

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS INTEGRADAS DO PONTAL

ALICE NORBERTO DE CARVALHO

GENOTIPAGEM E VALIDAÇÃO DE
MARCADORES INDEL EM AMOSTRAS COM
PATERNIDADE CONFIRMADA

ITUIUTABA

2017

ALICE NORBERTO DE CARVALHO

GENOTIPAGEM E VALIDAÇÃO DE MARCADORES INDEL EM AMOSTRAS COM PATERNIDADE CONFIRMADA

Trabalho de Conclusão de Curso para o Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia, Campus do Pontal, para conferir grau de Bacharela em Ciências Biológicas à discente.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende

Co-Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

ITUIUTABA

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Alice Norberto de.
Genotipagem e validação de marcadores InDel em amostras com paternidade confirmada / Alice Norberto de Carvalho; Orientador: Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende; Co-orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões — Ituiutaba, 2017.
61f. il. 30cm
Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Uberlândia.

Marcadores Moleculares; Polimorfismos Genéticos; InDels; Verificação de Paternidade.

Aos leitores deste trabalho, que seja possível
o entendimento de todo o texto.

Aos meus pais.

Ao meu irmão.

Aos meus orientadores.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Ana Cristina Norberto de Carvalho e ao meu pai, Victor Leonel de Carvalho Filho, pelo amor inestimável. Obrigada por me ensinarem a ser melhor a cada dia. Obrigada por cuidarem de mim com tamanho zelo e carinho. Ao meu irmão, Guilherme Victor Norberto de Carvalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende, que tanto contribuiu com o projeto. Agradeço por confiar a mim a realização deste trabalho, pelo tempo gasto para que tudo saísse da melhor maneira possível, pelas discussões, críticas, sugestões, e acima de tudo, pelos ensinamentos. Agradeço ainda, por todo o apoio que vem dando a mim durante minha graduação. Ficam aqui meus votos de admiração.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, pela disponibilidade, colaboração e fornecimento do material utilizado no trabalho. Obrigada por ter aberto as portas de seu laboratório e pela ativa participação na construção deste projeto.

À Profa. Dra. Yara Costa Netto Muniz e Profa. Dra. Juliana Doblas Massaro, por aceitarem o convite para fazerem parte da avaliação deste trabalho e pelas valorosas contribuições.

Às técnicas: Ana Lúcia Pimentel, Cláudia Wiesel e Maria do Carmo Tomitão Canas. Em especial à Maria, por ter sido sempre muito solícita, oferecendo-me apoio técnico nos momentos de dúvida. Ainda, aos meus companheiros de laboratório: Aline Silva Paula Brazorotto, Fernanda Bueno Barbosa, Igor Caetano Dias Alcarás, Marcela Dambrowski dos Santos, Maria Luisa de Barros Rodrigues, Sabrina Pereira Santos, Thaís Fenz Araújo e Vanessa Escolano Maso. Dentre todos, um agradecimento maior à Maria Luisa, por todo o ensinamento a respeito das técnicas laboratoriais.

À Ayling Martins Ng, que iniciou esse trabalho em seu projeto de mestrado. Novamente à Maria Luisa, pelo desenvolvimento de um segundo projeto vinculado.

À Prof^a Dr^a Jaqueline Carlos-Bender, pela indicação para o primeiro estágio que realizei no laboratório, sendo, desta forma, convidada a retornar e a desenvolver este trabalho. Também, à Prof^a Dr^a Luciana Karen Calábria, por toda a ajuda dada a mim no início do projeto e por ter sido a responsável por fazer os primeiros contatos. Aproveito para agradecer sua participação em minha trajetória acadêmica.

Aos membros da banca examinadora que a partir de suas sugestões, contribuíram para o enriquecimento desse trabalho.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA), do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo apoio financeiro.

"É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas."

(O Pequeno Príncipe)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	16
RESUMO.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES.....	19
POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	19
INSERÇÃO/DELEÇÃO (InDels).....	20
TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DE PATERNIDADE.....	21
TÉCNICAS: RFLP-VNTR x PCR-STR.....	21
JUSTIFICATIVA.....	23
OBJETIVOS.....	23
OBJETIVO GERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
DESENHO EXPERIMENTAL.....	24
AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	27
ASPECTOS ÉTICOS.....	28
ANÁLISE LABORATORIAL.....	28
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	28
ELETROFORESE.....	31
COLORAÇÃO E SECAGEM DO GEL.....	31
REPETIÇÃO DO PROCESSO DE ANÁLISE LABORATORIAL.....	31
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31

PARÂMETROS POPULACIONAIS.....	32
ESTIMATIVA DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	32
ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (EHW).....	32
PARÂMETROS FORENSES.....	33
CONTEÚDO DE INFORMAÇÃO DO POLIMORFISMO (PIC).....	33
HETROZIGOSE (H).....	34
PODER DE DISCRIMINAÇÃO (PD) E PODER CUMULATIVO DE DISCRIMINAÇÃO (PCD).....	34
PODER DE EXCLUSÃO (PE) E PODER CUMULATIVO DE EXCLUSÃO (PCE)	35
ÍNDICE DE PATERNIDADE (IP), ÍNDICE CUMULATIVO DE PATERNIDADE (ICP) E PROBABILIDADE CUMULATIVA DE PATERNIDADE (W).....	36
ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO.....	37
RESULTADOS.....	38
DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE BANDAS E CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA.....	38
AMOSTRAS SEM AMPLIFICAÇÃO.....	39
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
PARÂMETROS POPULACIONAIS.....	40
ESTIMATIVA DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS E ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (EHW).....	40
PARÂMETROS FORENSES.....	40
ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO.....	43
DISCUSSÃO.....	44
DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE BANDAS E CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA.....	44
AMOSTRAS SEM AMPLIFICAÇÃO.....	44
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
PARÂMETROS POPULACIONAIS.....	44
ESTIMATIVA DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS E ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (EHW).....	44

PARÂMETROS FORENSES.....	45
CONTEÚDO DE INFORMAÇÃO DO POLIMORFISMO (PIC).....	45
HETROZIGOSE (H).....	47
PODER DE DISCRIMINAÇÃO (PD) E PODER CUMULATIVO DE DISCRIMINAÇÃO (PCD).....	46
PODER DE EXCLUSÃO (PE) E PODER CUMULATIVO DE EXCLUSÃO (PCE)	46
ÍNDICE DE PATERNIDADE (IP), ÍNDICE CUMULATIVO DE PATERNIDADE (ICP) E PROBABILIDADE CUMULATIVA DE PATERNIDADE (W).....	47
ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXO 1.....	54
ANEXO 2.....	55
ANEXO 3.....	56
ANEXO 4.....	58
ANEXO 5.....	59

LISTA DE ABREVIACÕES

a	número de alelos
ABMLPM	Associação Brasileira de Medicina Legal e Perícias Médicas
AIM	Ancestry informative marker
APO	Alelo paterno obrigatório
C	Criança
°C	Graus Celsius
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetros
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CNV	Copy Number Variation
dbSNP	Database of Single Nucleotide Polymorphism
<i>dd</i>	Genótipo homozigoto <i>deleção/deleção</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Dinucleotídeos livres
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
F	Filho
FAEPA	Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
g	Graus
GC	Genótipo da criança
GF	Grupo filial

GM	Genótipo da mãe
GP	Grupo parental
GSP	Genótipo do suposto pai
H	Heterozigose
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HCl	Ácido clorídrico
H _e	Heterozigose esperada
HID	Human identification
H _o	Heterozigose observada
Hp	Suposto pai é o pai biológico da criança
H ₂ O	Água
<i>id</i>	Genótipo heterozigoto <i>inserção/deleção</i>
IGH-GCP	Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas
<i>ii</i>	Genótipo homozigoto <i>inserção/inserção</i>
ICP	Índice Cumulativo de Paternidade
InDel	Polimorfismo <i>inserção/deleção</i>
IP	Índice de Paternidade
kb	Quilobases
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
lc	Localização cromossômica
M	Mãe

mA	Miliampère
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MilliQ	Millipore Corporation
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Marcador molecular
MS	Ministério da Saúde
n	Número de indivíduos amplificados/analizados
n°	Número
na	Número de indivíduos não amplificados
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>n_{ii}</i>	Número observado de homozigotos para o alelo <i>inserção</i>
<i>n_{id}</i>	Número observado de heterozigotos
P	Pai
<i>p</i>	Frequência do alelo <i>inserção</i>
<i>p_q</i>	Frequência esperada de heterozigoto
<i>p²</i>	Frequência esperada de homozigoto para o alelo <i>inserção</i>
PA	Percentual de amplificação
pb	Pares de bases
PCD	Poder Cumulativo de Discriminação

PCE	Probabilidade Cumulativa de Exclusão
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Poder de Discriminação
PE	Poder de Exclusão
pH	Potencial hidrogeniônico
p_i	Frequência do alelo <i>inserção</i>
p_{ii}	Frequência do genótipo
PIC	Conteúdo de Informação do Polimorfismo
PM	Peso molecular
PP	Probabilidade "a priori"
q	Frequência do alelo <i>deleção</i>
q^2	Frequência esperada de homozigoto para o alelo <i>deleção</i>
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rs	Número de identificação
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SP	Suposto pai
STR	Short Tandem Repeat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts

VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
W	Probabilidade Cumulativa de Paternidade
μM	Micromolar
x	Veze
μg	Micrograma
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclagem da reação de PCR.....	29
Figura 2. Posicionamento do par de iniciadores externos direto/ <i>forward</i> e reverso/ <i>reverse</i>), complementares às regiões flanqueadoras à <i>inserção</i>	30
Figura 3. Padrão de bandas formado após migração eletroforética. Para todos os <i>loci</i> , a banda superior refere-se ao alelo <i>inserção</i> , e a banda inferior, ao alelo <i>deleção</i> . A presença apenas da banda <i>inserção</i> indica fenótipo homozigoto <i>ii</i> (2), analogamente, a presença apenas da banda <i>deleção</i> indica fenótipo homozigoto <i>dd</i> (3). A presença de ambas as bandas caracteriza fenótipo heterozigoto <i>id</i> (4). Os números (1) e (5), representam, respectivamente, o MM (<i>ladder</i>) e o controle negativo (branco).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Loci</i> polimórficos estudados por Ayling Martins Ng, localização cromossômica (lc), frequências fenotípicas (<i>ii</i> , <i>id</i> , <i>dd</i>), número de indivíduos amplificados (n), número de indivíduos não amplificados (na) e total de indivíduos, para os grupos parental (GP) e filial (GF).....	25
Tabela 2. Percentual de amplificação (PA) dos <i>loci</i> polimórficos estudados por Ayling Martins Ng, para o grupo parental (GP), grupo filial (GF) e total (GP+GF).....	26
Tabela 3. <i>Loci</i> polimórficos estudados por Maria Luisa de Barros Rodrigues, localização cromossômica (lc), frequências fenotípicas (<i>ii</i> , <i>id</i> , <i>dd</i>), número de indivíduos amplificados (n), número de indivíduos não amplificados (na) e total de indivíduos, para os grupos parental (GP) e filial (GF).....	27
Tabela 4. Percentual de amplificação (PA) dos <i>loci</i> polimórficos estudados por Maria Luisa de Barros Rodrigues, para o grupo parental (GP), grupo filial (GF) e total (GP+GF).....	27
Tabela 5. Para cada <i>locus</i> , sequência dos iniciadores direto (<i>forward</i>) e inverso (<i>reverse</i>).....	29
Tabela 6. Quantidade de tampão de reação (buffer), quantidade de MgCl ₂ , quantidade de solução de <i>primers</i> (F/R), quantidade de nucleotídeos livres (dNTPs), quantidade de DNA Polimerase (Taq Polimerase). quantidade de água destilada e volume total, por <i>locus</i> amplificado.....	29
Tabela 7. Volume de mix de reação, volume de DNA genômico e volume total de reação, para cada <i>locus</i> amplificado.....	30
Tabela 8. Ciclagem da reação de PCR.....	30
Tabela 9. Peso molecular (PM) do marcador molecular (MM) ou <i>ladder</i> , do alelo <i>inserção</i> e do alelo <i>deleção</i> , para cada <i>locus</i> amplificado.....	39
Tabela 10. Quantidade de amostras sem amplificação para cada <i>locus</i> e para o conjunto de <i>loci</i>	39

Tabela 11. Para cada <i>locus</i> , número de indivíduos por fenótipo, frequências alélicas e genotípicas e valor de <i>p</i> para o teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Para todos os <i>loci</i> , foram considerados somente os indivíduos não aparentados (mãe e pai), sendo, o valor de <i>n</i> =60. Os alelos <i>inserção</i> e <i>deleção</i> estão representados por <i>i</i> e <i>d</i> , respectivamente.....	40
Tabela 12. Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC), Heterozigose Observada (Ho), Heterozigose Esperada (He), Poder de Discriminação (PD), Poder Cumulativo de Discriminação (PCD), Poder de Exclusão (PE) e Poder Cumulativo de Exclusão (PCE).....	41
Tabela 13. Índice de Paternidade (IP) para cada possível cruzamento, Índice Cumulativo de Paternidade (ICP), considerando o cruzamento mais frequente para cada <i>locus</i> (valores em destaque na tabela) e Probabilidade Cumulativa de Paternidade (W), calculada segundo o valor do ICP. As letras M, F e P indicam mãe, filho(a) e pai, respectivamente. Os alelos <i>inserção</i> e <i>deleção</i> estão representados por <i>i</i> e <i>d</i>	42
Tabela 14. Segregação Alélica: Para cada <i>locus</i> , e considerando todos os fenótipos possíveis, número de filhos(as) (F), gerados a partir do cruzamento mãe (M) x pai (P) e frequências genotípicas observadas. Os alelos <i>inserção</i> e <i>deleção</i> estão representados por <i>i</i> e <i>d</i> , respectivamente.....	43
Tabela 15. Para cada <i>locus</i> , frequência genotípica observada e esperada.....	45
Tabela 16. Classificação fenotípica, por <i>locus</i> , dos 90 indivíduos selecionadosa estudo. Os indivíduos estão agrupados em 30 trios verdadeiros (mãe-filho(a)-pai), identificados por um código numérico, seguido pelas letras M, F e P, indicando mãe, filho(a) e pai, respectivamente. A tabela contém ainda a data de extração das amostras.....	59

RESUMO

Carvalho, A. N. Genotipagem e validação de marcadores InDel em amostras com paternidade confirmada. 2017. 61p. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Uberlândia.

Polimorfismos genéticos são variações na sequência de nucleotídeos da molécula de DNA que alteram o genoma dos indivíduos. Por definição, consideram-se polimórficos os *loci* que apresentam, para o alelo mais comum, frequência populacional igual ou inferior a 99%. Para que um *locus* polimórfico possa ser útil como marcador genético molecular, faz-se necessária a descrição formal do mesmo. Dentre os diversos tipos de marcadores estão os InDels, decorrentes da *inserção* ou *deleção* de um ou mais nucleotídeos em algum local do genoma. A abundância e ampla distribuição desses marcadores, o fato de serem derivados de um único evento mutacional, a possibilidade de genotipagem em pequenos amplicons e a facilidade de detecção por PCR convencional, utilizando-se um par de iniciadores complementares às regiões flangeadoras à *inserção*, seguida de eletroforese, por ser uma técnica de baixo custo e tempo de realização, tem direcionado o uso desses marcadores em exames de identificação humana, incluindo-se exames de verificação de paternidade. A partir do exposto, o projeto teve por objetivo, a descrição da genética formal de 3 *loci* InDel: L16 (16q23.1), L19 (19p13.3), e L22 (22q12.2), em 30 trios verdadeiros (mãe-filho(a)-pai). Os trios foram analisados por PCR convencional, onde foram empregados *primers* flangeadores à *inserção*, seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante à 10%. Posteriormente à genotipagem, foram calculados parâmetros populacionais e forenses, para que os *loci* pudessem ser validados em exames de paternidade. Em razão de 1 dos 3 *loci* (L16), ter se apresentado em desequilíbrio, quando foi aplicado o teste de Hardy-Weinberg, e pelo fato desse mesmo *locus*, assim como os outros 2, exibir, para quase todos os parâmetros calculados, índice informacional abaixo dos valores limite estabelecidos, a validação desses marcadores no diagnóstico de paternidade foi conseguida, com restrições.

Palavras-chave: Marcadores Moleculares; Polimorfismos Genéticos; InDels; Verificação de Paternidade.

INTRODUÇÃO

MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES

Polimorfismos Genéticos

A variação genética existente entre indivíduos da população humana é mínima. Porém, essas diferenças fazem com que cada indivíduo tenha um genoma único (com exceção dos gêmeos monozigóticos). A identificação humana (Human identification – HID) consiste no processo de determinação da identidade. Para tanto, é preciso estabelecer um conjunto de parâmetros que a individualize na população (França, 2011).

Polimorfismos genéticos são variações na sequência de nucleotídeos da molécula de DNA, que alteram o genoma dos indivíduos (Nussabaum et al., 2002). As alterações do material genético resultam na ocorrência simultânea de duas ou mais formas alélicas em um mesmo *locus*. Como consequência à ocorrência de polimorfismos, os cromossomos homólogos das espécies diplóides, que são geneticamente equivalentes, têm regiões onde a sequência de nucleotídeos é diferente, não existindo homólogos iguais. Por definição, consideram-se polimórficos, os *loci* que apresentam, para o alelo mais comum, frequência populacional igual ou inferior a 99% (Cavalli-Sforza et al., 1994).

Além de importantes para a análise do nível de variação genética entre indivíduos de uma população, os polimorfismos garantem, ao longo da evolução, alto grau de diversidade, auxiliando no entendimento de mecanismos evolutivos (Nussabaum et al., 2002). São usados também em análises de filogenia, identificação individual e rastreamento de doenças (Hartl e Clark, 2010). A partir do aprimoramento das tecnologias usadas para análise de DNA, os polimorfismos puderam ser utilizados como marcadores moleculares para identificação humana (Butler, 2005).

Os marcadores moleculares são usados para detecção de polimorfismos genéticos, por apresentarem vantagens sobre os marcadores morfológicos convencionais: (1) exibem neutralidade fenotípica; (2) são herdados, geralmente, de forma co-dominante; (3) dificilmente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas e (4) reduzem o tempo de identificação da diversidade genética entre os indivíduos analisados (Brammer, 2000). O marcador molecular é considerado informativo se apresentar considerável capacidade de discriminação na análise do menor número de *loci* possível (Butler, 2005).

Os diversos tipos de marcadores são classificados de acordo com o tipo de variação que apresentam: (1) VNTRs (Variações no número de repetições *in tandem*): incluem-se

nesse caso os mini e microsátélites, também chamados de STRs (Short Tandem Repeat); (2) SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) que são as substituições em um nucleotídeo único; (3) InDels, polimorfismos gerados pela *inserção* ou *deleção* de um ou mais nucleotídeos; (4) CNVs (Copy Number Variation), segmentos genômicos com tamanho superior a 1 kb, com variação do número de cópias em relação ao genoma de referência (Alkan et al., 2011), além de muitos outros.

Inserção/Deleção (InDels)

Os polimorfismos do tipo InDel são polimorfismos de comprimento, gerados em decorrência da *inserção* ou *deleção* de um ou mais nucleotídeos em algum local do genoma (Francez et al., 2011). Caracterizam-se pela elevada estabilidade devido a uma baixa taxa mutacional e por isso, são considerados como marcadores de evolução lenta (Bastos-Rodrigues et al., 2006).

Podem ser encontrados em forma multialélica, ou seja, apresentando quantidades variáveis de um segmento de DNA que é repetido por várias vezes em um local específico, mas, aproximadamente metade dos polimorfismos InDel são encontrados na forma bialélica, compondo-se somente do alelo *inserção* e/ou *deleção* do segmento (Nussabaum et al., 2002). Para os *loci* InDel bialélicos três fenótipos são possíveis: homozigose do alelo *inserção* (*ii*), homozigose do alelo *deleção* (*dd*) e heterozigose (*id*).

Os InDel bialélicos estão atualmente distribuídos em cinco classes: (1) *inserção/deleção* de uma base; (2) expansão monomérica de uma base; (3) expansões múltiplas de unidades repetitivas de 2-15 pb, onde incluem-se os polimorfismos do tipo STR; (4) *inserção* de transposons e (5) InDels com sequências randômicas, em que as bases não seguem uma ordem ou padrão (Mills et al., 2006).

Polimorfismos InDel bialélicos são os mais abundantes, em número, depois dos SNPs (Huang et al., 2014), correspondendo a aproximadamente 8% dos polimorfismos humanos (Weber et al., 2002), o que significa uma base polimórfica para cada 7,2 kb de DNA (Mills et al., 2006). No genoma, encontram-se amplamente distribuídos, seja em regiões codificadoras ou não-codificadoras. Quando encontrados em regiões codificadoras podem existir variações protéicas qualitativas e/ou quantitativas, havendo alteração fenotípica. No entanto, os polimorfismos são mais frequentemente encontrados em regiões não-codificadoras, nesse caso, sem consequências para o funcionamento dos genes, não havendo alteração das proteínas. Por fim, encontram-se polimorfismos InDel em sequências cromossômicas sexuais.

O crescimento pelo interesse em se utilizar polimorfismos InDel em exames de identificação humana, seja na identificação criminal ou na identificação de paternidade justifica-se: (1) pela abundância e ampla distribuição desses marcadores

por todo o genoma (Weber et al., 2002); (2) por serem derivados de um único evento mutacional, tendo taxa de incidência de $2,3 \times 10^{-9}$ (Nachman e Crowell, 2000), quando comparados aos STRs, que têm taxa de incidência igual a $1,2 \times 10^{-3}$ (Weber e Wong, 1993); (3) por poderem apresentar significativas diferenças de frequência alélica entre populações geograficamente distintas, atuando, nesses casos, como marcadores informativos de ancestralidade (AIM) (Weber et al., 2002) e (4) por terem um número significativo de alelos que possam ser genotipados em pequenos amplicons, aumentando assim, o sucesso das análises de DNA degradado (Pereira et al., 2009; Ribeiro-Rodrigues et al., 2009).

Por fim, a possibilidade de detecção por PCR convencional, utilizando-se um par de iniciadores complementares às regiões flangeadoras à *inserção*, seguida de eletroforese, por ser uma técnica de baixo custo e tempo de realização, tem direcionado o uso de InDels em exames de identificação humana, incluindo-se exames de verificação de paternidade (Fondevila et al., 2012; Francez et al., 2012; LaRue et al., 2012; LaRue et al., 2013).

TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO DE PATERNIDADE

Técnicas: RFLP-VNTR x PCR-STR

O diagnóstico de paternidade pode ser obtido a partir do estudo de regiões gênicas denominadas minissatélites ou VNTRs ("Variable Number of Tandem Repeats - Número Variável de Repetições em Tandem), sequências com 9-100 nucleotídeos repetidos no DNA. A técnica utilizada para a análise dessas regiões denomina-se RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição") (Jeffreys et al, 1985; Jeffreys et al, 1985).

Para a realização da técnica de RFLP, o material genético dos indivíduos envolvidos com a verificação da paternidade, após extração, é submetido a tratamento com enzimas (ou endonucleases) de restrição. As endonucleases, quando em contato com o material genético, reconhecem sequências nucleotídicas específicas, clivando-as sempre que compatíveis com os seus sítios de reconhecimento. As regiões reconhecidas e clivadas pelas enzimas variam entre indivíduos geneticamente distintos, resultando em fragmentos com diferentes tamanhos (Fischer, 2000).

Posteriormente à restrição enzimática, os fragmentos genômicos são separados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. A separação em gel, não torna visível diferenças de tamanho entre os fragmentos, sendo necessária a utilização da técnica de *Shouthern Blotting*. Nessa técnica, os fragmentos são transferidos para uma membrana de nitrocelulose (nylon), através do arrastamento por capilaridade ou

vácuo. O material genético é covalentemente fixado à membrana pela utilização de altas temperaturas ou luz ultravioleta (Fisher, 2000).

Para a visualização dos fragmentos polimórficos entre os inúmeros fragmentos transferidos para a membrana são usadas sondas de ácidos nucleicos. As sondas hibridizam-se, por complementariedade, às sequências VNTRs fixadas na membrana. Entre os milhares de fragmentos resultantes do corte com enzimas de restrição, somente serão visíveis, aqueles fixados e complementares ao material da sonda. Por *locus*, cada sonda hibridiza-se com dois segmentos cromossômicos, correspondentes aos alelos materno e paterno de cada indivíduo. Após hibridização, a membrana é exposta a filmes de raios-X em uma técnica denominada auto-radiografia (Fisher, 2000).

Os indivíduos são diferenciados pelo comprimento das seqüências VNTRs, geradas após ação de uma enzima de restrição. O padrão de fragmentos é característico e herdável entre indivíduos geneticamente relacionados. Indivíduos sem relação genética diferem na posição dos sítios de restrição enzimática, gerando fragmentos de tamanhos distintos, nesse caso, as bandas serão observadas em posições diferentes na auto-radiografia (Pacini, 2011).

A verificação da paternidade também pode ser feita a partir do estudo de regiões polimórficas denominadas microssatélites ou STRs ("Short Tandem Repeats - Repetições Curtas em Tandem), sequências de 2 a 9 nucleotídeos repetidos no DNA (Hartl e Clark, 2010). O tamanho reduzido dos STRs possibilita que amostras com quantidades diminutas de material genético ou com alto grau de degradação sejam usadas para o diagnóstico. Diferentemente, os marcadores VNTRs, necessitam, para a análise, de grande quantidade de material (Hill et al., 2008).

A análise individual de um *locus* STR apresenta poder de discriminação relativamente baixo quando comparado a um *locus* VNTR. Em decorrência disso, diversas regiões STRs são analisadas conjuntamente. Quando várias regiões STRs são estudadas simultaneamente, o poder de discriminação conseguido é semelhante ao de um único *locus* VNTR (Góes, 2002).

Para a análise conjunta dessas regiões em uma única reação de PCR são utilizados sistemas de amplificação multiplex. Sistemas multiplex têm como vantagem a diminuição de custos e do tempo necessário para a realização da técnica. Em outras palavras, a verificação de paternidade feita a partir da tecnologia de PCR é mais rápida e barata, em comparação com a tecnologia de RFLP (Góes, 2002).

O material amplificado é separado por eletroforese em gel ou em sequenciador automático, obtendo-se padrões de bandas ou de picos, respectivamente. A

paternidade é confirmada quando o perfil genético obtido para o filho(a) é equivalente ao obtido para o suposto pai, nesse caso, o suposto pai é o pai biológico da criança. Se o perfil apresentado pelo filho(a) não coincidir com o apresentado pelo pai, a paternidade é refutada (Bjerre et al., 2001).

A técnica de RFLP apresenta elevada taxa mutacional, aumentando as chances de falsas exclusões de paternidade. Além disso, não possibilita uma determinação precisa dos alelos observados, dificultando uma comparação acuada entre resultados de diferentes laboratórios. Contrariamente, a tecnologia da PCR tem uma menor taxa de mutação. A análise dos resultados baseia-se na determinação exata dos alelos, facilitando a padronização da técnica entre diferentes laboratórios, permitindo comparações precisas entre os mesmos.

JUSTIFICATIVA

Em processos de HID e no estudo de populações, os marcadores InDel vêm ganhando notoriedade. Em decorrência disso, diversos trabalhos sugerem sua utilização em exames de paternidade.

Para que os *loci* InDel possam ser úteis na determinação da paternidade, faz-se necessária a descrição da genética formal dos mesmos. A descrição formal delineia as condições de amplificação, estabelecendo *primers* e condições de temperatura específicas, para cada *locus*.

Em decorrência do exposto, o projeto teve como pretexto complementar a descrição de 3 *loci* InDel, iniciada no projeto “Validação de marcadores *inserção/deleção* para genotipagem fetal não invasiva”, de autoria de Ayling Martins Ng, para que os mesmos pudessem ser validados para o diagnóstico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como principal objetivo complementar a descrição da genética formal de 3 *loci* InDel, iniciada no projeto "Validação de marcadores *inserção/deleção* para genotipagem fetal não invasiva" (Ng, 2015).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Genotipar 3 *loci* InDel em 30 trios verdadeiros (mãe-filho(a)-pai).

Calcular as frequências alélicas e genotípicas desses *loci*.

Calcular parâmetros populacionais e de interesse forense.

Confirmar, nesses trios, o modelo de segregação independente dos alelos parentais.

Validar esses marcadores em exames de paternidade.

MATERIAL E MÉTODOS

DESENHO EXPERIMENTAL

O projeto "Validação de marcadores *inserção/deleção* para genotipagem fetal não invasiva", de autoria de Ayling Martins Ng, iniciou a descrição formal de 20 *loci* InDel, sendo 16 polimórficos e 4 monomórficos.

Para cada *locus* polimórfico, foi selecionado um total de 150 indivíduos distribuídos em 50 trios (mãe-filho(a)-pai). Do total, 100 correspondiam ao grupo parental (GP), sendo 50 mães (M) e 50 pais (P), e, 50 ao grupo filial (GF), ou seja, aos filhos (F) dos casais. A localização cromossômica, as frequências fenotípicas, o número de indivíduos amplificados e de indivíduos sem amplificação, dos *loci* estudados por Ng estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. *Loci* polimórficos estudados por Ayling Martins Ng, localização cromossômica (lc), frequências fenotípicas (*ii*, *id*, *dd*), número de indivíduos amplificados (n), número de indivíduos não amplificados (na) e total de indivíduos, para os grupos parental (GP) e filial (GF)

<i>Locus</i>	<i>Lc</i>	GP						GF					
		<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	n	na	Total	<i>li</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	n	na	Total
L1	1q42.11	21	53	24	98	2	100	12	29	7	48	2	50
L2	2q37.3	29	37	23	89	11	100	14	22	10	46	4	50
L3	3q22.2	39	49	12	100	0	100	18	26	6	50	0	50
L4	4q13.3	11	42	37	90	10	100	7	22	20	49	1	50
L5	5p15.31	79	18	0	97	3	100	39	8	1	48	2	50
L7	7q21.3	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	50	50
L8	8q24.21	37	39	13	89	11	100	18	23	7	48	2	50
L9	9q34.13	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	50	50
L10	10p14	49	33	13	95	5	100	27	16	6	49	1	50
L11	11q13.3	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	50	50
L12	12q13.13	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	50	50
L13	13q14.11	16	33	48	97	3	100	7	18	23	48	2	50
L15	15q26.1	69	23	4	96	4	100	37	11	1	49	1	50
L16	16q23.1	57	36	5	98	2	100	27	19	2	48	2	50
L17	17q24.3	1	15	66	82	18	100	0	9	32	41	9	50
L18	18p11.21	42	43	14	99	1	100	18	22	8	48	2	50
L19	19p13.3	27	48	24	99	1	100	14	22	13	49	1	50
L20	20p13	9	38	50	97	3	100	4	21	23	48	2	50
L21	21q22.2	3	36	48	87	13	100	4	17	24	45	5	50
L22	22q12.2	24	51	19	94	6	100	9	27	12	48	2	50

Os *loci* foram, em quase todo o texto, referidos de forma simplificada, utilizando-se a letra L, seguida pelo número do cromossomo em que se localiza. Número de identificação (rs) no dbSNP (NCBI): L1: rs6143647; L2: rs3842570; L3: rs67696659; L4: rs33926123; L5: rs34156041; L7: rs74315104; L8: rs1305049; L9: rs118203674; L10: rs34656661; L11: rs80356802 ; L12: rs267607475; L13: rs67616458; L15: rs11275778; L16: rs138481647; L17: rs59137132; L18: rs140462903; L19: rs148112183; L20: rs71311113; L21: rs71330398 e L22: rs67519581. L7, L9, L11 e L12: monomórficos.

Para cada *locus* estudado por Ng, foram calculados percentuais de amplificação para os grupos parental, filial e para o grupo total, que considera ambos. Os resultados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Percentual de amplificação (PA) dos *loci* polimórficos estudados por Ayling Martins Ng, para o grupo parental (GP), grupo filial (GF) e total (GP+GF)

<i>Locus</i>	PA		
	GP	GF	Total
L1	98,00	96,00	97,33
L2	89,00	92,00	90,00
L3	100,00	100,00	100,00
L4	90,00	98,00	92,66
L5	97,00	96,00	96,66
L7	0,00	0,00	0,00
L8	89,00	96,00	91,33
L9	0,00	0,00	0,00
L10	95,00	98,00	96,00
L11	0,00	0,00	0,00
L12	0,00	0,00	0,00
L13	97,00	96,00	96,66
L15	96,00	98,00	96,66
L16	98,00	96,00	97,33
L17	82,00	82,00	82,00
L18	99,00	96,00	98,00
L19	99,00	98,00	98,66
L20	97,00	96,00	96,66
L21	87,00	90,00	88,00
L22	94,00	96,00	94,66

L7, L9, L11 e L12: monomórficos.

A descrição da genética formal dos 4 *loci* monomórficos selecionados não foi completada em trabalhos posteriores. Marcadores monomórficos são invariáveis, tornando impossível a utilização dos mesmos para a diferenciação entre indivíduos de uma população.

Estando descartados os *loci* monomórficos, o projeto "Análise de segregação alélica e descrição formal de marcadores genéticos *inserção/deleção*", de autoria de Maria Luisa de Barros Rodrigues, complementou a descrição de 7 dos 16 *loci* polimórficos. Para cada *locus* foram analisados 30 trios ou 90 indivíduos, sendo 60 pertencentes ao GP e 30 ao GF. A tabela 3 contém a localização cromossômica, as frequências fenotípicas, o número de indivíduos amplificados e de indivíduos sem amplificação, dos *loci* estudados por Rodrigues.

Tabela 3. *Loci* polimórficos estudados por Maria Luisa de Barros Rodrigues, localização cromossômica (*lc*), frequências fenotípicas (*ii*, *id*, *dd*), número de indivíduos amplificados (*n*), número de indivíduos não amplificados (*na*) e total de indivíduos, para os grupos parental (GP) e filial (GF)

<i>Locus</i>	<i>Lc</i>	GP						GF					
		<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	<i>n</i>	<i>na</i>	Total	<i>li</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	<i>n</i>	<i>na</i>	Total
L1	1q42.11	10	31	19	60	0	60	2	17	11	30	0	30
L4	4q13.3	10	26	24	60	0	60	1	16	13	30	0	30
L5	5p15.31	41	19	0	60	0	60	18	11	1	30	0	30
L8	8q24.21	28	25	7	60	0	60	15	11	3	29	1	30
L10	10p14	33	19	8	60	0	60	15	12	3	30	0	30
L13	13q14.11	6	18	36	60	0	60	2	14	14	30	0	30
L18	18p11.21	23	27	10	60	0	60	8	18	4	30	0	30

Número de identificação (rs) no dbSNP (NCBI): L1: rs6143647; L4: rs33926123; L5: rs34156041; L8: rs1305049; L10: rs34656661; L13: rs67616458 e L18: rs140462903.

Para cada *locus*, também foram calculados percentuais de amplificação para os grupos parental, filial e total. A tabela 04 contém os resultados.

Tabela 4. Percentual de amplificação (PA) dos *loci* polimórficos estudados por Maria Luisa de Barros Rodrigues, para o grupo parental (GP), grupo filial (GF) e total (GP+GF)

<i>Locus</i>	PA		
	GP	GF	Total
L1	100,00	100,00	100,00
L4	100,00	100,00	100,00
L5	100,00	100,00	100,00
L8	100,00	96,66	98,88
L10	100,00	100,00	100,00
L13	100,00	100,00	100,00
L18	100,00	100,00	100,00

O presente trabalho amplificou amostras não amplificadas em trabalhos anteriores. Dos 16 *loci* polimórficos, foram selecionados, aleatoriamente, 3 deles: L16 (16q23.1), L19 (19p13.3), e L22 (22q12.2). O total de indivíduos amplificados por *locus*, foi igual a 90 ou 30 trios verdadeiros (mãe-filho(a)-pai).

AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras biológicas dos 90 indivíduos agrupam-se em 30 trios verdadeiros, ou seja, que tiveram paternidade confirmada após procurarem pelo Serviço de Investigação de Paternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP).

O material genético é parte do banco de amostras "Populações Urbanas", alocado no Laboratório de Genética Bioquímica, do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho está incluso nos projetos "Validação de marcadores *inserção/deleção* para genotipagem fetal não invasiva" (Ng, 2015) e "Análise de segregação alélica e descrição formal de marcadores genéticos *inserção/deleção*" (Rodrigues, 2015), com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), processo HCRP n° 11015/2014. O documento de aprovação do projeto está em anexo (Anexo 1). O anexo 2 contém o documento que reconhece a criação do banco de amostras "Populações Urbanas", omitido pelo CEP, processo HCRP n° 8079/2004.

ANÁLISE LABORATORIAL

A análise laboratorial do presente trabalho compôs-se das seguintes etapas: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Eletroforese, Coloração e Secagem do Gel. As amostras biológicas amplificadas foram extraídas nos anos de 2003 e 2004, justificando porque o projeto não abrangeu a fase de extração.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os reagentes utilizados nas reações de PCR estão descritos a seguir:

Tampão de reação 10X livre de $MgCl_2$: Tris/Hcl 100 mM; pH 8,3; KCl 500 mM (Sigma - Aldrich).

$MgCl_2$: 25 mM (Sigma - Aldrich).

Solução de *primers*: solução trabalho a 2,5 μ M, sendo 10 μ L do *primer* direto (*forward*), 10 μ L do *primer* reverso (*reverse*) e 180 μ L de água destilada ultrafiltrada.

dNTPs: 20 mM cada (Biotools -B&M Labs, SA).

DNA Polimerase (Taq): 5U/ μ L (Sigma - Aldrich).

Água destilada ultrafiltrada (MilliQ - Millipore Corporation).

Os *primers* utilizados foram os mesmos desenhados por Ng, no projeto "Validação de marcadores *inserção/deleção* para genotipagem fetal não invasiva". Ng desenhou um trio de iniciadores, sendo dois complementares às regiões flanqueadoras (externos) e um complementar à *inserção* (interno). No presente trabalho somente foram usados os *primers* externos ou flanqueadores.

A tabela 5 contém, para cada *locus*, a sequência dos iniciadores direto (*forward*) e reverso (*reverse*). Abaixo, a figura 1 esquematiza o posicionamento do par de iniciadores externos complementares às regiões flanqueadoras à *inserção*.

Tabela 5. Para cada *locus*, sequência dos iniciadores direto (*forward*) e inverso (*reverse*)

<i>Locus</i>	<i>Primer Direto (5'-3')</i>	<i>Primer Reverso (5'-3')</i>
L16	TCAGCAAGACGAGAGCAGAA	CCCTCTGCCTCGGAACTTTA
L19	CCTCTCTGCTGTGTGGACTT	CTGGACCTCACTCTCCTCAC
L22	GTGAGTGAGGGGACAGTCGT	TGCAGGCCTGACATAGACC

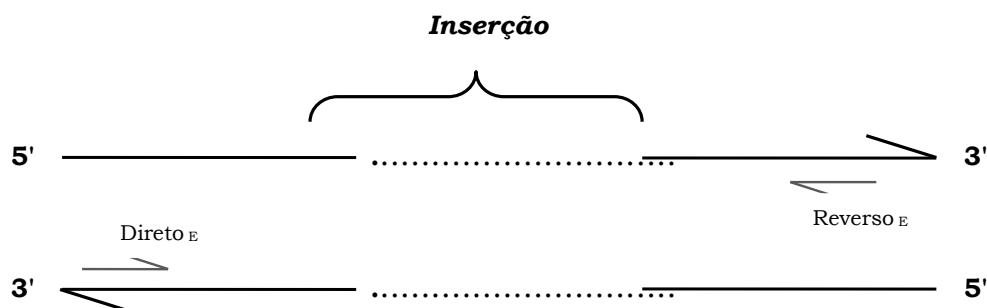


Figura 1. Posicionamento do par de iniciadores externos (direto/*forward* e reverso/*reverse*), complementares às regiões flanqueadoras à *inserção* (arquivo pessoal).

O mix de reação foi preparado pela adição de tampão (buffer), $MgCl_2$, solução de *primers*, dNTPs, Taq Polimerase e água destilada. A concentração de cada um dos reagentes seguiu o descrito por Ng (2015) (tabela 6).

Tabela 6. Quantidade de tampão de reação (buffer), quantidade de $MgCl_2$, quantidade de solução de *primers* (F/R), quantidade de nucleotídeos livres (dNTPs), quantidade de DNA Polimerase (Taq Polimerase), quantidade de água destilada e volume total, por *locus* amplificado

<i>Locus</i>	Buffer (μL)	$MgCl_2$ (μL)	Primer (F/R) (μL)	dNTPs (μL)	Taq Polimerase (μL)	Água Destilada (μL)	Total (μL)
L16	2,50	2,00	0,70	0,16	0,10	15,54	21,00
L19	2,50	2,00	1,00	0,16	0,10	15,24	21,00
L22	2,50	1,50	1,00	0,16	0,10	16,74	22,00

Cada microtubo de reação de 0,5 mL, teve volume final de 25 μL. Para os *loci* 16, e 19, 4 μL do volume final eram DNA genômico e 21 μL eram mix de reação. Para o *locus* 22, 3 μL do volume final eram DNA genômico e 22 μL eram mix de reação, conforme descrito na tabela 7.

Tabela 7. Volume de mix de reação, volume de DNA genômico e volume total de reação, para cada *locus* amplificado

<i>Locus</i>	Mix de Reação (μL)	DNA Genômico (μL)	Total (μL)
L16	21	4	25
L19	21	4	25
L22	22	3	25

O termociclador utilizado para as reações de PCR foi o modelo GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems).

A tabela 8 e a figura 2 contêm a ciclagem da reação de PCR. Para todos os *loci* foram utilizadas as mesmas condições de amplificação, padronizadas por Ng (2015).

Tabela 8. Ciclagem da reação de PCR

Fase	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Repetição
Desnaturação de DNA	95	11	1x
	94	1	
Pareamento de <i>Primer</i>	60	1	30x
Polimerização	70	2	
	70	10	1x
Armazenamento	20	∞	∞

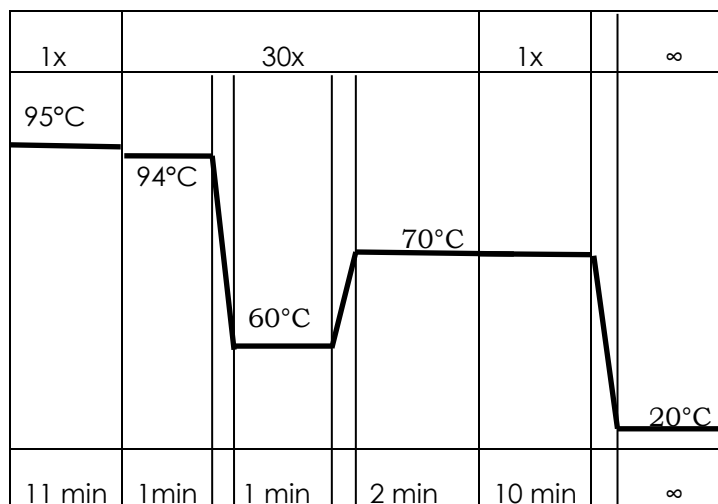


Figura 2. Ciclagem da reação de PCR (arquivo pessoal).

Eletroforese

Após a PCR, o produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante à 10%. As corridas tiveram duração aproximada de 2 horas, com fonte de voltagem constante ajustada a 200V e 400mA. O protocolo de análise laboratorial - eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante, elaborado pelo Laboratório de Genética Bioquímica, do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), contém uma descrição detalhada do procedimento (Anexo 3).

Coloração e Secagem do Gel

Para a observação do padrão de bandas, a coloração do gel foi feita utilizando-se nitrato de prata. Posteriormente à coloração, houve a secagem do gel por ressecamento. Os procedimentos de coloração e secagem do gel estão descritos de forma detalhada no protocolo de análise laboratorial - coloração com nitrato de prata e secagem do gel, também elaborado pelo Laboratório de Genética Bioquímica, do Departamento de Genética, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) (Anexo 4).

REPETIÇÃO DO PROCESSO DE ANÁLISE LABORATORIAL

Para as amostras sem amplificação, houve repetição do processo de análise laboratorial. Anteriormente à realização da PCR, o material foi aquecido, utilizando-se o termociclador DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer). O tempo de aquecimento foi de aproximadamente 15 minutos. Para a realização da PCR, o mix de reação e a ciclagem, foram os mesmos usados em amostras amplificadas. Na eletroforese, coloração e secagem do gel, também não foram feitas modificações.

Aquelas amostras que continuaram sem amplificação, passaram, novamente, pelo processo de análise laboratorial. Dessa vez, além do aquecimento prévio do material, houve alteração no mix de reação. A concentração de DNA genômico passou de 3 ou 4 μL , para 6 μL , independentemente do *locus* analisado. Todas as outras padronizações, relacionadas à PCR e as demais etapas, foram mantidas. Não houve uma quarta tentativa para as amostras não amplificadas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas compuseram-se do estudo de parâmetros populacionais, ou seja, foram calculadas, para cada *locus*, as frequências alélicas (p_i) e genotípicas (p_{ii}), considerando-se a aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas, propostas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Além do estudo de parâmetros populacionais, também foram estimados parâmetros de interesse forense. Foram os seguintes, os parâmetros forenses estudados: Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC), Heterozigose (H), Poder de Discriminação (PD), Poder Cumulativo de Discriminação (PCD), Poder de Exclusão (PE), Poder Cumulativo de Exclusão (PCE), Índice de Paternidade (IP), Índice Cumulativo de Paternidade (ICP) e Probabilidade Cumulativa de Paternidade (W).

Finalmente, foi feita, para cada *locus*, a análise de segregação, por contagem direta a partir do fenótipo dos trios. Para cada fenótipo, foi registrado o número de indivíduos filhos(as) (F), gerados a partir do cruzamento mãe (M) x pai (P).

Parâmetros Populacionais

Estimativa das Frequências Alélicas e Genotípicas

A frequência alélica corresponde à porcentagem ou proporção de ocorrência de um determinado alelo de um *locus* em uma população. Analogamente, a frequência genotípica indica a porcentagem de ocorrência de determinado genótipo em relação aos outros genótipos observados dentro de uma população (Beiguelman, 2008).

As frequências alélicas (p_i) e genotípicas (p_{ii}) de cada *locus* foram estimadas por contagem direta, utilizando-se o programa Genepop[®] versão 4.4.3 (Rousset, 2008), disponível em <http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>.

Adiante, as equações para contagem em organismos diplóides:

$$p_i = \frac{2n_{ii} + n_{id}}{2n} \qquad p_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Em que:

p_i = frequência do alelo *inserção*;

p_{ii} = frequência do genótipo *inserção/inserção*;

n_{ii} = número de homozigotos observados para o alelo *inserção*;

n_{id} = número de heterozigotos observados;

n = número de indivíduos analisados.

Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

Segundo Beiguelman (2008), o teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) afirma que, em uma população mendeliana, as frequências alélicas e genotípicas mantêm-se constantes, geração após geração.

Considerando-se os três fenótipos possíveis para um *locus* InDel bialélico: homozigose do alelo *inserção* (*ii*), homozigose do alelo *deleção* (*dd*) e heterozigose (*id*), as frequências genotípicas esperadas, no equilíbrio, para os alelos *inserção* (*i*) e *deleção* (*d*), podem ser calculadas a partir do binômio expandido (Beiguelman, 2008):

$$(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$$

Em que:

p = frequência do alelo *inserção*;

q = frequência do alelo *deleção*;

p^2 = frequência esperadas de homozigotos para o alelo *inserção*;

$2pq$ = frequência esperada de heterozigotos;

q^2 = frequência esperada de homozigotos para o alelo *deleção*.

Para verificar a aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas propostas pelo EHW foi utilizado o programa Genepop[®] versão 4.4.3 (Rousset, 2008), disponível em <http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>.

A princípio foi realizado o teste exato do EHW (Weir, 1996), que faz os cálculos para todas as configurações de amostras possíveis por Cadeia de Markov, considerando a hipótese nula de combinação aleatória dos gametas. Para o *locus* que apresentou desvio, foi realizado um segundo teste, na qual a hipótese nula era a deficiência de heterozigotos.

Para evitar viés na análise dos dados, os parâmetros populacionais foram calculados considerando-se somente os indivíduos parentais (geneticamente independentes). Excluindo-se os indivíduos filiais (geneticamente dependentes), a amostra populacional inicial de 90 indivíduos ($n=90$), passou a ter 60 indivíduos ($n=60$).

PARÂMETROS FORENSES

Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC)

O Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC) indica a probabilidade com que o genótipo da prole permite a dedução do genótipo parental (Hildebrand, 1992). Em um *locus*, seu valor pode ser determinado de acordo com a fórmula expandida (Botstein et al, 1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^a p_i^2 \right) + \sum_{i=1}^a p_i^4$$

Em que:

a = número de alelos;

p_i = frequência do i -ésimo alelo

Heterozigose (H)

Os valores de heterozigose esperada (H_e) e observada (H_o) referem-se à proporção de indivíduos heterozigotos esperada, segundo o EHW, e observada na população, respectivamente (Butler, 2005).

A heterozigose esperada estima a diversidade gênica intra-populacional, definida como a probabilidade de dois alelos escolhidos aleatoriamente, em uma população, serem diferentes (Weir, 1996). A heterozigose observada é estimada por contagem direta. Valores elevados de H_o , em uma população, indicam alta diversidade alélica (Butler, 2005). Ambas podem ser calculadas segundo as equações:

$$H_o = \frac{nid}{n} \qquad H_e = 2pq$$

Em que:

nid = número de heterozigotos observados;

n = número de indivíduos analisados;

p = frequência do alelo *inserção*;

q = frequência do alelo *deleção*.

Poder de Discriminação (PD) e Poder Cumulativo de Discriminação (PCD)

O Poder de Discriminação (PD) fornece a probabilidade de que dois indivíduos escolhidos aleatoriamente, em uma população, apresentem perfis genéticos diferentes, ou seja, tenham, para um determinado *locus*, genótipos distintos (Butler, 2005).

A equação para o cálculo do PD está descrita a seguir:

$$PD = 1 - PI$$

Em que:

$$PI = p^4 + q^4 + (2pq)^2$$

PI = probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente tenham genótipos idênticos nos mesmos *loci*.

Abaixo, está a equação expandida:

$$PD = 1 - (p^4 + q^4 + (2pq)^2)$$

Em que:

p = frequência do alelo *inserção*;

q = frequência do alelo *deleção*.

O Poder Cumulativo de Discriminação (PCD) fornece a probabilidade de um determinado conjunto de marcadores distinguir, em uma população, dois indivíduos, geneticamente. Abaixo, está descrita a equação matemática para o cálculo do PCD:

$$PCD = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - PD_i)$$

Em que n = número de loci avaliados.

Poder de Exclusão (PE) e Poder Cumulativo de Exclusão (PCE)

O Poder de Exclusão (PE) fornece a probabilidade de excluir um indivíduo erroneamente acusado em uma investigação de paternidade (Evetts e Weir, 1998; Desmarais et al., 1998). Segundo a Associação Brasileira de Medicina Legal e Perícias Médicas (ABMLPM), para que a exclusão possa ser caracterizada, os alelos do suposto pai não devem corresponder a mais do que dois alelos paterno-obrigatórios (APO) (Carvalho, 2009).

Em havendo essa correspondência, a confirmação pela paternidade somente pode ser assumida após análise de outros marcadores. Deve haver análise de outros marcadores para ser certificada a exclusão ou confirmada a ocorrência de mutação (Ban, 2000; AABF, 1999; Brinkmann et al., 1999; Weir, 1996).

Ainda havendo correspondência, a validação da paternidade depende, em última instância, do cálculo das frequências populacionais dos marcadores utilizados, isso porque, os alelos comuns entre as partes analisadas são comuns na população, podendo haver variações (de frequência) entre grupos populacionais distintos (Evetts e Weir, 1998; Weir, 1996).

A equação para o cálculo do PE está descrita a seguir:

$$PE = \sum_i p_i (1 - p_i)^2 - \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \neq i} p_i^2 p_j^2 (4 - 3p_i - 3p_j)$$

Em que:

p_i = frequência do alelo i-ésimo.

p_j = frequência do alelo j-ésimo diferente de i-ésimo.

O Poder Cumulativo de Exclusão (PCE) de um conjunto de marcadores é dado pela equação:

$$PCE = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - PE_i)$$

Em que n = número de loci avaliados.

Índice de Paternidade (IP), Índice Cumulativo de Paternidade (ICP) e Probabilidade Cumulativa de Paternidade (W)

O Índice de Paternidade (IP) reflete a razão entre a probabilidade de que um homem com fenótipo do suposto pai (SP) seja o pai biológico da criança, e a probabilidade de que outro homem qualquer selecionado aleatoriamente na população possa ser o verdadeiro pai (Evetts e Weir, 1998).

Em outras palavras, a equação descreve a razão entre a probabilidade de que o genótipo da criança seja originado dos genótipos da mãe e suposto pai, partindo do princípio que este seja o pai biológico, e a probabilidade de que o genótipo da criança seja originado dos genótipos da mãe e de um outro homem não relacionado ao suposto pai, utilizando dados de frequência alélica da população.

A equação para o cálculo do IP está descrita a seguir:

$$IP = \frac{Pr(G_C/G_M, G_{SP}, H_p)}{Pr(G_C/G_M, G_{SP}, H_d)}$$

Em que:

G_C = genótipo da criança;

GM = genótipo da mãe;

GSP = genótipo do suposto pai;

Hp = suposto pai é o pai biológico de C;

Hd = suposto pai não é o pai biológico de C.

O IP é calculado para cada *locus* analisado. A multiplicação desses índices gera o Índice Cumulativo de Paternidade (ICP), calculado utilizando-se a seguinte equação:

$$ICP = \prod_{i=1}^n IP_i$$

Em que n = número de *locus* avaliados.

Quanto maior o ICP, maior a probabilidade de o homem investigado ser o pai biológico.

A Probabilidade Cumulativa de Paternidade (W) é calculada utilizando-se o valor do ICP, e fornece a probabilidade de o suposto pai ser o pai verdadeiro da criança. O valor de W pode ser obtido pela seguinte fórmula, quando a probabilidade "a priori" (PP) é 0,5 (Evetts e Weir, 1998):

$$W = \frac{ICP}{(ICP + 1)}$$

As análises forenses foram feitas utilizando-se o programa Excel[®] versão 12.0 (Microsoft Office, 2007), disponível em <https://products.office.com/excel/>. No programa, foram inseridas as equações específicas de cada parâmetro acima descrito. Além das equações, foram usados os valores de frequência alélica gerados pelo programa Genepop[®] versão 4.4.3 (Rousset, 2008), disponível em <http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>.

Para evitar viés na análise dos dados, os cálculos foram feitos considerando-se somente os indivíduos parentais. Excluindo-se os indivíduos filiais, a amostra inicial de 90 indivíduos ($n=90$), passou a ter 60 indivíduos ($n=60$).

ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO

A análise de segregação confirma, ou não, o modelo mendeliano de separação dos alelos. Segundo as Leis Mendelianas, dois ou mais pares de genes, localizados em diferentes pares de cromossomos homólogos, segregam-se, durante a meiose, de maneira totalmente independente. O processo de combinação alélica, para a formação dos gametas, é um evento aleatório.

Contrariamente, quando dois ou mais pares de genes, condicionando duas ou mais características, localizam-se em um mesmo par de cromossomos homólogos, espera-se que a separação alélica ocorra conjuntamente, segundo um modelo de segregação não independente.

Além da confirmação do modelo de segregação acima descrito, a análise é usada para identificar, em uma família ou população, o modelo de herança para uma dada característica. Em outras palavras, define o número de genes envolvidos na expressão de um determinado fenótipo, considerando a ocorrência de interações gênicas e/ou interações gene-ambiente (Burton et al., 2005; Thomas, 2004).

Fez-se a análise de segregação utilizando-se o programa Excel® versão 12.0 (Microsoft Office, 2007), disponível em <https://products.office.com/excel/>. Nesse caso, nem a geração parental, nem a geração filial, foi excluída das análises. A amostra populacional usada compreendia então, um total de 90 indivíduos (n=90).

RESULTADOS

DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE BANDAS E CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Abaixo, estão a figura 3 e a tabela 9. A figura 3 contém, para cada *locus*, imagens representativas do padrão de bandas. No anexo 5, encontra-se a classificação fenotípica completa, ou seja, referente a todos os *loci* e trios analisados. A tabela 10 descreve, para cada *locus*, o peso molecular (PM) do marcador molecular (MM) ou *ladder*, do alelo *inserção* e do alelo *deleção*.

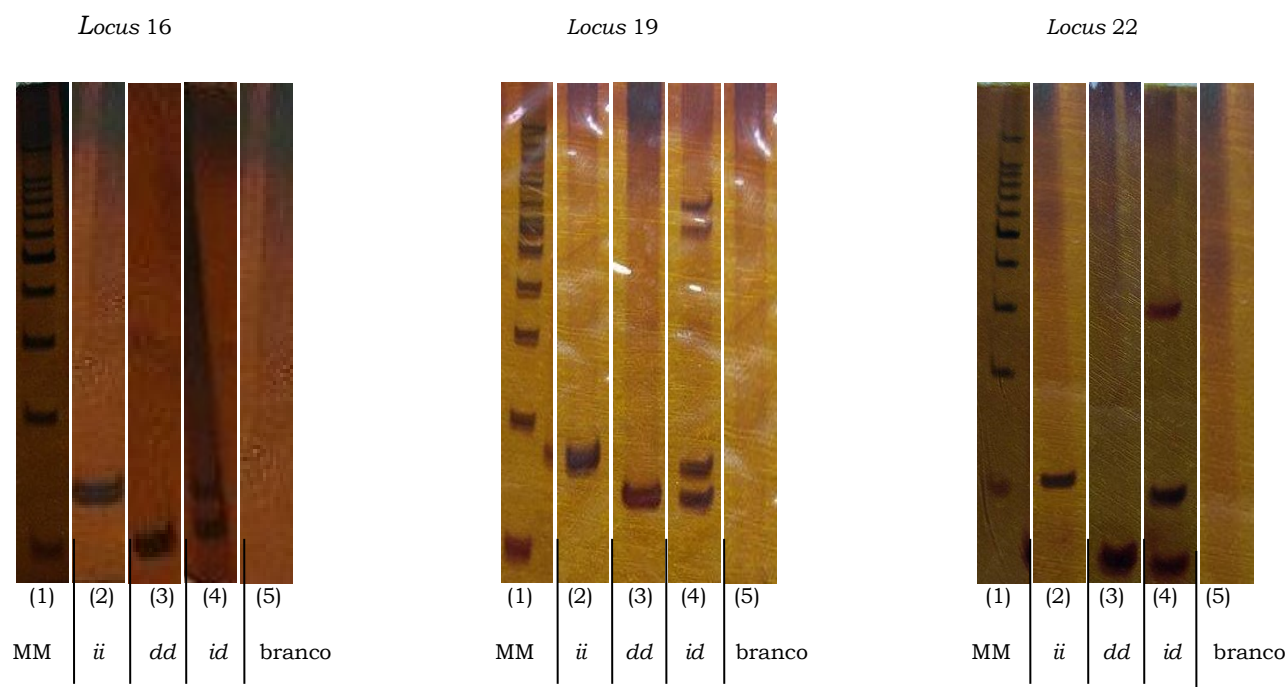


Figura 3. Padrão de bandas formado após migração eletroforética. Para todos os *loci*, a banda superior refere-se ao alelo *inserção*, e a banda inferior, ao alelo *deleção*. A presença apenas da banda *inserção* indica fenótipo homozigoto *ii* (2), analogamente, a presença apenas da banda *deleção* indica fenótipo homozigoto *dd* (3). A presença de ambas as bandas caracteriza fenótipo heterozigoto *id* (4). Os números (1) e (5) representam, respectivamente, o MM (*ladder*) e o controle negativo (branco) (arquivo pessoal).

Tabela 9. Peso molecular (PM) do marcador molecular (MM) ou *ladder*, do alelo *inserção* e do alelo *deleção*, para cada *locus* amplificado

<i>Locus</i>	MM (<i>ladder</i>)	alelo <i>inserção</i>	alelo <i>deleção</i>
L16	100pb	151pb	123pb
L19	100pb	171pb	145pb
L22	100pb	103pb	71pb

AMOSTRAS SEM AMPLIFICAÇÃO

Mesmo havendo repetição do processo de análise laboratorial, algumas amostras não apresentaram amplificação. Abaixo, a tabela 10 contém a quantidade de indivíduos não amplificados, por *locus*.

Tabela 10. Quantidade de amostras sem amplificação para cada *locus* e para o conjunto de *loci*

<i>Locus</i>	Amostras sem Amplificação
L16	4
L19	2
L22	4
Total	10

Os *loci* 16 e 22 apresentaram a maior porcentagem de indivíduos sem amplificação (4,44%), no *locus* 19, essa porcentagem foi menor (2,22%). Considerando-se os 3 *loci*, a porcentagem de indivíduos sem amplificação foi igual a 3,70%.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

PARÂMETROS POPULACIONAIS

Estimativa das Frequências Alélicas e Genotípicas e Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

O número de indivíduos para cada fenótipo, as frequências alélicas e genotípicas e o valor de p para o teste do EHW estão descritos na tabela 11.

Tabela 11. Para cada *locus*, número de indivíduos por fenótipo, frequências alélicas e genotípicas e valor de p para o teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Para todos os *loci*, foram considerados somente os indivíduos não aparentados (mãe e pai), sendo, o valor de $n=60$. Os alelos *inserção* e *deleção* estão representados por i e d , respectivamente

Locus	Número de Indivíduos			Frequência		Frequências Genotípicas Observadas			p (EHW)
	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	p	q	<i>li</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	
L16	30	17	11	0,664	0,336	0,517	0,293	0,190	0,016
L19	11	32	16	0,458	0,542	0,186	0,542	0,271	0,603
L22	14	26	19	0,458	0,542	0,237	0,441	0,322	0,433

A partir dos resultados apresentados, o maior valor de frequência para o alelo i foi o do *locus* 16 (0,664) e o menor valor foi (0,458) para os outros *loci*. Para o alelo d , o maior valor obtido foi nos *loci* 19 e 22 (0,542), o *locus* 16 apresentou o menor valor (0,336).

Em relação à frequência genotípica, o maior valor conseguido para o fenótipo ii foi (0,517) para o *locus* 16, o menor valor foi (0,186) para o *locus* 19. Para o fenótipo id o maior valor foi (0,542) para o *locus* 19 e o menor (0,293) para o *locus* 16. Por fim, para o fenótipo dd , verificou-se, no *locus* 22 o maior valor (0,322) e no *locus* 16 o menor (0,190).

Considerando-se o valor de p para o EHW, o *locus* 16 apresentou-se em desequilíbrio (0,016). O valor de p , para os outros *loci*, foi maior que o nível de significância de 0,05, indicando que estão em equilíbrio.

PARÂMETROS FORENSES

Quanto aos parâmetros de interesse forense, foram calculados, para cada *locus*: Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC), Heterozigose Observada (H_o), Heterozigose Esperada (H_e), Poder de Discriminação (PD), Poder Cumulativo de Discriminação (PCD), Poder de Exclusão (PE) e Poder Cumulativo de Exclusão (PCE). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 12.

Tabela 12. Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC), Heterozigose Observada (H_o), Heterozigose Esperada (H_e), Poder de Discriminação (PD), Poder Cumulativo de Discriminação (PCD), Poder de Exclusão (PE) e Poder Cumulativo de Exclusão (PCE)

Locus	PIC	H_o	H_e	PD	PE
L16	0,347	0,293	0,446	0,594	0,173
L19	0,373	0,542	0,496	0,623	0,187
L22	0,373	0,441	0,496	0,623	0,187
Valor Cumulativo				PCD=0,942	PCE=0,453

Considerando-se os resultados descritos na tabela, o maior valor de PIC foi (0,373) para os *loci* 19 e 22. O *locus* 16 apresentou o menor valor (0,347).

Em relação aos valores obtidos para H_o , o *locus* 19 apresentou o maior valor de H_o (0,542). O menor valor foi o do *locus* 16 (0,293). Quanto aos valores de H_e , os *loci* 19 e 22 apresentaram o maior valor (0,496), o menor valor foi o do *locus* 16 (0,446).

O PD foi maior para os *loci* 19 e 22 (0,623) e menor para o *locus* 16 (0,549). O PCD, considerando-se todos os *loci*, foi de 0,942.

Por fim, os valores de PE estão entre 0,187 e 0,173, para os *loci* 19 e 22 e para o *locus* 16, respectivamente. O valor de PCE, considerando-se, novamente todos os *loci*, foi de 0,453.

A tabela 13 traz os valores do Índice de Paternidade (IP) para cada possível cruzamento, o valor do Índice Cumulativo de Paternidade (ICP), considerando-se o cruzamento mais frequente para cada *locus* e a Probabilidade Cumulativa de Paternidade (W), calculada segundo o valor do ICP.

Tabela 13. Índice de Paternidade (IP) para cada possível cruzamento, Índice Cumulativo de Paternidade (ICP), considerando o cruzamento mais frequente para cada *locus* (valores em destaque na tabela) e Probabilidade Cumulativa de Paternidade (W), calculada segundo o valor do ICP. As letras M, F e P indicam mãe, filho(a) e pai, respectivamente. Os alelos *inserção* e *deleção* estão representados por *i* e *d*

Caso	Cruzamento			IP		
	M	F	P	L16	L19	L22
1	<i>ii</i>	<i>ii</i>	<i>ii</i>	1,506	2,185	2,185
2			<i>id</i>	0,753	1,093	1,093
3		<i>id</i>	<i>id</i>	1,487	0,922	0,922
4			<i>dd</i>	2,974	1,844	1,844
5	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	2,974	1,844	1,844
6			<i>id</i>	1,487	0,922	0,922
7		<i>id</i>	<i>ii</i>	1,506	2,185	2,185
8			<i>id</i>	0,753	1,093	1,093
9	<i>id</i>	<i>ii</i>	<i>ii</i>	1,506	2,185	2,185
10			<i>id</i>	0,753	1,093	1,093
11		<i>dd</i>	<i>dd</i>	2,974	1,844	1,844
12			<i>id</i>	1,487	0,922	0,922
13		<i>id</i>	<i>dd</i>	2,974	1,844	1,844
14			<i>id</i>	2,000	2,000	2,000
15			<i>ii</i>	1,506	2,185	2,185
				ICP= 6,026		
				W= 0,858		

No *locus* 16 os casos de número 4, 5, 11 e 13 foram os que apresentaram os maiores valores de IP (2,974). Os casos 2, 8 e 10 tiveram os menores valores (0,753). Os *loci* 19 e 22 tiveram nos casos 1, 7, 9 e 15 os maiores valores (2,185). Os casos de número 3 e 12 foram os que apresentaram menor valor (0,922).

Além do cálculo do IP, foi estimado o valor do ICP (6,026), considerando-se o cruzamento mais frequente para cada *locus* (valores em destaque na tabela). A definição do cruzamento mais frequente dependeu do percentual de ocorrência daquele cruzamento no *locus* em questão.

No *locus* 16 o cruzamento mais frequente foi (caso 1: M: *ii* x P: *ii*), com percentual de ocorrência de 19,41%. Nos *loci* 19 e 22 o cruzamento mais frequente foi (caso 14: M: *id*

x P: *id*), com percentual de ocorrência igual a 12,32%. Os menores percentuais foram 1,27% (caso 5) e 4,38% (caso 1), para o *locus* 16 e para os *loci* 19 e 22, respectivamente (valores não indicados na tabela).

Finalmente, foi calculado, a partir do valor do ICP, o valor de W (0,858).

ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO

Os resultados obtidos para a análise de segregação encontram-se na tabela 14.

Tabela 14. Segregação Alélica: Para cada *locus*, e considerando todos os fenótipos possíveis, número de filhos(as) (F), gerados a partir do cruzamento mãe (M) x pai (P) e frequências genotípicas observadas. Os alelos *inserção* e *deleção* estão representados por *i* e *d*, respectivamente

Locus	F	M	<i>ii</i>			<i>dd</i>			<i>id</i>			Total	Frequências Genotípicas na Prole
		P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	<i>li</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>		
L16	<i>ii</i>		6	2					4	1		13	0,4406
	<i>id</i>			2	1	1	1		3	1	1	10	0,4463
	<i>dd</i>						0	3		0	0	3	0,1130
L19	<i>ii</i>		0	1					1	1		3	0,2094
	<i>id</i>			3	1	2	1		1	7	1	16	0,4964
	<i>dd</i>						3	3		1	2	9	0,2942
L22	<i>ii</i>		2	0					3	0		5	0,2094
	<i>id</i>			1	3	4	1		0	6	1	16	0,4964
	<i>dd</i>						1	2		2	1	6	0,2942

Após a genotipagem dos 60 indivíduos do grupo parental, o fenótipo do grupo filial, composto por 30 indivíduos, foi determinado para análise de segregação. Houve variação na quantidade de trios em cada *locus*, pois foram excluídos da análise os trios em que pelo menos um indivíduo não apresentou amplificação. Para o *locus* 16 o total de indivíduos foi igual a 26 (n=26), para o *locus* 19 igual a 28 (n=28) e para o *locus* 22 igual a 27 (n=27).

Nos *loci* 19 e 22, os indivíduos heterozigotos (*id*), apresentaram o maior valor de frequência (0,4964). O menor valor (0,1130) foi visto no *locus* 16, devido a baixa frequência de homozigotos para o alelo *deleção* (*dd*).

DISCUSSÃO

DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE BANDAS E CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Em todos os *loci* analisados (L16, L19 e L22), a amplificação ocorreu de maneira adequada, gerando bandas nítidas e situadas na região prevista, considerando-se o tamanho estimado para cada fragmento. Os perfis eletroforéticos encontrados, foram, em todos os *loci*, os mesmos já descritos por Ng (2015).

AMOSTRAS SEM AMPLIFICAÇÃO

As amostras biológicas amplificadas no presente trabalho foram extraídas nos anos de 2003 e 2004, sendo usadas em projetos anteriores do laboratório. O tempo decorrido desde a coleta até o processamento, bem como os sucessivos congelamentos e descongelamentos a que as amostras foram submetidas, podem ter alterado a integridade do material genético, favorecendo a sua fragmentação (Wang et al., 2015). Sendo assim, a falta de amplificação de algumas amostras pode estar relacionada a esses fatores.

Sendo baixo o percentual de amostras não amplificadas (3,70%) e considerando que 2 delas (5023M e 5030F) não apresentaram amplificação em nenhum dos 3 *loci* (ver anexo 5), foi descartada a possibilidade de a falta de resultados estar relacionada a utilização de *primers* inespecíficos. A hipótese de inespecificidade de *primers* já havia sido desconsiderada por Ng (2015).

Se a falta de amplificação estivesse relacionada ao uso de *primers* inespecíficos, esperar-se-ia um maior percentual de amostras não amplificadas. Além disso, uma mesma amostra não apresentaria amplificação naquele *locus* em que o *primer* usado foi inespecífico, e não no conjunto total de *loci*.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

PARÂMETROS POPULACIONAIS

Estimativa das Frequências Alélicas e Genotípicas e Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

Os valores de frequência calculados para o alelo *inserção* (*i*) e para o alelo *deleção* (*d*), foram, para os *loci* 19 e 22, exatamente os mesmos. A equidade dos valores justifica-se pelo fato de, nos dois *loci*, o número de alelos *inserção* e *deleção* da geração parental, ser o mesmo. Para ambos os *loci*, foram contados 54 alelos *inserção* e 64 alelos *deleção*, correspondendo a um total de 118 alelos (não houve amplificação de 1 indivíduo da geração parental).

Em relação à frequência genotípica, os valores observados e esperados foram, na maioria dos casos, condizentes, conforme descrito na tabela 15.

Tabela 15. Para cada *locus*, frequência genotípica observada e esperada

<i>Locus</i>	Frequência Observada			Frequência Esperada		
	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>
L16	0,517	0,293	0,190	0,439	0,450	0,111
L19	0,186	0,542	0,271	0,207	0,501	0,292
L22	0,237	0,441	0,322	0,207	0,501	0,292

A maior discrepância foi no fenótipo heterozigoto (*id*) do *locus* 16, em que a diferença entre a frequência observada (0,293) e esperada (0,450) foi de 0,157.

Considerando-se o teste do EHW, o *locus* 16 apresentou-se em desequilíbrio por deficiência de heterozigotos.

PARÂMETROS FORENSES

Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC)

Os valores de PIC vão de 0 a 1. Os polimorfismos considerados pouco informativos são aqueles com valores inferiores a 0,25. Valores entre 0,25 e 0,50, indicam informatividade mediana. Por fim, são considerados muito informativos, os polimorfismos com PIC acima de 0,50. Para um marcador com dois alelos, como os aqui estudados, os valores de referência são um pouco menores, sendo o valor máximo igual a 0,375 (Hildebrand et al., 1992).

O maior valor alcançado foi nos *loci* 19 e 22 (0,373) e o menor valor foi o do *locus* 16 (0,347). Isso significa que nos dois primeiros *loci*, 37,30% dos indivíduos filiais devem ser informativos sobre os *loci* parentais. No *locus* 16, a probabilidade de o fenótipo da prole permitir a dedução do fenótipo parental, é de 34,70%.

O valor do PIC é diretamente proporcional ao número de alelos e às suas frequências. O número total de alelos (118), os valores de frequência para o alelo *inserção* (0,458) e para o alelo *deleção* (0,542), foram os mesmos nos *loci* 19 e 22, justificando a igualdade de valores de PIC encontrada nesses dois *loci*. O valor do PIC é também diretamente proporcional à heterozigose, sendo, a menor informatividade do *locus* 16, explicada por haver nele, menos indivíduos heterozigotos.

Para fins forenses, os marcadores considerados mais informativos têm os seus valores de frequência próximos a $1/n$, sendo n é o número de alelos do *locus*. Em sistemas bi-alélicos, os marcadores mais informativos são aqueles em que as frequências dos alelos se igualam, ou seja, correspondem a 50% (Oka et al., 2014).

Todos os *loci* descritos obtiveram bons valores, considerando o PIC máximo para um *locus* bi-alélico. Os *loci* com os maiores valores foram exatamente aqueles com frequências alélicas próximas a 0,50.

Heterozigose (H_i)

O *locus* 16 foi o que apresentou a maior discrepância entre os valores calculados para H_o (0,293) e para H_e (0,446). A obtenção de um valor de H_o abaixo do esperado pode ser explicada pela pouca quantidade de indivíduos heterozigotos (*id*) observada no *locus*. O baixo valor de H_o confirmou a baixa diversidade alélica apresentada pelo *locus*.

Os valores de H_e , foram, para os *loci* 19 e 22, coincidentes (0,496). Tal coincidência justifica-se pelo fato de os 2 *loci* exibirem exatamente as mesmas frequências alélicas. Houve diferença nos valores de H_o visto que, o número de indivíduos por fenótipo não foi o mesmo. O valor de H_o para o *locus* 22 foi igual a 0,441, também abaixo do esperado (baixa diversidade alélica). O *locus* 19 foi o único que apresentou H_o acima do esperado (0,542), sendo, entre os 3, aquele com maior diversidade alélica.

Poder de Discriminação (PD) e Poder Cumulativo de Discriminação (PCD)

Considera-se para o cálculo do PD, os valores de frequência alélica conseguidos para cada *locus*. Dois dos *loci* estudados (L19 e L22), obtiveram valores similares de frequência, tanto para o alelo *inserção* (0,458), quanto para o alelo *deleção* (0,542), esclarecendo o porquê de ambos apresentarem iguais valores de PD.

O valor do PCD para o conjunto de *loci* analisados, foi igual a 0,942, indicando que a probabilidade de se diferenciar, em uma população, dois indivíduos não aparentados, é de 94,20%. Assim, a probabilidade de não identificar, em uma população, dois indivíduos com o mesmo fenótipo, a partir da análise desses 3 *loci*, é de 5,80%.

Para a obtenção de um valor de PCD igual a 0,9999, encontrado por Torres et al. (2014), em um painel com 30 InDels bi-alélicos, seria necessária a análise de um conjunto de 10 *loci* com PD semelhantes aos que foram aqui estudados.

Poder de Exclusão (PE) e Poder Cumulativo de Exclusão (PCE)

De forma semelhante ao PD, o cálculo do PE depende dos valores de frequência alélica que foram os mesmos nos *loci* 19 e 22 ($p=0,458$ e $q=0,542$). Essa equidade de valores novamente esclarece porque os valores de PE foram iguais em ambos os *loci*.

Os *loci* 19 e 22 apresentaram os maiores valores de PE (0,187), confirmando o valor máximo esperado para um *locus* bi-alélico, que é de 0,190 (Jamieson, 1997). O valor do PCE (0,453), para o conjunto de *loci* descritos, indica que a probabilidade de excluir, em pelo menos 1 dos 3 *loci*, um indivíduo falsamente acusado em um exame de paternidade, é de 45,30%, valor esse, significativamente baixo.

Para a obtenção de um valor de PCE satisfatório, ou seja, igual a 0,9999, seria necessária a análise de um conjunto contendo 46 *loci* InDel, com PE semelhantes aos encontrados nesse estudo.

Índice de Paternidade (IP), Índice Cumulativo de Paternidade (ICP) e Probabilidade Cumulativa de Paternidade (W)

As frequências alélicas, usadas para o cálculo do IP foram, em 2 dos *loci* (L19 e L22), coincidentes ($p=0,458$ e $q=0,542$). Essa equidade de resultados explica porque, esses mesmos *loci* tiveram, para os 15 casos descritos, exatamente os mesmos valores de IP (ver tabela 14).

O ICP, calculado considerando-se o cruzamento mais frequente para cada *locus*, foi igual a 6,026. O valor mínimo, requerido para a validação da paternidade, é igual a 10000 ($ICP \geq 10000$) (Nutini et al., 2003). O baixo o valor conseguido, justifica-se, por nenhum cruzamento, nem os mais frequentes, terem sido informativos para o diagnóstico. A obtenção de um valor de ICP considerado mínimo, depende da análise de 16 *loci* InDel, similares aos que foram aqui descritos (ICP de 16 *loci* = 11970,568).

O valor de W, calculado a partir do ICP, foi igual a 0,858, indicando que a probabilidade de o suposto pai ser o pai biológico da criança é de 85,80%. Valores de W entre 0,900 e 0,949, indicam uma provável paternidade. Valores entre 0,950 e 0,990, são tidos como um forte indício (de paternidade). Por fim, W acima de 0,990 refere-se a uma paternidade quase certa (Evelt e Weir, 1998; Weir, 1996). Novamente, foi baixo o valor calculado para W.

Precisariam ser amplificados, para alcançar o valor mínimo, 4 marcadores similares a esses ($W=0,900$). Nesse caso, o valor do ICP estaria abaixo do esperado ($ICP=9,078$). O valor máximo seria atingido se fossem amplificados 16 *loci* InDel ($W=0,999$). Com a amplificação de 16 *loci*, não só o valor de W, mas também o do ICP aproximar-se-ia do máximo, indicando que se, em um exame, fossem usados marcadores equivalentes a esses, a garantia de que o suposto pai seria o verdadeiro pai da criança, dependeria da amplificação de pelo menos 16 marcadores.

ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO

Realizou-se a análise de segregação com o intuito de confirmar se os marcadores em questão seguem, em todos os *loci* analisados, o modelo mendeliano de separação dos alelos. Segundo as proposições mendelianas, genes que encontram-se em diferentes cromossomos não estão em ligação e por isso, segregam-se independentemente um do outro. Somente ocorre linkage nos genes que encontram-se em um mesmo cromossomo, nesse caso, a segregação de ambos ocorre conjuntamente, segundo um modelo não independente.

Os marcadores selecionados para o presente projeto localizam-se em cromossomos diferentes, sendo assim, a análise de segregação comprovou a inexistência de ligação gênica: a segregação do *locus* 16 não interferiu na segregação dos *loci* 19 e 22. Da mesma forma, a segregação do *locus* 19 não interferiu na segregação dos *loci* 16 e 22, assim como a do *locus* 22 não interveio na separação dos demais.

Utilizando-se somente da análise de segregação não foi possível verificar a herdabilidade dos marcadores, ou seja, não foi possível inferir se a herança dos mesmos depende, além das questões genéticas, de outros fatores, como por exemplo, os ambientais.

CONCLUSÃO

O presente trabalho complementou a descrição da genética formal de 3 *loci* InDel: L16 (16q23.1), L19 (19p13.3), e L22 (22q12.2), iniciada no projeto "Validação de marcadores *inserção/deleção* para genotipagem fetal não invasiva" (Ng, 2015).

A amostra populacional avaliada era composta de 90 indivíduos agrupados em 30 trios verdadeiros (mãe-filho(a)-pai). Os ensaios em PCR convencional geraram, para todos os *loci*, bandas nítidas e com tamanho previsto para cada fragmento. Os perfis eletroforéticos foram coincidentes aos descritos por Ng (2015).

A partir do exposto e sendo baixo o percentual de indivíduos sem amplificação, pôde-se concluir que o objetivo principal, que era a genotipagem desses marcadores, foi alcançado.

A conclusão pela validação dos mesmos em exames de paternidade, foi conseguida, com restrições. Um dos motivos seria o desequilíbrio do *locus* 16, evidenciado após análise por meio do teste de aderência ao EHW.

Além disso, o *locus* 16, assim como os outros 2, apresentou, para quase todos os parâmetros calculados, índice informacional abaixo dos valores limite estabelecidos. A baixa informatividade dos *loci* impossibilita a utilização desses marcadores para o diagnóstico definitivo.

Para validar o uso desses marcadores em processos de HID, sugere-se a genotipagem de um maior número de indivíduos. Com a análise de um maior número de indivíduos, espera-se ser possível a validação desses *loci*.

Para que se possa realizar um exame de paternidade utilizando-se somente marcadores InDel, é necessário aumentar o número de *loci* analisados. Um painel de InDels mais consistente, apresentaria poder de discriminação satisfatório, tornando possível seu uso em exames de verificação de paternidade.

Em vista do exposto, o presente trabalho sugere o desenvolvimento de pesquisas futuras, que tenham por objetivo a validação desses marcadores, a partir da análise de um maior número de indivíduos, ou, que descrevam outros *loci*, dispondo assim, de um painel de InDels mais robusto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABB. Apparent mutations observed at the 13 CODIS STR loci in the course of paternity testing. 1999. Disponível em: <http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/mutation.htm>. Acesso em: 26 de mar. 2017.
- Alkan, C., Coe, B. P., Eichler, E. E. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12:363-376.
- Ban, J. D. Interpretation of STR profiles-community guidelines. Presentation in the 3rd annual fluorescent STR megaplex technology workshop. 2000.
- Bastos-Rodrigues, L., Pimenta, J. R., Pena, S. D. J. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Annals of Human Genetics*. 2006;70:658-665.
- Beiguelman, B. *Genética de Populações Humanas*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 235 p.
- Bjerre, A., Court, D. S., Lincoln, N., Morling N. Society for forensic haemogenetics. *Forensic Science International*. 2001;90:41-55.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32:314-331.
- Brammer, S.P. Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha do trigo em cultivares brasileiras de trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell). 2000. 105f. Tese Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Brinkmann, B., Klitsch, M., Neuhuber, F., Huhne, J., Rolf, B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;64(5):1473-4.
- Butler, J. M. *Forensic DNA typing biology, technology and genetics of STR markers*. 2 ed. Cambridge: Academic Press, 2005. 688 p.
- Burton, W. N., Chen, C. Y., Conti, D. J., Schultz, A. B., Pransky, G., Edington, D. W. The association of health risks with on-the-job productivity. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2005;47(8):769-777.
- Carvalho, S. P. M. Avaliação da qualidade do DNA obtido de saliva humana armazenada e sua aplicabilidade na identificação forense em odontologia legal. 2009. Dissertação (Mestrado em Ortodontia e Odontologia em Saúde Coletiva) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
- Cavalli-Sforza L. L., Menozzi P., Piazza A. *The history and geography of human genes*. Princeton University Press, 1994.
- Desmarais, D., Zhong, Y., Chakraborty, R., Perreault, C., Busque, L. Development of a highly polymorphic STR marker for identity test purpose at the Human Androgen Receptor Gene (Humara). *Journal Forensic Science*. 1998;5:1046-1049.

- Evett, I., Weir, B. Interpreting DNA evidence: statistical genetics for forensic scientists: Sinauer Associates Sunderland, MA, 1998.
- Fischer, A. J, Techniques of crime scene investigation. In: Press, C, ed. Techniques of Crime Scene Investigation. 2000:584.
- Fondevila, M., Phillips, C., Santos, C., Pereira, R., Gusmão, L., Carracedo, Á. et al. Forensic performance of two *insertion-deletion* marker assays. International Journal of Legal Medicine. 2012;126:725-737.
- França, G. V. Medicina Legal. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011.
- Francez, P. A. C., Ribeiro-Rodrigues, E. M., Santos S. E. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. Forensic Science International: Genetics. 2012a;6(1):132-5.
- Francez, P. A. C., Ribeiro-Rodrigues, E. M., Velasco, A. M., Santos, S. E. *Insertion-deletion* polymorphisms—utilization on forensic analysis. International Journal of Legal Medicine. 2011;126:491-496.
- Góes, Andréa, C. S. Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais. Revista do Biomédico. 2002. Disponível em: <http://www.crbm1.com/bio65/artigocien_65.asp> Acesso em: 15 de abr. 2017.
- Hartl, D. L., Clark, A. G. Princípios de genética de populações. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.
- Hildebrand, C. E., Torney, D. C., Wagner, R. P. Informativeness of polymorphic DNA markers. Los Alamos Science. 1992;20:100-102.
- Hill, C. R. et al. Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. Journal of Forensic Sciences. 2008;53(1):73-80.
- Huang, J., Luo, H., Wei, W., Hou, Y. A novel method for the analysis of 20 multi-Indel polymorphisms and its forensic application. Electrophoresis. 2014;35:487-493.
- Jamieson, A., Taylor, S. C. S. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. Animal Genetics. 1997;28:397-400.
- Jeffreys, A. J., Brookfield, J. F., Semeonoff, R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature. 1985;317(6040):818-819.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature. 1985;314(6006):67-73.
- LaRue, B., Ge, J., King, J., Budowle, B. A validation study of the Qiagen Investigator DIPplex® kit; an INDEL-based assay for human identification. International Journal of Legal Medicine. 2012;126(4):533-40.
- LaRue, B., Lagacé, R., Chang, C-W., Holt, A., Hennessy, L., Ge, J., et al. Characterization of 114 *insertion/deletion* (INDEL) polymorphisms, and selection for a global INDEL panel for human identification. Legal Medicine. 2013.

- Mills, R. E., Luttig, C. T., Larkins, C. E., Beauchamp, A., Tsui, C., Pittard, W. S. et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Research*. 2006;16:1182-1190.
- Nachman, M. W., Crowell, S. L. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics*. 2000;156:297-304.
- Ng, A. M. Validação de marcadores *inserção/deleção* para genotipagem fetal não invasiva. 2015. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F. Thompson & Thompson: Genética médica. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 640 p.
- Nutini, A.L., Mariottini, A., Giunti, L., Torricelli, F., Ricci, U. Double incompatibility at human alpha fibrinogen and penta E *loci* in paternity testing. *Croatian Medical Journal*, 2003;44:342-346.
- Oka, K., Asari, M., Omura, T., Yoshida, M., Maseda, C., Yajima, D., et al. Genotyping of 38 *insertion/deletion* polymorphisms for human identification using universal fluorescent PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 2014;28(1):13-8.
- Pacini, D. B. Banco genômico: identificação genética de diptero de interesse forense. CRBio Digital. 2011. Disponível em: <<http://crbiodigital.com.br/portal?txt=3577313236>> Acesso em: 28 de mai. 2017.
- Pereira, R., Phillips, C., Alves, C., Amorim, A., Carracedo, Á., Gusmão, L. A new multiplex for human identification using *insertion/deletion* polymorphisms. *Electrophoresis*. 2009;30:3682-3690.
- Ribeiro-Rodrigues, E. M., Santos, N. P. C., Ribeiro-dos-Santos, A. K. C., Pereira, R., Amorim, A., Gusmão, L. et al. Assessing interethnic admixture using an X-linked *insertion-deletion* multiplex. *American Journal of Human Biology*. 2009;21:707-709.
- Rodrigues, M.L. B. Análise de segregação alélica e descrição formal de marcadores genéticos *inserção/deleção*. 2015. 44f. Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Rousset, F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 2008;8(1):103-106.
- Thomas, D. C. Statistical methods in genetic epidemiology. New York: Oxford University, 2004.
- Torres, S. R. R., Uehara, C. J. S., Sutter-Latorre, A. F., Almeida, B. S., Sauerbier, T. S., Muniz, Y. C. N. et al. Population genetic data and forensic parameters of 30 autosomal InDel markers in Santa Catarina State population, Southern Brazil. *Molecular Biology Reports*. 2014;41:5429-5433.
- Wang, Q., Cai, Y., Brady, P., Vermeesch, J. R. Real-time PCR evaluation of cell-free DNA subjected to various storage and shipping conditions. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(4):12797-12804.
- Weber, J. L., David, D., Heil, J., Fan, Y., Zhang, C., Marth, G. Human diallelic *insertion/deletion* polymorphisms. *American Journal of Human Genetic*. 2002;71:854-862.

- Weber, J.L., Wong, C. Mutation of human short tandem repeats. *Human molecular genetics*. 1993;2:1123-1128.
- Weir, B. S. *Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data*. 2 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 216 p.

ANEXO 1

OFÍCIOS DO COMITÊ DE ÉTICA - APROVAÇÃO DO PROJETO



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 02 de outubro de 2014

Ofício nº 3622/2014
CEP/FC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"VALIDAÇÃO DE MARCADORES INSERÇÃO/DELEÇÃO PARA GENOTIPAGEM FETAL NÃO INVASIVA"** – de 24/09/2014 foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 395ª Reunião Ordinária realizada em 29/09/2014 e enquadrado na categoria: APROVADO, bem como a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 11015/2014.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. FÁBIO CARMONA
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
AYLING MARTINS NG
PROF. DR. AGUINALDO LUIZ SIMÕES (Orientador)
Depto. de Genética – FMRP-USP

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP n 5440
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO 2

OFÍCIOS DO COMITÊ DE ÉTICA - APROVAÇÃO DO BANCO DE AMOSTRAS "POPULAÇÕES URBANAS"



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 833-1144

Ribeirão Preto, 02 de março de 2005

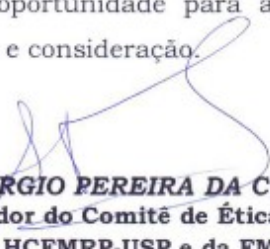
Ofício nº 570/2005
CEP/SPC

Senhor Professor:

O Comitê de Ética em Pesquisa recebeu carta, onde Vossa Senhoria encaminha a proposta de criação e reconhecimento de Banco de Amostras designado "**Populações Urbanas**" localizado no Laboratório de Genética e Bioquímica, do Departamento de Genética – FMRP-USP.

Sobre o assunto, o Comitê de Ética em Pesquisa em sua 196ª Reunião Ordinária realizada em 28.02.2005, analisou a proposta de criação e a enquadrando na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 8079/2004.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.


PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. AGUINALDO LUIZ SIMÕES
Depto. de Genética – FMRP-USP
Em mãos

ANEXO 3

PROTOCOLO DE ANÁLISE LABORATORIAL - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO-DESNATURANTE

Reagentes e Soluções

Solução de acrilamida/bisacrilamida (29:1): 29 g de acrilamida (PM= 71,08); 1 g de bisacrilamida (N,N'-metileno-bis-acrilamida; PM= 154,17), 100 mL de água destilada.

Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0: 186 g de EDTA (PM = 372,24); 1 L de água destilada; pastilhas de hidróxido de sódio (NaOH) para ajuste do pH.

Tampão TBE 10X 0,9 M pH 8,0: 108 g de Tris (PM = 121,1); 53 g de ácido bórico (PM = 61,83); 40 mL de solução de EDTA 0,5 M pH 8,0; água destilada para completar volume final de 1 L.

Tampão de corrida TBE 1X 0,9 M pH 8,0: 100 mL de Tampão TBE 10X; 900 mL de água destilada.

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina) (Sigma-Aldrich).

Solução hipersaturada de persulfato de potássio: 650 mg de persulfato de potássio (PM = 270,32); 6,5 mL de água destilada.

Tampão de amostra: 900 µL de bromofenol; 900 µL de xilenocianol; 900 µL de TBE 10X; 4,5 mL de Ficol 30% diluído em água; 1,8 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; 3,6 g de sacarose (completamente diluída na solução final).

Mix para gel não-desnaturante 10%: 6,66 mL de solução acrilamida/bisacrilamida; 1,4 mL de glicerol; 9,7 mL de água destilada; 2,0 mL de TBE 10%.

Padrão de peso molecular 100 pb (Promega): 5 µL de solução estoque do padrão de peso molecular 500 µg/µL; 150 µL de água destilada; 50 µL de tampão de amostra.

PROCEDIMENTO

Para a montagem do cassete de vidro, foram colocados dois espaçadores de teflon, nas bordas laterais, entre duas placas de vidro 16 cm x 16 cm, próprias para eletroforese. As placas foram presas, uma à outra, com o auxílio de dois grampos, posicionados um em cada borda.

Para a preparação do gel foram adicionados 15 µL de TEMED e 500 µL de persulfato de potássio a 20 mL do mix para gel. Após a preparação, a mistura foi vertida em um cassete de vidro previamente montado, disposto em posição horizontal. Imediatamente

após a mistura ser despejada na região intermediária existente entre as duas placas, um pente de teflon de 30 poços foi posicionado na parte superior do cassete. A reação de polimerização levou, em média, 35 minutos para ocorrer.

Após a polimerização do gel, sem que o cassete fosse desmontado, houve a remoção do pente e dos grampos, para a lavagem dos poços com água. Para a retirada da água acumulada nos poços, o cassete, por algumas vezes, foi entornado, de forma que os poços ficassem voltados para baixo.

Por fim, o cassete foi colocado na cuba de eletroforese, em posição vertical. Derramou-se tampão de corrida (TBE 1x) em ambos os pólos, enchendo os poços com tampão. A cuba foi conectada à uma fonte de voltagem constante para a realização de uma pré-corrida de poucos minutos, antes da aplicação das amostras. A fonte foi então desligada para a preparação das amostras (5 µL de DNA amplificado adicionado a 5 µL de tampão de amostra). Após a preparação, as amostras foram então aplicadas, cada uma em um poço do gel, colocando-se no primeiro poço, o marcador de peso molecular (*ladder* de 100 pb), e no último, o controle negativo (branco) da PCR (ausência de DNA). Feito isso, iniciou-se a corrida com duração aproximada de 2 horas, com fonte de voltagem constante ajustada em 200 V e 400 mA.

ANEXO 4

PROTOCOLO DE ANÁLISE LABORATORIAL - COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA E SECAGEM DO GEL

Reagentes e Soluções

Solução fixadora: 166,67 mL de álcool etílico; 6,67 mL de ácido acético glacial e 826,66 mL de H₂O.

Solução reveladora: 22,5g de NaOH (PM= 40,00); 1L de H₂O. No momento da coloração, adicionar 2 mL de formaldeído (PM = 30,05) para cada 100 mL de solução reveladora utilizada.

Solução de nitrato de prata: 100 g de nitrato de prata; 1 L de água (armazenada sob abrigo da luz).

PROCEDIMENTO

Para que o gel pudesse ser removido do conjunto de placas, foram retirados os espaçadores e separadas, cuidadosamente, as placas de vidro, com o auxílio de uma espátula. Posteriormente à remoção, o gel foi mergulhado em uma mistura contendo 100 mL de solução fixadora e 4 mL de solução de nitrato de prata. Após mantida sob agitação por aproximadamente 5 minutos, a mistura foi descartada. Posteriormente, o gel foi lavado com 100 mL de água destilada a 60°C. Após o descarte da água, o gel foi colocado em um recipiente contendo 100 mL de solução reveladora levemente aquecida, adicionada à 2 mL de formaldeído. O recipiente foi mantido em agitação, por alguns minutos, até o aparecimento de bandas nítidas. Após o aparecimento das bandas, houve o descarte da solução reveladora. Por fim, para bloqueio da reação de revelação, foram adicionados, sobre o gel, 100 mL da solução fixadora.

A documentação dos resultados, fez-se, com a secagem do gel. No processo de secagem, uma placa de vidro foi forrada com papel celofane culinário umedecido. Sobre a placa forrada, colocou-se o gel e, por cima, outra folha de papel celofane umedecido, de maneira que não houvessem bolhas de ar entre as camadas de celofane, sobre o vidro e/ou sobre o gel. O conjunto celofane-gel-celofane, deixado em condições ambientes, por cerca de 2 dias, ressecou completamente.

ANEXO 5

CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Tabela 16. Classificação fenotípica, por *locus*, dos 90 indivíduos selecionados para estudo. Os indivíduos estão agrupados em 30 trios verdadeiros (mãe-filho(a)-pai), identificados por um código numérico, seguido pelas letras M, F e P, indicando mãe, filho(a) e pai, respectivamente. A tabela contém ainda a data de extração das amostras

Indivíduo	L16	L19	L22	Data da Extração
4711M	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	1/10/2003
4711F	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	1/10/2003
4711P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	1/10/2003
4712M	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	1/10/2003
4712F	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	1/10/2003
4712P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	1/10/2003
4714M	<i>id</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	1/10/2003
4714F	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	1/10/2003
4714P	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	1/10/2003
4717M	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	1/10/2003
4717F	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	1/10/2003
4717P	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	1/10/2003
4723M	<i>dd</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	8/10/2003
4723F	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	8/10/2003
4723P	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	8/10/2003
4731M	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	8/10/2003
4731F	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	8/10/2003
4731P	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	8/10/2003
4733M	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	8/10/2003
4733F	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>ii</i>	8/10/2003
4733P	<i>dd</i>	<i>id</i>	<i>ii</i>	8/10/2003
4735M	<i>ii</i>	<i>ii</i>	<i>ii</i>	8/10/2003
4735F	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>ii</i>	8/10/2003
4735P	<i>dd</i>	<i>id</i>	<i>ii</i>	8/10/2003
4769M	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	12/10/2003
4769F	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	12/10/2003
4769P	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	12/10/2003
4771M	<i>ii</i>	<i>ii</i>	<i>id</i>	12/10/2003

4771F	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	12/10/2003
4771P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	12/10/2003
4774M	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	20/10/2003
4774F	<i>id</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	20/10/2003
4774P	<i>id</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	20/10/2003
4776M	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	12/11/2003
4776F	<i>na</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	12/11/2003
4776P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	12/11/2003
4779M	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	12/11/2003
4779F	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	12/11/2003
4779P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	12/11/2003
4973M	<i>id</i>	<i>ii</i>	<i>id</i>	09/06/2004
4973F	<i>id</i>	<i>ii</i>	<i>id</i>	09/06/2004
4973P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	09/06/2004
4975M	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	09/06/2004
4975F	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	09/06/2004
4975P	<i>ii</i>	<i>ii</i>	<i>ii</i>	09/06/2004
4978M	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	09/06/2004
4978F	<i>id</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	09/06/2004
4978P	<i>id</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	09/06/2004
4981M	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	09/06/2004
4981F	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	09/06/2004
4981P	<i>ii</i>	<i>ii</i>	<i>id</i>	09/06/2004
4985M	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	09/06/2004
4985F	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>ii</i>	09/06/2004
4985P	<i>ii</i>	<i>ii</i>	<i>ii</i>	09/06/2004
4986M	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>ii</i>	09/06/2004
4986F	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	09/06/2004
4986P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	09/06/2004
4994M	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	17/06/2004
4994F	<i>ii</i>	<i>ii</i>	<i>id</i>	17/06/2004
4994P	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	17/06/2004
5010M	<i>na</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	29/06/2004
5010F	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	29/06/2004
5010P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	29/06/2004

5017M	<i>dd</i>	<i>ii</i>	<i>id</i>	07/07/2004
5017F	<i>dd</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	07/07/2004
5017P	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	07/07/2004
5023M	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>na</i>	14/07/2004
5023F	<i>dd</i>	<i>id</i>	<i>na</i>	14/07/2004
5023P	<i>dd</i>	<i>ii</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5024M	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	14/07/2004
5024F	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>na</i>	14/07/2004
5024P	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5025M	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>id</i>	14/07/2004
5025F	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5025P	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5028M	<i>dd</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5028F	<i>dd</i>	<i>ii</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5028P	<i>dd</i>	<i>ii</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5029M	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	14/07/2004
5029F	<i>ii</i>	<i>dd</i>	<i>ii</i>	14/07/2004
5029P	<i>id</i>	<i>id</i>	<i>ii</i>	14/07/2004
5030M	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5030F	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>na</i>	14/07/2004
5030P	<i>ii</i>	<i>ii</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5031M	<i>id</i>	<i>ii</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5031F	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	14/07/2004
5031P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>ii</i>	14/07/2004
5032M	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	14/07/2004
5032F	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>dd</i>	14/07/2004
5032P	<i>ii</i>	<i>id</i>	<i>id</i>	14/07/2004