



Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Genética

Estimativa da taxa de mutação de marcadores STRs do cromossomo Y em uma amostra da população brasileira e sua importância no processo de identificação humana

Goiânia-GO

Março, 2015



Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Genética

Estimativa da taxa de mutação de marcadores STRs do cromossomo Y em uma amostra da população brasileira e sua importância no processo de identificação humana

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientando: **Isabella Lacerda Fernandes**

Orientador: Dr. Cláudio Carlos da Silva

Co-orientadora: Dra. Thaís Cidália Vieira

Goiânia-GO

Março, 2015

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

F363e Fernandes, Isabella Lacerda.
Estimativa da taxa de mutação de marcadores STRs do cromossomo Y em uma amostra da população brasileira e sua importância no processo de identificação humana [manuscrito] / Isabella Lacerda Fernandes – Goiânia, 2015.
67 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética.

“Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva”.
Bibliografia.

1. Cromossomos. 2. Hereditariedade. 3. Mutação (Biologia). I. Título.

CDU 575.1(043)

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

ATA DA SESSÃO DE APRESENTAÇÃO E DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE
CONCLUSÃO DE CURSO DE MESTRADO

1 No dia 31 de março de 2015, reuniu-se a 105ª Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado,
2 composta pelos membros: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás, Profa. Dra Thais Cidália
3 Vieira Gigonzac-Co-Orientadora/UEG, Profa. Dra Kátia Karina Verolli de O. Moura/PUC Goiás; Profa.
4 Dra Jaqueline Gleice Aparecida Freitas/UEG, para avaliação da dissertação intitulada “**Estimativa da**
5 **taxa de mutação de marcadores STRs do cromossomo Y em uma amostra da população brasileira**
6 **e sua importância no processo de identificação humana..**”, da candidata **Isabella Lacerda**
7 **Fernandes**, aluna do Mestrado em Genética (MGene) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. A
8 sessão iniciou-se às 14..h..00...min., na Sala de Defesa de Teses, da área IV, sob a presidência do Prof.
9 Dr. Cláudio Carlos da Silva, que concedeu 30 minutos à candidata para expor sinteticamente o estudo. A
10 seguir, a arguição procedeu-se de forma interativa. Ao final da defesa, a sessão foi suspensa e a
11 Comissão se reuniu em separado para avaliação e atribuição de nota. Discutido o trabalho e o
12 desempenho do mestrando, a Banca Examinadora considerou-a Aprovada com a
13 nota 10,0 (..... dez) equivalente ao conceito “...A...”. Portanto, a discente
14 foi declarada **Mestre em Genética pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás**, pelo Presidente da
15 Banca Examinadora, que encerrou a sessão às 16..h..00...min. Não havendo nada mais a tratar, a
16 presente ata foi lavrada e assinada pelos membros da Banca Examinadora.
17 Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás Cláudio Carlos da Silva
18 Profa. Dra Thais Cidália Vieira Gigonzac-Co-Orientadora/UEG Thais Cidália
19 Profa. Dra Kátia Karina Verolli de O. Moura/PUC Goiás Kátia Karina Verolli de O. Moura
20 Profa. Dra Jaqueline Gleice Aparecida Freitas/UEG Jaqueline Gleice A. Freitas
21 Esta ata contém 21 linhas contínuas, sem rasuras, emendas ou retificação.



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • propei@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 105/2015

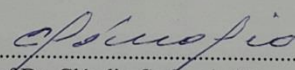
MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

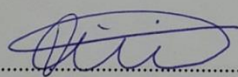
DISCENTE: ISABELLA LACERDA FERNANDES

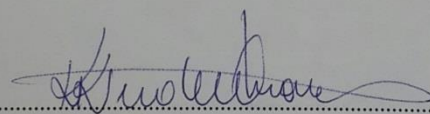
DEFENDIDA EM 31 DE MARÇO DE 2015 E Aprovada COM CONCEITO A

O título foi alterado () não () sim _____

BANCA EXAMINADORA


.....
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva
(presidente-orientador)


.....
Profa. Dra. Thais Cidália Vieira Gigonzac / UEG
Co-Orientadora


.....
Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de O Moura / PUC Goiás
(membro interno)


.....
Profa. Dra. Jaqueline Gleice Aparécida Freitas / UEG
(membro externo)

*“O segredo da vida não é ter tudo o que você quer, mas AMAR tudo o que
você TEM! ”*

George Carlin

Dedico este trabalho ...

À minha mãe, eterna e melhor mãe, ao meu pai e irmão.

Amo vocês!

“O segredo da saúde, mental e corporal, está em não se lamentar pelo passado, não se preocupar com o futuro, nem se adiantar aos problemas, mas, viver sabiamente e seriamente o presente”

Buda

Agradecimentos...

Agradeço...

Imensamente à todos aqueles que de alguma forma contribuíram para conclusão deste trabalho.

Primeiramente a minha mãe, Sueli, que por toda vida me apoiou em todas decisões e acreditou em cada passo dado ao longo desses seis anos e meio de formação. Me deu todo amor, carinho, colo e atenção maternal insubstituíveis. Sou eternamente grata e honrada por ser sua filha. Essa vitória também é sua!

Ao meu pai e irmão pelo apoio em toda minha vida.

Ao meu Orientador, Professor Dr. Cláudio Carlos da Silva, que com sua incomparável simpatia e carisma fraternal me acolheu de braços abertos, proporcionando a realização deste trabalho.

A minha Co-orientadora, Professora Dr^a. Thaís Cidália Vieira, por toda dedicação, ajuda, carinho, dicas, correções e atenção ao longo deste trabalho.

Ao Professor Dr. Aparecido Divino da Cruz, Phd, do fundo do meu coração, que foi minha luz no fim do túnel, depositando sua confiança em meus braços e acreditando que eu conseguiria. Muito obrigada pelo seu exemplo, pelo seu apoio e seus ensinamentos.

Ao meu amigo MSc. Ricardo Goulart Rodovalho e a equipe do Laboratório Biocroma, pela confiança de me proporcionarem uma oportunidade de estágio que aprimorou meus conhecimentos na área. Por todos os momentos de dúvidas que foram esclarecidas de maneira clara e receptiva. Por todos conselhos e ensinamentos. E principalmente por todos os dados e análises concedidas com muito carinho e paciência para realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Núcleo de Pesquisa Replicon, por todo apoio, amizade, companheirismo, risadas e aprendizados que foram compartilhados ao longo desses dois

anos. Vocês são muito especiais!

À Professora Dr^a. Daniela de Melo e Silva e toda equipe da Universidade Federal de Goiás, por me receber sempre com alegria e quando foi necessário me acolheram com muito carinho.

À Pontifícia Universidade Católica de Goiás, por toda estrutura e corpo docente.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

Aos meus familiares, tios e amigos que acreditaram na minha vitória.

E sempre, a Nossa Senhora Aparecida, que abençoa e protege todos os meus dias e da minha família.

Muito obrigada!

“A felicidade não é algo pronto. Ela é feita de suas próprias ações.”

Dalai Lama

LISTA DE ABREVIATURAS

CAAE	Cadastro de Apresentação para Avaliação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CODIS	<i>Combined DNA Index System</i> Sistema Combinado de Índices de DNA
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FBI	<i>Federal Bureau of Investigation</i> Agência Federal de Investigação
GO	Estado de Goiás - Brasil
IAM	<i>Infinite Allele Model</i> Modelo de alelo infinito
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISFG	<i>International Society for Forensic Genetics</i> Sociedade Internacional de Genética Forense
Lagene	Laboratório de Citogenética e Genética Molecular Humana da Secretaria da Saúde do Estado de Goiás
Mb	Mega bases
mt-DNA	DNA mitocondrial
µm	Micrômetro
MSY	<i>Male-Specific Region of the Y chromosome</i> Região Masculino-específica do Cromossomo Y

NPR	Núcleo de Pesquisa Replicon
NRY	<i>Non Recombining Region of the Y Chromosome</i> Região Não Recombinante do Cromossomo Y
PAR 1	<i>Pseudoautosomal Region 1</i> Região Pseudoautossômica 1
PAR 2	<i>Pseudoautosomal Region 2</i> Região Pseudoautossômica 2
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> Reação em cadeia da polimerase
PUC	Pontifícia Universidade Católica de Goiás
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
SMM	<i>Step-wise mutation model</i> Modelo de mutação por passo
STR	<i>Short tandem repeat</i> Curta repetição em tandem - microssatélite
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
V/cm	Volt por centímetro
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i> Número variável de repetições em tandem
Y-STR	Microssatélite do cromossomo Y
YHRD	<i>Haplotype frequency estimate of Y-STR</i> Estimativa da frequência de haplótipos de microssatélites do cromossomo Y (yhrd.org)

Lista de Tabelas e Gráficos

Tabela 1. Nomenclatura de microssatélites de regiões codificantes	26
Tabela 2. Tipos de mutações gênicas	31
Tabela 3. Relação de autores e suas publicações de mutações no cromossomo	39
Tabela 4. Lista de 23 marcadores Y-STRs com seu número de repetições e estrutura repetitiva	44
Tabela 5. 15 mutações observadas em 80 pares de amostras de pai/filho em 23 Y STRs analisados	47
Tabela 6. Comparação entre a taxa de mutação analisada neste estudo com a taxa de mutação combinada de YHRD	48
Gráfico 1. Relação de marcadores STRs do cromossomo Y e suas respectivas mutações identificadas em uma amostra da população brasileira com o sistema de amplificação <i>PowerPlex® Y23 System (Promega Corporation)</i>	49
Gráfico 2. Relação da porcentagem de análises de STRs do cromossomo Y distribuídos nas regiões Brasileiras	51

Lista de Figuras

Figura 1. 13 <i>loci</i> STRs e suas localizações cromossômicas, determinados pelo CODIS como padrão para análise de vínculo genético	26
Figura 2. Posição dos Y STRs ao longo do cromossomo Y	29
Figura 3. Estado atual do Banco de Dados de haplótipos Y da população brasileira	30
Figura 4. <i>Infinite Allele Model</i>	32
Figura 5. <i>Step-wise Mutation Model</i>	33
Figura 6. Mecanismo de DNA <i>slippage</i> no STR	34
Figura 7. Sistema de amplificação <i>PowerPlex® Y23 System</i> - Promega	44
Figura 8. Eletroferograma representativo da amostra 15 Y com mutação no DYS576	48

Índice Analítico

Agradecimentos	ix
Lista de abreviaturas	xii
Lista de tabelas	xiv
Lista de figuras	xv
Resumo	xviii
Abstract	xix
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Identidade e Identificação	20
1.2 Evolução dos principais métodos de identificação humana	20
1.3 Identificação Humana pelo DNA	22
1.4 Marcadores polimórficos do DNA	23
1.4.1 Marcadores minissatélites (VNTRs)	24
1.4.2 Marcadores microssatélites (STRs)	24
1.4.3 Marcadores microssatélites do Cromossomo Y (Y-STRs)	28
1.5 Mutação	30
1.5.1 Modelo de mutação nos microssatélites	32
1.5.2 Mecanismos de mutação dos microssatélites	33
1.5.3 Mutação no cromossomo Y	36
1.5.4 Importância da estimativa de taxa de mutações do cromossomo Y no processo de identificação humana	37
2. OBJETIVOS	40

2.1	Objetivo geral	40
2.2	Objetivos específicos	40
3.	METODOLOGIA	41
3.1	Delineamentos do estudo	41
3.2	Grupo amostral	41
3.3	Amostras biológicas	42
3.4	Extração de DNA e Amplificação por PCR	43
3.5	Genotipagem e Análise dos Fragmentos Amplificados	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.	CONCLUSÕES	52
6.	PERPECTIVAS	53
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8.	ANEXOS	66

RESUMO

Os marcadores microssatélites são sequências curtas, repetitivas, altamente polimórficas e hereditárias presentes no DNA, que seguem o padrão mendeliano de segregação. Devido a sua herança haplotípica tem sido utilizado para rastrear a linhagem paterna por ser passado de geração em geração sem nenhuma alteração, exceto em casos de mutação. O modelo *step-wise mutation* é o mais aceito para mutação nos marcadores microssatélites, admitindo-se que, a cada evento mutacional o comprimento de um microssatélite altera por uma ou poucas unidades de repetição devido ao processo de *slippage*, que ocorre durante a replicação do DNA. Este trabalho teve como objetivo estimar as taxas de mutações dos marcadores microssatélites do cromossomo Y em uma amostra da população brasileira e suas implicações no processo de identificação humana. Trata-se de um estudo molecular, que foi conduzido no Laboratório Biocroma em parceria com o LaGene e Replicon em Goiânia/Goiás. As amostras de estudo foram selecionadas de 80 casos de investigação de paternidade pela análise do DNA, submetidos a análise de mutações nos haplótipos do cromossomo Y com o sistema de amplificação molecular *PowerPlex® Y23 System – Promega Corporation*. Foram identificados 15 registros de mutações germinativas no cromossomo Y entre supostos pais e supostos filhos referentes às amostras analisadas. Os resultados obtidos permitiram identificar 9 mutações de ganho e 6 mutações de perda de números de repetições. O marcador DYS576 apresentou o maior número de mutações registrados (20%), seguido pelo DYS570, que permitiu identificar 2 mutações (13,33%). Os marcadores DYS389 II, DYS391, DYS481, DYS549, DYS438, DYS439, DYS393, DYS458, DYS385 a/b e DYS456 apresentaram apenas 1 (6,66%) registro de mutação cada. Nos demais marcadores, DYS389 I, DYS448, DYS19, DYS533, DYS437, DYS635, DYS390, DYS392, DYS643 e Y-GATA-H4 não foram identificadas mutações nas amostras analisadas neste estudo. Desta forma a identificação das mutações aumenta as ferramentas que são utilizadas nos laboratórios de análise de vínculo genético e que podem garantir um resultado mais confiável minimizando possíveis erros nas análises.

Palavras chave: Cromossomo Y, Hereditariedade, Taxa de mutação, Haplótipo

ABSTRACT

Microsatellite markers are short sequences, repetitive, highly polymorphic and hereditary present in the DNA, which follow the Mendelian pattern of segregation. Due to its haplotype heritage has been used to trace the paternal line to be passed from generation to generation without any changes, except in cases of mutation. The step-wise mutation model is more acceptable to mutation in microsatellite markers, assuming that each mutational event the length of a microsatellite changes by one or a few repeating units due to slippage process, which occurs during replication DNA. This study aimed to estimate the rates of change of microsatellite markers of the Y chromosome in a sample of the population and its implications in human identification process. It is a molecular study, which was conducted at Biocroma Laboratory in partnership with LaGene and Replicon in Goiânia/Goiás. Samples of study were selected from 80 cases of investigation of paternity by DNA analysis, undergo mutation analysis in the Y chromosome haplotypes with molecular amplification system PowerPlex® Y23 System - Promega Corporation. Were identified 15 records of germline mutations in the Y chromosome between alleged parents and children related to suspected samples. The results have identified 9 mutations gain and 6 mutations loss of repetitions numbers. The DYS576 marker had the highest number of reported mutations (20%), followed by DYS570, which identified two mutations (13.33%). The markers DYS389 II, DYS391, DYS481, DYS549, DYS438, DYS439, DYS393, DYS458, DYS385 a / b DYS456 showed only 1 (6.66%) mutation record each. In the other markers, DYS389 I, DYS448, DYS19, DYS533, DYS437, DYS635, DYS390, DYS392, DYS643 and Y-GATA-H4 mutations were not identified in the samples analyzed in this study. Thus the identification of mutations increases the tools that are used in genetic analysis link laboratories and can deliver a more reliable result minimizing potential errors in the analyzes.

Keywords: Y chromosome, Heredity, Mutation rate, Haplotype

1. INTRODUÇÃO

1.1 Identidade e Identificação

A identidade pode ser considerada como a soma de caracteres próprios que individualizam uma pessoa diferenciando-a das demais da população. Por outro lado, a identificação é o meio imprescindível nos âmbitos social e jurídico pelo qual se determina a identidade (Siegle, Knupfer e Suukko, 2000). A identificação pode ser conclusiva ou inconclusiva. As conclusivas mais utilizadas são as impressões papiloscópicas, arcada dentária e marcadores microssatélites do DNA. Dentre as que não são conclusivas, pode-se incluir a tipagem sanguínea, atualmente pouco utilizada, marcas e tatuagens no corpo (Espíndula, 2006).

Os testes de identificação humana podem ser utilizados em uma variedade de contextos como análise de vínculo genético através do DNA, investigação de casos forenses, teste de paternidade, investigação de pessoas desaparecidas, identificação de vítimas em desastre de massa e reconstruções de perfis genéticos. Logo, o objetivo final, consiste na obtenção e a confirmação de vínculo entre duas pessoas ou de um material biológico e uma pessoa. Porém cada caso de identificação possui sua avaliação específica, podendo ter uma abordagem técnica, uma interpretação estatística e questões éticas distintas (Zietkiewicz, 2011).

Uma identificação técnica deve ser realizada seguindo alguns princípios biológicos e técnicos básicos, imprescindíveis em um processo de identificação. Os princípios biológicos requerem unicidade (a característica analisada deve ser única e distinta em um indivíduo), imutabilidade (não se alterar significativamente) e perenidade (se tornar eternas resistindo à ação do tempo). Os princípios técnicos estabelecem praticabilidade (elementos de obtenção e registro fáceis) e classificabilidade (classificação adequada e de fácil acesso) (França, 2004).

1.2 Evolução dos principais métodos de identificação humana

Ao longo da história da humanidade, diferentes métodos de identificação

humana foram propostos. Em 1883, Alphonse Bertillon criou o sistema antropométrico o qual é considerado o primeiro método científico de identificação humana. Este sistema analisava três caracteres: o antropométrico, o somastocópico (descritivo) e a análise de sinais particulares do indivíduo. O criminologista francês observava esses caracteres para construir um sistema que pudesse classificar e individualizar os indivíduos. Bertillon em 1885, teve seu sistema de identificação reconhecido pelo Congresso Internacional de Antropologia Criminal em Roma e denominado de “Bertillonagem” (Garrido, 2009)

Ao passar do tempo, Juan Vucetich verificou deficiência e insegurança na metodologia de Bertillon, e acrescentou no sistema, a análise das impressões digitais. Em 1896, o sistema de Bertillon foi definitivamente substituído pelo sistema papiloscópico estipulado por Vucetich (NLM). A obra “*Dactiloscopia Comparada*” (1904) de Vucetich provou cientificamente a eficiência e a confiabilidade de seu método celebrado com o reconhecimento internacional na época (UFCG).

Oscar Amoedo, foi pioneiro e criador da Odontologia Legal, publicando seu primeiro livro “*A odontologia forense*” em 1898 (Amoedo, 1898). Desde então, a odontologia forense passou a desempenhar um papel importante na identificação de indivíduos que não podem ser identificados visualmente ou por outros meios, isto é, as necessidades de recorrer aos estudos das características dentárias aumentam com o grau de destruição dos tecidos moles de um indivíduo (Gupta et al., 2014). Segundo Vanrell (2002), os dentes resistem a ação do calor em casos de carbonização, desde que a vítima esteja com a boca e os lábios fechados.

A identificação odontológica é confiável, objetiva, rápida e frequentemente eficaz. A identificação pela arcada dentária é muito utilizado na rotina técnica de identificação humana, já que quando comparado a identificação através do DNA, torna-se mais vantajoso por sua praticidade, confiabilidade e custo acessível (Perrier, 1998; Silva e Beaini, 2014). Porém, foi com a descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953, que a prática de identificação humana se tornou mais usual, mesmo sendo dispendiosa, já que nem todos os indivíduos possuem registros odontológicos.

A história da molécula de DNA começou em 1865, onde Gregor Mendel, um monge austríaco, através de uma pesquisa inovadora, descobriu as leis da

hereditariedade com o uso de ervilhas no jardim do monastério (Mendel, 1866; Snustad e Simmons, 2008). Porém, o DNA só foi isolado primeiramente em 1869 por Friedrich Miescher. Depois de vários experimentos, Friedrich Miescher notou que uma substância que não era uma proteína, precipitava na solução quando um ácido era adicionado e se dissolvia quando uma solução alcalina estava presente (Miecher, 1869; Miecher, 1871). Ao decorrer dos anos, poucos cientistas que se interessaram pelo assunto descobriram ainda que, o DNA era composto de quatro bases e um açúcar, que fazia parte de um cromossomo e que era portador de informações genéticas (Dahm, 2005). Após 84 anos do primeiro contato com a molécula, a estrutura do DNA foi descoberta e descrita por Watson e Crick, o que revolucionou expressivamente os estudos na genética moderna (Watson e Crick, 1953).

1.3 Identificação Humana pelo DNA

O ácido desoxirribonucleico, ou DNA, é formado pelo açúcar desoxirribose, um grupamento fosfato e pelas bases nitrogenadas adenina, citosina, guanina e timina. Watson e Crick em 1953, deduziram que os nucleotídeos são ligados um ao outro, em uma cadeia bifilamentar com uma configuração helicoidal. As ligações são formadas por interações químicas entre o fosfato de um nucleotídeo e o açúcar do outro nucleotídeo. De uma extremidade a outra da cadeia, forma-se uma sequência linear de bases nitrogenadas que possuem atrações químicas específicas formando uma dupla hélice (Watson e Crick, 1953; Snustad e Simmons, 2008). O DNA que compõe os cromossomos humanos (DNA genômico) corresponde a uma sequência de aproximadamente três bilhões de bases nitrogenadas, encontrado em todas as células do corpo humano (Griffiths et al., 2009). Este DNA possui material genético hereditário capaz de replicar, e os genes, depositários das informações genéticas, são responsáveis pelas atividades da célula (Wiemann et al., 2001). Os dados codificados pelo DNA em si, é passada de geração em geração como um meio de informação genética de um indivíduo (Butler, 2005).

O genoma humano possui a propriedade de ter longas cadeias polinucleotídicas resultando na possibilidade de surgirem variações ou mutações na sua sequência, que possivelmente, podem não afetar a função do DNA ou das proteínas codificadas por essas sequências. Porém algumas dessas mutações permitem a diferenciação de

indivíduos. Estas mutações resultam em marcadores genéticos, que podem ser qualquer sítio no genoma onde há pequenas alterações nas sequências do DNA humano, que possuem a capacidade de serem detectadas, possuindo um poder discriminatório preciso e eficiente entre indivíduos de uma mesma população (Alberts et al., 1997; Pena, 2005).

1.4 Marcadores polimórficos do DNA

Em uma determinada espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em alguns locais específicos do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se esta variação for encontrada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo. Polimorfismos podem atuar como marcadores moleculares na identificação humana, pois são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles (*linkage*) (Balasubramanian, 2004).

Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA. São herdados geneticamente e podem ser qualquer sítio no genoma onde há possibilidade de detectar alterações nas sequências do DNA (Alberts et al., 1997; Ferreira e Grattapaglia, 1998). Portanto, a validação de vários marcadores polimórficos de DNA proporcionou uma nova dimensão aos estudos de variabilidade genética em nível molecular, sendo amplamente utilizados com diversos propósitos e aplicados inclusive na identificação individual e em estudos populacionais (Soares-Vieira, 2008; Carracedo et al., 2010; Pinto et al., 2013).

O genoma dos eucariotos está cheio de sequências de DNA repetitivas. Estas sequências repetitivas possuem todos os tipos de tamanhos e são normalmente designadas pelo comprimento da unidade de repetição e pelo número de unidades de repetição contínuas. Estas regiões são frequentemente referidas como DNA satélite. O termo satélite surgiu devido ao fato de que, durante a 1ª experiência realizada em 1961, algumas frações menores formaram bandas separadas do DNA, por esse motivo foram designadas de satélites em relação à fração maior. Essas frações representavam os VNTRs (*variable number of tandem repeats*) conhecidos também como minissatélites (Britten e Kohne, 1968; Primrose, 1998; Jobling et al., 2004; Butler, 2005).

1.4.1 Marcadores minissatélites (VNTRs)

Os minissatélites são sequências repetitivas em tandem no DNA que variam aproximadamente de motivos com 6 até mais de 50 nucleotídeos (Bunnett, 2000). Nas análises dos VNTRs, Dr. Jeffreys utilizava a técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), onde enzimas de restrições clivam as regiões específicas de VNTRs no DNA (Butler, 2005). Os VNTRs foram usados com sucesso para a análise do DNA por mais de 10 anos. No entanto, as análises de *loci* de VNTR foram decrescendo pois requerem elevadas quantidades de DNA, a metodologia não é tão eficiente para a análise de material degradado e amostras com pouca quantidade de DNA como, por exemplo, amostras biológicas coletadas do meio ambiente (Góes, 2002). Todavia, uma nova metodologia foi desenvolvida por Mullis em 1983 e descrita posteriormente, para o estudo de regiões hipervariáveis do DNA, a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mullis e Faloona, 1987).

1.4.2 Marcadores microssatélites (STRs)

Cerca de 95% da sequência de DNA do genoma humano não codifica informações genéticas e, dessarte, essas regiões ficaram conhecidas como “*junk DNA*” (DNA lixo). Entretanto, nestas regiões estão presentes as sequências repetitivas do DNA. Atualmente atribui-se a estas regiões funções importantes como, investigação em testes de vínculo genético na área forense, teste de paternidade e atuação no controle da expressão gênica (Lima, 2008).

Os microssatélites são sequências compostas por motivos de repetições curtas, hipervariáveis e hereditárias, que seguem o padrão mendeliano de segregação de co-dominância. Variam de 1 a 6 nucleotídeos que se repetem em tandem. Estão presentes dispersos de forma consideravelmente uniforme em cerca de 3% do total do genoma humano (Hancock, 1999; Butler, 2006). Segundo Ellegren (2000), os STRs são encontrados preponderantemente nas regiões não codificantes e apenas em 8% das regiões codificantes.

Os microssatélites podem ser classificados de acordo com a natureza das

sequências repetitivas em, perfeita, imperfeita, interrompida ou composta. O microsatélite perfeito é aquele em que a sequência repetitiva não é interrompida por qualquer base, enquanto em um microsatélite imperfeito existe um par de bases entre os motivos repetidos que não correspondem à sequência do motivo. Em uma sequência repetitiva interrompida, há uma sequência curta entre a sequência repetitiva que não coincide com o motivo, enquanto que em um microsatélite composto, a sequência contém duas sequências de repetições adjacentes e distintas (Cregan et al., 1999; Knapik et al., 1998).

De acordo com o *International Human Genome Sequencing Consortium* (2001), os STRs também podem ser classificados quanto ao número de nucleotídeos que formam o motivo, como mononucleotídeo (AAAA), dinucleotídeo (AGAGAGAG), trinucleotídeo (ACTACTACTACT), tetranucleotídeo (AAGGAAGGAAGGAAGG), pentanucleotídeo (ACTGTACTGTACTGTACTGTACTGT) e hexanucleotídeo (AAATTTAAATTTAAATTTAAATTT).

A Sociedade Internacional de Genética Forense (1997), determinou padrões para denominar os STRs humanos. Na denominação do microsatélite D16S539, a título de exemplo, o “D” significa DNA, o “16” é o cromossomo em que está localizado, o “S” significa STR e “539” refere-se a uma identificação exclusiva. Porém os microsatélites que estão presentes em genes ou íntrons, utiliza-se a região codificante para denominação, como vWA, TPOX e TH01, conforme tabela 1 (Bär et al., 1997; Gill et al., 1997).

As recomendações para nomenclatura do Y-STR seguem exatamente os mesmos princípios dos autossômicos, todavia, em 2005, a ISFG publicou recomendações adicionais. Em casos em que um único par de *primer* amplifica dois *loci*, como por exemplo o DYS385, este marcador deve ser tratado como “*loci* DYS385”, os fragmentos observados como genótipos e os alelos separados por um hífen, como em "DYS385*11-14". Os Y-STRs normalmente possuem somente uma única cópia, porém se houver duplicações de Y-STRs em situações de mutação, os fragmentos observados também devem ser tratados como genótipos e os dois alelos separados por um hífen. Quando dois Y-STRs distintos estão presentes em um mesmo amplicon mas suficientemente afastados um do outro podendo ser analisados com *primers* adicionais que discriminam os dois, o 5' Y-STR deve ser denominado

“DYS#.1” e o segundo como “DYS#.2”. Os alelos devem ser designados de acordo com o número total de repetições incluídas numa simples ou em uma complexa sequência na estrutura do DNA que varia entre os indivíduos (Gusmão et al., 2005).

Tabela 1. Nomenclatura de microssatélites de regiões codificantes

TPOX	íntron 10 do gene humano da tireóide peroxidase
TH01	íntron 10 do gene humano da tirosina hidroxilase
vWA	íntron 40 do gene fator de coagulação von Willebrand

O sistema CODIS (*Combined DNA Index System*) implantado pelo FBI (*Federal Bureau of Investigation*) norte americano, exigiu que sejam utilizados no mínimo 13 *loci* STRs como padrão, na elaboração de perfis genéticos alfanuméricos para armazenamento em banco de dados, que se localizam no “DNA lixo”, os quais não revelam informações fenotípicas (Figura 1) (DNA initiative). Porém, fornecem aos bancos de dados da justiça criminal mundial, informações genéticas de indivíduos que por algum motivo, foram submetidos a investigação de vínculo genético (Forensic; FBI's).

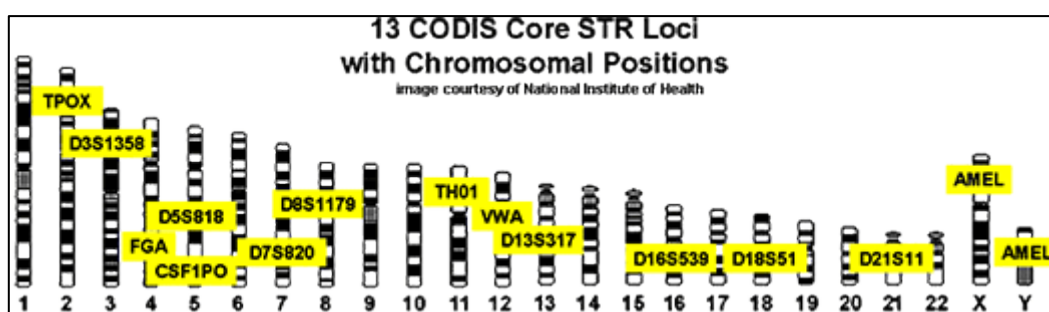


Figura 1. 13 *loci* STRs e suas localizações cromossômicas, determinados pelo CODIS como padrão para análise de vínculo genético.

Fonte: ([http://projects.nfstc.org/otc/module 2/2.2.005.htm](http://projects.nfstc.org/otc/module%202/2.2.005.htm))

O objetivo principal de uma investigação de vínculo genético no âmbito forense é fornecer dados que esclareçam se determinado indivíduo é doador de um vestígio biológico. As possibilidades de resultados da investigação consignam-se em inclusão, quando as amostras biológicas originaram de uma mesma fonte; exclusão, quando as amostras são de origens diferentes; inconclusão, quando não é possível

esclarecer se as amostras provêm ou não do mesmo indivíduo (Inman et al., 2002).

As amostras obtidas passam por um processo de amplificação para análise dos STRs. Essa amplificação é realizada através da PCR. A PCR é uma reação baseada na replicação enzimática *in vitro* de uma sequência específica da molécula de DNA. Uma das fitas da molécula é utilizada como molde para a ação da enzima DNA polimerase (enzima Taq-polimerase proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*) (Mullis e Faloona, 1987).

A DNA polimerase tem a função de revisão, ou seja, é capaz de verificar se os nucleotídeos (ATCG) da fita nova estão corretamente pareados com a fita molde. O mecanismo de revisão da enzima, permite que antes de realizar adição de um novo nucleotídeo, verifica se o último nucleotídeo que foi ligado á fita de DNA “filha” está corretamente pareado com a fita molde. Se o pareamento estiver incorreto, a enzima DNA polimerase desfaz a ligação fosfodiéster e o nucleotídeo mal pareado é retirado da cadeia de DNA em formação. Por conseguinte, essa enzima é capaz de realizar duas atividades bem diferentes: realiza polimerização de nucleotídeos no sentido 5’-3’ e remove no sentido 3’-5’ da fita de DNA os nucleotídeos que foram pareados incorretamente (Snustad e Simmons, 2008).

As cópias da sequência alvo são replicadas de forma exponencial, capaz de amplificar bilhões de vezes rapidamente uma molécula de DNA (Mullis, 1987). São necessárias sequências de *primers* (iniciadores) para que a enzima se ligue e inicie a síntese da nova fita. Esses *primers*, são sequências de DNA em fita simples sintetizadas em laboratório com aproximadamente 18 a 25 bases. Os *primers* possuem a capacidade de complementariedade com os segmentos que flanqueiam a sequência da fita molde que será amplificada e de delimitar esta região a ser amplificada. Na PCR são utilizados dois *primers*, sendo um complementar a fita, o *sense* (*primer* 5’) e outro complementar a fita no sentido reverso, o *primer antisense* (*primer* 3’) (Verlengia, 2013; Farah, 2007).

O material genético é submetido a ciclos de temperatura em um termociclador na presença de primers (oligonucleotídeos complementares a sequência de DNA adjacente àquela que deseja-se estudar), nucleotídeos (timina, citosina, adenina e guanina – dNTP’s) e a enzima DNA polimerase, resultando na amplificação célere e eficaz de milhares de cópias de uma determinada região do DNA (Mullis e Faloona,

1987).

Os dados genotípicos correspondentes aos produtos de PCR, normalmente, são obtidos por eletroforese capilar, que necessita de pequena demanda de amostra e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo, oferecendo muitas vantagens sobre outros meios utilizados como campos eletroforéticos (Tavares, 1997).

Nos testes de paternidade realizados na esfera forense e cível, a análise do DNA é baseada na interpretação de semelhanças ou de divergências nos *loci* de marcadores microssatélites. Testes de paternidade com diferenças encontradas nos *locus* entre o suposto pai e o suposto filho, são atribuídas à exclusão de paternidade (Kayser et al., 2001). Utilizando-se de 13 a 21 *loci* autossômicos polimórficos em um teste de paternidade, se em três ou mais *locus* não houver compatibilidade de alelos entre o suposto filho e o suposto pai, este suposto pai pode ser excluído da possibilidade de ser o pai biológico do suposto filho. Por conseguinte, o compartilhamento de alelos entre o suposto filho e o suposto pai, permite concluir como aceitável a hipótese de paternidade com uma probabilidade igual ou superior a 99,9999% (Fré et al., 2014; ISFG).

Os marcadores microssatélites revolucionaram significativamente as análises de vínculo genético. Tornaram a melhor solução para a investigação por possuírem um alto poder de discriminação e possibilitar uma análise rápida, eficiente e mais simples, ainda que o DNA esteja em pouca quantidade ou degradado (Butler, 2005; Góes, 2002).

A hipervariabilidade dos STRs ocorre devido à alta taxa de mutações nas células da linhagem germinativa presentes nos *loci*, podendo variar de 10^{-2} a 10^{-6} evento por *locus*/geração, comparado a outras regiões do genoma (Goldstein e Schlotterer, 1999). As mutações quando analisadas de forma errada, excluindo um vínculo genético em um ou mais *locus* podem desservir as análises dos resultados obtidos.

1.4.3 Marcadores microssatélites do Cromossomo Y (Y-STRs)

O cromossomo Y é o único cromossomo específico do sexo masculino. É considerado o terceiro menor dos 24 tipos de cromossomos da espécie humana, representando aproximadamente 2% do genoma. Em 19 de Junho de 2003, sua sequência foi publicada pelo Instituto Whitehead e pela Universidade de Washington,

apresentando cerca de 23 Mb de aproximadamente 50 Mb de comprimento, em um cromossomo Y normal. Este cromossomo pode ser utilizado para rastrear a linhagem paterna por ser passado de geração em geração sem nenhuma alteração (exceto quando ocorre algum evento mutacional) por possuir herança haplotípica, isto é, blocos de DNA transmitidos em conjunto para os descendentes. À exceção das regiões pseudoautosômicas, a maior parte do cromossomo Y não participa de recombinação meiótica (Jobling e Tyler-Smith, 2003).

O cromossomo Y é composto por três regiões. Duas regiões pseudoautosômicas (PARS), que possuem a capacidade de recombinar com as regiões homólogas do cromossomo X (Butler, 2005). Estas regiões correspondem a 5% do total do cromossomo, uma localizada na extremidade do braço curto do cromossomo Y (PAR1) e a outra na extremidade do braço longo (PAR2). A terceira região correspondente a 95% é chamada de região não recombinante do cromossomo Y (NRY), onde se localiza os marcadores microssatélites do cromossomo Y (Y-STRs), conforme figura 2 (Rower *et al.*, 2001; Miller, 2001; Góis, 2006; Martins, 2008; Xue *et al.*, 2009; Geystelen *et al.*, 2013). Skaletsky et al. (2003), renomearam a NRY como região específica do sexo masculino (MSY) devido a evidências frequentes de conversão de genes ou recombinação intracromossomal.

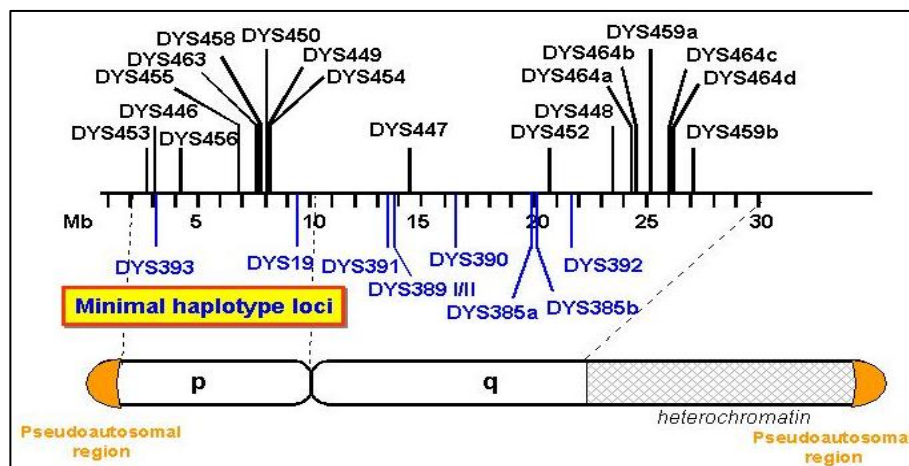


Figura 2. Posição dos Y STRs ao longo do cromossomo Y

Fonte: (<http://www.cstl.nist.gov/strbase/ystrpos1.htm>)

Segundo Peter de Knijff (2003), o banco de dados de haplótipos do cromossomo Y (www.yhrd.org) deve ser analisado de forma qualitativa e não quantitativa, pois este banco de dados pode não proporcionar uma fiel frequência haplotípica da população em geral, figura 3.

O YHRD (*Y-STR Haplotype Reference Database*), estipulou a utilização de um haplótipo mínimo para determinação da frequência de microssatélites do cromossomo Y nos casos de investigação de vínculo genético. O haplótipo mínimo que consiste em um grupo de nove marcadores Y-STRs (DYS19, *DYS389 I*, *DYS389 II*, *DYS390*, *DYS391*, *DYS392*, *DYS393* e *DYS385 a/b*) foi selecionado em 1997, para o uso em investigações forenses (Kayser et al., 1997). Este grupo de haplótipos pode ser acrescentado de outros *loci* Y-STRs (*DYS438*, *DYS439*, *DYS437*, *DYS448*, *DYS456*, *DYS458*, *DYS635*, *Y-GATA-H4*) aumentando o poder de discriminação (Mulero et al., 2006).

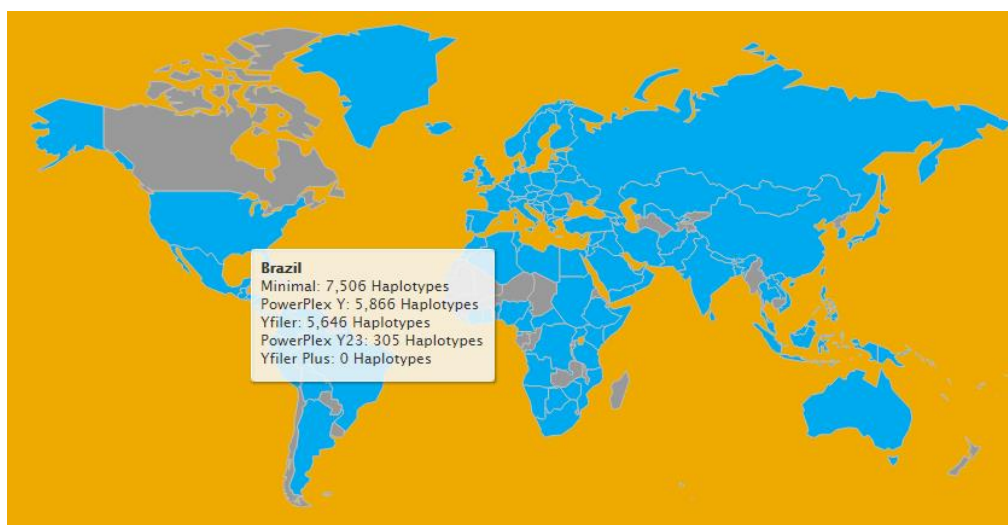


Figura 3. Estado atual do Banco de Dados de haplótipos Y da população brasileira
 Fonte: (<https://yhrd.org/pages/resources/stats#countries> - modificado)

Os marcadores microssatélites do cromossomo Y não são tão eficazes na diferenciação de indivíduos quanto os marcadores autossômicos, no entanto, são marcadores complementares muito importantes na investigação forense e em testes de vínculo genético inconclusivos, como em casos de crimes sexuais e reconstruções (Butler, 2005).

1.5 Mutação

Mutação é qualquer mudança súbita ou herdável permanente, que ocorre no genótipo de uma célula ou organismo, tendo como consequência a principal fonte da variabilidade genética. As mutações ocorrem em todos os seres vivos, sendo crucial para a evolução e diversidade das espécies (Griffiths et al., 2001). Eventos mutacionais

no material genético de um organismo podem incluir alterações em um gene ou em cromossomo, tanto em número quanto na estrutura (Snustad, 2008).

Mutações gênicas são alterações nas sequências de nucleotídeos da molécula de DNA e acontecem devido à mudança de uma ou mais bases nitrogenadas (Tabela 2). As mutações gênicas podem originar por falhas incorporadas durante o processo de replicação do DNA ou por erro no sistema reparo do DNA, resultando em alterações em genes individuais. Em organismos multicelulares, as mutações podem afetar em qualquer estágio do ciclo celular células nucleadas diversas (Watson et al., 2007). As mutações podem afetar tanto as células somáticas quanto as células da linhagem germinativa, que podem ser transmitidas de uma geração a outra (Griffiths et al., 2009).

Segundo Snustad (2008), as mudanças na sequência do DNA podem ocorrer de forma espontânea (causa desconhecida) ou induzida (resultante a exposição à agentes mutagênicos). Alterações nas sequências do DNA ocorrem em todos os seres vivos, sendo fundamentais para a diversidade e evolução das espécies (Griffiths et al., 2001).

Tabela 2. Tipos de mutações gênicas (Watson et al., 2007)

MUTAÇÕES GÊNICAS	TIPOS	FUNÇÕES
ESTRUTURAL	Substituição	Uma base é trocada por outra
	Inserção	Uma ou mais bases são inseridas da sequência original
	Deleção	Uma ou mais base são removidas da sequência original
	<i>Non-sense</i>	Resulta em um códon de parada no término da tradução
FUNCIONAL	<i>Sense</i>	Resulta na substituição de base que não acarreta na mudança de aminoácido
	<i>Missense</i>	Resulta na substituição de aminoácido e altera a função da proteína

Os eventos mutacionais do tipo micro-inserção consiste na adição de um ou mais nucleotídeos na sequência da molécula de DNA, geralmente, é originado por transposons, sequências móveis no DNA, ou incoerências durante a replicação dos microsatélites. Na micro-deleção, verifica-se a remoção de um ou mais nucleotídeos da sequência da molécula de DNA, usualmente não reparáveis. Contudo, teoricamente, a

mesma sequência pode ser reparada pelo mecanismo de inserção. Todavia, os transposons capazes de reverter uma pequena deleção (com uma ou duas bases) em um local são inverossímil, ou até inexistentes (Antonarakis et al., 2010).

Eventos onde ocorrem mutações geram novos alelos, proporcionando uma relação entre o grau de polimorfismo e a taxa de mutação de um *locus* específico, assim quanto maior o grau de mutação, mais variável é o *locus*. Em análises com finalidade forenses, os *locus* mais polimórficos são mais utilizados devido ao elevado poder de discriminação (Kayser et al., 1997).

1.5.1 Modelo de mutação nos microssatélites

A estimativa de eventos mutacionais nos marcadores microssatélites podem ser realizadas por comparação dos genótipos da descendência com o dos pais (Butler, 2005). Dois modelos foram propostos para explicar as mutações nos *loci* microssatélites:

a. *Infinite Allele Model* (IAM)

Em 1964, Kimura e Crow propuseram o modelo de alelo infinito determinando que as mutações que ocorrem nos microssatélites são resultados de perda ou ganho de uma ou mais unidades de repetição, gerando uma nova forma alélica não tendo sido encontrada anteriormente na população. Na formação de alelos idênticos, obrigatoriamente também serão idênticos na descendência (figura 4).

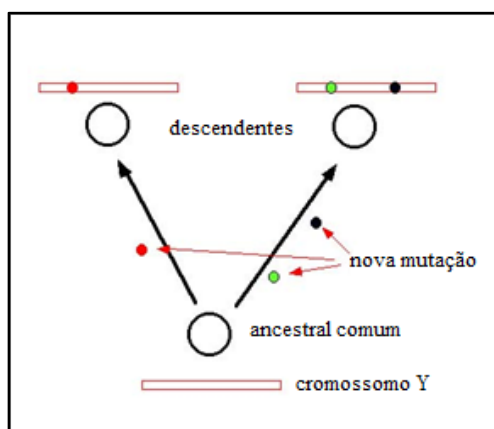


Figura 4. *Infinite Allele Model*

Fonte: (nitro.biosci.arizona.edu/ftdna/models.html#Mutation; Kimura e Crow, 1964 - modificado)

b. *Step-wise Mutation Model (SMM)*

Já em 1978, Kimura e Ohta, desenvolveram o modelo de mutação por passo. Este modelo foi o mais aceito para os microssatélites. Admite-se que, a cada evento mutacional o comprimento de um microssatélite altera por uma ou poucas unidades de repetição (figura 5). As probabilidades de adição ou deleção são iguais e constantes através dos alelos, os quais podem ter tamanhos ilimitados. Assume ainda que, estas mutações podem ocasionar à formação de alelos já existentes na população, idênticos por estado, e não por descendência (Heyer et al., 1997; Gusmão et al., 2005; Decker et al., 2008; Ge et al., 2009; Laouina et al., 2013; Weng et al., 2013; Fré et al., 2014; Pinto et al., 2014; Caliebe et al., 2015).

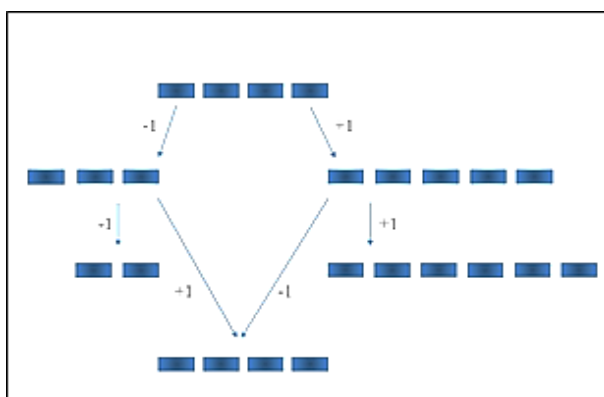


Figura 5. *Step-wise Mutation Model*

1.5.2 Mecanismos de mutação dos microssatélites

Foram descritos dois mecanismos como sendo responsáveis pelas mutações nos microssatélites: *crossing-over* desigual na meiose e *DNA slippage*.

a. *Crossing-over* desigual na meiose

Crossing-over é o processo onde cromossomos homólogos se pareiam na meiose e ocasionalmente trocam suas partes (Griffiths et al., 2001). O mecanismo de *crossing-over* desigual gera grandes blocos de DNA satélite pois está associada a grandes trocas de unidades repetitivas entre os cromossomos homólogos que se parearam erroneamente. (Huang, 2002). Ocorre normalmente, em unidades de repetições em tandem de extensão moderada a longa (Fan e Chu, 2007).

b. DNA *slippage*

O mecanismo de DNA *slippage* proposto por Kornberg e colaboradores em 1964, é o mais bem aceito como padrão para explicar as mutações nos microssatélites com o modelo de mutação *step-wise* (Fan e Chu, 2007).

O processo de *slippage* ocorre durante a replicação do DNA, quando a enzima DNA polimerase avança ou recua durante a replicação em uma região repetitiva, gerando em consequência um pareamento incorreto de uma ou mais unidades de repetições entre a fita molde e a recém sintetizada. Portanto, as fitas do DNA podem se dissociar e reassociar-se incorretamente (Kornberg, 1964; Tachida e Lizuka, 1992). Em seguida, as sequências repetitivas do DNA não pareados formam um “*loop*” no local da incompatibilidade (Jobling, 2004). Se o *loop* formado estiver na fita recém sintetizada terá como resultado a inserção da unidade repetitiva, porém, se estiver na fita molde terá a deleção da unidade repetitiva, conforme figura 6 (Levinson e Gutman, 1987; Schlötterer e Tautz, 1992; Butler, 2005). Entretanto, a taxa de mutação nos microssatélites não é a mesma de *slippage*. O DNA *slippage* ocorre em taxas muito mais elevadas, contudo, o sistema de reparo de mau pareamento tem a capacidade de corrigir as deleções e inserções (Schlötterer e Tautz, 1992; Strand et al., 1993).

Segundo Srand e colaboradores (1993), a maior parte dos *loops* é reconhecido e eliminado pelo sistema de reparo podendo reduzir a taxa de mutação de 100 a 1000 vezes.

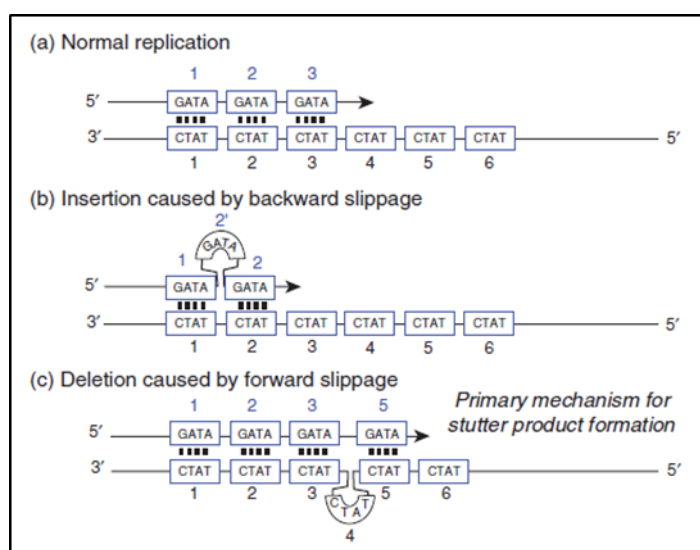


Figura 6. Mecanismo de DNA *slippage* no STR

Fonte: (Butler, 2005)

Em casos em que o sistema de reparo está ausente ou ineficiente são observados altos níveis de instabilidade nos microssatélites. Quando ocorre mutações em alguns genes específicos do mecanismo de reparo, pode-se aumentar a ocorrência de mutações em todo o genoma (Di Rienzo et al., 1994; Debrauwere et al., 1997; Yamada et al., 2002).

Alguns fatores podem influenciar nas taxas de mutações dos STRs, tais como a composição e o comprimento da unidade de repetição, o comprimento da sequência, a idade e o sexo do indivíduo.

Unidades repetitivas compostas com maior número de GC são menos propensas a sofrerem eventos mutacionais, por possuírem uma ligação de ponte de hidrogênio a mais do que o pareamento do tipo AT, à vista disso, são mais estáveis (Pardi et al., 2005).

Os microssatélites dinucleotídeos apresentam taxas de mutações mais elevadas do que os tri- e tetranucleotídeos, segundo estudos realizados *in vitro* (Schlötterer e Tautz, 1992). As unidades repetitivas menores são mais predispostas a sofrerem maiores taxas de mutações (Chakraborty et al., 1997; Kruglyak et al., 1998; Lee et al., 1999).

Os eventos mutacionais em alelos longos e não interrompidos são mais comuns do que em alelos curtos (Primmer et al., 1996; Brinkmann et al., 1998; Huang et al., 2002; Whittaker et al., 2003), pelo fato do mecanismo da DNA *slippage* acontecer em taxas mais elevadas em sequências repetitivas de comprimento mais longo (Ellegren, 2000a; Lai e Sun, 2003). Estudos realizados por Amos et al. (1996), concluíram que indivíduos heterozigotos possuem maior instabilidade nos microssatélites que indivíduos homozigotos, sugerindo que, a heterozigosidade aumenta a mutabilidade do alelo.

Há uma maior taxa de mutação na linhagem germinativa masculina do que na linhagem germinativa feminina (Brinkmann et al., 1998; Henke e Henke 1999; Sajantila et al., 1999; Xu et al., 2000; Dauber et al., 2003; Geadá et al., 2003; Simonsen e Morling, 2004; Tang e Law, 2004; Whittle et al., 2004; Yan et al., 2006). Esta teoria é explicada pelo fato de que há diferenças na gênese das células germinativas de números e tipos de divisões celulares entre os sexos. Nas células germinativas feminina, a oogônia sofre 22 divisões celulares antes da meiose iniciar e os oócitos serem gerados.

Já nas células masculinas, as espermatogônias se renovam rotineiramente por mitose e meiose antes de se tornarem células espermáticas. Concluíram por conseguinte que, quanto maior número de divisões celulares, maior será a probabilidade de mutação (Shimmin *et al.*, 1993; Brinkmann *et al.*, 1998; Ellegren, 2000b). A idade do indivíduo também pode influenciar na frequência de mutação dos microssatélites. Na idade adulta, o número do acúmulo de divisões mitóticas aumenta rapidamente. Em indivíduos com idade de 28 anos as células espermáticas sofrem cerca de 380 mitoses e indivíduos com 35 anos aproximadamente 510 mitoses (Ellegren, 2000b; Fan e Chu, 2007).

1.5.3 Mutação no cromossomo Y

O cromossomo Y possui tipos divergentes de polimorfismos que apresentam taxas de mutações distintas, permitindo assim, apurar o intervalo de tempo da história entre os indivíduos de diferentes populações e o tipo de marcador microssatélite mais apropriado para uma população específica. Eventos mutacionais são maneiras exclusivas de alterações na região Y não-recombinante (NRY) e fonte de toda variabilidade genética presente no cromossomo (Jobling e Tyler-Smith, 1995). Além disso, mutações no cromossomo Y envolvem principalmente inserções ou deleções de uma única unidade de repetição (*one step*), embora inserções sejam mais frequentes do que deleções (Caliebe *et al.*, 2015). Na inexistência de mutação, os marcadores microssatélites do cromossomo Y encontrados em um pai é idêntico em seu filho, sendo transmitida através das gerações pela linhagem patrilínea da mesma forma: sem alteração (Jobling e Tyler-Smith, 1995). Em geral, as mudanças ocorrem nas regiões extragênicas e de íntrons, conhecidas como regiões neutras, isto é, que não conferem caráter adaptativo aos indivíduos e nem expressam características fenotípicas. Em vista disso, a análise das mudanças dentro de regiões Y- STRs específicas pode revelar a genealogia paterna e as relações evolutivas entre diferentes grupos de indivíduos (Hammer, 1995).

A incorporação de marcadores STRs do cromossomo Y é crescente a cada dia na rotina laboratorial de análises de vínculo genético. Da mesma maneira como os haplótipos de mtDNA, os Y-STRs representam as informações genéticas a partir de uma linhagem que não sofre recombinação e que podem ser compartilhados por muitos indivíduos de uma única família. Há um grande número de polimorfismo de Y-STRs

sendo descritos rotineiramente, bem como o número de sistemas de amplificação *multiplex* sendo desenvolvidos. A necessidade de distinção de indivíduos masculinos de uma mesma linhagem paterna está aumentando relativamente devido ao acúmulo de mutações de Y-STRs de geração em geração (Gusmão et al., 2006).

Segundo estudos realizados por Gusmão et al. (2006), com base em uma taxa de mutação média de 2.8×10^{-3} haplótipos incluindo nove Y-STRs do YHRD (*Y-Chromosome STR Haplotype Reference Database*), são esperados ao menos um alelo divergente entre pai e filho em cerca de 1 a 40 pares analisados. A taxa média de mutação para Y-STRs é de aproximadamente 0,2% por geração (Kayser et al., 2000; Dupuy et al., 2004). Por esta razão, a utilização de marcadores microssatélites do cromossomo Y tem aumentado significativamente adequando-se a casos forenses, investigação de vínculo genético e estudo da origem das populações (Jobling, 1995; Jobling, 2000; Ferreira et al., 2006; Geystelen et al., 2013; Wei et al., 2013).

Um dos casos mais famoso que foi solucionado com o auxílio da análise dos *locus* Y-STRs foi a identificação de Sadaam Hussein, presidente do Iraque, que tinha diversos sócias para dificultar sua apreensão. Ao ser preso, em 2003, foi necessário confirmar sua identidade, através da comparação de seu perfil Y-STR com o perfil extraído dos corpos de seus filhos que tinham sido mortos em combate no mesmo ano (Tamaki et al., 2005).

Estimativas de taxas de mutação devem basear-se no número de mutações observadas e no número total de mutações a partir do número total de transmissões de alelos (Gusmão et al., 2006).

1.5.4 Importância da estimativa de taxa de mutações do cromossomo Y no processo de identificação humana

A avaliação de alelos adicionais na investigação forense deve ser levada em consideração em duas importantes circunstâncias. Primeiro, pela possibilidade existente de interpretação errada de uma relação biológica entre dois homens em consequência de mutações no Y-STRs e segundo, pela possibilidade de se diferenciar dois homens proximamente relacionados.

As análises dos dados dos *locus* dos pares de pais e filhos com a paternidade confirmada permite estimar as taxas de mutações de diferentes marcadores do cromossomo Y (Zhivotovsky et al., 2004). Taxas de mutações estudadas e descritas dos marcadores STRs do cromossomo Y são de extrema importância para complementação das análises de vínculos genéticos entre indivíduos do sexo masculino em avaliação estatística dos testes de paternidade e em estudos forenses. Estudos realizados para descrição de bancos de dados de *locus* STRs do cromossomo Y de uma população específica, bem como as estimativas de taxas de mutação para a população na qual os testes realizados são imprescindíveis para uma análise e conclusão correta dos resultados. Esta característica traz a necessidade do estabelecimento de bancos de dados haplotípicos regionais, especialmente nos casos de populações isoladas. Por conseguinte, valores adequados das taxas de mutação poderão ser incluídos nos cálculos do índice de paternidade da população estudada, aumentando assim a confiabilidade dos resultados genéticos e promovendo uma maior segurança na determinação do vínculo genético investigado.

Os bancos de dados são singularmente instáveis para marcadores STRs do cromossomo Y, ainda mais no Brasil, um país com uma complexa história de miscigenação. O esforço enorme para aprimorar e implementar os bancos de dados, torna-se essencial para identificar a diversidade genética real esperada de um país extenso e heterogêneo. Os bancos de dados de caráter relevante são notáveis para identificar claramente as frequências de distribuição haplotípica, alélica e genotípica de populações distintas (Quintana-Murci et al., 2001).

A indução para a criação de um banco de dados de mutações Y-STRs surge com o intuito de enriquecer o conhecimento científico sobre o assunto (Kayser et al., 2001). Pesquisadores, sabendo da importância do estudo, desenvolveram pesquisas com bancos de dados de mutações do cromossomo Y em distintas populações, segundo a tabela 3. No entanto, ainda não existem estudos de estimativa de taxas de mutações do cromossomo Y envolvendo todas as regiões do Brasil, tornando este estudo, o pioneiro nesta análise.

Tabela 3. Relação de autores e suas publicações de mutações no cromossomo Y

AUTOR	POPULAÇÃO ESTUDADA	ANO	REVISTA	ARTIGO
Nicole Nascimento da Fré et al.	Rio Grande do Sul/Brasil	2014	Int J Legal Med	Genetic data and de novo mutation rates in father-son pairs of 23 Y-STR loci in Southern Brazil population
Nádia Pinto et al.	-	2014	Forensic Science International: Genetics	Mutation and mutation rates at Y chromosome specific Short Tandem Repeat Polymorphisms (STRs): A reappraisal
Adil Laouina et al.	Marrocos	2013	Legal Medicine	Mutation rate at 17 Y-STR loci in “Father/Son” pairs from moroccan population
Weixia Weng et al.	China	2013	Int J Legal Med	Mutation rates at 16 Y-chromosome STRs in the South China Han population
Miriam Goedbloed et al.	Alemanha e Polónia	2009	Int J Legal Med	Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFI STR® Yfiler® PCR amplification kit
D.J. Ballard et al.	Grã-Bretanha e Irlanda	2005	Forensic Science International	A study of mutation rates and the characterization of intermediate, null and duplicated alleles for 13 Y chromosome STRs
Gusmão et al.	Argentina, Brasil, Colombia, Portugal, Espanha, e Venezuela	2005	Human Mutation	Mutation Rates at Y Chromosome Specific Microsatellites
Lev Zhivotovsky et al.	Bulgária	2004	Am. J. Hum. Genet.	The Effective Mutation Rate at Y Chromosome Short Tandem Repeats, with Application to Human Population-Divergence Time
Evelyne Heyer et al.	Canadá	1997	Oxford University Press	Estimating Y chromosome specific micro- satellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estimar, em uma amostra populacional do Brasil, as taxas de mutações observadas em marcadores STRs do cromossomo Y e suas implicações na identificação humana.

2.2 Objetivos específicos

- Facilitar a investigação de vínculo genético na população brasileira;
- Estimar, na população estudada, a eficiência desses marcadores na identificação humana;
- Analisar as mutações do cromossomo Y de outros estudos realizados no Brasil.

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamentos do estudo

Trata-se de um estudo molecular, que foi conduzido no Laboratório Biocroma - Clínica de Exames de DNA, Goiânia/GO – Brasil, em parceria com o Laboratório de Citogenética e Genética Molecular Humana da Secretaria da Saúde do Estado de Goiás - LaGene e o Núcleo de Pesquisas Replicon - NPR da Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC GOIÁS.

3.2 Grupo amostral

As amostras de estudo foram selecionadas de 80 casos positivos de investigação de paternidade pela análise do DNA (160 amostras), submetidos a análise de mutações nos haplótipos do cromossomo Y com o sistema de amplificação molecular *PowerPlex® Y23 System – Promega Corporation*. O vínculo genético entre o suposto pai e o suposto filho foi previamente confirmado para todos os pares pela análise dos STRs autossômicos componentes do sistema de amplificação *Multiplex Plus* – desenvolvido *in house*. Para confirmação de vínculo genético, foi adotado um percentual de paternidade mínimo correspondente a 99,9999% conforme recomendado pela ISFG.

As amostras foram selecionadas randomicamente, procedentes de diferentes regiões brasileiras, Centro-Oeste, Sul, Sudeste, Norte e Nordeste, atendendo os parâmetros aplicados pelo Laboratório Biocroma. Os critérios de inclusão para seleção das amostras estão associados à amplificação molecular satisfatória dos marcadores microssatélites autossômicos FGA, TPOX, D8S1179, vWA, PENTA E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, PENTA D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, D17S301, DIGATA113, D18S53, D20S482, D14S1434, D20S1082 do sistema desenvolvido *in house* utilizados na análise inicial da investigação de paternidade. Além disso, o volume de material biológico disponível para assegurar a cadeia de custódia da amostra.

Os critérios de exclusão das amostras estão associados à exclusão de paternidade pelos marcadores microssatélites autossômicos e ao volume insatisfatório de material biológico disponível.

Os indivíduos participantes foram orientados sobre os propósitos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 2). Este estudo foi realizado de acordo com padrões éticos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC-GO e incluído na Plataforma Brasil (CAAE: 00773013.5.0000.0037). Todo o estudo foi conduzido sob a égide da Resolução 196/1996-CNS e da Resolução 446/2011-CNS, que normatizam a conduta ética dos processos investigativos no cenário nacional.

Foram identificados 15 registros de mutações germinativas no cromossomo Y entre supostos pais e supostos filhos referentes às amostras analisadas. Estas amostras foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório Biocroma no período de agosto de 2012 a setembro de 2014 (25 meses), para investigação de vínculo genético em testes de paternidade.

3.3 Amostras biológicas

Os indivíduos participantes foram submetidos à coleta por punção capilar de aproximadamente uma gota de sangue depositados no FTA-Card® Classic (Whatman), um cartão especial que proporciona a conservação e estabilização automática de ácidos nucléicos sem a necessidade de refrigeração, protegendo-os de efeitos oxidativos e de nucleases. Este cartão é impregnado com uma mistura de substâncias químicas que são responsáveis por lisar a membrana celular, imobilizar e estabilizar os ácidos nucléicos e inibir o crescimento de microrganismos, permitindo a conservação da amostra à temperatura ambiente por no mínimo 4 anos (Smith e Burgoyne, 2004). Portanto, a facilidade da coleta das amostras e a fixação no cartão FTA-Card® Classic permite que as amostras sejam transportadas e armazenadas de forma prática, o que facilita a rotina laboratorial. As amostras biológicas foram obtidas no Laboratório Biocroma - Clínica de Exames de DNA, Goiânia/GO – Brasil e em postos de coleta distribuídos pelas regiões brasileiras Sul, Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Todas as coletas seguiram os critérios, cuidados e procedimentos operacionais padronizados para a coleta

de sangue capilar (WHO, 2010).

3.4 Extração de DNA e Amplificação por PCR

As amostras foram submetidas a extração de DNA conforme o protocolo estabelecido pelo laboratório Biocroma (anexo 1 – quadro 1).

As amostras de DNA extraídos foram submetidos a reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), conforme o seguindo os protocolos estabelecidos pelo fabricante (*PowerPlex® Y23 System – Promega Corporation*) (anexo 1 – quadro 2).

Os protocolos tratam-se das metodologias citadas, de forma reduzida, devido ao sigilo dos procedimentos estabelecido pelo laboratório Biocroma, por se tratar de uma empresa privada.

3.5 Genotipagem e Análise dos Fragmentos Amplificados

Para obtenção dos dados genéticos da análise preliminar de paternidade e análise adicional do cromossomo Y utilizou-se mais de um sistema de amplificação molecular. O primeiro, tratou-se de um sistema desenvolvido *in house*, composto por 21 loci autossômicos altamente polimórficos mais amelogenina (FGA, TPOX, D8S1179, vWA, PENTA E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, PENTA D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, D17S301, DIGATA113, D18S53, D20S482, D14S1434, D20S1082). Após a análise inicial, os casos foram encaminhados para uma investigação adicional para análise de frequências de mutações no cromossomo Y. Foram utilizados adicionalmente ao sistema de amplificação Multiplex Plus, o sistema *PowerPlex Y23 – Promega*. O sistema de amplificação *PowerPlex® Y23 System – Promega* é composto por 23 loci de Y-STR altamente polimórficos: DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, Y-GATA-H4, DYS481, DYS533, DYS549, DYS576 e DYS643, detalhados e ilustrados conforme figura 7 e tabela 4.

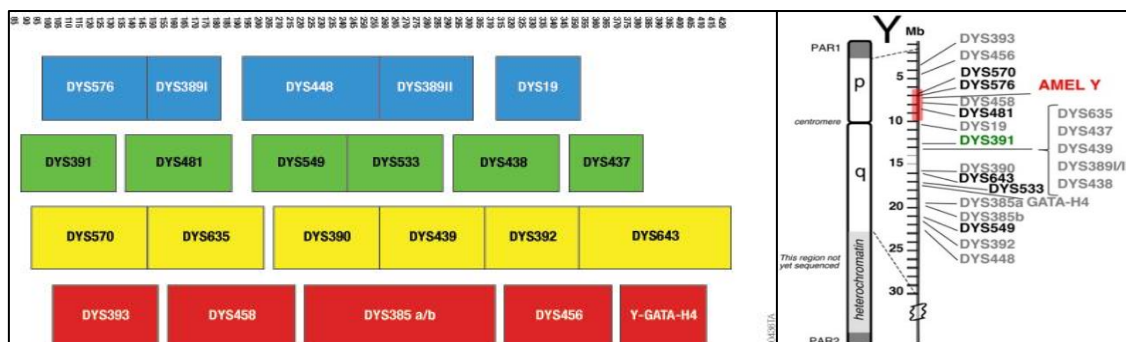


Figura 7. Sistema de amplificação PowerPlex® Y23 System – Promega Corporation
 Fonte: (www.promega.com.br - modificado)

Tabela 4. Lista de 23 marcadores Y-STRs com seu número de repetições e estrutura repetitiva

Y-STR	NÚMERO DE REPETIÇÕES*	ESTRUTURA REPETITIVA
DYS576	13 – 21	AAAG
DYS389 I	9 – 17	(TCTG) (TCAT) (TCTG)
DYS389 II	24 – 34	TCTA
DYS448	20 – 26	AGAGAT
DYS19	10 – 19	TAGA
DYS391	6 – 14	TCTA
DYS481	20 – 30	CTT
DYS549	10 – 14	GATA
DYS533	9 – 14	ATCT
DYS438	6 – 14	TTTTTC
DYS437	13 – 17	TCTA
DYS570	12 – 23	TTTC
DYS635	17 – 27	T#TA
DYS390	17 – 28	(TCTA) (TCTG)
DYS439	9 – 14	AGTA
DYS392	6 – 17	TAT
DYS643	7 – 15	CTTTT
DYS393	9 – 17	AGAT
DYS458	13 – 20	GAAA

DYS385a/b	7 – 28	GAAA
DYS456	13 – 18	AGAT
Y-GATA-H4	8 – 13	TAGA

* baseado em dados da literatura e colaboração de pesquisadores; # alelo variante;
 Fonte: (www.cstl.nist.gov/strbase/ystr_fact.htm)
 (STR base – última atualização 29/06/2009)

Os dados genotípicos correspondentes aos produtos de PCR foram obtidos por eletroforese capilar através do sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzers - Applied Biosystems®. A separação na eletroforese capilar, é conduzida em tubos com 36 cm de comprimento, que são preenchidos com um eletrólito condutor e são submetidos à ação de um campo elétrico. O capilar possui uma alta resistência elétrica permitindo o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm), conseguindo obter separações eficientes, resoluções excepcionais e tempo de análises rápidas. Devido a relação entre a área superficial interna e volume que é apreciavelmente grande (fatores geométricos), um capilar possibilita a dissipação do calor com eficiência gerado pela passagem da corrente elétrica.

O sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzers - Applied Biosystems® possibilita a avaliação da qualidade dos dados em tempo real, capacidade avançada de multiplexação para a análise dos fragmentos de DNA com até 6 fluorescências exclusivas, configuração, manutenção e operação simples.

Os dados foram analisados com a utilização do software de análises genéticas GeneMapper® ID-X. Esse software de genotipagem fornece o dimensionamento e a qualidade alélica do DNA para todos os sistemas de eletroforese. É especializado para diversas aplicações, incluindo a análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (AFLP®), da perda de heterozigose (LOH), de microssatélites e análise genotipagem SNP. O software GeneMapper® contribui com o aumento da eficiência de processamento de dados com a auto-análise remota.

Os índices de paternidade foram calculados de acordo com o banco de frequências haplotípicas do cromossomo Y da população brasileira disponível no banco de dados YHDR. A taxa de mutação para Y-STR foi calculada por *locus* dividindo o número de mutações pelo número de transferências de alelos do pai para filho (YHRD), utilizando o software Microsoft Excel para obtenção dos resultados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para obtenção dos resultados no presente estudo, foram analisados no período de 25 meses, 80 pares de amostras de pais e filhos para investigação de vínculo genético em uma amostra da população brasileira. Em 1.840 transmissões alélicas (80 casos com 23 marcadores analisados), foram identificadas 15 mutações. Todos os casos analisados tiveram inclusão de paternidade com a probabilidade mínima de 99,9999% comprovada através da análise autossômica. Como a transmissão do cromossomo Y é vertical, as mutações encontradas são de origem paterna.

Foram analisados 23 marcadores microssatélites do cromossomo Y com o sistema de amplificação *PowerPlex® Y23 System – Promega Corporation*, de acordo com a sequência de repetição, o número de mutação e a taxa de mutação por *locus* conforme tabela 5.

A figura 9, exemplifica um caso de mutação no *locus* DYS576 da amostra 15 Y. Dos 15 casos analisados, 14 (93,33%) tiveram a mutação envolvendo apenas uma unidade de repetição e 1 (6,66%), envolvendo duas unidades de repetição (DYS481: 24 - 22), assim como nos resultados de Fré et al. (2014), onde 92,30% (n=12) tiveram apenas um *locus* mutado por ganho/perda de repetição e 7,70% (n=1) com perda de 2 repetições no *locus* DYS481. Desse modo, 9 casos (60%) tiveram ganho de 1 repetição, 5 (33,33%) perda de 1 repetição e 1 (6,66%) perda de 2 repetições (tabela 6).

Observou-se uma irrisória diferença entre os ganhos (n= 9) e perdas (n=6) de números de repetições encontradas nos filhos. Segundo Fré et al. (2014), esta proporção foi semelhante a de proporções globais de 55,2% de ganhos e 44,8% de perdas, sendo que algumas variações entre os estudos podem ser resultado de diferenças no tamanho da amostra e/ou no número de *loci* analisados. Estes resultados estão de acordo com o modelo de mutação por passo descritos na literatura por Kimura e Ohta (1978) e em concordância com outros estudos (Heyer et al., 1997; Gusmão et al., 2005; Decker et al., 2008; Ge et al., 2009; Laouina et al., 2013; Weng et al., 2013; Fré et al., 2014; Pinto et al., 2014; Caliebe et al., 2015).

Tabela 5. 15 mutações observadas em 80 pares de amostras de pai/filho em 23 Y STRs analisados

AMOSTRA	LOCUS STR	ALELOS		Nº STEPS	SISTEMA (S) DETECÇÃO	COMENTÁRIOS
		PAI	FILHO			
1Y	DYS391	11	12	1	PowerPlex® Y23 System	Ganho de uma repetição
2Y	DYS576	15	16	1	PowerPlex® Y23 System	Ganho de uma repetição
3Y	DYS458	17	18	1	PowerPlex® Y23 System	Ganho de uma repetição
4Y	DYS456	16	15	1	PowerPlex® Y23 System	Perda de uma repetição
5Y	DYS576	19	20	1	PowerPlex® Y23 System	Ganho de uma repetição
6Y	DYS549	12	13	1	PowerPlex® Y23 System	Ganho de uma repetição
7Y	DYS385	14	15	1	PowerPlex® Y23 System	Ganho de uma repetição
8Y	DYS438	9	8	1	PowerPlex® Y23 System	Perda de uma repetição
9Y	DYS481	24	22	2	PowerPlex® Y23 System	Perda de duas repetições
10Y	DYS570	24	25	1	PowerPlex® Y23 System	Ganho de uma repetição
11Y	DYS393	13	14	1	PowerPlex® Y23 System	Ganho de uma repetição
12Y	DYS570	17	18	1	PowerPlex® Y23 System	Ganho de uma repetição
13Y	DYS439	13	12	1	PowerPlex® Y23 System	Perda de uma repetição
14Y	DYS389II	30	29	1	PowerPlex® Y23 System	Perda de uma repetição
15Y	DYS576	18	17	1	PowerPlex® Y23 System	Perda de uma repetição

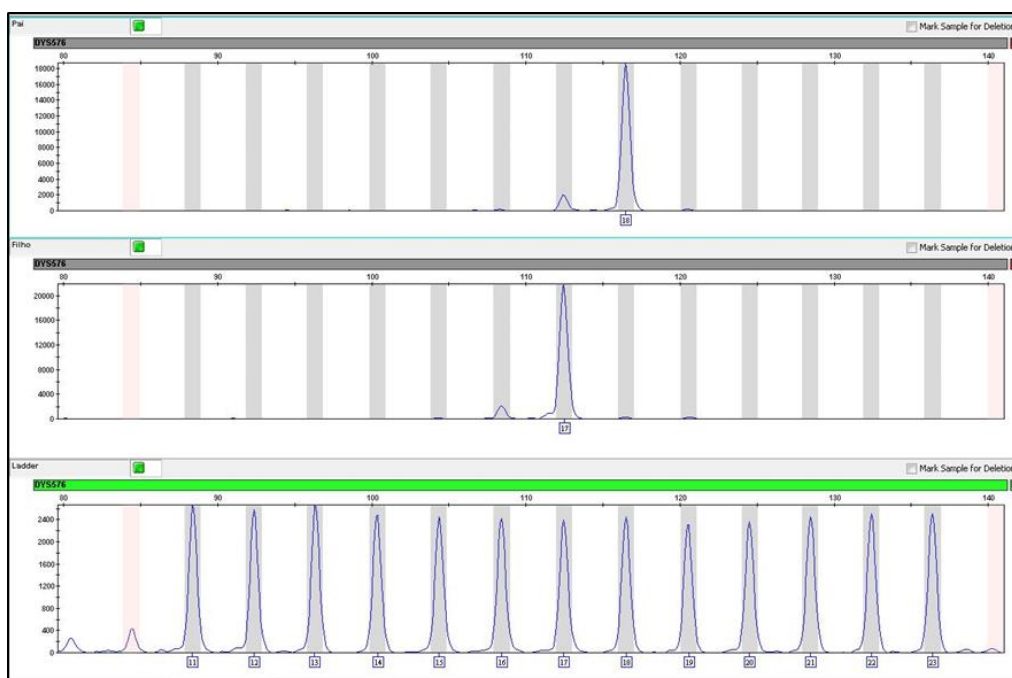


Figura 8. Eletroferograma representativo da amostra 15 Y com mutação no DYS576

BANCO DE DADOS YHRD				RESULTADOS DESTE ESTUDO		
LOCUS	MUTAÇÃO	MEIOSES	TAXA DE MUTAÇÃO (combinada)	MUTAÇÃO	MEIOSES	TAXA DE MUTAÇÃO
DYS391	38	15.486	$2,45 \times 10^{-3}$	1	80	$1,25 \times 10^{-2}$
DYS576	8	447	$1,79 \times 10^{-2}$	3	80	$3,75 \times 10^{-2}$
DYS458	46	7.228	$6,36 \times 10^{-3}$	1	80	$1,25 \times 10^{-2}$
DYS456	31	7.229	$4,29 \times 10^{-3}$	1	80	$1,25 \times 10^{-2}$
DYS549	1	447	$2,24 \times 10^{-3}$	1	80	$1,25 \times 10^{-2}$
DYS385	64	26.171	$2,45 \times 10^{-3}$	1	80	$1,25 \times 10^{-2}$
DYS438	4	10.673	$3,75 \times 10^{-4}$	1	80	$1,25 \times 10^{-2}$
DYS481	3	447	$6,71 \times 10^{-3}$	1	80	$1,25 \times 10^{-2}$
DYS570	8	447	$1,79 \times 10^{-2}$	2	80	$2,5 \times 10^{-2}$
DYS393	15	14.264	$1,05 \times 10^{-3}$	1	80	$1,25 \times 10^{-2}$
DYS439	58	10.647	$5,45 \times 10^{-3}$	1	80	$1,25 \times 10^{-2}$
DYS389 II	59	14.310	$4,12 \times 10^{-3}$	1	80	$1,25 \times 10^{-2}$
TOTAL	335			15		

Tabela 6. Comparação entre a taxa de mutação analisada neste estudo com a taxa de mutação combinada do banco de dados YHRD

Fonte: (https://yhrd.org/pages/resources/mutation_rates)

Dentre as 15 situações de mutação, 3 ocorreram no *locus* DYS576, 2 no *locus* DYS570, e apenas 1 em cada um dos *loci*: DYS539, DYS458, DYS456, DYS549, DYS385, DYS438, DYS481, DYS393, DYS439, DYS389 II (gráfico 1). Nos demais

marcadores, *DYS389 I*, *DYS448*, *DYS19*, *DYS533*, *DYS437*, *DYS635*, *DYS390*, *DYS392*, *DYS643* e *Y-GATA-H4* não foram identificadas mutações nas amostras analisadas neste estudo e em conformidade com Fré et al. (2014), que também não identificou mutações nestes *loci*, exceto no *locus* *DYS390*. De acordo com o banco de dados YHRD, não foi identificado mutação para o *locus* *DYS533* em nenhum estudo e o *locus* *DYS392* possui a menor taxa de mutação, sendo esta de $5,19 \times 10^{-4}$.

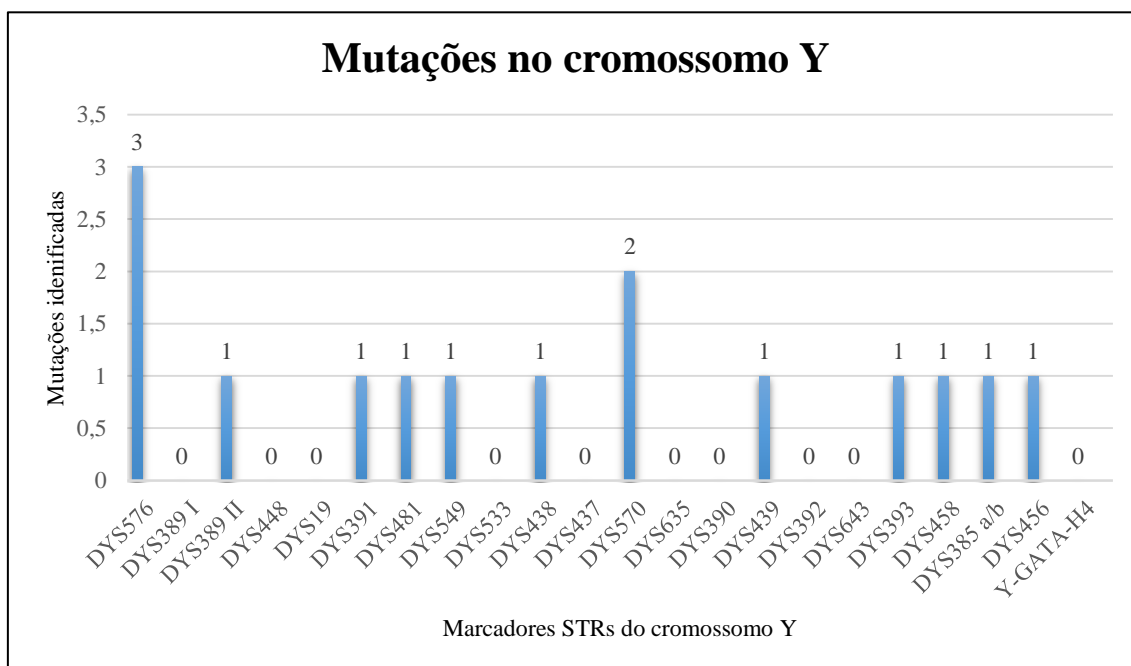


Gráfico 1. Relação de marcadores STRs do cromossomo Y e suas respectivas mutações identificadas em uma amostra da população brasileira com o sistema de amplificação *PowerPlex® Y23 System - Promega Corporation*

Alguns estudos têm avaliado e estimado taxas de mutações de marcadores microssatélites do cromossomo Y. Na China, Weng *et al.* (2013), analisaram 918 pares de pais e filhos de uma amostra da população do Sul da China com 16 *loci* do sistema de amplificação *AmpFLSTR® Yfiler™ PCR Amplification kit*. Foram identificados 36 casos de mutações dentre as 14.688 transmissões alélicas analisadas. Em Marrocos, Laouina *et al.* (2013), analisaram 252 pares de pais e filhos com o sistema de amplificação *AmpFLSTR® Yfiler™ PCR Amplification kit* e identificaram 15 casos de mutações. Decker *et al.* (2008), realizaram um estudo com uma amostra da população dos Estados Unidos de diferentes etnias. O estudo reportou a taxa de mutação de 389 pares de pais e filhos utilizando o sistema de amplificação *17 Y-STR loci Yfiler™ kit* e observou 24 casos de mutações.

No Brasil, há poucos estudos ainda relatados. Gusmão *et al.* (2005), realizaram

um estudo com amostras da população da Argentina, Brasil, Colômbia, Portugal, Venezuela e Espanha de 17 diferentes laboratórios. As amostras foram obtidas de 3.026 pares de pais e filhos que tiveram a paternidade previamente confirmadas com os STRs autossômicos. A análise de 16 Y-STR resultou em 55 casos de mutações. Do mesmo modo em Goés et al.(2005), analisaram 17 *loci* do cromossomo Y em 119 pares de pais e filhos e identificaram 8 mutações em 2.223 transferências alélicas de uma amostra da população do Rio Janeiro - Brasil.

O estudo mais recente e mais completo realizado no Brasil até o momento é o do grupo de pesquisadores do Rio Grande do Sul/ Brasil (Fré et al., 2014). Neste estudo, foram analisados 150 pares de pais e filhos com o sistema de amplificação *PowerPlex® Y23 System – Promega*. Um total de 13 mutações foram identificadas em 3.450 transferências alélicas entre pai-filho. A pesquisa foi inédita no território brasileiro pois analisou um total de 23 marcadores STRs do cromossomo Y. Contudo, até então, ainda não há trabalhos realizados com amostras de todas as regiões do Brasil utilizando o *PowerPlex® Y23 System – Promega*. Portanto, este trabalho se torna inédito com a amplitude de todo o território brasileiro.

A diferença observada nas taxas de mutações do presente estudo em relação a estudos anteriores acontece, devido aos diferentes números amostrais (pares de pais e filhos) de cada população e/ou pelos diferentes números de *loci* analisados dos sistemas de amplificação.

A Região Sudeste apresentou maior número de casos analisados (35%). Em seguida a Região Norte (27%), Região Nordeste (18%), Região Centro-Oeste (18%) e Região Sul (2%) (gráfico 2).

Os valores distintos das taxas de mutação descritos para os *loci* de Y-STRs demonstram que é imprescindível, para a avaliação dos testes de paternidade e investigações forenses a utilização de um banco de dados oriundo da população estudada, bem como estimativas de taxas de mutação específicas para a população na qual os testes estão sendo realizados. Com isso, valores adequados das taxas de mutação poderão ser incluídos nos cálculos do índice de paternidade aumentando a confiabilidade e precisão dos resultados de vínculo genético e promovendo uma maior segurança na determinação do parentesco. No entanto, os estudos devem-se estender

com uma cobertura mundial de análises com suas distintas populações.

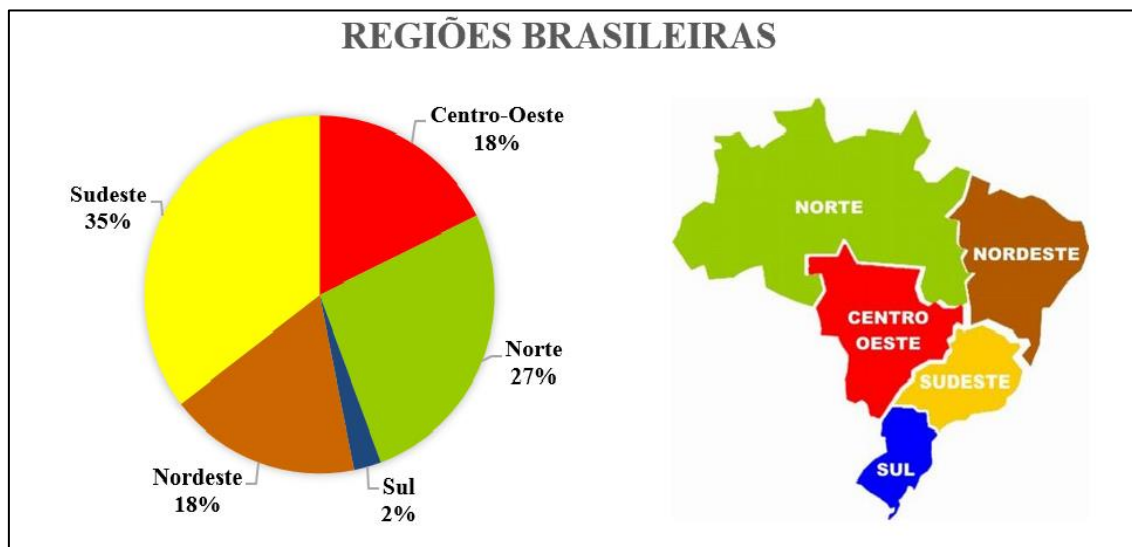


Gráfico 2. Relação da porcentagem de análises de STRs do cromossomo Y distribuídos nas regiões Brasileiras (100% = 80 pares de pais e filhos)

5. CONCLUSÕES

- Foram analisados 23 marcadores STRs do cromossomo Y das regiões brasileiras. Identificou-se 15 mutações nas amostras de pares de pais e filhos de um total de 1.840 transmissões alélicas.

- A maioria dos registros de mutações (93,33%) apresentaram adição ou subtração de apenas uma unidade de repetição, confirmando que este tipo de evento (*one step mutation*) é mais frequente, independente da mudança ocorrer por inserção ou deleção de nucleotídeos.

- A identificação das mutações aumenta as ferramentas/dados que são utilizados nos laboratórios de análise de vínculo genético e podem garantir um resultado mais confiável minimizando possíveis erros nas análises.

- Os marcadores STRs do cromossomo Y que não apresentaram mutações são os mais indicados para realização das análises, principalmente o DYS533 que jamais foi descrita uma mutação e o DYS392 que possui a menor taxa de mutação combinada de todos os estudos realizados e inseridos no YHRD.

- Os resultados obtidos tiveram diferenças consideráveis comparando-os com outros estudos. Isto deve-se ao número amostral relativamente baixo em relação ao número total da população brasileira de aproximadamente 202.033.270 de habitantes (IBGE, 2014) sendo que aproximadamente 98.487.258 são homens (IBGE, 2012).

6. PERSPECTIVAS

Com base em trabalhos já descritos e publicados, outros estudos semelhantes poderão ser feitos para complementar o banco de dados mundial de mutações no cromossomo Y. Seria interessante continuar o estudo da população brasileira e de suas regiões isoladas, aumentando significativamente o número amostral de maneira que possibilite uma estimativa da taxa mutacional de valor significativo, a fim de comparar com as demais populações já estudadas, já que análises desse porte demandam um tempo expressivo. Ademais, estudos futuros realizados com um mesmo número amostral, poderiam facilitar as comparações das taxas de mutações de cada *locus* dos marcadores microssatélites do cromossomo Y das diferentes populações.

Desta forma, a implementação dos resultados deste trabalho no banco de dados mundial do cromossomo Y será realizada após o número amostral mínimo desejado (n=200), ser alcançado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia Molecular da célula*. Ed. Artes médicas, Porto Alegre; 1997.

Amoedo O. *L'Art Dentaire en Médecine Légale*, Paris. Paris Masson et Cie, éditeurs libraires de l'Académie de médecine. 1898.

Amoedo O. The role of the dentists in the identification of the victims of the catastrophe of the Bazar de la Charité, Paris, 4 mai 1897. *Dental Cosmos*. 1897; 39: 905–912.

Antonarakis SE, Cooper DN. Human Gene Mutation: Mechanisms and Consequences in M.R. Speicher et al. (eds.), *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010; 319-363.

Arizona. Details on the various assumptions used in computing TMRCA. Disponível em: <http://nitro.biosci.arizona.edu/ftdna/models.html#Mutation>. Acesso em: 20 de dez. de 2014.

Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30(6): 593-601.

Ballard DJ et al. A study of mutation rates and the characterisation of intermediate, null and duplicated alleles for 13 Y chromosome STRs. *Forensic Science International*. jan. 2005; 155: 65-70. Disponível em: <10.1016/j.forsciint.2004.12.012>. Acesso em: 20 dez. 2014.

Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W e Olaisen B. DNA recommendations further report of the DNA commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Leg Med*. 1997; 110: 175-176.

Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Hühne J and Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 1408-1415.

Britten RJ, Kohne DE. *Science*. 1968; 161: 529–540.

Butler JM. Forensic DNA typing: Biology, Technology and Genetics of STR markers. 2. ed. USA: Elsevier Academic Press. 2005; 655 p.

Butler JM. Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity testing. *BioTechniques*. 2006; 43: n.4.

Caliebe A, Jochens A, Willuweit S, Roewer L, Krawczak M. No shortcut solution to the problem of Y-STR match probability calculation. *Forensic Science International: Genetics*. 2015; 15: 69–75.

Carracedo A, Butler JM, Gusmão L, Parson W, Roewer L, Schneider PM. Editorial: Publication of population data for forensic purposes. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2010; 4: 145-147.

Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ and Deka R. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 1041-1046.

Cregan B, Mudge J, Fickus EW, Marek LF, Danesh D, Denny R, Shoemaker RC, Matthews BF, Jarvik T and Young ND. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. *Theoretical and Applied Genetic*. 1999; 98: 919-928.

Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*. 2005; 278: 274 – 288.

Dauber EM, Bär W, Klintschar M, Neuhuber F, Parson W, Glock B and Mayr WR. Mutation rates at 23 different short tandem repeat loci. *Int Cong Series*. 2003; 1239: 565-567.

de Knijff P. Profiles in DNA. 2003; 7: 3–5. Disponível em: <<http://www.promega.com/profiles>>. Acesso em: 30 de jun. de 2014.

Decker AE, Kline MC, Redman JW, Reid TM, Butler JM. Analysis of mutations in father–son pairs with 17 Y-STR loci. *Forensic Science International: Genetics* 2. 2008; 31–35.

DNA initiative. DNA Database Hits. Disponível em: <http://www.dna.gov/dna->

databases/hits. Acesso em: 1 out. 2014.

Dupuy BM, Stenersen M, Egeland T, and Olaisen B. *Human Mutation*. 2004; 23: 117–124.

Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genet*. 2000a; 16: 551-558.

Ellegren H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat. Genet*. 2000b; 24: 400-402.

Espíndula A. *Perícia Criminal e Cível. Uma visão completa para peritos e usuários da perícia*. 2ª.ed, Millennium. 2006.

Fan H and Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. *Geno. Prot. Bioinfo*. 2007; 5: 7-14.

Farah SB. *Métodos de análise dos ácidos nucléicos*. In: *DNA: segredos e mistérios*. 2. Edição- São Paulo: Saravier. 2007.

FBI's. Combined DNA Index System (CODIS) Homepage. Disponível em: <http://www.fbi.gov/hq/lab/codis/index1.htm>. Acesso em: 20 set. 2014.

Ferreira LB, Mendes-Júnior CT, Wiesel CEV, Luizon MR, Simões AL. Y-STR diversity and ethnic admixture in White and Mulatto Brazilian population samples. *Genet. Mol. Biol. Ribeirão Preto – SP*. 2006; 29: 605-607.

Ferreira ME, Grattapaglia D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 1998; p. 220.

Forensic Science Service Homepage. Disponível em: <http://www.forensic.gov.uk>. Acesso em: 03 maio 2014.

França GV. *Medicina Legal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Fré NN *et al*. Genetic data and de novo mutation rates in father-son pairs of 23 Y-STR loci in Southern Brazil population. *Int J Legal Med*. nov. 2014; 13: 1-3. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00414-014-1101-2/fulltext.html>. Acesso em: 04 fev. 2015.

Garrido RG. Evolução dos processos de identificação humana: das características antropométricas ao DNA. 2009. Disponível em <http://www.geneticanaescola.com.br>. Acesso em 19 ago 2014.

Ge J, Budowle B, Aranda XG, Planz JV, Eisenberg AJ, Chakraborty R. Mutation rates at Y chromosome short tandem repeats in Texas populations. *Forensic Sci Int Genet.* 2009; 3 (3):179–184

Geadá H, Viriato L, Vieira-Silva C, Cruz C, Lucas I, Ribeiro T and Espinheira R. STR mutations in paternity investigations: a study of 1-year consecutive cases. *Int Cong Series.* 2003; 1239: 657-660.

Geystelen AV, Decort R, Larmuseau MHD. Updating de Y-chromosomal phylogenetic tree for forensic application based on whole genome SNPs. *Forensic Science International: Genetics.* 2013; 7: 573-580.

Gill P, Brinkmann B, Aloja ED, Andersen J, Bär W, Carracedo A, Dupuy B, Eriksen B, Jangblad M, Johnsson V, Kloosterman AD, Lincoln P, Morling N, Rand S, Sabatier M, Scheithauer R, Schneider P e Vide MC. Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *For Sci Int.* 1997; 87: 185-192.

Goedbloed M et al. Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFlSTR® Yfiler® PCR amplification kit. *Int J Legal Med.* mar. 2009; 123: 471-482. Disponível em: <doi:10.1007/s00414-009-0342-y>. Acesso em: 08 jan. 2015.

Góes ACS, Silva DA, Domingues CS, Sobrinho JM, Carvalho EF. Identification of a criminal by DNA typing in a rape case in Rio de Janeiro, Brazil. *São Paulo Medical Journal.* 2002; 120 (3): 77-80.

Góes ACS et al. Population and mutation analysis of 17 Y-STR loci from Rio de Janeiro (Brazil). *Int J Legal Med.* 2005; 119: 70–76.

Góis CC. Estudo de frequências alélicas de 12 microssatélites STRs do cromossomo Y na população brasileira de Araraquara e da região da grande São-Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade de Odontologia da Universidade de São-Paulo-SP. 2006.

Goldstein DB, Schlotterer C. *Microsatellites: Evolution and Application*. Oxford University Press, New York. 1999; p. 368.

Griffiths AJF et al. *Introdução à genética*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

Griffiths AJF et al. *Introdução à genética*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009.

Gupta S et al. Contemporary practice in forensic odontology. *Journal Of Oral And Maxillofacial Pathology: JOMFP*. 2014; 2 (18) 244-250. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4196294/>>. Acesso em: 02 fev. 2015.

Gusmão L et al. Mutation Rates at Y Chromosome Specific Microsatellites. *Human Mutation*. 2005; 6 (26): 520-528.

Gusmão L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Roewer L, Tyler-Smith C, Schneider PM. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci Int*. 2006; 157: 187-97.

Hammer MF. A recent common ancestry for human Y chromosomes. *Nature*. 1995; 378 (6555): 376-378.

Hancock JM. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein D, Schlotterer C, editors. *Microsatellites - Evolution and Applications*. New York: Oxford University Press. 1999; 1-9.

Henke J and Henke L. Mutation rate in human microsatellites. *Am J Hum Genet*. 1999; 64: 1473.

Heyer E et al. Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Human Molecular Genetics*. 1997; 6 (5): 799-803.

Huang QY et al. Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *Am. J. Hum. Genet*. 2002; 70: 625-634.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/paisesat/main_frameset.php. Acesso em: 02 de mar. de 2015.

Inman K, Rudin N. The origin of evidence. *Forensic Sci Int.* 2002; 126 (1): 11-16.

International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409: 860-921.

Jeffreys AJ, Brookfield JF, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature.* 1985b; 317: 818–819.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific “fingerprints” of Human DNA. *Nature.* 1985a; 314: 67–74.

Jobling MA, Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet.* 1995; 11: 449–56.

Jobling MA, Tyler-Smith C. New uses for new haplotypes the human Y chromosome, disease and selection. *Trends Genet.* 2000; 16: 356–62.

Jobling MA, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet.* 2003; 4: 598-612.

Jobling MA, Hurles ME, Tyler-Smith C. *Human Evolutionary Genetics: origins, people and disease.* 1^a ed. New York: Garland Publishing. 2004.

Kayser M, de Knijff P, Dieltjes P, Krawczak M, Nagy M, Zerjal T, Pandya A, Tyler-Smith C, Roewer L. Applications of microsatellite-based Y chromosome haplotyping. *Electrophoresis.* 1997; 18 (9): 1602-1607.

Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke J, Brauer S, Kruger C, Krawczak M, Nagy M, Dobosz T, Szibor R, de Knijff P, Stoneking M, Sajantila A. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *American Journal of Human Genetics.* 2000; 66: 1580–1588.

Kayser M, Sajantila A. Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Sci Int.* 2001; 118:116–121.

Kimura M, Crow JF. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. 1964; 49: 725-738.

Kimura M, Ohta T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978; 75: 2868-2872.

Knapik EW, Goodman A, Ekker M, Chevrette M, Delgado J, Neuhauss S, Shimoda N, Driever W, Fishman M, Cand Jacob HJ. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics*. 1998; 18: 338-343.

Kornberg A et al. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. Oligonucleotides as templates and the mechanisms of their replication. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1964; 51: 315-323.

Kruglyak S et al. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1998; 95: 10774-10778.

Lai Y and Sun F. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Mol. Biol. Evol.* 2003; 20: 2123-2131.

Laouina A et al. Mutation rate at 17 Y-STR loci in “Father/Son” pairs from moroccan population. *Legal Medicine*. 2013; 15: 269-271. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2013.03.003](https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2013.03.003)>. Acesso em: 20 jan. 2015.

Lee JS, Hanford MG, Genova JL and Farber RA. Relative stabilities of dinucleotide and tetranucleotide repeats in cultured mammalian cells. *Hum Mol Genet*. 1999; 8: 2567-2572.

Levinson G and Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4: 203-221.

Lima HB. DNA x criminalidade. *Perícia Federal, Brasília-DF*. 2008; 7-11.

Martins JA. Estudo de frequências alélicas de STRs do cromossomo X na população brasileira de Araraquara-SP. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, SP. 2008.

Mendel G. Versuche qber Pflanzenhybriden. Verh. Nat.forsch. Ver. Brqnn. 1866; 4, 3 – 47.

Miescher F. Letter I; to Wilhelm His; Tqbingen, February 26thIn: His, W et al. (Eds.), Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher—Aus dem wissenschaftlichen Briefwechsel von F. Miescher, vol. 1. F.C.W. Vogel, Leipzig. 1869; p. 33– 38.

Miescher F. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. Med.-Chem. Unters. 1871; 4: 441– 460.

Miller OJ, Therman E. Human chromosomes. New York: Springer. 2001; 255–266.

Morling N et al. Authentication of forensic DNA samples. Forensic Science International: Genetics, In Press, Corrected Proof. 2010.

Mulero JJ, Chang CW, Calandro LM, Green RL, Li Y, Johnson CL, Hennessy LK. Development and validation of the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system. J Forensic Sci. 2006; 51 (1): 64-75.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987; 155: 335-350.

NFSTC. Science Serving Justice. Disponível em: <http://projects.nfstc.org/otc/espanol/module2/2.2.005.htm>. Acesso em: 14 de dez. 2014.

NIST. Nacional Institute of Standards and Technology. Disponível em: www.cstl.nist.gov. Acesso em: 05 de jan. de 2015.

NIST. Nacional Institute of Standards and Technology. STR Base. Disponível em: www.cstl.nist.gov/strbase/ystr_fact.htm. Acesso em: 25 de ago. de 2014.

NLM. Visible Proofs Forensic views of de body – Biographies. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/visibleproofs/galleries/biographies/vucetich.html>. Acesso em: 20 de abr. de 2014.

Pardi F, Sibly RM, Wilkinson MJ and Whittaker JC. On the structural differences

between markers and genomics AC microsatellites. *J Mol Evol.* 2005; 60: 688-693.

Pena SDJ. Segurança pública: determinação de identidade genética pelo DNA. *Parcerias estratégicas*, nº 20. 2005.

Perrier M. Introduction à l'odontostomatologie médico-légale: L'odontostomatologie médico-légale peut se définir comme la discipline de la médecine dentaire appliquée aux besoins de la justice.. *Rev Mens Suisse Odontostomatol*, Lausanne. 1998; 108 (3): 237-246.

Pinto LM, Oliveira CL, Santos LL, Tarazona-Santos E Molecular characterization and population genetics of non-CODIS microsatellites used for forensic applications in Brazilian population. *Forensic Science International: Genetics*; 2013.

Pinto N, Gusmão L, Amorim A. Mutation and mutation rates at Y chromosome specific Short Tandem Repeat Polymorphisms (STRs): A reappraisal. *Forensic Science International: Genetics.* 2014; 9: 20-24. Disponível em: <dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.008>. Acesso em: 30 jan. 2015.

Primrose SB. *Principles of Genome Analysis: A Guide to Mapping and Sequencing DNA from Different Organisms.* 2nd edn. Malden, MA: Blackwell Science.1998.

Promega. Promega Homepage. Disponível em: <http://www.promega.com.br/products/pm/genetic-identity/powerplex-y23/>. Acesso em: 20 de nov. de 2014.

Quintana-Murci L, Krausz C, McElreavey K. The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Sci Int.* 2001; 118 (2-3): 169-181.

Roewer L et al. Continent-Wide Decoupling of Y-Chromosomal Genetic Variation from Language and Geography in Native South Americans. *Plos Genetics.* 2013; 9 (4): 1-16. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3623769/pdf/pgen.1003460.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

Sajantila A, Lukka M and Syvänen A-C. Experimentally observed germline mutations at human micro- and minisatellite loci. *Eur J Hum Genet.* 1999; 7: 263-266.

Schlötterer C and Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 211-215.

Shimmin LC, Chang BH-J and Li W-H. Male-driven evolution of DNA sequences. *Nat.* 1993; 362: 745-747.

Siegel J, Knupfer G e Suukko P. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, 1-3, 1484p., 2000

Silva M da, Beaini TL. A Odontologia Legal e a ciência do Direito. *Revista Brasileira de Odontologia Legal: RBOL.* 2014; 1 (1): 1-6. Disponível em: <<http://portalabol.com.br/rbol/v1n1/RBOL-V1N1-editorial.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2015.

Simonsen BT and Morling N. Results of the 2003 paternity testing workshop of the English Speaking Working Group of the International Society of Forensic Genetics. *Int Cong Series.* 2004; 1261: 115-117.

Skaletsky H et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003; 423: 825–837.

Smith LM, Burgoyne LA. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. *BMC Ecology.* 2004: 4.

Snustad P and Simmons M. *Fundamentos de Genética.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. 903 p. Tradução de: Paulo A. Mota.

Soares-Vieira JA, Billerbeck AEC, Iwamurai ESM, Mendonça BB, Gusmão L, Ottopa. Population and Mutation analysis of Y-STR Loci in a sample From the City of São Paulo. *Genet Mol. Biol.* 2008; 31 (3): 651-656.

Strand M, Prolla TA, Liskay RM and Petes TD Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nat.* 1993; 365: 274-276.

Tachida H, Lizuka M. Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics.* 1992; 131: 471-478.

Tamaki K, Jeffreys AJ. Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Leg Med.* 2005; 7 (4): 244-250.

Tang W-M and Law M-Y. Germiline mutations at 15 STR loci in the Chinese

population. *Int Cong Series*. 2004; 1261: 67-69.

Tavares MFM. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Química Nova*, São Paulo. abr. 1997; 5 (20): 493-511.

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Biografias Juan Vucetich. Disponível em: <http://www.dec.ufcg.edu.br/biografias/JuanVuce.html>. Acesso em: 25 de abr. de 2014.

Vanrell JP. *Odontologia Legal & Antropologia Forense*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.

Verlengia R et al. Sistema de amplificação de ácidos nucléicos pela reação em cadeia de polimerase. In: *Análises de RNA, proteínas e metabólitos: metodologia e procedimentos técnicos*. Ed. Santos. São Paulo. 2013.

Watson JD and Crick FHC. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953; 171: 737– 738.

Watson JD *et al*. *Recombinant DNA. Genes and Genomes – A short course*. Third Edition. W. H. Freeman and Comoany, New York. 2007.

Wei W, Ayub Q, Xue Y, Tyler-Smith C. A comparison of Y-chromosomal lineage dating using either resequencing or Y-SNP plus Y-SNP genotyping. *Forensic Science International: Genetics*. 2013; 7: 568-572.

Weng W et al. Mutation rates at 16 Y-chromosome STRs in the South China Han population. *Int J Legal Med*. 2013; 127: 369–372.

Whittle MR, Romano NL, Negreiros VAC. Updated Brazilian genetic data, together with mutation rates, on 19 STR loci, including D10S1237. *For Sci Int*. 2004; 139: 207-210.

Wiemann M, Winkler L, Bingmann D. Light microscopic methods to study cells on non-transparent materials. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. 2001; 32 (12) 976–983.

World Health Organization. WHO best practices for injections and related procedures

for toolkit. Geneva: WHO; 2010. 69p. Disponível em: http://www.who.int/injection_safety/Phlebotomy-portuges_web.pdf. Acesso em: 10 de jul. de 2015.

Xu X, Peng M, Fang Z and Xu X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nat Genet.* 2000; 24: 396-399.

Xue Y, Wang Q, Long Q, NG B, Swerdlow H, Burton J, Skuce C, Taylor R, Abdellah Z, Zhao Y. Human Y Chromosome Base-Substitution Mutation Rate Measured by Direct Sequencing in a Deep-Rooting Pedigree *Current Biology.* 2009; 19:1453-1457.

Yamada NA, Smith GA, Castro A, Roques CN, Boyer JC, Farber RA. Relative rates of insertion and deletion mutations in dinucleotide repeats of various lengths in mismatch repair proficient mouse and mismatch repair deficient human cells. *Mut Res.* 2002; 499: 213-225.

Yan J, Liu Y, Tang H, Zhang Q, Huo Z, Hu S, Yu J. Mutations at 17 STR loci in Chinese population. *For Sci Int.* 2006; 162: 53-54.

YHRD. Y Chromosome Haplotype Reference Database. Disponível em: <http://www.yhrd.org/>. Acesso em: 15 de fev. de 2014.

Zhivotovsky LA, Underhill PA, Cinnioglu C, Kayser M, Morar B, Kivisild T, Scozzari R, Cruciani F, Destro-Bisol G, Spedini G, Chambers GK, Herrera RJ, Yong KK, Gresham D, Tournev I, Feldman MW, Kalaydjieva L. The effective mutation rate at Y chromosome short tandem repeats, with application to human population-divergence time. *Am J Hum Genet.* 2004; 74(1): 50–61.

Zietkiewicz E et al. Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *J Appl Genetics.* 2011; 53: 41-60.

8. ANEXOS

8.1 Quadros

Quadro 1. Protocolo resumido de extração de DNA estabelecido pelo laboratório Biocroma


- Picotar o papel filtro e depositar o fragmento dentro do tubo previamente identificado;
- Adicionar 200 µL de Solução de Extração (preparo in house);
- Incubar até que o fragmento de papel FTA fique bem claro (aproximadamente 20 minutos);
- Aspirar a solução de extração;
- Adicionar 200 µL de Água padrão ultra puro;
- Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente (T.A.);
- Aspirar a água e deixar o tubo secar por 40 minutos.

Quadro 2. Protocolo resumido de amplificação por PCR do sistema *PowerPlex® Y23 System – Promega*

- Proporções Utilizadas:
 - ✓ Água: 17,5 µL;
 - ✓ Master Mix: 5,0 µL;
 - ✓ Primer: 2,5 µL;
 - ✓ Volume final: 25,0 µL
- Foi utilizada a seguinte ciclagem para o procedimento de PCR:

TEMPERATURA	TEMPO	Nº CICLOS
96°C	2 minutos	-
94°C	10 segundos	30
61°C	1 minuto	
72°C	30 segundos	
60°C	20 minutos	-
4°C	∞	-

8.2 Ficha de cadastro com TCLE do Laboratório Biocroma - Clínica de Exames de DNA, Goiânia/GO Brasil

- IDENTIFICAÇÃO DOS ENVOLVIDOS -	
Suposto PAI (nome): _____	
Data de Nascimento: ____/____/____ Natural de (cidade): _____ Estado: _____	
RG: _____ Órgão Emissor: _____ Certidão de nascimento: _____ Livro: _____ Folha: _____	
Endereço: _____ Bairro: _____	
Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Telefone: _____	
<p>Autorizo a obtenção de minha amostra biológica, para realização de exames de investigação de paternidade ou vínculo genético. Declaro que as identificações, assinaturas e informações acima são autênticas e de minha inteira responsabilidade e autorizo que os dados de genotipagem sejam utilizados para fins de pesquisa.</p> <p>OBS.: Anexar fotocópias dos documentos de identidade dos envolvidos.</p>	
Data: ____/____/____	_____ ASSINATURA <small>(Conforme documento de identidade)</small>
<small>BRUNO, Leandro Alves</small>	
- IDENTIFICAÇÃO DOS ENVOLVIDOS - <small>(se menor, mãe ou responsável legal deve preencher e assinar)</small>	
FILHO (nome): _____	
Data de Nascimento: ____/____/____ Natural de (cidade): _____ Estado: _____	
RG: _____ Órgão Emissor: _____ Certidão de nascimento: _____ Livro: _____ Folha: _____	
Declaração de Nascimento Vivo: _____	
Endereço: _____ Bairro: _____	
Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Telefone: _____	
<p>Autorizo a obtenção de minha amostra biológica, para realização de exames de investigação de paternidade ou vínculo genético. Declaro que as identificações, assinaturas e informações acima são autênticas e de minha inteira responsabilidade e autorizo que os dados de genotipagem sejam utilizados para fins de pesquisa.</p> <p>OBS.: Anexar fotocópias dos documentos de identidade dos envolvidos.</p>	
Data: ____/____/____	_____ ASSINATURA <small>(Conforme documento de identidade)</small>
<small>BRUNO, Leandro Alves</small>	
- IDENTIFICAÇÃO DOS ENVOLVIDOS -	
MÃE (nome): _____	
Data de Nascimento: ____/____/____ Natural de (cidade): _____ Estado: _____	
RG: _____ Órgão Emissor: _____ Certidão de nascimento: _____ Livro: _____ Folha: _____	
Endereço: _____ Bairro: _____	
Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____ Telefone: _____	
<p>Autorizo a obtenção de minha amostra biológica, para realização de exames de investigação de paternidade ou vínculo genético. Declaro que as identificações, assinaturas e informações acima são autênticas e de minha inteira responsabilidade e autorizo que os dados de genotipagem sejam utilizados para fins de pesquisa.</p> <p>OBS.: Anexar fotocópias dos documentos de identidade dos envolvidos.</p>	
Data: ____/____/____	_____ ASSINATURA <small>(Conforme documento de identidade)</small>
<small>BRUNO, Leandro Alves</small>	
<p>Algum dos envolvidos foi submetido a transplante de medula ou transfusão sanguínea?</p> <p><input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Quem? _____</p> <p><input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim O suposto pai é parente da mãe?</p> <p><input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Grau de Parentesco: _____</p>	
<p>Em caso de reconstrução indicar o vínculo de parentesco com o falecido:</p>	
 <p>Biocroma <small>LABORATÓRIO DE GENÉTICA</small></p> <p>Av. C-4, nº 488, Jardim América - CEP: 74205-040 Goiânia - GO Fones: (62) 3443-6162 / (62) 3092-7161 www.biocroma.com.br</p>	