

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**“Haplótipos ligados ao cromossomo X na investigação de paternidade
em casos incompletos”**

Igor Caetano Dias Alcarás

**Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**“Haplótipos ligados ao cromossomo X na investigação de paternidade
em casos incompletos”**

Igor Caetano Dias Alcarás

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Aguinaldo Luiz Simões

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Alcarás, Igor Caetano Dias

Haplótipos ligados ao cromossomo X na investigação de paternidade em casos incompletos. Ribeirão Preto, 2015.

50 p. : il.3 ; 30 cm

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Simões, Aguinaldo Luiz.

1. X-STR. 2. Genética de Populações. 3. Paternidade. 4. Haplótipos. 5. Cromossomo X.

A todos meus professores de vida, por me ensinarem
o prazer do conhecimento, a alegria de sorrir
e a persistência em lutar.

Dedico.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
INTRODUÇÃO.....	9
HIPÓTESE/OBJETIVOS.....	11
METODOLOGIA.....	12
Amostras.....	12
Locus analisados.....	12
Análise laboratorial.....	14
Extração de DNA.....	14
Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction - PCR</i>)	14
PAGE.....	14
RESULTADOS	15
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO. PROTOCOLOS PARA ANÁLISE LABORATORIAL	44
Protocolo 1 – EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	44
Reagentes e soluções	44
Procedimentos	44
Protocolo 2 – Reação em cadeia da polimerase	46
Reagentes e soluções	46
Procedimento	46
Protocolo 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	47
Reagentes e soluções	47
Procedimento	47
Protocolo 4 – Coloração com nitrato de prata	50
Reagentes e soluções	50
Procedimento	50

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por se fazer sempre presente em minha vida, seu amor incondicional e misericordioso me dando forças e condições para chegar até aqui mesmo em meio às turbulências.

Ao **Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões**, pela orientação, amizade e parceria, desde o meu inocente terceiro ano da faculdade até as tensas vésperas de cada entrega de relatório, seus conhecimentos transmitidos, compreensão e paciência durante meu estágio.

À CNPq pelo apoio financeiro, aos professores membros da banca examinadora, **Prof^a. Maura** e **Prof. Celso**, por se fazerem também meus orientadores desde meus primeiros anos estagiando, e se mostrarem disponíveis para avaliar este trabalho. Também a todos meus professores por quem desenvolvi grande admiração, **Dalton, Bete, Annie, Eduardo, Maria Elena, Jesus, Aline, Márcia**, também **Sheila** e **Suzi**, e muitos outros. Vocês iluminaram meu futuro.

Aos funcionários do Departamento de Genética, ao divertido Bloco B, as histórias da **Edna** e **Bete**, as risadas da **Rô**, o pessoal dos demais laboratórios, e todas as minhas companheiras de laboratório que de alguma forma me auxiliaram ao longo do projeto, **Marcela, Sabrina, Aline, Naty, Fernanda, Ayling, Laís, Edilene, Vanessa** e **Polyana**, principalmente à minha colega de monografia **Malu** pelos momentos de descontração e tensão coletiva.

Em especial à **Cláudia, Ana Lúcia** e **Maria do Carmo**, por me socorrerem nas horas de maior sufoco, me ajudarem em tudo que sempre pedi sem nunca reclamarem e pelas palavras de carinho, conforto e segurança nos momentos em que pensei desistir. Também a meu amigo **Guilherme Jacques** pelas dicas, conselhos, artigos e motivações na área que escolhi seguir.

Aos meus colegas de república **Yoda, Piá, Suga, Bem-de-Vida** e **Bernah**, por serem os melhores moradores com quem eu poderia me arrumar nesta graduação, aturarem meus barulhos acordado pela madrugada afora e terem sido uma segunda família em Ribeirão Preto nos momentos em que me senti só e desabrigado.

À USP e minha querida Filô, Atlética, CEB, Filormônica e à república que ajudei a fundar, Cabrón, que me proporcionaram os melhores anos de espírito universitário tão sonhado. A todo o grupo da Natação e do Atletismo, em especial à minha treinadora **Fogs**, pela energia e motivação que me deram.

À minha amada 48^a turma da Bio pelos momentos de amizade, intrigas, desesperos em vésperas de provas e, principalmente, pelas risadas geradas no nosso estilo que fez de nossa turma única. A todas as demais pessoas com quem trombei que de alguma forma colaboraram para facilitar minha vida ao longo da graduação. Agradeço também à toda turma do Departamento de Química por me acolherem como um de vocês, aos meus veteranos, em especial **Péde, Fralda** e **Matheus**, e demais calouros que jamais esquecerei, assim como o apelido que aqui vesti com orgulho e carinho.

Aos meus melhores amigos de Jaboticabal, **Gui, Rogerinho, Breno, Barbára, Ana** e **Gláucia**, também **Arthur, Bianca, Luíza** e **LG**, assim como meu irmão **Matias**, dentre outros tantos, que mesmo longe sempre estiveram presentes e me apoiando. Aos moleques da Confraria pela irmandade sem igual. Aos meus melhores irmãos de classe **Marcelo, Pepino, Muffin, Carona** e **Socó** pelos momentos inesquecíveis, brigas, risadas, choros, trabalhos, festas...! Sem vocês teria sido muito mais árdua a caminhada.

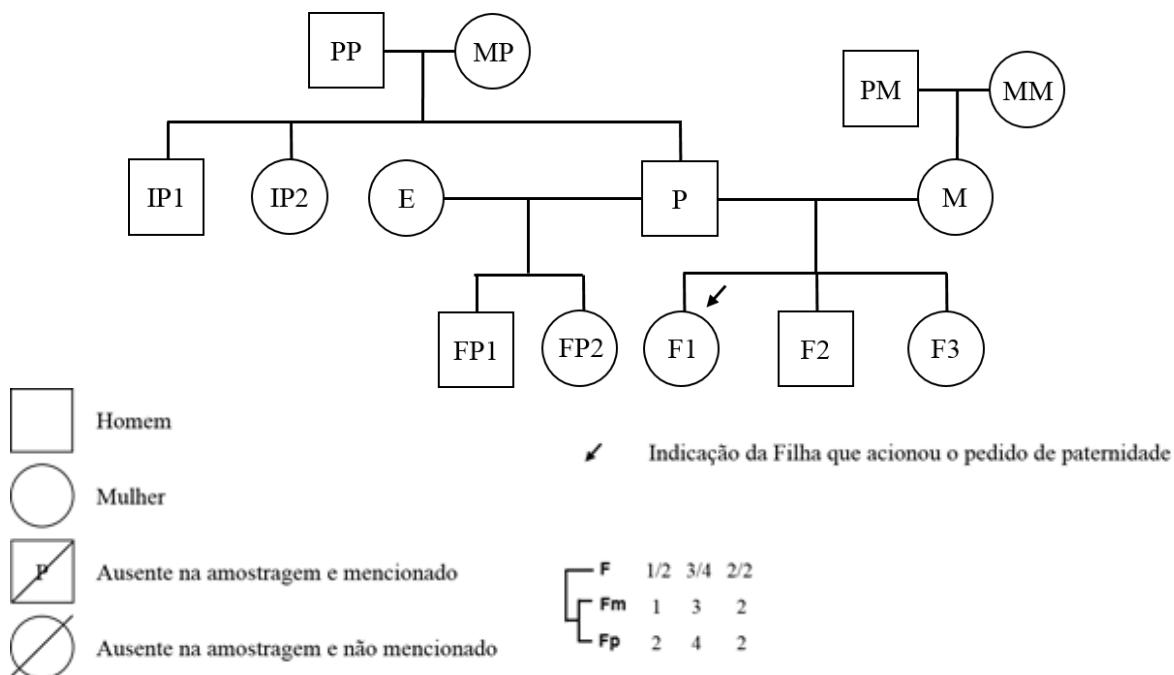
À minha família, avós, tios, primos, por serem meu porto seguro a cada fim de semana, e finalmente, aos meus pais **Marcos** e **Zezé** que, depois de tantas discussões sobre “o laboratório”, hoje podem ver o resultado de tanto esforço. Mesmo aos tropeços nestes cinco anos, eu nada seria nem aqui estaria se não fosse por cada lágrima, abraço e beijo de vocês em aceitar que estou crescendo. Também ao meu irmão **Thiago**, quem mais amo no mundo, meu herói e ídolo. Por fim, à vida e ao meu bom humor em sempre saber sorrir nos melhores e piores momentos.

RESUMO

Quando se analisa a possibilidade de dois indivíduos não aparentados serem compatíveis com hipótese de parentesco, os STRs (Short Tandem Repeat) destacam-se por apresentarem elevada quantidade de variações polimórficas de fácil diagnóstico por PCR, mesmo com o DNA parcialmente degradado ou em pouca quantidade. Diferente dos cromossomos autossômicos, o pai transfere 100% de seu cromossomo X às filhas. Dessa forma, quando a reconstrução do perfil genético de um suposto pai ausente é feita com o emprego de X-STRs não são necessários muitos parentes a serem analisados. X-STRs são úteis ainda quando dois indivíduos do sexo feminino possuem o mesmo pai, pois assim ambas devem compartilhar sempre pelo menos um alelo. Com marcadores autossômicos, porém, ambas poderiam ter alelos diferentes herdados do mesmo pai, tornando a exclusão mais difícil. Foram utilizadas 52 amostras de DNA de indivíduos que procuraram o serviço de Investigação de Paternidade do Departamento de Genética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, obtidas e armazenadas no Laboratório de Genética e Bioquímica, totalizando 11 casos de paternidade do tipo incompleto, isto é, aqueles em que o suposto pai está ausente, e um completo, mas com relação incestuosa, permitindo, portanto, a análise por X-STRs. Neste estudo, é avaliado o impacto do emprego de 13 loci do tipo STR, recentemente descritos por ANDRADE (2014), em testes de paternidade em núcleos familiares selecionados. Os loci analisados constituem dois blocos de haplótipos ligados ao cromossomo X: o primeiro com sete loci na região Xp21, próxima ao locus da distrofina (Distrofia Muscular de Duchene – DMD) e o segundo com seis loci pericentroméricos (PC) na região Xp11.1-Xq11.21. A comparação destes resultados com aqueles obtidos pela análise de rotina, previamente realizada com marcadores autossômicos, indicou que há situações em que os marcadores ligados ao cromossomo X acrescentam informação significativa para a conclusão dos casos, tornando as análises mais precisas.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ind.	Indivíduos
PP	Pai do Pai
MP	Mãe do Pai
P	Pai
IP	Irmão/ã do Pai
IPpp	Alelos que IP recebeu de PP
IPmp	Alelos que IP recebeu de MP
FP	Filho/a do Pai
FPp	Alelos que FP recebeu de P
FPe	Alelos que FP recebeu de E
E	Esposa
M	Mãe
Mp	Alelos que M recebeu de seu P
Mmm	Alelos que M recebeu de MM
F	Filho/a
Fp	Alelos que F recebeu de P
Fm	Alelos que F recebeu de M
MM	Mãe da Mãe
PM	Pai da Mãe



INTRODUÇÃO

A maioria dos testes de identidade humana utiliza marcadores genéticos autossômicos. Dentre os vários tipos de marcadores genéticos, destacam-se os STRs (*Short Tandem Repeats*) geralmente encontrados nas regiões não codificantes – regiões intergênicas e introns (BUTLER, 2005). Alguns se localizam em exons, entre eles os genes de algumas doenças neurodegenerativas, tais como SCA1 e Huntington (ORR *et al*, 1993; The Huntington Disease Collaborative Research Group, 1993).

Entre os marcadores de DNA utilizados para testes de identificação humana, os STRs ganharam significativa importância por apresentarem elevada quantidade de variações polimórficas (alelos), essenciais quando se pretende analisar a possibilidade de que dois indivíduos aleatórios tenham o mesmo genótipo ou sejam compatíveis com hipótese de parentesco (BUTLER, 2005). Também são fáceis de se diagnosticar por PCR, mesmo com o DNA parcialmente degradado e/ou em pouca quantidade, gerando resultados fáceis de interpretar e comparar com dados armazenados em arquivos computadorizados. (GOODWIN *et al*, 2007).

Os marcadores presentes em cromossomos autossômicos possuem 50% de chance de serem transmitidos à prole, uma vez que um filho herda um dos cromossomos do pai e outro da mãe, formando assim um par de cromossomos homólogos.

Diferentemente dos autossomos, o pai transfere 100% de seu cromossomo X às filhas. O cromossomo X dos filhos é de origem exclusivamente materna, enquanto que nas filhas uma cópia é recebida do pai e a outra da mãe. Dessa forma, conhecendo os genótipos de STRs de uma filha e de seu pai, é possível ter informação sobre os haplótipos de X-STRs maternos e, no sentido inverso, conhecendo-se os genótipos da mãe e da filha, o haplótipo paterno pode ser quase integralmente determinado. Devido a essas propriedades do cromossomo X, em investigações de paternidade em casos incompletos (pai ausente), a possibilidade de determinar o haplótipo paterno pelo estudo de familiares consanguíneos para reconstruir seu perfil genético permite a análise destes exames com mais facilidade (GOMES *et al*, 2007).

Examinando apenas os tradicionais STRs autossômicos, estes casos muitas vezes permanecem inconclusivos, pois a reconstrução do perfil do suposto pai exigiria vários parentes a serem analisados. Como frequentemente poucos parentes estão disponíveis para o exame, o índice de parentesco final é, muitas vezes, baixo.

Quando a reconstrução do perfil genético do suposto pai é feita com o emprego de X-STRs, mãe, filhas e irmãs dele tornam-se importantes na análise, pois os alelos paternos podem ser facilmente determinados a partir delas. Dessa forma, muitas vezes, a presença apenas da avó paterna do indivíduo questionado é suficiente para aumentar a probabilidade de que o perfil genético do suposto pai seja reconstruído, uma vez que ele herda apenas um cromossomo X, o materno, diferentemente do que ocorre com a aplicação de marcadores autossômicos, que exigem a análise de mais parentes do suposto pai (ROSS *et al.*, 2005).

Outra situação em que marcadores X-STRs mostram grande utilidade é na comparação entre duas possíveis irmãs (Figura 1). Neste caso, se elas forem filhas do mesmo pai (Figura 1.a), compartilharão um dos cromossomos X, herdado do pai. Portanto, nesta comparação, elas necessariamente apresentarão igualdade em pelo menos um dos alelos de cada locus. Daí resulta que o teste de paternidade para as duas irmãs ou meio irmãs pode ser feito até mesmo sem a análise de pais biológicos ou parentes. Com marcadores autossômicos, porém, ambas poderiam ser consideradas irmãs, mesmo com dois alelos diferentes, o que tornaria a exclusão extremamente difícil (Figura 1.b). Turina e colaboradores (2007) solucionaram um caso de meio irmãs no qual apenas quatro X-STRs foram utilizados enquanto que a análise de 15 autossômicos não foi suficiente.

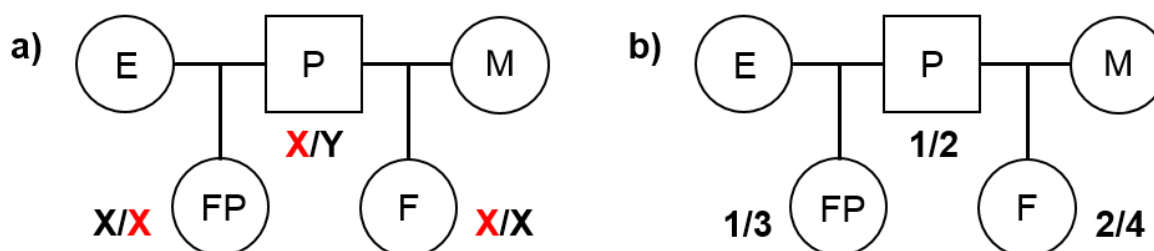


Figura 1: Situações de comparação entre duas possíveis irmãs. **(a)** Confirmação de paternidade mediante uso de marcadores ligados ao cromossomo X. O pai transfere apenas um cromossomo X às suas filhas, elas necessariamente apresentarão, portanto, igualdade em pelo menos um dos alelos de cada locus. **(b)** Comparação de paternidade mediante uso de marcadores autossômicos, exemplificados pelos alelos 1 a 4 na figura, sendo que ambas poderiam ser consideradas irmãs ainda que apresentem alelos diferentes.

Em situações nas quais existe mais de um suposto pai, e que sejam da mesma família (Figura 2), o cromossomo X também pode ser usado, facilitando a determinação de paternidade. Quando os supostos pais de uma criança são pai e filho (Figura 2.a), utilizando-se de STRs autossômicos, estes obrigatoriamente compartilham 50% dos alelos, dificultando a diferenciação entre suposto pai e verdadeiro pai biológico da criança e relativa proximidade de parentesco entre eles. No caso dos X-STRs, a resolução fica mais facilitada,

pois pai e filho não compartilham nenhum alelo por descendência, uma vez que herdam o cromossomo X cada um de suas mães e ambas são diferentes. Entretanto, no caso dos supostos pais serem dois irmãos (Figura 2.b), ambos recebem o cromossomo X da mesma mãe e por isso há uma chance de 50% destes possuírem alelos idênticos por descendência, da mesma forma como ocorre com os STRs autossômicos, sendo ambos os sistemas equivalentes nesta situação.

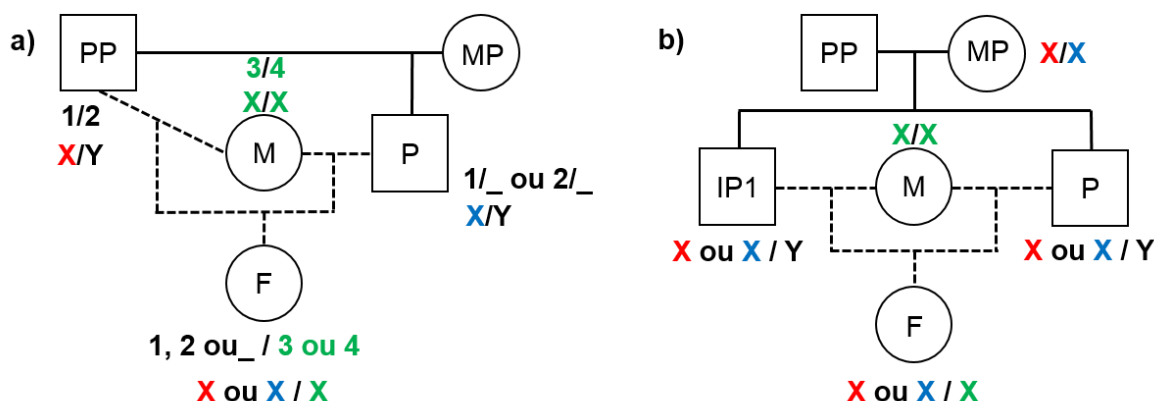


Figura 2: Situações nas quais existe mais de um suposto pai, e que sejam da mesma família. (a) Supostos pais sendo pai e filho. A análise por autossômicos se mostra difícil pois ambos os supostos pais compartilham 50% do genótipo obrigatoriamente. Com a análise por X-STRs, não compartilham nenhum alelo por descendência, evidenciando quem é o verdadeiro pai de F. (b) Supostos pais sendo dois irmãos. Ambos podem receber o mesmo cromossomo X de sua mãe, sendo o uso de X-STRs, portanto, equivalente ao sistema autossômico neste caso

HIPÓTESE/OBJETIVOS

Há situações, portanto, em que se prevê que marcadores genéticos polimórficos ligados ao cromossomo X podem trazer informações adicionais à análise de marcadores autossômicos. No presente trabalho, procura-se quantificar o efeito da análise de tais marcadores ligados ao X e testar a hipótese de que eles são úteis em tais análises.

O objetivo do presente trabalho é avaliar o impacto do emprego de 13 loci do tipo STR, recentemente descritos (ANDRADE, 2014), distribuídos em dois blocos de haplótipos ligados ao cromossomo X, na investigação de paternidade em grupos de casos em que o suposto pai é desconhecido, não se podendo constituir, portanto, um trio convencional formado por mãe, filho e pai, utilizando para tanto os demais parentes disponíveis.

METODOLOGIA

Foram selecionados 12 casos com suposto pai desconhecido, totalizando 52 indivíduos, para análise de 13 loci. Os resultados e conclusões daí obtidos foram comparados com os anteriormente obtidos na análise de rotina (15 a 20 loci de marcadores autossômicos) e registrados no Laboratório de Genética e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

AMOSTRAS

As amostras analisadas neste trabalho são provenientes de indivíduos que procuraram o serviço de Investigação de Paternidade do Departamento de Genética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), totalizando 11 casos de paternidade do tipo incompleto, ou seja, com o suposto pai falecido ou desconhecido, e um completo, mas com suposta relação incestuosa, permitindo, portanto, a análise por X-STRs.

Amostras de sangue e/ou *swab* bucal dos indivíduos que procuraram o serviço de Investigação de Paternidade foram coletadas, quando do atendimento, pelo pessoal atendente e, posteriormente, processadas e armazenadas, segundo protocolos de procedimento adiante descritos.

Algumas amostras utilizadas neste trabalho já tinham o seu DNA extraído e estocado. Quando necessário, novas alíquotas foram extraídas seguindo a metodologia adiante descrita.

LÓCUS ANALISADOS

Utilizando a metodologia de PCR, seguida de PAGE (*Polyacrylamide Gel Eletrophoresis*) e coloração por nitrato de prata (ver Protocolos 2, 3 e 4 adiante no anexo), foram analisados dois blocos de haplótipos, um contendo sete loci na região Xp21 (8,25cM) próxima ao locus da distrofina (Distrofia Muscular de Duchene - DMD) e outro contendo seis loci pericentroméricos (PC) na região Xp11.1-Xq11.21 (0,66 cM).

Os sete loci da região DMD (aqui designados por PR1, 4, 8, 9, 10, 13 e 14, de acordo com o primer utilizado para sua amplificação), foram descritos e utilizados por Sarlo (2011) para a identificação indireta de portadores de mutação no gene DMD. Este haplobloco encontra-se em uma região onde apenas um locus foi analisado em estudos de populações

brasileiras, próximo e/ou sobreposto ao gene da distrofina (Xp21). É o mais extenso dos estudados neste trabalho, com 8,25cM entre o primeiro e o último locus (Andrade 2014).

O procedimento para detecção dos alelos de seis loci do tipo STR da região pericentromérica (PC) do cromossomo X humano foi realizado pela primeira vez por Andrade (2014), sendo, portanto, estes loci e iniciadores ainda não descritos até então. É o menos extenso dos estudados (0,66cM), localiza-se em uma região cromossômica ainda não empregada em estudos deste tipo. A tabela 1 apresenta informações sobre os 13 marcadores analisados neste estudo.

Tabela 1: Informações sobre os 13 marcadores propostos para o presente estudo. cM: Distância genética em centimorgans. pb: número de pares de bases do amplicon. A distância genética foi obtida em <http://compugen.rutgers.edu/old/map-interpolator/> (Andrade 2014).

Primer	Locus	Repetição (UR)	Localização (pb)	(cM)	(pb)
Xp21 – Distrofia Muscula de Duchene (DMD) – 8,25cM					
PR1	DXS31212596	CTT	31302625–31302831	53,3270	207
PR4	DXS31841757	AAAAC	31931802–31932007	54,7628	206
PR8	DXS32069474	CAAAAA	32159403–32159628	55,5868	226
PR9	DXS32064591	AAACA	32154641–32154744	55,5646	274
PR10	DXS32161638	TTTA	32251680–32251841	56,1903	136
PR13	DXS32336904	ATCT	32426703–32427069	57,3406	367
PR14	DXS33001871	AAAT	33091924–33092130	61,5753	207
Xp11.1-Xq11.21 – Pericentroméricos (PC) – 0,66cM					
PC1	DXS56749371	GAAA	56749371–56749571	90,0056	230
PC2	DXS56909198	ATTT	56909000–56909298	90,1024	126
PC3	DXS57434969	ATTT	57434869–57435069	90,4398	125
PC4	DXS61920979	CTTT	61920879–61921079	90,6504	209
PC5	DXS62085977	TAAAA	62085877–62086077	90,6569	325
PC6	DXS62290471	GAAA	62290371–62290671	90,6642	334

A localização dos haploblocos propostos para este estudo ao longo do cromossomo X humano está representada na Figura 3.

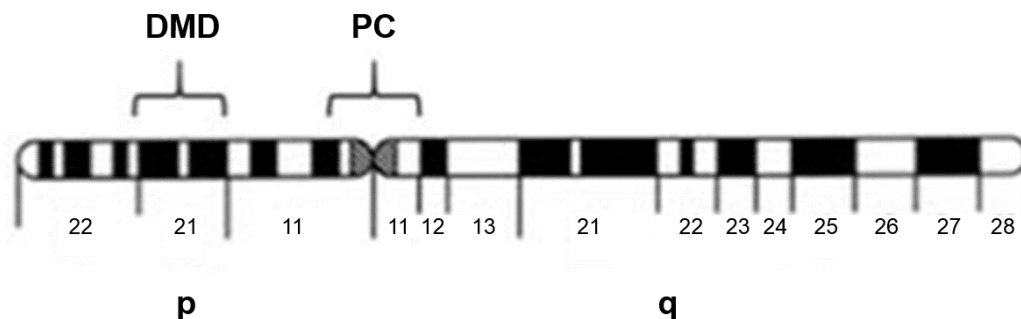


Figura 3: Localização dos dois blocos de loci STRs no cromossomo X propostos para este trabalho.

ANÁLISE LABORATORIAL

Extração de DNA

A extração do DNA das amostras armazenadas a -20 °C no laboratório seguiu o Protocolo 1 (Anexo). Após todo o processo de extração, o DNA extraído foi armazenado em a -20°C até ser utilizados no processo de PCR.

Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*)

Os procedimentos básicos para a técnica de PCR estão descritos no Protocolo 2 (Anexo). A seguir são citadas apenas as condições específicas para a situação aqui descrita.

Os 13 loci utilizados (Tabela 1) foram amplificados por PCR. Para sua otimização, avaliou-se os efeitos da concentração do DNA alvo, dos iniciadores e a ciclagem. Foram realizados ensaios de temperaturas (PCR gradiente) com as seguintes variáveis: (1) temperatura de pareamento, (2) concentração de iniciadores; (3) concentração de $MgCl_2$; e (4) concentração de DNA. Este último foi usado, em média, na quantidade de 2 ng/ μL em volume final de 25 μL de uma mistura de reação composta por 15,15 μL de água, 2,5 μL de tampão de reação (750 mM Tris HCl pH 9.0, 500 mM KCl, 200 mM $(NH_4)_2SO_4$; 10X Reaction Buffer $MgCl_2$ FREE, Biotools B&M LABS.S.A., Cat. Nr. 10.047) e reagentes na concentração final de 0,2 μM Primer, 0,2 mM dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 0,1 Taq Polimerase (5 U/ μL) (Alves Da Silva, 2007).

Para a realização da PCR, foi usado um termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems). A ciclagem otimizada para a PCR para o haplobloco DMD foi: um aquecimento inicial a 95°C por onze segundos, e em seguida 35 ciclos de três temperaturas: 94°C por um minuto para desnaturar o DNA, 63°C por um minuto para o pareamento dos iniciadores e 72°C por um minuto para a extensão do fragmento, finalizando a reação com 60°C por 60 minutos. Para o haplobloco PC, seguiu-se o mesmo procedimento, com exceção da segunda temperatura de ciclagem ter sido 65°C no lugar de 63°C e variando entre 33 ou 34 ciclos ao invés de 35.

Para padronização das condições de PCR, os iniciadores sintetizados (SIGMA-ALDRICH) foram diluídos em água destilada ultrafiltrada para uma solução estoque a 50 μM .

PAGE

O DNA das 52 amostras foi genotipado para cada um dos 13 loci, a partir de seus programas de PCR (individual). Para aquelas amostras com resultados inconclusivos (bandas espúrias, alteradas ou claras) e aquelas que não apresentaram amplificação, o

ensaio foi repetido com mudanças no protocolo, novas extrações e novas PCRs até ser possível observar amplificação das bandas nos géis.

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante descrito no Protocolo 3 (Anexo). O cassete utilizado é constituído por placas de vidro de 22,0 cm x 17,0 cm e pente para 28 poços. As eletroforeses duraram aproximadamente entre três a quatro horas e meia a 24mA constantes. Conforme indicado no Protocolo 4 anexo, para observação do padrão de bandas, a coloração do gel foi feita com nitrato de prata e secagem em condição ambiente.

RESULTADOS

A leitura das bandas ocorreu de duas maneiras distintas, dependendo do locus ou da eletroforese, conforme o grau de desnaturação das moléculas de DNA. Na figura 4, está exemplificada, pelo locus PR9, a leitura de um alelo a cada 2 bandas, devido às duas fitas da dupla-hélice do DNA de cada cromossomo que desnaturaram durante a eletroforese. Na figura 5, através do locus PC6, está exemplificado a leitura de um alelo a cada banda, devido ao menor grau de desnaturação das fitas de DNA. Em ambas, apresenta-se também como foi feita a leitura dos indivíduos de cada núcleo familiar segundo o fenótipo de amostras previamente conhecidas (Padrões de Leitura). Usou-se também amostras controle (Branco).

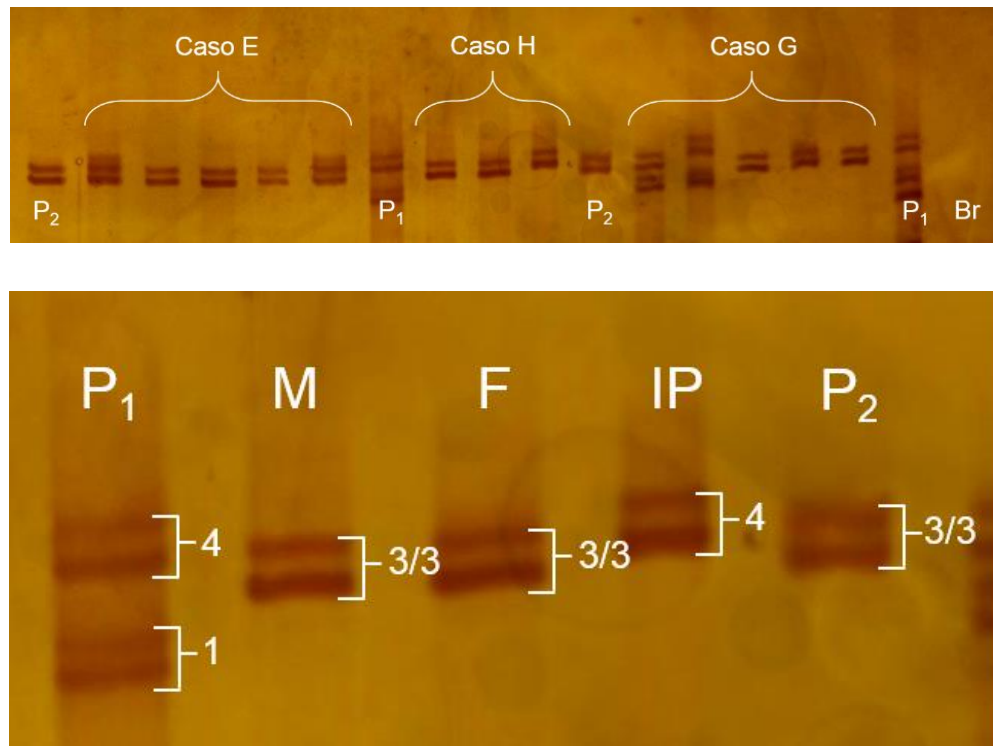


Figura 4: Gel de Poliacrilamida para o locus PR9. Acima, amostras dos casos E, H e G junto a 2 Padrões de leitura (P₁ e P₂) e amostra controle (Br) para o locus PR9. A leitura de cada 2 bandas, nessa situação, corresponde a um alelo. Abaixo, caso H ampliado. O Padrão 1 corresponde aos alelos 1/4, enquanto que o Padrão 2 corresponde aos alelos 3/3. De acordo com essas leituras, observa-se que M = 3/3, F = 3/3 e IP = 4, uma vez que por ser homem apresenta apenas 1 cromossomo X.

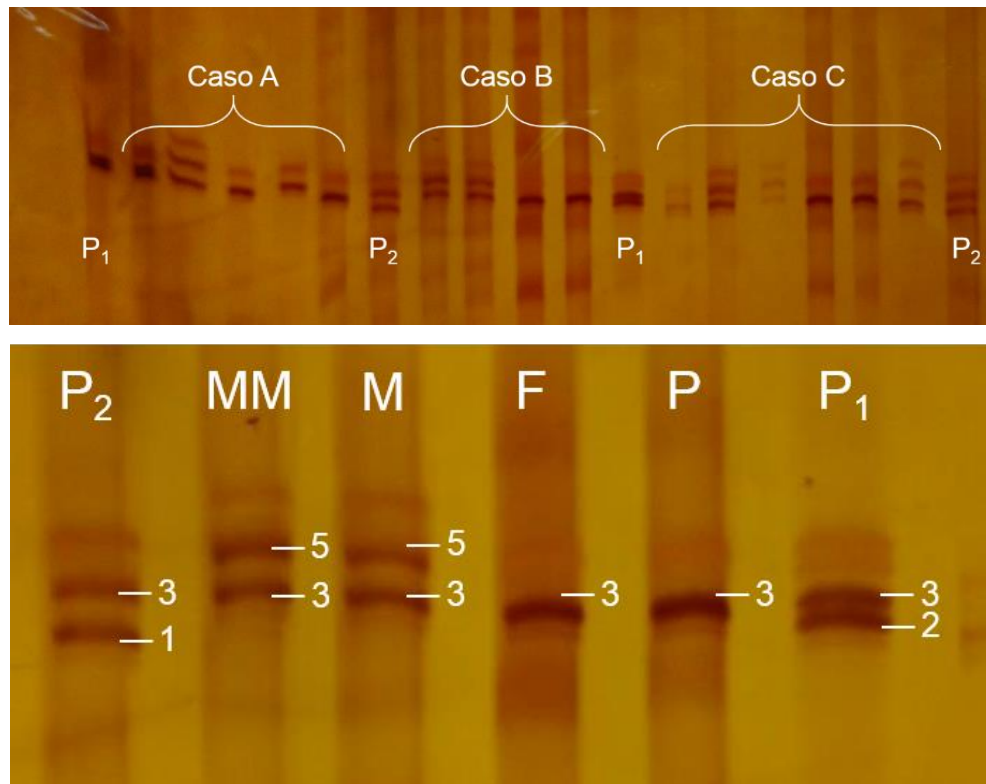


Figura 5: Gel de Poliacrilamida de amostras dos casos A, B e C junto a 2 Padrões de leitura (P₁ e P₂) e amostra controle (branco) para o locus PC6. A leitura de cada banda, nessa situação, corresponde a um alelo. Abaixo, Ampliação do caso B. O Padrão 1 corresponde aos alelos 2/3, enquanto que o Padrão 2 corresponde aos alelos 1/3. De acordo com essas leituras, observa-se que MM = 3/5, M = 3/5, F = 3 e P = 3.

Os 52 indivíduos, pertencentes a 12 núcleos familiares, foram classificados segundo seu fenótipo relativo a sete loci do haplobloco DMD e seis loci do haplobloco PC (Tabela 2).

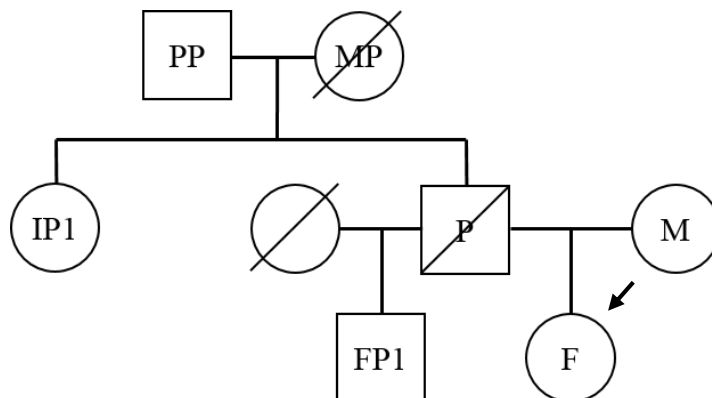
Tabela 2: Fenótipos de todos os indivíduos amostrados relativo aos loci analisados dos haploblocos DMD e PC. Alguns em que não foi possível realizar a leitura estão em branco.

ID do Caso	Ind.	Sexo	Locus												
			DMD							PC					
			PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
A	PP	Ma	17	9	5	7	12	13	5	6			4	4	2
	IP1	Fe	17/17	9/10	5/5	7/7	10/12	11/13	5/5	5/6			4/5	4/6	2/2
	M	Fe	19/21	10/11	5/5	9/10	12/14	11/12	3/5	4/5			3/5	2/7	2/3
	F	Fe	17/21	10/11	5/5	7/10	10/12	11/11	5/5	4/6			3/4	2/6	2/4
	FP1	Ma	16	10	6	9	13	13	3	5				6	3
B	MM	Fe	18/20	10/11	5/7	8/10	12/12	11/12	3/4	3/6	2/6		4/4	3/5	3/5
	M	Fe	20/20	10/10	5/6	8/10	10/12	11/11	3/4	5/6	2/6		4/5	4/5	3/5
	F	Fe	20/20	10/10	6/6	8/8	10/10	11/11	4/6	5/5	6/6		5/5	4/4	3/3
	P	Ma	20	10	6	8	10	11	4	5	6		5	4	3
C	IP1	Ma	20	10	5	9	10	11	4				4	4	2
	E	Fe	24/25	10/10	5/5	9/10	11/12	11/11	4/4	5/6			4/5		2/5
	FP1	Ma	25	10	5	9	12	11	4	6			4	6	2
	FP2	Ma	25	10	5	9	12	11	4	6			4	6	2
	M	Fe	12/22	10/10	5/6	9/9	11/13	8/11	3/3	3/6			4/6		2/5
	F	Fe	12/22	10/11	5/6	9/9	9/11	8/12	3/4	4/6			4/6	4/5	2/5
D	IP1	Ma	19	10	6	7	15	10	3	1	5	3	3	4	8
	IP2	Ma	8	9	6	7	13	10	4	2	5	1	2	9	7
	M	Fe	11/20	9/10	6/7	7/8	13/14	9/9	3/3	1/3	5/5	3/3	2/3	8/10	5/5
	F1	Ma	8/11	9/10	6/7	7/7	13/14	9/10	3/4	2/3	5/5	1/3	2/2	8/9	5/7
	F2	Fe	8/11	9/10	6/7	7/7	13/14	9/10	3/4	1/2	5/5	1/3	2/3	9/10	5/7
	F3	Fe	8/11	9/10	6/7	7/7	13/14	9/10	3/4	2/3	5/5	1/3	2/2	8/9	5/7
E	PP	Ma	21	10	5	9	12	13	5	4	8		6	5	4
	MP	Fe	12/14	9/10	5/5	9/9	12/13	11/11	5/5	3/7	2/4		3/5	3/7	3/3
	M	Fe	12/21	10/10	6/6	9/10	12/13	11/13	5/5	4/5	2/2		5/5	2/5	2/4
	F	Fe	12/21	10/10	5/6	9/9	12/12	11/12	4/5	3/5	2/2		5/5	5/7	3/4
F	P	Ma	22	10	6	9	12	12	5				5		3
	MP	Fe	17/19	9/10	5/6	9/9	13/14	11/12	4/4	3/6			5/7	4/7	3/4
	M	Fe	22/22	9/11	5/6	8/9	12/13	12/12	4/5	4/6			2/5	2/6	4/4
	F	Fe	17/22	9/11	5/6	9/9	13/14	11/12	4/4	4/6			5/5	4/6	3/4
G	IP	Ma	19	10	5	10	10	12	6	2	6		3/6		
	M	Fe	19/21	11/11	5/7	9/9	13/13	11/14	6/6	4/6	2/6		1/7		
	F	Fe	19/19	10/11	5/7	9/9	12/13	11/12	4/6	3/6	2/6		1/7		
H	IP1	Ma	13	10	5	9	13	13	5	5	2		7	6	
	IP2	Ma	24	10	5	9	12	13	6	6	2		6	6	
	M	Fe	13/26	11/11	5/5	7/9	11/12	11/11	5/6	3/4	6/6			4/6	
	F	Fe	13/24	9/11	5/5	7/10	12/12	11/11	5/6	4/4	6/6		5/5	6/8	
	FP	Fe	13/24	10/10	5/5	9/9	13/13	12/13	5/5	3/5	2/4			3/6	

Tabela 2: (Continuação).

I	E	Fe	12/18	10/10	5/5	10/10	11/13	11/12	5/5	5/5	6/6		2/4		
	FP1	Ma	12	10	5	10	12	12	5	5	6				
	FP2	Fe	12/18	10/10	5/5	9/10	12/13	11/12	5/5	4/5	4/6		4/6		
	F	Fe	16/20	10/10	5/5	10/11	9/11	11/12	3/4	3/5	4/6		2/6		
J	PP	Ma	10	11	5	10	13	13	5	5	4		5		
	IP	Fe	10/21	10/11	5/5	9/9	12/13	11/13	5/5	3/5	4/6	5/5	6/7	2/5	
	M	Fe	21/21	10/11	5/6	9/10	10/12	11/12	1/4	3/6	2/6	2/5	2/5	2/3	
	F	Fe	21/21	10/11	5/6	9/10	10/11	11/13	1/5	5/6	2/6	5/5	2/7	2/2	
K	PP	Ma	12	10	7	9	12	11	3	4	2	3	7	3	
	MP	Fe	16/20	10/10	5/5	10/11	12/12	11/11	3/6	3/5	2/6	4/4	7/8	2/3	
	F	Fe	12/21	10/11	5/5	10/10	9/12	11/11	3/4	3/5	2/6	4/4	5/7	2/4	
	F2	Ma	23	10	5	10	10	11	3	5	4	5	7	2	
L	M	Fe	12/15	10/11	5/6	8/9	12/12	11/12	7/7	3/4	3/4	1/1	2/3	4/8	3/7
	F1	Fe	15/18	10/11	5/6	9/7	12/12	11/12	7/6	3/5	3/5	1/1	3/4	6/8	5/7
	F2	Fe	15/18	10/11	5/6	9/7	12/12	11/12	7/6	3/5	3/5	1/1	3/4	6/8	5/7

Os resultados são reapresentados a seguir em cada um dos heredogramas de cada família analisada e seus resultados de acordo com cada locus. As abreviaturas mencionadas estão listadas no fim deste trabalho. Para alelos encontrados na suposta filha que não são compatíveis com a hipótese desta ter recebido o mesmo cromossomo X de seu suposto pai em questão no heredograma, adotou-se o termo “inconsistência”, enquanto que para todos os alelos encontrados que são incompatíveis com a premissa de parentesco alegado previamente ao exame, adotou-se o termo “incompatível”.

Caso A

Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC4	PC5	PC6
PP	17	9	5	7	12	13	5	6	4	4	2
IP1	17/17	9/10	5/5	7/7	10/12	11/13	5/5	5/6	4/5	4/6	2/2
IPmp	17	10	5	7	10	11	5	5	5	6	2
IPpp	17	9	5	7	12	13	5	6	4	4	2
M	19/21	10/11	5/5	9/10	12/14	11/12	3/5	4/5	3/5	2/7	2/3
F	17/21	10/11	5/5	7/10	10/12	11/11	5/5	4/6	3/4	2/6	2/4
Fm	21	10/11	5	10	12	11	5	4	3	2	2
Fp	17	10/11	5	7	10	11	5	6*	4*	6	4*
FP1(**)	16	10	6	9	13	13	3	5		6	3

(*) denota inconsistência destes alelos com a hipótese de ter recebido o mesmo cromossomo X; (**) FP1 foi incluído na tabela, mas não é informativo.

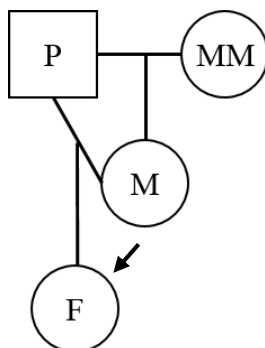
Não foi possível realizar a leitura dos locos PC2 e PC3 para todos os indivíduos do heredograma A.

A MP (ausente na amostragem) possui dois cromossomos X e transmitiu um para IP1. Há 50% de chance de transmitir o mesmo X para P (ausente na amostragem). A presença de PP permite definir com exatidão os alelos que IP1 recebeu de MP. Portanto, na linha IPmp da tabela acima estão apresentados os alelos que IP1 recebeu de MP. Fica também definido uma parte do genótipo de MP. F recebeu um X de M e outro de P. Como M foi analisada, sabe-se exatamente quais os alelos que F recebeu de M (linha Fm) e de P (linha Fp). Observa-se que no locus PR4 não é possível determinar se F recebeu o alelo 10 ou o 11 e, por este motivo, ambos estão listados. Se o X que F herdou de P for o mesmo que IP1 recebeu de MP, F terá pelo menos um alelo de cada locus igual aos de IP1, e, consequentemente, um alelo de cada locus igual aos de MP. De fato, esta concordância é

observada integralmente para os 7 loci PR, mas não para os loci PC1, PC4 e PC6. Interpreta-se este achado como decorrente da recombinação entre os dois blocos, pois os alelos dos loci PR sugerem o recebimento de um cromossomo X de MP, mas os alelos dos loci PC sugerem o recebimento de outro cromossomo X. Isto sugere recombinação entre os dois blocos de haplótipos.

O índice de parentesco baseado nos autossômicos foi de 679, correspondente à probabilidade 99,85%.

Neste caso os marcadores de X não podem ser computados pela presença da recombinação, pois a probabilidade desta não pode ser estimada com precisão.

Caso B


Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC4	PC5	PC6
MM	18/20	10/11	5/7	8/10	12/12	11/12	3/4	3/6	2/6	4/4	3/5	3/5
M	20/20	10/10	5/6	8/10	10/12	11/11	3/4	5/6	2/6	4/5	4/5	3/5
MMm	20	10	5	10	12	11	3	6	2	4	5	5
Mp	20	10	6	8	10	11	4	5	6	5	4	3
F	20/20	10/10	6/6	8/8	10/10	11/11	4/6*	5/5	6/6	5/5	4/4	3/3
Fm	20	10	6	8	10	11	4	5	6	5	4	3
Fp	20	10	6	8	10	11	4/6*	5	6	5	4	3
P	20	10	6	8	10	11	4	5	6	5	4	3

(*) denota inconsistência com a hipótese de ter recebido o mesmo cromossomo X.

Não foi possível realizar a leitura do locus PC3 para todos os indivíduos do heredograma B.

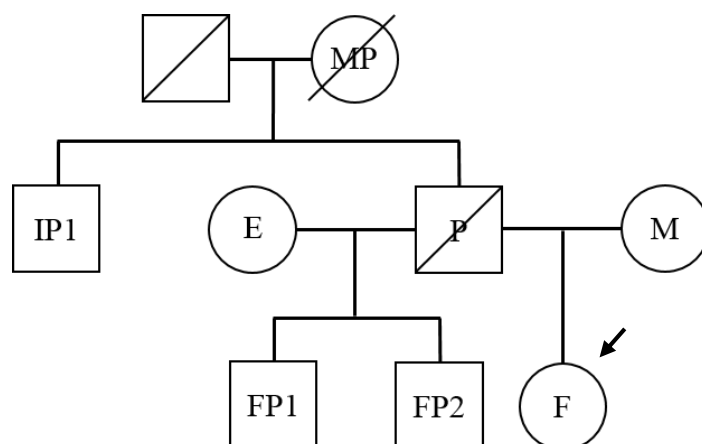
Neste caso, testa-se a hipótese de incesto, isto é, o pai de M (P) foi acusado de também ser o pai de F. Tratando-se de um incesto, o pai não é ausente, mas a análise por X-STRs pode ser aplicada da mesma forma como proposto neste trabalho.

Pelos dados expostos na tabela acima, é possível estabelecer com exatidão os alelos que M recebeu de P e MM (Mp e MMm, respectivamente). Também foi possível estabelecer, com exatidão, pelo genótipo de F, que esta apresenta um elevado número de loci em homozigose, confirmando o recebimento do haplótipo de P que, por sua vez está presente também em M.

Houve, entretanto, uma inconsistência quanto ao resultado do locus PR14 para F que apresentou o genótipo 4/6 o que é discrepante em relação à sua filiação, uma vez que o alelo PR14*6 não está presente nos genitores de M. Ainda não foi possível elucidar se se trata de mutação ou resultado de algum artefato laboratorial.

Através da leitura dos alelos do haplobloco de PR e PC, com exceção do PR14 que apresenta uma inconsistência, é possível notar que M transmitiu a F o mesmo cromossomo que recebeu de P, sendo F, portanto, homozigota para todos os loci.

Este resultado corroborou fortemente as conclusões alcançadas pelo estudo de marcadores autossômicos, pois estes demonstraram índice de parentesco 4562705225.76 e probabilidade 99,99%.

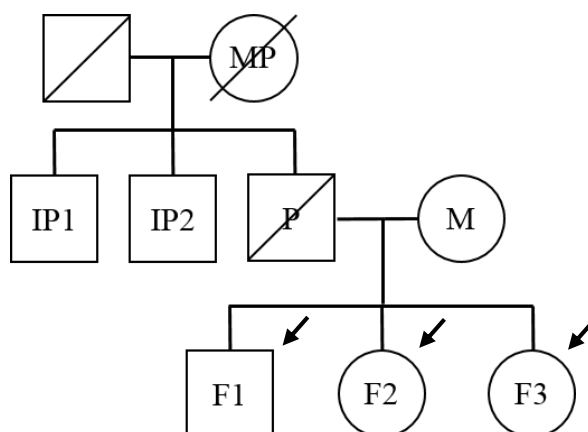
Caso C

Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC4	PC5	PC6
IP1	20	10	5	9	10	11	4		4	4	2
E	24/25	10/10	5/5	9/10	11/12	11/11	4/4	5/6	4/5		2/5
FP1	25	10	5	9	12	11	4	6	4	6	2
FP2	25	10	5	9	12	11	4	6	4	6	2
M	12/22	10/10	5/6	9/9	11/13	8/11	3/3	3/6	4/6		2/2
F	12/22	10/11	5/6	9/9	9/11	8/12	3/4	4/6	4/6	4/5	2/5
Fm	12/22	10	5/6	9	11	8	3	6	4/6	4/5	2
Fp	12/22	11	5/6	9	9	12	4	4	4/6	4/5	5

(**) E, FP1 e FP2 foram incluídos na tabela, mas não são informativos.

Não foi possível realizar a leitura dos locos PC2 e PC3 para todos os indivíduos do heredograma C, além do locus PC5 para M e E e PC1 para IP1.

A partir de IP1, é possível reconstruir parcialmente os genótipos do cromossomo X de MP (ausente na amostragem). O haplótipo descrito na linha IP1 está presente, com certeza, em MP. Um dos cromossomos X de F foi herdado de M e o outro de P. Comparando-se os alelos de F com os alelos M, conclui-se que F recebeu de P os alelos descritos na linha Fp. Comparando-se com o haplótipo da linha IP1, conclui-se que P herdou o cromossomo não representado aqui e o passou para F ou é uma exclusão. Em conclusão, não indica confirmação da paternidade, mas também não é suficiente para excluir a paternidade investigada. Os marcadores autossômicos indicaram possibilidade de parentesco com índice de paternidade 199 e probabilidade 99,95%.

Caso D

Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
IP1	19	10	6	7	15	10	3	1	5	3	3	4	8
IP2	8	9	6	7	13	10	4	2	5	1	2	9	7
M	11/20	9/10	6/7	7/8	13/14	9/9	3/3	1/3	5/5	3/3	2/3	8/10	5/5
F1	8/11	9/10	6/7	7/7	13/14	9/10	3/4	2/3	5/5	1/3	2/2	8/9	5/7
F1m	11	9/10	6/7	7	13/14	9	3	3	5	3	2	8	5
F1p	8	9/10	6/7	7	13/14	10	4	2	5	1	2	9	7
F2	8/11	9/10	6/7	7/7	13/14	9/10	3/4	1/2	5/5	1/3	2/3	9/10	5/7
F2m	11	9/10	6/7	7	13/14	9	3	1	5	3	2/3	10	5
F2p	8	9/10	6/7	7	13/14	10	4	2	5	1	2/3	9	7
F3	8/11	9/10	6/7	7/7	13/14	9/10	3/4	2/3	5/5	1/3	2/2	8/9	5/7
F3m	11	9/10	6/7	7	13/14	9	3	3	5	3	2	8	5
F3p	8	9/10	6/7	7	13/14	10	4	2	5	1	2	9	7

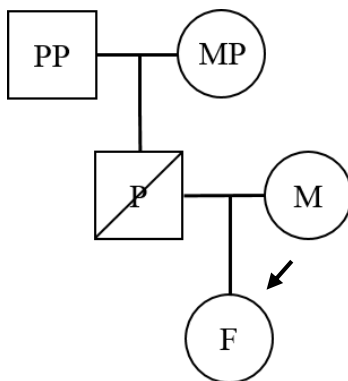
O teste de paternidade foi realizado para determinar se F1, F2 e F3 eram irmãos. Ao exame, constatou-se que o indivíduo F1 era portador da Síndrome de Klinefelter (XXY), o que explicou a ocorrência de heterozigose em vários dos locos do cromossomo X.

A partir de IP1 e IP2 que receberam cromossomos X diferentes, pode-se determinar os alelos de cada locus analisado neste trabalho para o genótipo do cromossomo X de MP (ausente na amostragem). Há 50% de chance de um destes cromossomos X também ter sido transmitido para P. Dessa forma, F2 e F3 devem apresentar pelo menos um dos alelos de

cada locus comum a MP por ascendência, uma vez que receberam um alelo de M e outro alelo de P (ausente na amostragem), herdado de MP. Na tabela, para F1, F2 e F3, estão representados os possíveis haplótipos (F1m, F1p, F2m, ... etc.) herdados de M e P. A análise exclusiva destes últimos e M não permite concluir com exatidão os haplótipos herdados, especialmente em relação aos loci PR4, PR8 e PR10. No entanto, pode-se notar que F1 e F3 receberam de M os dois haplótipos (PR e PC) no mesmo cromossomo, enquanto que em F2 pode ter ocorrido recombinação entre os cromossomos X de M, uma vez que F2 apresenta todo o haplótipo DMD idêntico ao de seus irmãos, ou seja, pertencentes ao mesmo cromossomo X de M, mas todo o haplótipo PC pertencente ao outro cromossomo X, o que pode ser observado pelos seus alelos complementares aos transmitidos a F1 e F3, comparando-se com o genótipo de M.

Sendo assim, o conjunto de concordâncias é suficiente para concluir-se que os três receberam os mesmos haplótipos de IP2. Esta concordância levaria a uma elevada estimativa de índices de parentesco.

O índice de parentesco obtido pelos marcadores autossômicos foi 7286104, com probabilidade 99,99%, concordantes com a conclusão do exame de marcadores do cromossomo X. Neste caso, em particular, a detecção casual de paciente XXY permite inferir que o cromossomo X duplicado trata-se do de origem paterna.

Caso E

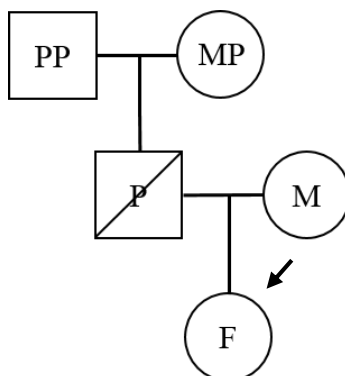
Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC4	PC5	PC6
PP**	21	10	5	9	12	13	5	4	8	6	5	4
MP	12/14	9/10	5/5	9/9	12/13	11/11	5/5	3/7	2/4	3/5	3/7	3/3
M	12/21	10/10	6/6	9/10	12/13	11/13	5/5	4/5	2/2	5/5	2/5	2/4
F	12/21	10/10	5/6	9/9	12/12	11/12	4/5	3/5	2/2	5/5	5/7	3/4
Fm	12/21	10	6	9	12	11	5	5	2	5	5	4
Fp	12/21	10	5	9	12	12*	4*	3	2	5	7	3

(*) denota inconsistência destes alelos com a hipótese de ter recebido o mesmo cromossomo X. (**)

PP foi incluído na tabela, mas não é informativo.

Não foi possível realizar a leitura do locus PC3 para todos os indivíduos do heredograma.

Comparando-se os resultados de F com os de M, determinam-se parcialmente os alelos recebidos de P (Linha Fp) e que devem todos estar presentes em MP. Há duas inconsistências: os alelos PR13*12 e PR14*4 presentes em F deveriam estar presentes em MP, mas não estão. Este achado entra em conflito com a informação obtida a partir dos marcadores autossômicos, a partir dos quais foi calculado um índice de parentesco de 51238215, equivalente a uma probabilidade de parentesco muito superior a 99,99%. A explicação possível é que trata-se de erro de classificação decorrente da ausência de marcadores de referência completamente padronizados (ver DISCUSSÃO).

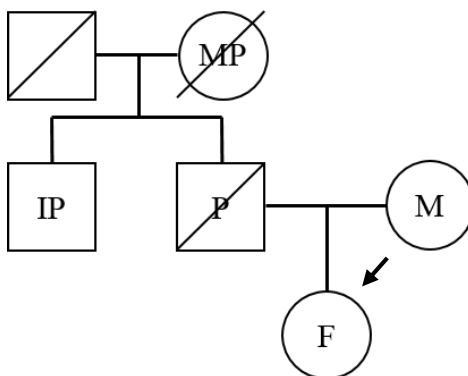
Caso F


Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC4	PC5	PC6
PP*	22	10	6	9	12	12	5		5		3
MP	17/19	9/10	5/6	9/9	13/14	11/12	4/4	3/6	5/7	4/7	3/4
M	22/22	9/11	5/6	8/9	12/13	12/12	4/5	4/6	2/5	2/6	4/4
F	17/22	9/11	5/6	9/9	13/14	11/12	4/4	4/6	5/5	4/6	3/4
Fm	22	9/11	5/6	9	13	12	4	4/6	5	6	4
Fp	17	9/11	5/6	9	14	11	4	4/6	5	4	3

(*) PP foi incluído na tabela, mas não é informativo.

Não foi possível realizar a leitura dos locos PC2 e PC3 para todos os indivíduos, além dos locos PC1 e PC5 para PP. Este, no entanto, não é informativo nesta situação.

Assim como o heredograma anterior, analisando os alelos de F recebidos de M, é possível determinar os alelos que F recebeu de seu pai. Todos eles, listados na linha Fp, estão presentes em MP, o que concorda com os resultados da análise de marcadores autossômicos, cuja análise apontou um índice de parentesco de 489103959, correspondente a uma probabilidade superior a 99,99%.

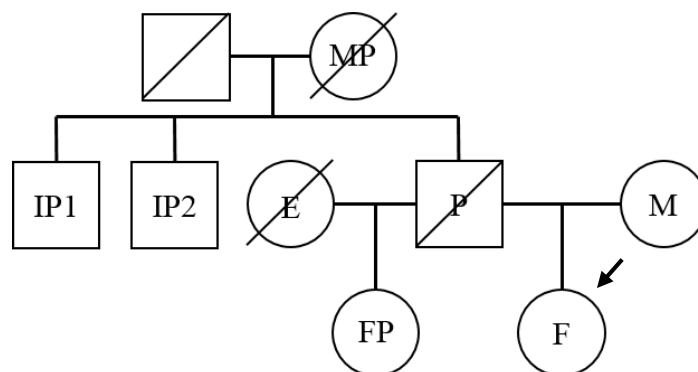
Caso G

Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC4
IP	19	10	5	10	10	12	6	2	6	
M	19/21	11/11	5/7	9/9	13/13	11/14	6/6	4/6	2/6	1/7
F	19/19	10/11	5/7	9/9	12/13	11/12	4/6	3/6	2/6	1/7
Fm	19	11	5/7	9	13	11	6	6	2/6	1/7
Fp	19	10	5/7	9*	12*	12	4*	3*	2/6	1/7

(*) denota inconsistência destes alelos com a hipótese de ter recebido o mesmo cromossomo X.

Não foi possível realizar a leitura dos locos PC3, PC5 e PC6 para todos os indivíduos, além de PC4 para IP.

IP herdou apenas um cromossomo X de MP, ausente na amostragem. Há 50% de chance desta transmitir o mesmo X para P, também de genótipo desconhecido. Comparando-se os alelos de F recebidos de M com os alelos de IP recebidos de MP, é possível inferir os alelos que F recebeu de P. Se P for realmente pai de F, há 50% de chance de ser o mesmo cromossomo X presente em IP. Portanto, F e IP podem ou não apresentar alelos em comum para cada locus. Em quatro locos (PR9, PR10, PR14 e PC1), os alelos que F recebeu de seu pai (linha Fp) não estão presentes em IP. Embora não indique diretamente uma exclusão, reduz significativamente o índice de parentesco eventualmente estimado, o que concorda com os resultados da análise de marcadores autossômicos que apontou um índice de parentesco baixíssimo de 0.0007, correspondente à Probabilidade total de apenas 0,07%, resultando em “Exclusão” da paternidade investigada.

Caso H

Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC4	PC5
IP1	13	10	5	9	13	13	5	5	2	7	6
IP2	24	10	5	9	12	13	6	6	2	6	6
M	13/26	11/11	5/5	7/9	11/12	11/11	5/6	3/4	6/6		4/6
F	13/24	9/11	5/5	7/10	12/12	11/11	5/6	4/4	6/6	5/5	6/8
Fm	13	11	5	7	12	11	5/6	4	6	5	6
Fp	24*	9*	5	10*	12*	11*	5/6	3*	6*	5*	8*
FP	13/24	10/10	5/5	9/9	13/13	12/13	5/5	3/5	2/4		3/6
FPe	24	10	5	9	13	12	5	3	4		3
FPp	13	10	5	9	13	13	5	5	2		6

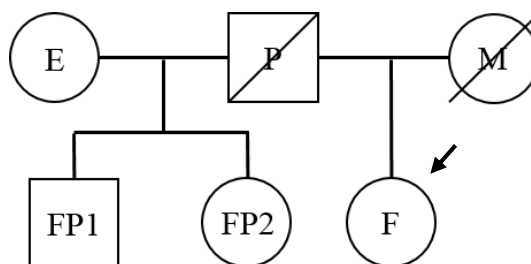
(*) denota inconsistência destes alelos com a hipótese de ter recebido o mesmo cromossomo X.

Não foi possível realizar a leitura dos loci PC3 e PC6 neste caso, além do locus PC4 para alguns indivíduos.

Através das leituras dos genótipos de IP1 e IP2, pode-se reconstruir os genótipos de MP (ausente na amostragem) como heterozigota para os loci PR1, PR10, PR14, PC1 e PC4 e homozigota para os demais loci analisados.

Ao analisar F e comparar seus alelos com M, pode-se listar quais alelos F recebeu de P na linha Fp. Há ainda FP que auxilia na reconstituição do genótipo de P, listando quais alelos ela pode ter recebido de sua mãe (E, ausente na amostragem) e de P. Comparando estes alelos com os de IP1 e IP2, nota-se que P herdou de MP o mesmo cromossomo X que IP1,

transmitindo-o posteriormente a FP, o que é possível se observar com base nos alelos PR1*13, PR10*13, PR14*5 e PC1*5, que indicam que FP apresenta assim o mesmo cromossomo X de IP1 e não o de IP2. Através disso, reconstrói-se o genótipo de P como sendo o mesmo X de IP1. No entanto, ao analisar os alelos que F recebeu de seu pai, observa-se muitas discrepâncias com o possível genótipo de MP, uma vez que sete alelos da linha Fp não são encontrados em nenhum dos supostos cromossomos X presentes em MP, transmitidos a IP1, IP2 e P, e outros dois alelos que não estão presentes no provável cromossomo X de P herdado de MP. Conclui-se, assim, que não há relação de paternidade entre F e o suposto pai (P), indicando clara exclusão, o que concorda com os resultados da análise pelos autossômicos. Neste caso, portanto, os marcadores de X contribuem para maior certeza da conclusão.

Caso I


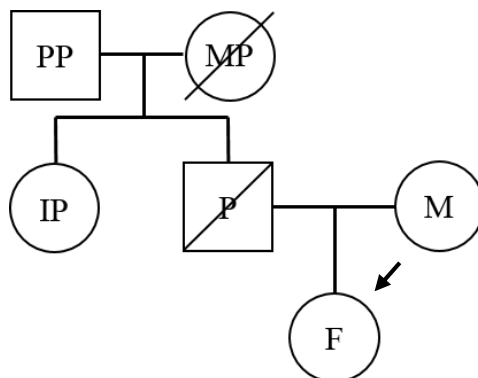
Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC5
E	12/18	10/10	5/5	10/10	11/13	11/12	5/5	5/5	6/6	2/4
FP1	12	10	5	10	12**	12	5	5	6	
FP2	12/18	10/10	5/5	9/10	12/13	11/12	5/5	4/5	4/6	4/6
FP2e	12	10	5	10	13	12	5	5	6	4
FP2p	18	10	5	9	12	11	5	4	4	6
F	16/20	10/10	5/5	10/11	9/11	11/12	3/4	3/5	4/6	2/6
Fm	16/20	10	5	10/11	9/11	11/12	3/4	3/5	4/6	2/6
Fp	16/20*	10	5	10/11*	9/11*	11/12	3/4*	3/5*	4/6	2/6

(*) denota inconsistência destes alelos com a hipótese de ter recebido o mesmo cromossomo X. (**) denota alelo incompatível.

Não foi possível realizar a leitura dos locos PC3, PC4 e PC6 para todos os membros do heredograma I, além do locus PC5 para FP1.

FP1 informa com precisão um dos cromossomos presentes em E, com exceção de uma incompatibilidade no locus PR10 (Alelo 12). Consequentemente, facilita a comparação de FP2 com E e a determinação do haplótipo paterno em P. Os alelos PR1*12, PR9*10, PR13*12, PC1*5 e PC2*6 em FP2 podem ser determinados segundo FP1, estando portanto no mesmo cromossomo que os demais alelos de FP1. Com a reconstrução parcial do genótipo de P através de F na linha Fp, pode-se comparar estes alelos com os de FP2 recebidos de P, listados na linha FP2p. Nesta linha da tabela está, portanto, o haplótipo presente em P que pode ser comparado aos resultados de F. A análise locus a locus

evidencia inconsistências nos loci PR1, PR9, PR10, PR14 e PC1, nos quais F apresenta alelos que não estão presentes em FP2p e que, portanto, não pertencem ao pai de FP1 e FP2. O exame pelos marcadores do cromossomo X aponta para exclusão clara, o que corrobora a conclusão baseada nos marcadores autossômicos que indicaram um índice de parentesco de apenas 0.1173, correspondente a Probabilidade total de 10,50%, confirmando a “Exclusão” da paternidade alegada.

Caso J

Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC4	PC5	PC6
PP	10	11	5	10	13	13	5	5	4			5
IP	10/21	10/11	5/5	9/9	12/13	11/13	5/5	3/5	4/6	5/5	6/7	2/5
IPpp	10	11	5	9**	13	13	5	5	4	5	6/7	5
IPmp	21	10	5	9	12	11	5	3	6	5	6/7	2
M	21/21	10/11	5/6	9/10	10/12	11/12	1/4	3/6	2/6	2/5	2/5	2/3
F	21/21	10/11	5/6	9/10	10/11	11/13	1/5	5/6	2/6	5/5	2/7	2/2
Fm	21	10/11	5/6	9/10	10	11	1	6	2/6	5	2	2
Fp	21	10/11	5/6	9/10	11*	13*	5	5*	2/6	5	7	2

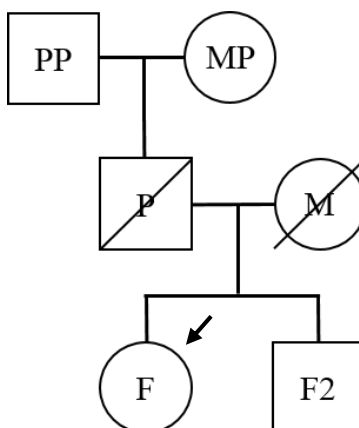
(*) denota inconsistência destes alelos com a hipótese de ter recebido o mesmo cromossomo X. (**) denota alelo incompatível.

Não foi possível realizar a leitura do locus PC3, além dos locus PC4 e PC5 para PP, o que não interferiu na análise dos marcadores.

Com base nas leituras de PP e IP, foi possível reconstruir os haplótipos de um dos cromossomos X de MP (ausente na amostragem), salvo o locus PR9 no qual há uma incompatibilidade dos alelos de IP para com o de PP. Ainda assim, há 50% de chance de MP transmitir a P (ausente na amostragem) o mesmo X transmitido a IP.

As inconsistências observadas em F em relação ao haplótipo conhecido de MP demonstram apenas que F não recebeu aquele haplótipo, mas não invalida a hipótese de que o parentesco alegado seja verdadeiro, uma vez que é possível que MP tenha um segundo haplótipo compatível com os resultados de F. Portanto, neste caso, os marcadores ligados

ao X não contribuem para o cálculo do IP. O índice de parentesco baseado nos autossômicos de 10660670, com probabilidade de 99%, indicou paternidade possível e praticamente confirmada.

Caso K

Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC4	PC5	PC6
PP**	12	10	7	9	12	11	3	4	2	3	7	3
MP	16/20	10/10	5/5	10/11	12/12	11/11	3/6	3/5	2/6	4/4	7/8	2/3
F	12/21	10/11	5/5	10/10	9/12	11/11	3/4	3/5	2/6	4/4	5/7	2/4
Fm	12/21	10/11	5	10	9/12	11	3/4	3/5	2/6	4	5/7	2/4
Fp	12/21*	10/11	5	10	9/12	11	3/4	3/5	2/6	4	5/7	2/4
F2	23*	10	5	10	10*	11	3	5	4	5	7	2

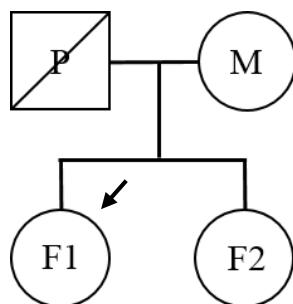
(*) denota inconsistência destes alelos com a hipótese de ter recebido o mesmo cromossomo X. (**) PP foi incluído na tabela, mas não é informativo.

Não foi possível realizar a leitura dos loci PC3 para todos os indivíduos do heredograma K.

Com a análise de F2, é possível reconstruir parcialmente o genótipo de um dos cromossomos de M, sendo que há 50% de chance de esta transmitir o mesmo X para F. Conhecendo o genótipo de alguns loci dos cromossomos X de MP, dado que também há 50% de chance de cada X ser transmitido para P (ausente na amostragem), pode-se então comparar os prováveis alelos destes loci de F recebidos de P com os genótipos conhecidos de MP.

Esta análise se torna difícil porque um dos cromossomos de M pode ter qualquer outro alelo e muitas combinações seriam possíveis para os haplótipos de F. Mas é simples comparar diretamente F com MP porque entre ambas deve haver pelo menos um alelo compartilhado. É o que se observa em todos os loci, com exceção à inconsistência

encontrada nos alelos PR1*12/21, o que pode ser uma mutação ou erro de tipificação. No entanto, ainda persiste a necessidade de se estimar um índice de parentesco para esta situação, o que é complexo e ainda demanda extenso trabalho de informática. Fica registrado apenas que os marcadores autossômicos indicaram índice de parentesco 718892, com probabilidade de 99,99%, e os marcadores de X, portanto, corroboram tal conclusão.

Caso L


	Ind.	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
	M	12/15	10/11	5/6	8/9	12/12	11/12	7/7	3/4	3/4	1/1	2/3	4/8	3/7
[	F1	15/18	10/11	5/6	9/7	12/12	11/12	7/6	3/5	3/5	1/1	3/4	6/8	5/7
	F1m	15	10/11	5/6	9	12	11/12	7	3	3	1	3	8	7
	F1p	18	10/11	5/6	7	12	11/12	6	5	5	1	4	6	5
[	F2	15/18	10/11	5/6	9/7	12/12	11/12	7/6	3/5	3/5	1/1	3/4	6/8	5/7
	F2m	15	10/11	5/6	9	12	11/12	7	3	3	1	3	8	7
	F2p	18	10/11	5/6	7	12	11/12	6	5	5	1	4	6	5

Este foi um exame de maternidade acionado por F1 a fim de saber se era realmente filha de M. A partir da análise dos marcadores autossômicos, verificou-se que F1 e F2 são de fato filhas de M, porém diferem na maior parte dos loci analisados em relação ao seu suposto pai, uma vez que apresentam mais de dois alelos diferentes para estes marcadores autossômicos, o que indica serem de pais diferentes. Mediante esta dúvida, realizou-se a análise de paternidade usando os marcadores X-STRs e seus resultados estão dispostos no heredograma acima.

Ao se comparar o genótipo de F1 e F2 com o de M, nota-se que estas apresentam sempre um alelo em comum, evidenciando que receberam o mesmo X de M. Já quando os demais alelos das filhas foram comparados, diferente do que se observou nos marcadores autossômicos, estas também apresentaram os mesmos alelos, ou seja, receberam o mesmo X paterno.

Neste caso, a maior parte dos alelos dos marcadores autossômicos apontaram-nas como meio-irmãs, ou seja, indicam que os pais seriam dois indivíduos diferentes, ao passo que os marcadores ligados ao cromossomo X divergiram, indicando como possível a paternidade de ambas as filhas para o mesmo pai, confirmando que sejam de fato irmãs.

Como o único indivíduo que poderia apresentar o mesmo cromossomo X de P mas com diferentes cromossomos autossômicos seria um possível irmão seu (IP, ausente no heredograma), pode-se supor que F1 e F2 sejam filhas de M mas com pais diferentes e irmãos (P e IP) ou, menos provável, seriam primos que teriam recebido o mesmo cromossomo X de suas mães, porém com autossômicos distintos. Índice de Parentesco baseado nos autossômicos igual a 23,44.

A tabela 3 apresenta, por fim, o que se conclui pela comparação da análise feita por marcadores autossômicos obtidos anteriormente no laboratório e a análise por X-STRs realizada neste estudo. Pode-se notar que sete casos analisados por macadores X-STRs corroboraram com os marcadores autossômicos, enquanto dois casos não corroboraram, dois foram inconclusivos, e um não pôde ser computado.

Tabela 3: Conclusão das análises feitas por marcadores autossômicos e X-STRs comparadas.

ID do Caso	Análise por Marcadores		Conclusão
	Autossômicos	X-STRs	
A	Paternidade possível	Não computado	Não computado
B	Paternidade possível	Paternidade possível	Corroboram
C	Paternidade possível	Inconclusivo	Inconclusivo
D	Paternidade possível	Paternidade possível	Corroboram
E	Paternidade possível	Exclusão de paternidade	Divergem
F	Paternidade possível	Paternidade possível	Corroboram
G	Exclusão de paternidade	Exclusão de paternidade	Corroboram
H	Exclusão de paternidade	Exclusão de paternidade	Corroboram
I	Exclusão de paternidade	Exclusão de paternidade	Corroboram
J	Paternidade possível	Inconclusivo	Inconclusivo
K	Paternidade possível	Paternidade possível	Corroboram
L	Exclusão de paternidade	Paternidade possível	Divergem

DISCUSSÃO

A tabela 4 apresenta o número de alelos encontrados por Andrade (2014), do qual este trabalho deriva diretamente, comparados aos encontrados neste estudo. Andrade (2014) relatou, no haplobloco DMD, 21 alelos para o locus PR1, 3 para o locus PR4, 4 para PR8, 6 para PR9, 9 para PR10, 12 para o locus PR13 e 7 para PR14. Neste trabalho, porém, o número de alelos encontrados foi um pouco diferente: 18 alelos para o locus PR1, 3 para os locus PR4 e PR8 cada, 5 para PR9, 7 para PR10 e 6 para os locus PR13 e PR14 cada.

Andrade (2014) também encontrou, para o haplobloco PC, 10 alelos no locus PC1, 8 para PC2, 4 para PC3, 10 para PC4, 11 para PC5 e 12 para PC6, em contraste com os nossos números: 7 alelos para os locus PC1 e PC4, 6 para PC2 e PC6, 2 para PC3 e 9 para PC5.

É possível observar que neste trabalho o número de alelos encontrados para todos os locus foi menor, o que provavelmente deve-se ao fato de que Andrade (2014) trabalhou com um número amostral muito maior, englobando populações urbanas diferentes, como ameríndias e de outros estados, enquanto este estudo analisou populações em sua maioria da cidade de Ribeirão Preto (SP) e região, sendo todas do Estado de São Paulo. Outro motivo para o baixo número de alelos seria o fato de que muitas amostras pertencentes ao mesmo núcleo familiar possuem graus de parentesco entre si, apresentando, portanto, baixa diversidade alélica, e compartilhando os mesmos alelos para alguns locus.

Tabela 4: Número de alelos encontrados por Andrade (2014) e neste estudo para cada locus dos dois haploblocos estudados neste projeto (DMD e PC).

Autor	DMD							PC					
	PR1	PR4	PR8	PR9	PR10	PR13	PR14	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
Andrade (2014)	21	3	4	6	9	12	7	10	8	4	10	11	12
Presente estudo	18	3	3	5	7	6	6	7	6	2	7	9	6

Os locus aqui analisados, apesar de já descritos por Andrade (2014) e Sarlo (2011), ainda têm muitos aspectos a serem estudados para sua aplicação em casos de investigação de parentesco ou em casos forenses. A taxa de mutação e a certeza de segregação de acordo com as leis mendelianas da herança biológica são alguns desses aspectos.

Neste trabalho, em muitos casos, foram encontrados fenótipos incompatíveis com o parentesco alegado previamente. Repetições seriam necessárias para se confirmar as razões para tais incongruências.

O número de indivíduos geneticamente independentes que compõem a amostra aqui analisado é muito pequeno, mas permitiu estimar com razoável precisão as frequências alélicas que se demonstraram semelhantes às aquelas descritas por Andrade (2014). Como a descrição destes loci é muito recente, não há comparação possível com dados da literatura.

Há muitos outros loci de X, do tipo STR descritos, inclusive, um conjunto de 12 loci que forma um kit sob nome Argus (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). A grande diferença, que poderá ser explorada, é que tal conjunto de alelos forma grupos de haplótipos com alta taxa de recombinação (Elakkary 2014), enquanto que os dois blocos aqui analisados são formados por loci muito estreitamente ligados, o que permite a determinação de haplótipos com mais segurança. Entre os dois blocos, a distância é razoavelmente grande e a ocorrência de recombinação entre os blocos é bastante possível, tal como provavelmente ocorreu nos heredogramas A e D.

Não há ainda *softwares* que calculem índices de parentesco a partir de marcadores ligados ao cromossomo X. Na verdade, existem programas que fazem análises apenas parciais.

Como dificuldade a ser relatada, observou-se que a classificação fenotípica destes sistemas ainda se recente de metodologia completamente padronizada, principalmente no que se refere a um painel de referência para todos, ou pelo menos a maior parte, os alelos possíveis para cada sistema. Muitos resultados incompatíveis com o parentesco alegado tiveram que passar por várias tentativas de determinação.

CONCLUSÃO

Ainda é necessário aprimoramento da técnica de determinação destes marcadores e dos padrões de referência. Apesar disso, os dados até agora obtidos demonstram que esses loci X-STRs atenderão ao objetivo de tornar mais precisa a estimativa de probabilidades de parentesco em casos de investigação da paternidade de filhas em que o suposto pai está ausente, podendo também trazer informações adicionais à análise de marcadores autossômicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade CCF. Estrutura genética e Desequilíbrio de Ligação em Africanos, Ameríndios e Remanescentes de Quilombos Brasileiros estimados por novos STRs-X [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2014.
- Butler, JM. Forensic DNA Typing, 2nd ed. New York: Elsevier Academic Press; 2005.
- Elakkary S, Hoffmeister-Ullerich S, Shculze C, Seif E, Sheta A, Hering S, Edelmann J, Augustin C. Genetic polymorphisms of twelve X-STRs of the investigator Argus X-12 kit and additional six X-STR centromere region loci in an Egyptian population sample. Forensic Sci. Int. 2014, 11: 26-30.
- Gomes I, Prinz, M, Pereira R, Meyers C, Mikulavasovich RS, Amorim, A, et al. Genetic analysis of three US population groups using a X-chromosomal STR decaplex. Int J Legal Med. 2007, 121: 198-203.
- Goodwin W, Linacre A, Hadi S. An Introduction to Forensic Genetics. Chichester (EN): John Wiley & Sons Ltd; 2007.
- Higuchi, R. (1989). Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich, H.A., (Ed) PCR technology – principles and aplications for DNA amplification, pp. 36 New York: Stockton, Press.
- Machado FB, Duarte LP, Medina-Acosta E. Improved criterion-referenced assessment in indirect tracking of haemophilia A using a 0.23 cM-resolution dense polymorphic marker set. Haemophilia, 15, 1135-1142, 2009.
- Orr HT, Chung M, Banfi S, Kwiatkowski TJ-J, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LPW, Zoghbi HY. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. Nat Genet. 1993, 4: 221-226.
- Ross MT, Grafhan DV, Coffey AJ, Scherer S, Mclay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. Nature Publishing Group. 2005, 434: 325-7.
- Sarlo, GL. Desenvolvimento de marcadores de microssatélites para o rastreo indireto de portadores de mutações no gene DMD causadoras das distrofias musculares de Duchenne e Becker. 2011. Monografia de Conclusão de Curso Ciências Biológicas (ênfase em Biotecnologia), UENF, RJ.

- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72: 971-983.
- Turrina S, Atzei R, De Leo D. Polymorphism of four X-chromosomal STRs: DXS7423, DXS7424, DXS8378 and DXS6809 in a North Italian population sample and their use in kinship testing. *Forensic Sci. Int.* 2007, 168: 241-3.
- Wiesel CEV. Frequências e Segregação Alélicas dos loci SCA1 (Ataxia Espinocerebelar Tipo 1) e MJD (Doença de Machado-Joseph) em indivíduos normais [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1999.

ANEXO. PROTOCOLOS PARA ANÁLISE LABORATORIAL

PROTOCOLO 1 – EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Reagentes e soluções

Detergente Nonidet (polyhethoxyethanol).

Triton X.

Tween 20.

Tampão de Lise de Eritrócitos: Tris/HCl 0,01 M pH 7,6; sacarose 0,32 M; MgCl 5,0 mM; e Triton X-100 1%.

Tampão de lise de leucócitos: Tris/HCl 0,01 M pH 8,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; NP-40 0,45%; Tween 20-0,45%.

Proteinase K (10 mg/mL).

Procedimentos

A extração de DNA para as amostras de sangue foi realizada seguindo uma adaptação ao método de HIGUCHI (1989).

Colocar aproximadamente 1,0 µL de sangue total em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL (tipo *ependorf*), por meio de uma micropipeta e ponteiros estéreis.

- Em seguida, adicionar 1,0 mL de tampão de lise de eritrócitos a cada microtubo.
- Homogeneizar a mistura e centrifugue o conteúdo dos microtubos a 6000 giros por 2 minutos.
- Retirar o sobrenadante.

O procedimento todo deve ser repetido até que o precipitado apresente cor branca (3-4 repetições), indicando a presença de glóbulos brancos (leucócitos) e a ausência de hemácias.

Ao adquirir aparência branca, retirar o sobrenadante e suspenda o precipitado em 300 µL de tampão de lise de leucócitos, adicionando-se 5 µL de Proteinase K em cada microtubo.

Terminadas estas etapas da extração, colocar as amostras em uma estufa a 65°C por um período de 1 hora e, em seguida, em uma estufa a 37°C por um período de aproximadamente 12 horas.

Por fim, submeter as amostras a um passo de desnaturação da Proteinase K (94°C por 10 min) e então armazená-las em um refrigerador com temperatura aproximada de -20°C.

Para a extração de *swab* bucal, após homogeneização do tubo *VacuTainer*, colocar aproximadamente 700 µL da amostra em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL (tipo *eppendorf*), utilizando-se uma micropipeta e ponteiras estéreis.

- Em seguida, adicionar 700 µL de tampão de lise de eritrócitos a cada microtubo.
- Homogeneizar a mistura e centrifugue o conteúdo dos microtubos a 6000 giros por 2 minutos.
- Retirar o sobrenadante e suspender o precipitado em 300 µL de tampão de lise de leucócitos, adicionando-se 5 µL de Proteinase K em cada microtubo.

Os passos seguintes são realizados como na extração de sangue.

PROTOCOLO 2 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Reagentes e soluções

Tampão de reação 10X livre de $MgCl_2$: Tris/HCl 75 mM pH 9,0; KCl 50 mM; $(NH_4)_2SO_4$ 20 mM (BIOTOOLS-B&M Labs, SA).

$MgCl_2$: 50mM (BIOTOOLS-B&M Labs, SA).

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

dNTP: 20 mM (BIOTOOLS-B&M Labs, SA).

DNA polymerase (Taq): 5 U/ μ L (BIOTOOLS-B&M Labs, SA).

Água destilada ultrafiltrada (MilliQ - Millipore Corporation).

Procedimento

Ensaio de PCR convencional com volume final de 25 μ L:

- Misturar os reagentes acima em quantidades específicas: 2,5 μ L de tampão de reação; 1 μ L de $MgCl_2$; 0,25 μ L de dNTP; 1,5 μ L de *primer*; 0,1 μ L de Taq.

As quantidades de *primer* e Taq podem ser variáveis para cada locus.

- Acrescentar água destilada para completar o volume final de 21 μ L para o mix de reagentes.

Em microtubos de 0,5 mL (ou 0,2 mL quando em placa de 96 poços):

- Pipetar 4 μ L de DNA genômico, já extraído das amostras, em seu respectivo microtubo;
- Pipetar 4 μ L de água destilada em um microtubo como controle negativo de amplificação;
- Acrescentar em cada microtubo os 21 μ L do mix de reagentes.

Cada reação deve ter um controle negativo.

PROTOCOLO 3 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 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).

Formamida

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

Tampão de amostra (*Loading Buffer*): 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). Misturar tudo até a dissolução completa da sacarose.

Tampão da amostra desnaturante: 300 µL de tampão de amostra; 900 µL formamida.

Mix para Gel desnaturante 10%: 9,6 g uréia, 9,742 mL de H₂O; 6,667 mL solução de bisacrilamida; 2 mL TBE (10x); 22 µL TEMED; 200 µL solução de persulfato de potássio.

Procedimento

Montagem do cassete de vidro:

- Colocar, entre duas placas de vidro (tamanho 22,0 x 17,0 cm) próprias para eletroforese, dois espaçadores de *teflon* em cada borda lateral;

- Prender o conjunto com grampos nas bordas laterais;

Preparação do gel:

- Misturar 20 mL do mix para gel mais 22 μ L de TEMED e 300 μ L de persulfato de potássio (catalisadores da polimerização);
- Imediatamente depois, colocar cuidadosamente a mistura no cassete de vidro montado;
- Encaixar um pente de *teflon* no limite superior do cassete com o gel ainda não polimerizado para que sejam formados os poços, onde serão aplicadas as amostras do DNA amplificado.

O pente deve ser colocado o mais rápido possível evitando que posteriormente fiquem resquícios de gel polimerizado nos poços.

A polimerização do gel ocorre em aproximadamente 20 minutos.

- Remover o pente e os grampos cuidadosamente e lavar os poços com água sem desmontar o cassete.

A água acumulada nos poços pode ser removida vertendo-se repetidamente o cassete com os poços para baixo, de maneira cuidadosa.

Eletroforese:

- Posicionar o cassete com o gel na cuba de eletroforese vertical, contendo tampão de corrida (TBE 1X) em ambos os polos (superior e inferior), de maneira que os poços se encham com o tampão;
- Conectar a cuba a uma fonte de voltagem constante.

Por segurança, é recomendado fazer uma pré-corrida ligando-se a fonte antes da aplicação das amostras para checar o correto funcionamento do aparato.

- As amostras devem ser pré aquecidas por 10 minutos a 94°C para desnaturar a dupla fita de DNA.
- Pipetar em cada poço um mix de 6 μ L da amostra de DNA amplificado e aproximadamente 7 μ L de tampão formamida.

É recomendado que se coloque um poço com uma amostra já sequenciada (conhecida) ao lado de cada locus analisado num mesmo gel para posterior comparação.

- Após aplicação das amostras, iniciar a eletroforese ligando a fonte na voltagem padronizada.

A duração da corrida eletroforética é baseada no tamanho das bandas e sua posição desejada no gel.

PROTOCOLO 4 – COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA

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 3 mL de formaldeído (PM = 30,05) para cada 100 mL de solução reveladora utilizada (6 em 200 mL).

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

Procedimento

- Retirar os espaçadores do cassete e separar as placas de vidro, cuidadosamente com ajuda de uma espátula, para remoção do gel;
- Mergulhar o gel em recipiente contendo 100 mL de solução fixadora;
- Logo após, acrescentar 6 mL da solução de nitrato de prata;
- Manter o gel em agitação nessa solução por 5 minutos para uma impregnação uniforme da prata;
- Descartar a solução anterior e adicione 200 mL de água destilada a 60°C para lavagem do gel;
- Descartar a água com resquícios de nitrato de prata e adicione 200 mL da solução reveladora levemente aquecida;
- Acrescentar de maneira uniforme 3 mL de formaldeído.

O recipiente deve ser agitado por alguns minutos até que as bandas estejam nítidas.

Após descarte da solução reveladora, a reação de revelação é bloqueada com um pouco de solução fixadora.

A secagem é feita forrando-se uma placa de vidro com papel celofane umedecido.

- Sobre a placa forrada, colocar o gel e, por cima, outra folha de papel celofane umedecido, evitando-se que haja bolhas de ar entre as folhas de papel e o gel.

Em condição ambiente, o conjunto de celofane e gel resseca completamente em um ou dois dias e o gel poderá ser identificado e conservado em coleção para registro dos resultados e para consultas posteriores.