280	0.025	0.0147	0.034	0.025	0.0183	0.01618	0.0162	0.0162	0.0162
28	0.149	0.15039	0.141	0.115	0.140	0.113	0.17514	0.1728	0.077	0.183	0.1618	0.162	0.162	0.162	0.162	0.162	0.162	0.162	0.162	0.162	0.162	0.162	0.162	0.162
28.2	0.001	0.00078	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
29	0.231	0.21568	0.217	0.191	0.230	0.211	0.21474	0.1998	0.199	0.160	0.1863	0.203	0.203	0.203	0.203	0.160	0.1863	0.203	0.160	0.1863	0.203	0.203	0.203	0.203
29.2	0.000	0.00291	0.001	0.001	0.000	0.000	0.00057	0.0020	0.000	0.003	0.000	0.003	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.003
30	0.229	0.24534	0.233	0.271	0.207	0.240	0.22001	0.2038	0.222	0.230	0.2039	0.224	0.224	0.224	0.224	0.222	0.2039	0.224	0.222	0.2039	0.224	0.224	0.224	0.224
30.2	0.032	0.03024	0.038	0.054	0.033	0.039	0.03011	0.0330	0.004	0.021	0.000	0.028	0.028	0.028	0.028	0.021	0.000	0.028	0.021	0.000	0.000	0.028	0.028	0.028
31	0.071	0.03922	0.063	0.078	0.060	0.103	0.06719	0.0799	0.161	0.065	0.0931	0.065	0.065	0.065	0.065	0.065	0.0931	0.065	0.065	0.0931	0.065	0.065	0.065	0.065
31.2	0.097	0.10150	0.099	0.080	0.107	0.098	0.09661	0.1049	0.035	0.108	0.1324	0.103	0.103	0.103	0.103	0.108	0.1324	0.103	0.108	0.1324	0.103	0.103	0.103	0.103
32	0.009	0.00961	0.012	0.012	0.013	0.015	0.01339	0.0140	0.083	0.011	0.000	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.000	0.011	0.011	0.000	0.000	0.011	0.011	0.011
32.2	0.098	0.10058	0.100	0.100	0.087	0.078	0.08494	0.0789	0.074	0.098	0.098	0.093	0.093	0.093	0.093	0.098	0.098	0.093	0.098	0.098	0.093	0.093	0.093	0.093
33	0.002	0.00184	0.002	0.003	0.000	0.000	0.00481	0.0170	0.087	0.001	0.000	0.004	0.004	0.004	0.001	0.000	0.004	0.001	0.000	0.000	0.004	0.004	0.004	0.004
33.2	0.032	0.03752	0.033	0.029	0.047	0.039	0.03056	0.0190	0.002	0.037	0.392	0.039	0.039	0.039	0.037	0.392	0.039	0.037	0.392	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
34	0.000	0.00238	0.001	0.006	0.003	0.000	0.00389	0.0150	0.024	0.008	0.008	0.005	0.005	0.005	0.008	0.008	0.005	0.008	0.008	0.005	0.000	0.005	0.005	0.005
34.2	0.003	0.00350	0.002	0.008	0.003	0.005	0.00240	0.0060	0.001	0.006	0.0049	0.004	0.004	0.004	0.006	0.0049	0.004	0.006	0.0049	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
35	0.007	0.00573	0.004	0.003	0.010	0.005	0.00870	0.0140	0.012	0.008	0.000	0.013	0.013	0.013	0.008	0.000	0.013	0.008	0.000	0.000	0.013	0.013	0.013	0.013
35.2	0.000	0.00068	0.000	0.006	0.000	0.005	0.00023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
36	0.000	0.00136	0.001	0.000	0.003	0.005	0.00286	0.0030	0.003	0.005	0.000	0.003	0.003	0.003	0.005	0.000	0.003	0.005	0.000	0.000	0.003	0.003	0.003	0.003
37	0.000	0.00010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00023	0.0030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
38	0.001	0.00019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00023	0.0020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

1 – (WHITTLE, ROMANO, NEGREIROS, 2004).

2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001).

3 – (RODRIGUES, PALHA, SANTOS, 2007).

4 – (SANTOS et al., 2004).

5 – (SILVA et al., 2004).

6 – (CASTILLO et al., 2009).

7 – (GOMES et al., 2007).

8 – (DELLALIBERA et al., 2004).

9 – (GÓES et al., 2004).

10 – (LEITE et al., 2003).

11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO F – Frequências alélicas do loco STR *D7S820* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ¹	BRA ²	PA ³	BA ⁴	MS ⁵	MC ⁶	PB ⁷	PE ⁸	RJ ⁹	RS ¹⁰	SP ¹¹
Alelo	<i>D7S820</i> N:445	<i>D7S820</i> N:16065	<i>D7S820</i> N:791	<i>D7S820</i> N:325	<i>D7S820</i> N:150	<i>D7S820</i> N:208	<i>D7S820</i> N:19185	<i>D7S820</i> N:323	<i>D7S820</i> N:437	<i>D7S820</i> N:300	<i>D7S820</i> N:98	<i>D7S820</i> N:561
6	0,000	0,00019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	0,017	0,01734	0,012	0,019	0,007	0,024	0,01473	0,0090	0,017	0,020	0,0102	0,011
8	0,124	0,14304	0,162	0,132	0,136	0,159	0,17459	0,1280	0,148	0,187	0,1582	0,170
9	0,128	0,12067	0,124	0,117	0,117	0,096	0,11798	0,1220	0,112	0,096	0,1531	0,130
10	0,272	0,27420	0,259	0,297	0,320	0,269	0,28040	0,3100	0,286	0,298	0,2806	0,289
11	0,253	0,24746	0,256	0,212	0,260	0,245	0,22617	0,2220	0,228	0,200	0,2041	0,225
12	0,161	0,16275	0,163	0,117	0,120	0,173	0,15421	0,1670	0,169	0,156	0,1633	0,170
13	0,039	0,03078	0,021	0,095	0,040	0,029	0,02838	0,0390	0,035	0,036	0,0255	0,046
14	0,006	0,00327	0,003	0,009	0,000	0,005	0,00302	0,0030	0,005	0,005	0,0051	0,006
15	0,000	0,00025	0,000	0,002	0,000	0,000	0,00010	0,0020	0,000	0,000	0,0000	0,000
16	0,000	0,00006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00000	0,0000	0,000	0,000	0,0000	0,000

1 – (WHITILE, ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007).

4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004).

9 – (GOES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO G – Frequências alélicas do loco STR *CSFIPO* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

Alelo	SC		BRA ¹		BRA ²		PA ³		BA ⁴		MS ⁵		MG ⁶		PB ⁷		PE ⁸		RJ ⁹		RS ¹⁰		SP ¹¹			
	<i>CSFIPO</i> N: 445	<i>CSFIPO</i> N: 10900	<i>CSFIPO</i> N: 771	<i>CSFIPO</i> N: 325	<i>CSFIPO</i> N: 150	<i>CSFIPO</i> N: 208	<i>CSFIPO</i> N: 19755	<i>CSFIPO</i> N: 323	<i>CSFIPO</i> N: 436	<i>CSFIPO</i> N: 300	<i>CSFIPO</i> N: 300	<i>CSFIPO</i> N: 436	<i>CSFIPO</i> N: 300													
6	0.001	0.00013	0.003	0.000	0.000	0.000	0.00053	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00053	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001
7	0.006	0.00936	0.010	0.011	0.013	0.029	0.01883	0.0140	0.017	0.013	0.029	0.01883	0.0140	0.017	0.026	0.017	0.017	0.017	0.017	0.026	0.017	0.017	0.017	0.025	0.025	0.025
8	0.010	0.01408	0.012	0.017	0.020	0.010	0.02313	0.0200	0.020	0.010	0.010	0.02313	0.0200	0.018	0.016	0.018	0.018	0.018	0.018	0.016	0.018	0.018	0.018	0.024	0.024	0.024
9	0.019	0.02225	0.018	0.022	0.020	0.024	0.02397	0.0310	0.022	0.020	0.024	0.02397	0.0310	0.019	0.024	0.019	0.019	0.019	0.019	0.024	0.019	0.019	0.019	0.022	0.022	0.022
10	0.293	0.27009	0.263	0.274	0.313	0.250	0.27775	0.2760	0.274	0.313	0.250	0.27775	0.2760	0.306	0.272	0.306	0.306	0.306	0.272	0.272	0.306	0.306	0.272	0.269	0.269	0.269
11	0.309	0.29794	0.307	0.295	0.284	0.327	0.28720	0.2870	0.284	0.284	0.327	0.28720	0.2870	0.269	0.278	0.269	0.269	0.269	0.278	0.278	0.269	0.269	0.275	0.275	0.275	0.275
12	0.298	0.31917	0.326	0.303	0.277	0.288	0.30144	0.2980	0.277	0.277	0.288	0.30144	0.2980	0.313	0.323	0.313	0.313	0.313	0.323	0.323	0.313	0.313	0.310	0.310	0.310	0.310
13	0.052	0.05780	0.054	0.068	0.063	0.072	0.05910	0.0590	0.063	0.063	0.072	0.05910	0.0590	0.048	0.053	0.048	0.048	0.048	0.053	0.053	0.048	0.048	0.067	0.067	0.067	0.067
14	0.012	0.00812	0.007	0.009	0.010	0.000	0.00737	0.0090	0.010	0.010	0.000	0.00737	0.0090	0.009	0.006	0.009	0.009	0.009	0.006	0.006	0.009	0.009	0.007	0.007	0.007	0.007
15	0.000	0.00106	0.000	0.001	0.000	0.000	0.00068	0.0060	0.000	0.000	0.000	0.00068	0.0060	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000

1 – (WHITTLE; ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004). 9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO H – Frequências alélicas do loco STR *D3S1358* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ¹	BRA ²	PA ³	BA ⁴	MS ⁵	MG ⁶	PB ⁷	PE ⁸	RJ ⁹	RS ¹⁰	Spu
Alelo	<i>D3S1358</i> N:451	<i>D3S1358</i> N:11042	<i>D3S1358</i> N:794	<i>D3S1358</i> N:325	<i>D3S1358</i> N:150	<i>D3S1358</i> N:208	<i>D3S1358</i> N:12563	<i>D3S1358</i> x	<i>D3S1358</i> x	<i>D3S1358</i> N:300	<i>D3S1358</i> N:104	<i>D3S1358</i> N:561
9	0.000	0.00014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00004			0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.00014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00008			0.000	0.000	0.000
11	0.003	0.00054	0.001	0.000	0.000	0.000	0.00080			0.001	0.000	0.000
12	0.002	0.00222	0.003	0.001	0.000	0.010	0.00370			0.001	0.0096	0.002
13	0.002	0.00371	0.003	0.003	0.007	0.005	0.00330			0.001	0.0096	0.004
14	0.104	0.09165	0.092	0.059	0.103	0.064	0.09467			0.100	0.0779	0.077
15	0.279	0.29256	0.292	0.322	0.330	0.294	0.28138			0.293	0.2798	0.324
16	0.248	0.26078	0.252	0.289	0.270	0.255	0.27430			0.262	0.2991	0.276
17	0.225	0.20780	0.218	0.157	0.197	0.186	0.21046			0.208	0.1837	0.201
18	0.126	0.13005	0.126	0.134	0.090	0.181	0.12183			0.126	0.1355	0.108
19	0.009	0.00946	0.011	0.023	0.003	0.005	0.00852			0.008	0.0048	0.008
20	0.002	0.00095	0.002	0.012	0.000	0.000	0.00092			0.000	0.0000	0.000

1 – (WHITTLE; ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004). 9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO I – Frequências alélicas do loco STR *TH01* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ¹	BRA ²	PA ³	BA ⁴	MS ⁵	MG ⁶	PB ⁷	PE ⁸	RJ ⁹	RS ¹⁰	SP ¹¹
Alelo	<i>TH01</i> N:451	<i>TH01</i> N:9654	<i>TH01</i> N:695	<i>TH01</i> N:325	<i>TH01</i> N:150	<i>TH01</i> N:208	<i>TH01</i> N:19440	<i>TH01</i> N:323	<i>TH01</i> N:427	<i>TH01</i> N:300	<i>TH01</i> x	<i>TH01</i> N:561
4	0.000	0.00005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00008	0.000	0.000	0.001		0.000
5	0.000	0.00088	0.000	0.012	0.000	0.005	0.00097	0.0020	0.000	0.000		0.003
6	0.205	0.22519	0.206	0.226	0.220	0.245	0.19144	0.1910	0.210	0.198		0.221
7	0.194	0.21411	0.222	0.261	0.283	0.225	0.25126	0.2480	0.253	0.258		0.244
8	0.139	0.13922	0.124	0.120	0.150	0.162	0.16429	0.1660	0.155	0.187		0.152
9	0.143	0.17418	0.176	0.165	0.127	0.172	0.16941	0.1460	0.166	0.145		0.173
9,3	0.305	0.23332	0.258	0.211	0.207	0.186	0.21381	0.2420	0.204	0.208		0.197
10	0.014	0.01269	0.014	0.005	0.013	0.005	0.00869	0.0050	0.012	0.003		0.010
11	0.000	0.00036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00005	0.000	0.000	0.000		0.000

1 – (WHITTLE; ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007).

4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004).

9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO J – Frequências alélicas do loco STR *DI3S317* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ¹	BRA ²	PA ³	BA ⁴	MS ⁵	MG ⁶	PB ⁷	PE ⁸	RJ ⁹	RS ¹⁰	SP ¹¹
Alelo	<i>DI3S317</i> N:450	<i>DI3S317</i> N:10697	<i>DI3S317</i> N:784	<i>DI3S317</i> N:325	<i>DI3S317</i> N:150	<i>DI3S317</i> N:208	<i>DI3S317</i> N:19209	<i>DI3S317</i> N:323	<i>DI3S317</i> N:434	<i>DI3S317</i> N:300	<i>DI3S317</i> N:104	<i>DI3S317</i> N:561
6	0.000	0.00005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.003	0.00065	0.000	0.003	0.000	0.000	0.00057	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
8	0.132	0.10596	0.113	0.100	0.057	0.077	0.09454	0.0800	0.079	0.078	0.101	0.088
9	0.087	0.08577	0.095	0.115	0.087	0.091	0.06791	0.0870	0.082	0.078	0.0962	0.077
10	0.061	0.05385	0.055	0.042	0.047	0.024	0.04495	0.0770	0.056	0.065	0.0577	0.051
11	0.269	0.30518	0.298	0.222	0.336	0.322	0.30520	0.2970	0.338	0.298	0.2596	0.279
12	0.287	0.28569	0.274	0.314	0.296	0.308	0.30861	0.3170	0.304	0.322	0.274	0.325
13	0.104	0.11774	0.114	0.152	0.127	0.130	0.12965	0.1020	0.103	0.128	0.1730	0.130
14	0.056	0.04422	0.048	0.049	0.040	0.048	0.04750	0.0400	0.036	0.031	0.0385	0.048
15	0.001	0.00084	0.003	0.003	0.003	0.000	0.00107	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000
16	0.000	0.00005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

1 – (WHITTLE; ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004). 9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO L – Frequências alélicas do loco STR *DI6S539* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ¹	BRA ²	PA ³	BA ⁴	MS ⁵	MG ⁶	PB ⁷	PE ⁸	RJ ⁹	RS ¹⁰	SP ¹¹
Alelo	<i>DI6S539</i> N:448	<i>DI6S539</i> N:10749	<i>DI6S539</i> N:770	<i>DI6S539</i> N:325	<i>DI6S539</i> N:150	<i>DI6S539</i> N:208	<i>DI6S539</i> N:18349	<i>DI6S539</i> N:323	<i>DI6S539</i> N:437	<i>DI6S539</i> N:300	<i>DI6S539</i> x	<i>DI6S539</i> N:561
5	0.001	0.000	0.001	0.002	0.000	0.000	0.00049	0.000	0.000	0.000		0.003
6	0.001	0.00037	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00010	0.000	0.000	0.000		0.000
7	0.000	0.00005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.000	0.000	0.000		0.000
8	0.016	0.02177	0.023	0.026	0.033	0.029	0.02412	0.0220	0.015	0.025		0.020
9	0.137	0.14890	0.159	0.177	0.140	0.163	0.16396	0.1580	0.157	0.198		0.180
10	0.091	0.07912	0.084	0.097	0.100	0.053	0.08428	0.1050	0.093	0.068		0.103
11	0.292	0.29217	0.295	0.286	0.287	0.298	0.29533	0.2960	0.303	0.282		0.285
12	0.290	0.26863	0.250	0.239	0.277	0.260	0.25178	0.2490	0.235	0.235		0.249
13	0.155	0.16215	0.156	0.151	0.150	0.149	0.15549	0.1420	0.170	0.161		0.138
14	0.015	0.02526	0.029	0.019	0.010	0.048	0.02341	0.0260	0.026	0.031		0.022
15	0.002	0.00149	0.003	0.003	0.003	0.000	0.00104	0.0020	0.001	0.000		0.000
16	0.000	0.00009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.000	0.000	0.000		0.000

1 – (WHITTLE, ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004). 9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO M – Frequências alélicas do loco STR *D2S1338* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ²	BA ⁴	MG ⁶	RJ ⁹	SP ¹¹
Alelo	<i>D2S1338</i> N:432	<i>D2S1338</i> N:633	<i>D2S1338</i> N:150	<i>D2S1338</i> N:4360	<i>D2S1338</i> N:232	<i>D2S1338</i> N:561
13	0.000	0.0024	0.000	0.000	0.000	0.000
14	0.001	0.0016	0.003	0.000	0.000	0.000
15	0.002	0.0016	0.000	0.00126	0.000	0.001
16	0.042	0.0450	0.050	0.05229	0.041	0.057
17	0.263	0.2077	0.220	0.20356	0.226	0.208
18	0.091	0.0742	0.061	0.07856	0.058	0.075
19	0.117	0.1224	0.117	0.11766	0.118	0.116
20	0.135	0.1367	0.133	0.12305	0.135	0.122
21	0.022	0.0600	0.063	0.06250	0.062	0.079
22	0.061	0.0814	0.097	0.08039	0.099	0.086
23	0.112	0.1169	0.123	0.10023	0.099	0.097
24	0.071	0.0758	0.093	0.08911	0.081	0.083
25	0.060	0.0553	0.037	0.07133	0.060	0.059
26	0.016	0.0174	0.003	0.01732	0.019	0.014
27	0.005	0.0016	0.000	0.00241	0.002	0.003
28	0.000	0.000	0.000	0.00023	0.000	0.000
29	0.001	0.000	0.000	0.00010	0.000	0.000
30	0.001	0.000	0.000	0.00000	0.000	0.000

2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004).
9 – (GÓES et al., 2004). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO N – Frequências alélicas do loco STR *D19S433* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ²	BA ⁴	MG ⁶	RJ ⁹	SP ¹¹
Alelo	<i>D19S433</i> N:437	<i>D19S433</i> N:629	<i>D19S433</i> N:150	<i>D19S433</i> N:10804	<i>D19S433</i> N:239	<i>D19S433</i> N:561
9	0.000	0.0008	0.003	0.00038	0.002	0.001
10	0.002	0.0016	0.000	0.00446	0.006	0.009
11	0.011	0.0175	0.017	0.03071	0.027	0.029
11.2	0.000	0.0007	0.000	0.00038	0.000	0.000
12	0.093	0.1010	0.090	0.10328	0.069	0.103
12.2	0.009	0.0095	0.013	0.01647	0.012	0.016
13	0.302	0.2369	0.304	0.24919	0.236	0.234
13.2	0.028	0.0326	0.037	0.03375	0.035	0.052
14	0.244	0.2941	0.240	0.27459	0.286	0.277
14.2	0.026	0.0318	0.033	0.04167	0.052	0.045
15	0.181	0.1518	0.130	0.13971	0.150	0.127
15.2	0.043	0.0588	0.070	0.05311	0.050	0.045
16	0.046	0.0350	0.047	0.03266	0.046	0.037
16.2	0.011	0.0215	0.013	0.01690	0.029	0.019
17	0.002	0.0040	0.000	0.00161	0.000	0.003
17.2	0.001	0.0016	0.003	0.00085	0.000	0.001
18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
18.2	0.001	0.0008	0.000	0.00028	0.000	0.002

2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004).
9 – (GÓES et al., 2004). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO O – Frequências alélicas do loco STR ν WA na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

Alelo	SC		BRA1		BRA2		PA3		BA4		MS5		MG6		PB7		PE8		RJ9		RS10		SP11	
	ν WA N:452	ν WA N:18233	ν WA N:781	ν WA N:325	ν WA N:150	ν WA N:208	ν WA N:19155	ν WA N:323	ν WA N:437	ν WA N:300	ν WA N:103	ν WA N:561												
11	0.003	0.00228	0.002	0.008	0.010	0.000	0.00433	0.0050	0.007	0.008	0.0146	0.004												
12	0.000	0.00038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00010	0.0000	0.000	0.000	0.000	0.002												
13	0.002	0.00436	0.006	0.015	0.010	0.010	0.00694	0.0050	0.007	0.006	0.000	0.008												
14	0.112	0.08699	0.084	0.068	0.066	0.088	0.08252	0.0680	0.074	0.083	0.0583	0.084												
15	0.115	0.12532	0.123	0.134	0.147	0.113	0.14952	0.1050	0.152	0.162	0.1504	0.138												
16	0.244	0.25660	0.246	0.263	0.240	0.275	0.25265	0.3020	0.256	0.244	0.2718	0.262												
17	0.229	0.26641	0.274	0.287	0.270	0.273	0.24876	0.2530	0.270	0.255	0.2767	0.248												
18	0.211	0.17457	0.184	0.148	0.133	0.142	0.17139	0.1820	0.158	0.165	0.1602	0.156												
19	0.068	0.06804	0.061	0.057	0.100	0.074	0.06688	0.0700	0.061	0.059	0.0534	0.079												
20	0.013	0.01349	0.019	0.020	0.017	0.020	0.01412	0.0080	0.013	0.015	0.0146	0.015												
21	0.003	0.00145	0.001	0.000	0.007	0.005	0.00256	0.0020	0.001	0.003	0.000	0.004												
22	0.000	0.00011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00023	0.0000	0.001	0.000	0.000	0.000												

1 – (WHITTLE; ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007).

4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007).

8 – (DELLALIBERA et al., 2004). 9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO P – Frequências alélicas do loco STR *TPOX* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ¹	BRA ²	PA ³	BA ⁴	MS ⁵	MG ⁶	PB ⁷	PE ⁸	RJ ⁹	RS ¹⁰	SP ¹¹
Alélo	<i>TPOX</i> N:448	<i>TPOX</i> N:10942	<i>TPOX</i> N:767	<i>TPOX</i> N:325	<i>TPOX</i> N:150	<i>TPOX</i> N:208	<i>TPOX</i> N:19698	<i>TPOX</i> N:323	<i>TPOX</i> N:436	<i>TPOX</i> N:300	<i>TPOX</i> x	<i>TPOX</i> N:561
5	0.002	0.00087	0.001	0.002	0.000	0.000	0.00046	0.0020	0.000	0.000		0.000
6	0.011	0.01220	0.011	0.013	0.023	0.010	0.02241	0.0220	0.019	0.025		0.027
7	0.003	0.00402	0.003	0.003	0.013	0.000	0.00736	0.0080	0.006	0.003		0.011
8	0.496	0.47702	0.445	0.410	0.460	0.436	0.44903	0.4230	0.444	0.466		0.461
9	0.098	0.11671	0.126	0.120	0.147	0.093	0.13809	0.1320	0.132	0.148		0.135
10	0.069	0.06498	0.074	0.066	0.077	0.083	0.06836	0.0760	0.065	0.056		0.063
11	0.274	0.27623	0.291	0.291	0.250	0.358	0.27752	0.2670	0.288	0.263		0.263
12	0.046	0.04606	0.048	0.091	0.030	0.015	0.03531	0.0700	0.046	0.038		0.038
13	0.001	0.00165	0.001	0.003	0.000	0.005	0.00146	0.000	0.000	0.001		0.002
14	0.000	0.00018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.000	0.000	0.000		0.000
15	0.000	0.00008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00000	0.000	0.000	0.000		0.000

- 1 – (WHITTLE; ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007).
4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004).
9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO Q – Frequências alélicas do loco STR *D18S51* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ¹	BRA ²	PA ³	BA ⁴	MS ⁶	MG ⁶	PB ⁷	PE ⁸	RJ ⁹	RS ¹⁰	SP ¹¹
Alelo	<i>D18S51</i> N:447	<i>D18S51</i> N:18273	<i>D18S51</i> N:757	<i>D18S51</i> N:325	<i>D18S51</i> N:150	<i>D18S51</i> N:208	<i>D18S51</i> N:4435	<i>D18S51</i> N:323	<i>D18S51</i> N:526	<i>D18S51</i> N:300	<i>D18S51</i> N:93	<i>D18S51</i> N:561
8	0.000	0.00005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.001	0.00079	0.001	0.001	0.000	0.000	0.00113	0.0020	0.001	0.001	0.000	0.001
10	0.007	0.01245	0.010	0.009	0.013	0.010	0.01195	0.0060	0.010	0.016	0.0161	0.003
10.2	0.000	0.00041	0.001	0.000	0.000	0.000	0.00101	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001
11	0.011	0.01166	0.011	0.008	0.017	0.015	0.00899	0.0198	0.032	0.008	0.0054	0.013
11.2	0.000	0.00005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	0.121	0.12584	0.134	0.120	0.137	0.093	0.11770	0.0977	0.121	0.121	0.1183	0.114
12.2	0.000	0.00036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	0.101	0.11799	0.113	0.115	0.114	0.108	0.09921	0.1376	0.123	0.116	0.1237	0.103
13.2	0.000	0.00112	0.001	0.000	0.000	0.000	0.00056	0.000	0.000	0.000	0.0052	0.001
14	0.191	0.15329	0.141	0.159	0.120	0.176	0.12785	0.1486	0.152	0.119	0.1828	0.133
14.2	0.000	0.00090	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00068	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
15	0.155	0.14803	0.139	0.139	0.170	0.147	0.14701	0.1346	0.165	0.148	0.1237	0.139
15.2	0.000	0.00071	0.000	0.000	0.003	0.000	0.00011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
16	0.125	0.13692	0.152	0.169	0.130	0.132	0.15626	0.1496	0.130	0.152	0.1398	0.153
16.2	0.000	0.00011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
17	0.132	0.12152	0.137	0.122	0.103	0.132	0.12480	0.1346	0.109	0.118	0.1237	0.136
17.2	0.000	0.00055	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
18	0.053	0.07610	0.071	0.088	0.057	0.108	0.08289	0.0698	0.072	0.083	0.0699	0.081
18.2	0.000	0.00118	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
19	0.053	0.04515	0.046	0.037	0.047	0.049	0.06009	0.0399	0.051	0.058	0.0391	0.067
19.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.036	0.02413	0.025	0.025	0.053	0.015	0.03574	0.0189	0.019	0.033	0.0323	0.032
20.2	0.000	0.00077	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
21	0.006	0.00919	0.011	0.005	0.013	0.015	0.01432	0.0289	0.012	0.013	0.000	0.015
21.2	0.000	0.00107	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00034	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22	0.006	0.00441	0.005	0.002	0.003	0.000	0.00710	0.0080	0.001	0.011	0.000	0.003
22.2	0.000	0.00211	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
23	0.001	0.00090	0.001	0.000	0.000	0.000	0.00056	0.0020	0.001	0.001	0.000	0.003
23.2	0.000	0.00016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
24	0.001	0.00104	0.001	0.001	0.000	0.000	0.00090	0.0020	0.000	0.000	0.000	0.000
24.2	0.000	0.00014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
25	0.000	0.00011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00023	0.0020	0.000	0.000	0.000	0.000
25.2	0.000	0.00014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
26	0.000	0.00016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.0020	0.000	0.000	0.000	0.001
27	0.000	0.00019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00011	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
27.2	0.000	0.00027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
28	0.000	0.00003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

1 – (WHITTLE; ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001).
3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004).
6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004).
9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO R – Frequências alélicas do loco STR *D5S818* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

SC	BRA ¹	BRA ²	PA ³	BA ⁴	MS ⁵	MG ⁶	PB ⁷	PE ⁸	R.J ⁹	RS ¹⁰	SPII
Alelo <i>D5S818</i> N: 450	<i>D5S818</i> N: 10802	<i>D5S818</i> N: 788	<i>D5S818</i> N: 325	<i>D5S818</i> N: 150	<i>D5S818</i> N: 208	<i>D5S818</i> N: 14124	<i>D5S818</i> x	<i>D5S818</i> x	<i>D5S818</i> N: 300	<i>D5S818</i> N: 104	<i>D5S818</i> N: 561
6	0.000	0.00009	0.000	0.000	0.000	0.00011			0.001	0.000	0.001
7	0.021	0.01717	0.008	0.017	0.024	0.01062			0.015	0.0144	0.013
8	0.004	0.01250	0.012	0.023	0.024	0.02453			0.015	0.0096	0.021
9	0.034	0.03828	0.029	0.010	0.024	0.03367			0.026	0.0481	0.053
10	0.067	0.06425	0.063	0.063	0.067	0.06078			0.052	0.0865	0.057
11	0.319	0.34021	0.328	0.347	0.365	0.31135			0.329	0.3702	0.307
12	0.371	0.34693	0.368	0.360	0.361	0.35238			0.371	0.3366	0.336
13	0.168	0.16603	0.169	0.160	0.116	0.19180			0.178	0.1058	0.202
14	0.013	0.01241	0.013	0.017	0.019	0.01246			0.013	0.0192	0.010
15	0.003	0.00134	0.002	0.003	0.000	0.00223			0.000	0.000	0.000
16	0.000	0.00079	0.000	0.000	0.000	0.00007			0.000	0.0096	0.000

- 1 – (WHITTLE, ROMANO, NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES, PALHA, SANTOS, 2007). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004). 9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).

ANEXO S – Frequências alélicas do loco STR *FGA* na população de estudo (SC) e em outras populações brasileiras.

	SC	BRA ¹	BRA ²	PA ³	BA ⁴	MS ⁵	MG ⁶	PB ⁷	PE ⁸	RJ ⁹	RS ¹⁰	SP ¹¹
Alelo	<i>FGA</i> N:449	<i>FGA</i> N:17139	<i>FGA</i> N:764	<i>FGA</i> N:207	<i>FGA</i> N:150	<i>FGA</i> N:208	<i>FGA</i> N:8030	<i>FGA</i> x	<i>FGA</i> N:254	<i>FGA</i> N:300	<i>FGA</i> N:101	<i>FGA</i> N:561
15	0.000	0.00005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
16	0.000	0.00038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00031		0.000	0.002	0.0198	0.000
16.2	0.000	0.00012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.005	0.000
17	0.003	0.00096	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00087		0.002	0.002	0.005	0.000
17.2	0.000	0.00047	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00006		0.002	0.000	0.000	0.000
18	0.008	0.00831	0.007	0.010	0.017	0.015	0.00803		0.012	0.013	0.006	0.006
18.2	0.006	0.00344	0.000	0.005	0.000	0.000	0.00468		0.004	0.000	0.000	0.004
19	0.079	0.07241	0.063	0.099	0.087	0.083	0.07386		0.049	0.048	0.0248	0.080
19.2	0.001	0.00093	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00087		0.010	0.000	0.006	0.001
20	0.116	0.11856	0.112	0.118	0.091	0.118	0.11645		0.106	0.112	0.104	0.106
20.2	0.000	0.00058	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00037		0.008	0.000	0.006	0.002
21	0.161	0.15287	0.168	0.140	0.177	0.167	0.14626		0.140	0.152	0.1881	0.145
21.2	0.003	0.00242	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00187		0.004	0.000	0.0099	0.000
22	0.165	0.16037	0.173	0.135	0.177	0.113	0.16949		0.153	0.197	0.203	0.167
22.2	0.003	0.00417	0.002	0.003	0.003	0.000	0.00349		0.010	0.000	0.000	0.004
23	0.155	0.15056	0.147	0.118	0.125	0.180	0.14776		0.118	0.146	0.1238	0.147
23.2	0.001	0.00204	0.000	0.000	0.003	0.005	0.00075		0.002	0.000	0.000	0.001
24	0.158	0.15083	0.150	0.172	0.157	0.123	0.15392		0.149	0.133	0.1386	0.158
24.2	0.001	0.00128	0.000	0.111	0.000	0.000	0.00012		0.006	0.000	0.000	0.000
25	0.087	0.10243	0.110	0.070	0.090	0.132	0.09882		0.140	0.126	0.0842	0.092
25.2	0.000	0.00114	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00006		0.002	0.000	0.000	0.000
26	0.045	0.04557	0.044	0.010	0.033	0.049	0.04514		0.041	0.033	0.0545	0.048
26.2	0.000	0.00055	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00012		0.004	0.000	0.000	0.000
27	0.004	0.01284	0.015	0.005	0.033	0.005	0.01588		0.006	0.028	0.0149	0.026
27.2	0.000	0.00012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.002	0.000	0.000	0.000
28	0.002	0.00309	0.004	0.002	0.007	0.000	0.00616		0.014	0.003	0.006	0.009
28.2	0.000	0.00020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.008	0.000	0.000	0.000
29	0.001	0.00111	0.001	0.002	0.000	0.000	0.00249		0.002	0.003	0.000	0.001
29.2	0.000	0.00003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00006		0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.00026	0.002	0.000	0.000	0.005	0.00044		0.006	0.002	0.000	0.000
30.2	0.000	0.00026	0.001	0.000	0.000	0.000	0.00044		0.000	0.000	0.000	0.000
31	0.000	0.00023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
31.2	0.001	0.00038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00056		0.000	0.000	0.000	0.002
32	0.000	0.00006	0.001	0.000	0.000	0.005	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
32.2	0.000	0.00015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00006		0.000	0.000	0.000	0.000
33	0.000	0.00006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
33.2	0.000	0.00009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
34.2	0.000	0.00006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
41	0.000	0.00006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
42.2	0.000	0.00003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00006		0.000	0.000	0.000	0.000
43.2	0.000	0.00003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00037		0.000	0.000	0.000	0.000
44	0.000	0.00026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
44.2	0.000	0.00003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
45	0.000	0.00003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
45.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00012		0.000	0.000	0.000	0.001
46	0.000	0.00009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
46.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00006		0.000	0.000	0.000	0.001
47	0.000	0.00006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
52.2	0.000	0.00003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000

1 – (WHITTLE; ROMANO; NEGREIROS, 2004). 2 – (GRATTAPAGLIA et al., 2001). 3 – (RODRIGUES; PALHA; SANTOS, 2007). 4 – (SANTOS et al., 2004). 5 – (SILVA et al., 2004). 6 – (CASTILLO et al., 2009). 7 – (GOMES et al., 2007). 8 – (DELLALIBERA et al., 2004). 9 – (GÓES et al., 2004). 10 – (LEITE et al., 2003). 11 – (FRIDMAN et al., 2008).