

Maria de Fátima Terra Pinheiro

CONTRIBUIÇÃO DA PCR
NA INVESTIGAÇÃO
MÉDICO-LEGAL

PORTO 1997

Maria de Fátima Terra Pinheiro

**CONTRIBUIÇÃO DA PCR
NA INVESTIGAÇÃO
MÉDICO-LEGAL**

PORTO
1997

Maria de Fátima Terra Pinheiro

**CONTRIBUIÇÃO DA PCR
NA INVESTIGAÇÃO
MÉDICO-LEGAL**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas de “Abel Salazar”
da Universidade do Porto
para a candidatura ao grau de Doutor

1997

A meus Pais

A meu Marido

A meu Filho

NOTAS PRÉVIAS

É natural que as palavras fujam ao sentir a emoção perturbada que há sempre em cada um de nós, quando se atinge um limiar que, após labutas insanes e sofridas, consegue ultrapassar barreiras humanas que, quantas vezes, conduzem ao desalento e à falta de coragem.

Flaubert dizia que se vale mais pelas aspirações do que pelas obras.

Por isso, aqui estou a apresentar esta tese de doutoramento, a submeter à apreciação douta daqueles que, ao longo dos tempos, tão bem souberam dar vida à ciência e contribuir para o seu progresso.

Tudo fiz para que a confiança em mim depositada não fosse, em qualquer tempo, defraudada, e sempre quis que a dedicação e esforço jamais fossem descuidados, pela consciência plena da elevada responsabilidade que se me impunha.

Procurei trilhar caminhos que a experiência e estudo me ditavam e seguir conselhos que outros, de mais valia, amavelmente me trouxeram.

Penso ter feito - e muito humildemente o digo - um trabalho sério e tão profundo quanto possível.

Mas se - como diria *Virgílio* - muitas vezes se pode porque se julga poder - não é a mim que compete dizer muito mais sobre esta dissertação.

O tema escolhido reflecte uma preocupação de aperfeiçoamento numa área delicada do saber humano e porque de significativa relevância, especialmente para a região norte, o estudo das técnicas aplicáveis à investigação da paternidade e criminalística biológica sobeja de importância e interesse prático.

Foi Kary Mullis quem, ao descobrir, em 1985, a “ PCR “, e por esse facto ao desenvolver toda uma metodologia empregue em múltiplas áreas da

ciência, me despertou para a imperiosa necessidade de aprofundar o conhecimento genético da população do Norte de Portugal, já que as exigências decorrentes dos serviços a meu cargo me impunham a procura de soluções que cada vez mais se aproximassem da verdade científica.

Mas nada seria possível - agora orgulhosamente o digo - sem os ensinamentos sábios e os sublimes conselhos do Sr. Professor Doutor Pinto da Costa, Mestre que soube admirar desde os tempos, já longínquos, em que iniciei funções profissionais no Instituto de Medicina Legal do Porto, admiração que o tempo ajudou a sedimentar.

Reconheço que não é fácil definir quer o Homem quer o Professor, quando a amizade, o reconhecimento, a gratidão e a hierarquia se misturam e confundem.

Mas se é de justiça realçar o saber, a vida profissional, a determinação e empenho em modernizar os serviços que dirige e a divulgação da ciência em que é Mestre, é também caro salientar o amigo das horas difíceis, o Director determinado, o Professor conselheiro e orientador desta dissertação.

A ele, por tudo, o meu muito obrigado.

Mas será também de elementar justiça prestar a minha homenagem :

- Ao Ex^o. Senhor Professor Doutor Nuno Grande pela confiança demonstrada ao ter-me contratado como assistente da disciplina de Medicina Legal e Toxicologia Forense do Instituto de Ciências Biomédicas “ Abel Salazar “.
- Ao Professor Doutor Emili Huguet, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Barcelona, que aceitou co-orientar a realização deste trabalho e que me tem proporcionado a participação em investigações conjuntas.
- Ao Professor Doutor Manuel Gené, da mesma Faculdade, pela ajuda técnica, ensinamentos e colaboração constante.

- À Professora Doutora Marian Martinez de Pancorbo, da Faculdade de Medicina e Odontologia da Universidade do País Basco e sua família, pelas inesgotáveis provas de amizade, disponibilidade, colaboração e imensa paciência que sempre me dispensaram.
- À Professora Doutora Azucena Castro da mesma Faculdade, pela amizade e ajuda, especialmente no tratamento informático da base de dados da nossa amostra populacional.
- À Dra. Maribel Fernandez, da mesma Escola, pelo apoio e acompanhamento no estudo.
- Ao Professor Doutor Angel Carracedo, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Santiago de Compostela, que me acompanhou e apoiou nos primeiros passos da Biologia Forense.
- Ao Professor Doutor Luís Blasquez Caeiro, da Faculdade de Biologia da Universidade de Santiago de Compostela, pelos ensinamentos e conselhos, tão importantes no início de uma carreira.
- À Professora Doutora Maria José Carneiro de Sousa pelo apoio quanto às minhas competências pedagógicas, como assistente do ICBAS e o incentivo para que me submetesse às provas de doutoramento para prosseguir na carreira académica.
- A todos os funcionários do Instituto de Medicina Legal do Porto, pelo apoio recebido e muito em especial à Dra. Lurdes Pontes e Maria João Touro Pereira, e ao Sr. Ernesto Sequeira pela disponibilidade e cooperação na elaboração de textos desta tese.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Marcadores genéticos	5
A. Aplicação em casos de filiação.....	7
B. Aplicação ao estudo de manchas	8
1.2. Vestígios biológicos	8
1.2.1. Natureza dos vestígios	8
1.2.1.1. Manchas de sangue.....	9
1.2.1.2. Sémen	10
1.2.1.3. Outros vestígios	10
1.3. Polimorfismos do DNA	12
1.3.1. Polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLPs)	13
1.3.2. Estudo do DNA minisatélite.....	13
1.3.2.1. Estudo do DNA minisatélite via RFLP	13
A. DNA fingerprint	14
B. Sondas de locus único.....	16
Limitações da tecnologia multilocus e unilocus.....	16
1.3.2.2. Estudo do DNA minisatélite via MVR.....	18
1.3.3. Estudo dos loci VNTR e STR via PCR	19
1.3.3.1. Sistemas AMPFLP e STR estudados por PCR.....	22
1.3.3.2. Polimorfismos de sequência estudados por PCR	25
A. HLA DQA1	25
B. Polymarker	26
1.3.4. DNA mitocondrial.....	26
1.3.5. Outras alternativas	28
1.4. Genética populacional.....	29
1.5. Aspectos legais da aplicação da análise do DNA aos casos forenses	32
1.5.1. Legislação portuguesa	32
1.5.2. Recomendações e normas.....	37
1.5.2.1. Recomendações da ISFH.....	37
A. Recomendações de 1989	37
B. Recomendações de 1991.....	37
C. Recomendações de 1992.....	38
D. Recomendações de 1993	38
E. Recomendações de 1994.....	38
1.5.2.2. Recomendações e normativas do Grupo Espanhol e Português da ISFH ...	39
1.5.2.3. Conclusões da 5ª Reunião do grupo Luso-Espanhol de Hemogenética Forense	39
1.5.2.4. Recomendações N°R (92)I do Conselho da Europa - Comité de Ministros.	43

2. Objectivos e razões do estudo.....	49
3. Material e métodos	55
3.1. Amostras analisadas para o estudo populacional	57
3.2. Amostras de casos forenses	57
3.3. Extracção do DNA	58
3.3.1. Extracção de DNA de sangue periférico com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.....	59
3.3.2. Extracção de DNA de manchas de sangue com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.....	61
3.3.3. Extracção do DNA de sangue líquido ou m. de sangue com Chelex	62
3.3.4. Extracção do DNA de raízes de pêlos.....	62
3.3.5. Extracção do DNA de exsudatos vaginais ou manchas de esperma.....	63
3.4. Quantificação do DNA.....	65
3.4.1. Quantificação espectrofotométrica do DNA.....	65
3.4.2. Valorização fluorimétrica do DNA.....	65
3.5. Loci analisados por PCR: AMPFLP e STR.....	66
3.5.1. Amplificação do DNA	66
3.5.1.1. Primers.....	67
3.5.1.2. Misturas de reacção	69
3.5.1.3. Condições de amplificação.....	71
3.5.2. Marcadores de pesos moleculares	71
3.5.3. Comprovação da amplificação.....	72
3.5.3.1. Composição do gel	73
3.5.3.2. Preparação do gel.....	74
3.5.3.3. Preparação das amostras.....	74
3.5.3.4. Aplicação das amostras	74
3.5.3.5. Condições electroforéticas.....	74
3.5.4. Electroforese dos produtos amplificados.....	75
3.5.4.1. Composição do gel	75
3.5.4.2. Preparação do gel.....	78
3.5.4.3. Preparação das amostras.....	79
3.5.4.4. Aplicação das amostras	80
3.5.4.5. Condições electroforéticas.....	81
3.5.4.6. Revelação	82
3.5.4.7. Determinação da precisão (%) das análises efectuadas no sequenciador automático (ALF).....	83
3.5.5. Soluções	84
4. Análise estatística	87
4.1. Determinação do número de alelos.....	89
4.2. Heterozigocidade.....	89
4.3. Conteúdo em informação polimórfica (PIC)	90
4.4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	90
4.4.1. Teste exacto de Odelberg.....	90

4.4.2. Teste G	91
4.4.3. Teste Guo e Thompson	91
4.5. Teste de associação alélica	92
4.5.1. Desequilíbrio de ligamento.....	92
4.6. Comparações entre populações.....	92
4.7. Estatísticos F	93
4.8. Distâncias genéticas.....	94
4.8.1. Distâncias de Reynolds	94
4.9. Parâmetros de interesse médico-legal	95
4.9.1. Probabilidade de exclusão “a priori”	95
4.9.2. Probabilidade de discriminação/coincidência	97
4.9.3. Cálculo da probabilidade em criminalística.....	98
5. Resultados	101
5.1. Determinação da precisão (%) das análises efectuadas no sequenciador automático (ALF)	103
5.2. Distribuição das frequências dos loci AMPFLP e STR.....	104
5.2.1. Características da amostra populacional estudada	104
5.2.2. Frequências génicas dos loci AMPFLP e STR	107
5.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	112
5.4. Teste de associação alélica	113
5.4.1. Desequilíbrio de ligamento.....	113
5.5. Comparações populacionais.....	114
5.6. Estatísticos F	125
5.7. Distâncias genéticas.....	126
5.8. Aplicações médico-legais	129
5.8.1. Investigação de paternidade	129
5.8.1.1. Prova positiva de paternidade.....	131
5.8.1.2. Exclusão de paternidade	132
5.8.2. Criminalística	133
6. Discussão	139
6.1. Extracção e quantificação do DNA.....	143
6.2. Amplificação do DNA	145
6.3. Electroforese dos produtos amplificados	146
Vantagens do uso da tecnologia automatizada na análise de fragmentos.....	147
6.4. Análise genético-populacional.....	148
6.4.1. Distribuição das frequências dos sistemas AMPFLP e STR.....	148
6.4.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg	149
6.4.3. Equilíbrio de ligamento	150

6.4.4. Comparações populacionais.....	150
6.4.5. Estatísticos F.....	155
6.4.6. Distâncias genéticas	156
6.5. Aplicações médico-legais	157
7. Conclusões.....	159
8. Bibliografia.....	163

Abreviaturas

A	Adenina
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
AMPFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ASO	Allele Specific Oligoprobes
cm	Centímetro
dATP	Desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina 5'-trifosfato
dNTPs	Desoxirribonucleosídeo 5'-trifosfato
dp	Desvio padrão
dTTP	Desoxitimidina 5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ep	Erro padrão
Fig	Figura
G	Guanina
g.l.	Graus de liberdade
h	Hora
HVR	Highly Variable Regions
HWE	Hardy Weinberg Equilibrium
ISFH	International Society for Forensic Haemogenetics
m	Minutos
mg	Miligramas
ml	Mililitros
MLP	Multilocus Probes
mtDNA	DNA mitocondrial
MVR	Minisatellite Variant Repeat
ng	Nanograma
nm	Nanómetros
PAGE	Polyacrilamide Gel Electrophoresis
pb	Pares de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Poder de Discriminação
p.e.	Presente estudo

PIC	Conteúdo em Informação Polimórfica
p.m.	Peso molecular
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
r.p.m.	rotações por minuto
s	Segundos
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SLP	Single Locus Probes
STR	Short Tandem Repeats
T	Timina
TBE	Tris-Bórico EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
U.V.	Ultravioleta
U/ml	Unidades por mililitro
V	Volts
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar

1. INTRODUÇÃO

Entre as múltiplas actividades de um laboratório de Biologia Forense constam a realização de dois tipos de perícias: as referentes aos casos de filiação e as de criminalística biológica. A resolução destes casos, ou seja, a identificação genética pressupõe sempre o estabelecimento da individualidade biológica que cada ser humano representa e fundamenta-se na exclusividade do seu DNA e na igualdade e invariabilidade deste em todas as células do organismo ao longo da vida.

A identificação genética é, actualmente, de importância fundamental em Medicina Legal, tanto no que concerne à investigação biológica da paternidade como à identificação em criminalística.

As investigações de paternidade têm sido o tipo de exames mais frequentemente solicitados aos Institutos de Medicina Legal, que realizam mais de 200 perícias do género por ano. No Instituto de Medicina Legal do Porto verificou-se, um aumento considerável do número deste tipo de perícias, solicitadas pelos tribunais, particularmente a partir da década de 80.

O principal motivo do pedido de um tão elevado número de casos deve-se, sobretudo, à reforma do Código Civil Português, de 1977, nomeadamente ao artigo 1864º. Este obriga a que se proceda à averiguação oficiosa da paternidade nos casos em que o filho seja registado apenas com o nome da mãe.

O fundamento biológico da resolução destes casos assenta no facto de cada indivíduo resultar da união de dois gâmetas, um materno (óvulo) e outro paterno (espermatozóide) que dão origem à formação de uma célula, o zigoto, a partir da qual se desenvolvem vários biliões de células que compõem o organismo humano. Daqui resulta que cada indivíduo herda informação genética de ambos os progenitores e que cada uma das suas células possui essa informação. Por isso, a investigação biológica da paternidade consiste na análise do património genético que um filho herdou da mãe e do pai. Uma vez apurada a parte genética herdada da mãe, é necessário verificar se o resto da informação é transmitida pelo pretenso pai. Se este possui as características hereditárias transmitidas à criança não pode ser excluído da paternidade e o resultado é apresentado em probabilidade de paternidade. Se, pelo contrário, o indigitado não tem essas características é afastado da possibilidade de paternidade.

Relativamente aos exames do âmbito da criminalística biológica, nos últimos três anos, houve um acréscimo notável do estudo de vestígios biológicos em casos relacionados com crimes. Este incremento deveu-se, fundamentalmente, ao melhor poder informativo proporcionado, uma vez que se dispõe, actualmente, de técnicas mais sensíveis. Estas perícias consistem no estudo dos vestígios e comparação das suas características genéticas com as da vítima e suspeito. A sua identificação e caracterização têm grande interesse, uma vez que, habitualmente, são transferidos fluídos orgânicos e secreções entre o criminoso e a vítima. Acresce ainda a sua importância na identificação individual a partir de restos cadavéricos, como ossos ou tecidos mumificados.

Durante muitas décadas, a nível médico-legal usaram-se os marcadores genéticos convencionais, designadamente antigénios eritrocitários, enzimas eritrocitárias, proteínas séricas e antigénios HLA, na resolução dos casos. A maior parte destes marcadores são proteínas que, para além da sua escassa estabilidade, possuem um baixo polimorfismo, isto é, apresentam poucas variedades alélicas, o que reduz o seu poder de discriminação.

Actualmente, a Medicina Legal dispõe de uma nova tecnologia que se baseia na variabilidade dos ácidos nucleicos das células, polimorfismos do DNA, cuja importância fundamental reside no facto de se estudar a individualidade biológica directamente do código genético ao contrário das proteínas, cuja caracterização depende da sua expressão em tecidos e fluídos biológicos. É para notar que o DNA está presente em todas as células nucleadas do organismo humano (DNA nuclear) e que esse DNA é, basicamente, idêntico em todas as células do mesmo indivíduo. Têm sido desenvolvidos métodos de extracção do DNA que permitem, por exemplo, separar DNA de células espermáticas (suspeito) das células vaginais (vítima) em casos de violação em que o perito dispõe do exsudato vaginal da vítima ou de manchas existentes em peças de vestuário (Gill e col., 1985; Giusti e col., 1986).

O estudo do DNA constitui hoje uma tecnologia que é admitida internacionalmente como prova pericial em tribunal, permitindo a resolução de casos de filiação complexos, como, por exemplo, casos de investigação de paternidade em que a mãe ou o pretense pai faleceram, quando existe a possibilidade do estudo de familiares próximos; o estudo de restos cadavéricos e a comparação das suas características genéticas com as do sangue, também, de familiares próximos; e ainda casos de filiação em que se dispõe de restos fetais resultantes de aborto ou infanticídio, em que se pretende identificar o autor do crime.

Tem sido especialmente na resolução de casos relativos à criminalística biológica que aquela tecnologia tem demonstrado revelar uma importância fundamental, uma vez que na maioria dos casos relacionados com crimes o perito dispõe de uma quantidade exígua de DNA, apresentando-se muitas vezes degradado.

A admissibilidade jurídica da utilização das técnicas de tipagem do DNA, contudo, tem sido nalguns casos alvo de controvérsias, designadamente, desde o famoso caso Castro (*People v. Castro*, 1989), relativamente à própria metodologia empregue, à interpretação dos resultados e aos métodos estatísticos utilizados, tais como, o equilíbrio de Hardy-Weinberg, a homogeneidade populacional e o equilíbrio de ligamento entre loci (Lander, 1989; Lewontin e Hartl, 1991; Chakraborty e Kidd, 1991).

O primeiro passo para obviar os problemas atrás referidos foi o desenvolvimento de metodologias que não suscitassem problemas de interpretação e que permitissem uma classificação exacta dos alelos dos diferentes polimorfismos. Em seguida, surgiram inovações relativas aos métodos estatísticos utilizados na análise dos resultados, proporcionando conclusões mais aproximadas à realidade biológica. Esta evolução conjunta dos métodos laboratoriais e estatísticos empregues na resolução de perícias médico-legais permite, actualmente, a obtenção de resultados que eram impensáveis há ainda escassos anos.

1.1. MARCADORES GENÉTICOS

Antes de 1985, tanto as investigações biológicas de paternidade como a análise de amostras biológicas com outro interesse médico-legal eram resolvidas mediante o estudo, fundamentalmente, de proteínas.

Desde a primeira sugestão feita por Landsteiner e Richter, no princípio deste século (1903), de que a caracterização do sistema ABO podia ser usada em medicina legal, para identificação de manchas de sangue e exclusão de paternidade, que uma considerável variedade de polimorfismos proteicos foram sendo descobertos, baseados, principalmente, na variação dos determinantes antigénicos e das proteínas que se encontram no sangue humano e outros fluídos biológicos. Para a caracterização daqueles sistemas polimórficos são usados vários métodos, como técnicas de aglutinação, em que se utilizam antisoros que possuem

anticorpos correspondentes aos antígenos da membrana dos eritrócitos (Wiener e Socha, 1976) e a electroforese para o estudo de proteínas.

Entre os sistemas do grupo dos antígenos eritrocitários referem-se os seguintes, alguns dos quais ainda se usam, nalguns laboratórios: Antígenos MN (Landsteiner e Levine, 1927) e Ss (Walsh e Montgomery, 1947) do sistema MNS; sistema P (Levine e Landsteiner, 1927); sistema Rh (Landsteiner e Wiener, 1940); sistema Kell (Coombs, Mourant e Race, 1946); sistema Lutheran (Callender e Race, 1946); sistema Duffy (Cutbush, Mollison e Parkin, 1950); sistema Kidd (Allen, Diamond e Niedzela, 1951).

Relativamente às proteínas, são seleccionadas as que apresentam variações pontuais ao nível da sua estrutura molecular primária. Cada proteína é constituída por sequências diferentes de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Como existem 20 aminoácidos diferentes há muitas proteínas distintas, cuja estrutura determina a sua especificidade e define a sua função biológica. Por outro lado, como os aminoácidos podem actuar como ácidos ou como bases, proporcionam propriedades eléctricas diferentes às proteínas, tendo em consideração que a carga eléctrica da proteína é a soma de todas as cargas dos resíduos laterais e que o pH do meio influencia a carga da molécula. Estas propriedades eléctricas são fundamentais para o seu estudo (electroforese).

As seroproteínas polimórficas mais utilizadas são: Proteína Específica de Grupo (Hirschfeld, 1959); Transferrina (Smithies, 1957); Orosomucóide (Schmid, 1962); α 1-antitripsina (Laurell e Eriksson, 1963); Haptoglobinas (Smithies e Wallser, 1955); Plasminogénio, Factor 3 do Complemento, Amilase (Ward e col., 1971).

As enzimas eritrocitárias são estudadas usando técnicas electroforéticas similares às das proteínas séricas. A forma como são detectadas fundamenta-se na sua actividade enzimática, que é posta em evidência, usando um substracto que é colocado sobre a superfície do gel, após a separação electroforética. Entre estes sistemas, destacam-se: Fosfatase Ácida Eritrocitária (Hopkinson, 1963); Fosfoglucomutase (Spencer, 1964); Transaminase pirúvica (Chen e Giblett, 1971); Glioxalase, Adenilato Cinase (Fildes e Harris, 1966).

O sistema HLA (Human Leucocyte Antigen) é o sistema mais informativo dos marcadores genéticos convencionais, tendo sido descrito por Dausset e col., em 1967. Os genes que codificam para os antígenos deste sistema

situam-se no braço curto do cromossoma 6 e dividem-se em duas classes I e II. Os de classe I ocupam os loci A, B e C. Os de classe II, os loci DR, DP e DQ. Como os loci se encontram no cromossoma muito próximos uns dos outros os antígenos são herdados em bloco, haplótipo. A caracterização destes antígenos faz-se nos linfócitos pela técnica de linfocitotoxicidade, usando-se uma bateria de antisoros de especificidade conhecida. Se se usar apenas os haplótipos dos loci A e B deste sistema a probabilidade média de exclusão é de 84.3% e combinado com os antígenos eritrocitários, proteínas séricas e enzimas eritrocitárias, aquele valor atinge os 99.96% (Carracedo, 1981).

Hoje, a utilidade dos marcadores genéticos convencionais tem um interesse limitado, por serem sistemas pouco polimórficos, com a excepção do sistema HLA. Na análise de vestígios, a insuficiente quantidade de amostra, o seu estado de degradação e a sua contaminação ou mistura de amostras provenientes de vários indivíduos, constituem obstáculos à resolução dos casos. Teoricamente, em amostras de sangue seco apenas se podem caracterizar o grupo sanguíneo ABO, as seroproteínas: Haptoglobinas (Hp), Proteína Específica de Grupo (Gc) e a Transferrina (Tf) e as enzimas eritrocitárias: Glioxalase (Glo), Esterase D (EsD), Peptidase A (PepA), Fosfatase Ácida Eritrocitária (AcP), Adenilato Cinase (AK) e a Fosfoglucomutase (PGM). No entanto, na prática, não se obtêm resultados de todos estes polimorfismos, como, por exemplo, nos casos de violação, pois apenas se pode tipar no semén o sistema ABO e a PGM, o que é notoriamente insuficiente para a identificação do criminoso (Sajantila e Budowle, 1991).

A. Aplicação em casos de filiação

A determinação da paternidade tem sido um tema que tem suscitado certa curiosidade e controvérsia ao longo dos tempos. A resolução destes casos, com meios científicos apropriados, teve como base a descoberta dos princípios da herança biológica, feita por Mendel, em 1866.

Nestes casos, o laboratório dispõe de material suficiente para efectuar o estudo de um grande número de marcadores genéticos e as amostras a estudar são colhidas e acondicionadas nas condições ideais. No entanto, para se obter um poder informativo suficiente, por forma a concluir-se adequadamente um relatório, é necessária a caracterização de um número relativamente elevado de marcadores, o que torna estes estudos muito

laboriosos e demorados. Foi a partir dos anos 70 que, com a aplicação conjunta de vários sistemas do grupo dos marcadores genéticos convencionais à investigação biológica de paternidade, se conseguiu obter garantias suficientes quanto ao valor de probabilidade de paternidade (P.P. > 99.73).

B. Aplicação ao estudo de manchas

As técnicas usadas para o estudo de polimorfismos proteicos foram desenvolvidas, sobretudo, para amostras de sangue líquido em condições laboratoriais controladas, tendo sido algumas delas adaptadas ao estudo médico-legal, nomeadamente de sangue seco. Contudo, as manchas de sangue chegam ao laboratório em diferentes espécies de substratos e algumas vezes contaminadas por material biológico (microrganismos) ou por outro material, como terra (Budowle e Allen, 1987). Para além de que ao envelhecerem, algumas enzimas perdem a sua actividade e a maior parte dos antigénios não podem ser detectados (Denault e col., 1980). Nos casos de violação em que os marcadores disponíveis são escassos e algumas proteínas como a Peptidase A, são apenas polimórficas em certos grupos étnicos (negros), os métodos serológicos, em regra, não permitem obter resultados conclusivos.

Por isso, actualmente, procede-se ao estudo do DNA dos vestígios biológicos, pois para além dos sistemas usados serem mais informativos, os métodos serológicos, não permitem obter resultados conclusivos.

1.2. VESTÍGIOS BIOLÓGICOS

1.2.1. Natureza dos vestígios

De acordo com a definição de Villanueva Cañadas (1991), “Criminalística é a ciência que estuda os indícios deixados no local do delito, graças aos quais se pode estabelecer, nos casos mais favoráveis, a identidade do criminoso e as circunstâncias que concorreram para o referido delito”.

O interesse médico-legal da criminalística reside no facto de se procurar vestígios anatómicos, biológicos ou humorais que permitam estabelecer a identidade do autor do crime. Todavia, os referidos vestígios encontrados na cena do crime são de natureza muito diversa, e, por isso, para a sua recolha deviam participar indivíduos especializados, designadamente,

polícias, médicos, peritos em balística e impressões digitais e técnicos do laboratório onde são efectuados os exames, ou indivíduos com informação suficiente por forma a fazerem a colheita e o acondicionamento dos vestígios nas melhores condições.

É para notar que o êxito do trabalho laboratorial depende da forma como os vestígios foram recolhidos, acondicionados e enviados. É também de grande importância a selecção adequada das amostras a estudar, pois não raras vezes é recebido material que não tem qualquer interesse médico-legal e que o perito tem que analisar, constituindo este tipo de exames uma mera perda de tempo.

Para a análise do DNA é necessário qualquer tipo de mancha ou produto que contenha material genético. Este material genético ou DNA encontra-se em todas as células nucleadas do organismo e possui características importantes para a sua aplicação em estudos de identificação, já que o DNA é único para cada indivíduo, como foi anteriormente referido, e é idêntico em todas as células do organismo de um mesmo indivíduo. Ou seja, estudando qualquer vestígio biológico podemos identificar o indivíduo ao qual esse vestígio pertence.

Os vestígios encontrados com mais frequência, com interesse médico-legal, são: manchas de sangue e sêmen.

1.2.1.1. Manchas de sangue

O sangue é o tipo de amostra mais frequentemente analisada, tanto no estado líquido como em mancha seca. O DNA é extraído dos leucócitos do sangue, uma vez que os eritrócitos são células anucleadas. Esta extracção é efectuada mediante diferentes protocolos, sendo os mais usados os que utilizam o fenol-clorofórmio (Smith e col., 1990) ou o Chelex (Singer-Sam e col., 1989).

Aquelas manchas podem encontrar-se em suportes porosos e absorventes existentes na cena do crime, como sofás, tapetes, alcatifas e mesmo na roupa da vítima ou do autor do crime; ou em suportes não porosos, como por exemplo diferentes tipos de revestimentos de chão ou paredes de residências, vidros ou cerâmicas.

1.2.1.2. Sémen

O sémen é a seguir ao sangue um dos vestígios mais estudados, o que se deve ao facto de haver muitos casos de suspeita de violação registados na casuística do Instituto de Medicina Legal do Porto. O DNA é extraído dos espermatozóides, por isso é conveniente efectuar, em primeiro lugar, uma confirmação microscópica da sua existência na amostra a analisar.

Na grande maioria dos casos estudados, a amostra presente para exame é o exsudato vaginal da violada, que é colhido aquando do exame efectuado no Serviço de Clínica Médico-Legal deste Instituto. No entanto, também pode haver sémen em peças de vestuário da vítima ou do agressor ou no local onde ocorreu a violação, tanto em suportes porosos como não porosos.

O facto das amostras de sémen poderem estar misturadas com outro tipo de produtos biológicos da vítima ou de haver mistura de sémen de dois ou mais indivíduos, não constitui problema para a resolução dos casos. Actualmente, há metodologias que permitem a separação eficiente do DNA dos espermatozóides do DNA das células do epitélio vaginal da violada e, no caso de mistura de sémen de mais de um indivíduo, a análise de DNA possibilita a detecção e identificação dos indivíduos.

1.2.1.3. Outros vestígios

Os pêlos são outro tipo de vestígio biológico frequentemente analisado (Higuchi e Blake, 1989). Estes podem aparecer em peças de vestuário, nas mãos da vítima, ou ainda na cena do crime e devem ser recolhidos e acondicionados com precaução, pois podem ser provenientes de pessoas distintas.

O DNA dos pêlos está particularmente concentrado na raiz, pelo que os pêlos arrancados dão melhores resultados, pois, na generalidade dos casos, possuem células do folículo piloso, o que permite obter DNA. Em condições ideais pode-se obter até 0.5 µg de DNA de um só pêlo, sendo a quantidade normalmente conseguida de 200 ng em cabelos recentemente arrancados e cerca de 10 ng em cabelos caídos (Higuchi e col., 1988). É para notar que a quantidade de DNA existente na raiz de um pêlo varia de pessoa para pessoa e na mesma pessoa é também variável consoante o local da sua proveniência (cabeça, barba, púbis, etc.).

Aquando da realização da extracção do DNA de pêlos deve-se ter em consideração o facto da existência de melanina na sua composição. Esta constitui um factor inibidor da amplificação, pelo que se deve, preferencialmente, usar apenas as raízes.

A saliva não contém células, mas, por transportar células epiteliais da cavidade bucal, possui DNA.

As amostras que tenham saliva, como filtros de cigarros fumados, garrafas ou latas de refresco e ainda selos ou envelopes, são susceptíveis de identificar o autor do crime (Walsh e col., 1992). As mais frequentes são as pontas de cigarros que, não raras vezes, aparecem no local do crime.

A identificação dos restos cadavéricos através do estudo do material genético depende do estado de preservação o qual, varia com o tempo decorrido desde a morte e de outros factores ambientais, sendo os mais adversos a humidade e a temperatura. Se estes restos forem encontrados submersos a possibilidade de se conseguir bons resultados é remota, uma vez que o estado de degradação é muito maior.

Como na maioria dos casos não se dispõe de sangue, o material que se estuda, é músculo ou osso, mesmo que tenha decorrido bastante tempo após a morte (Pääbo, 1985; Hagelberg e Clegg, 1991).

Como restos postmortem também se podem estudar os dentes (polpa dentária), que representam elementos importantes na identificação genética em casos de incêndio em que as partes do organismos mais preservadas são as peças dentárias (Andersen e col., 1995), em locais onde ocorreram grandes catástrofes em que exista um grande número de mortos e ainda em casos de afogamento.

O material fetal é usado, na maioria dos casos, no esclarecimento de casos de investigação biológica de maternidade em que há suspeita do feto ter sido abandonado pela mãe.

As amostras procedentes de tecidos fetais devem ser rapidamente congeladas para evitar a sua degradação e contêm quantidades apreciáveis de DNA, susceptíveis de serem analisadas, designadamente em casos de paternidade (Wiegand e col., 1991).

1.3. POLIMORFISMOS DO DNA

Os polimorfismos proteicos são o reflexo da variação das sequências codificantes do DNA. O genoma humano contém o código para 30.000-100.000 genes distribuídos numa pequena percentagem dos cerca de três bilhões de nucleótidos do genoma haplóide.

As características que proporcionam a base da identificação genética assentam na individualidade biológica de cada ser humano.

A ideia da identificação genética através da análise do DNA não surgiu até cerca de seis anos após a descoberta dos primeiros polimorfismos. Nos finais dos anos 70, o interesse de mapear, exaustivamente, o genoma, com a finalidade de acelerar a localização dos genes responsáveis pelas doenças hereditárias humanas, provocou o interesse no desenvolvimento de um grande número de marcadores altamente polimórficos, permitindo a localização dos genes, mediante ligamento genético a marcadores conhecidos, sendo possível o diagnóstico precoce das referidas doenças. Assim, em 1980 surgiu, como nova proposta, o mapa de ligamento genético dos cromossomas humanos baseado no estudo de polimorfismos hereditários de tamanho dos fragmentos de restrição, produzidos por endonucleases de restrição, os RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein e col., 1980).

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é uma molécula biológica complexa existente no núcleo das células (DNA nuclear) ou nas mitocôndrias (DNA mitocondrial). A informação genética para cada uma das proteínas e através delas, para cada uma das nossas funções biológicas, está contida em porções (sequências) de DNA, os genes. É no estudo das proteínas codificadas pelos respectivos genes que se baseia o estudo dos marcadores genéticos convencionais. No entanto, como já foi referido, elas apresentam um interesse limitado. O DNA de todos os genes, ou seja, as sequências codificantes (DNA expressivo ou codificante) constitui apenas uma parte do DNA total.

Algumas sequências não codificantes (DNA não expressivo, não codificante ou heterocromatina), cuja função biológica ainda não está perfeitamente estabelecida, encontram-se repetidas em "tandem", isto é, uma sequência de pares de bases (pb), seguida de outra sequência idêntica e assim sucessivamente. Estas regiões hipervariáveis são chamadas minisatélites ou loci VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) (Nakamura e col., 1987), se as sequências são constituídas por 10-70 pb

que se repetem entre 20 e 60 vezes e microsátélites ou loci STR (Short Tandem Repeats) se as sequências são apenas constituídas por 2-7 nucleótidos que se repetem também várias vezes (Edwards e col., 1991a; Edwards e col., 1992).

1.3.1. Polimorfismos de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLPs)

Os RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) resultam da actuação de enzimas de restrição, que são endonucleases que reconhecem e cortam sequências específicas de bases na dupla cadeia de DNA. Estes fragmentos de restrição podem ser analisados por electroforese em gel de agarose seguida de Southern blot (transferência) e hibridação com uma sonda marcada (Southern, 1975).

Os RFLPs detectam variações na sequência do DNA devidas à substituição de um par de bases ou a mecanismos de inserção-delecção que criam ou eliminam um local de corte da enzima de restrição. Deste modo, produz-se uma alteração no tamanho dos fragmentos de DNA. Neste tipo de polimorfismos só há dois alelos possíveis, dependendo da presença ou ausência do local de corte da enzima de restrição (Botstein e col., 1980).

Os RFLPs são muito utilizados, como marcadores genéticos bialélicos, no diagnóstico pré-natal de doenças genéticas, uma vez que podem ser utilizados como marcadores ligados a genes causadores de doenças. No entanto, são pouco informativos nos casos médico-legais, já que seria necessário o estudo de um número elevado de RFLPs para que fosse possível tirar conclusões, demonstrando apenas vantagens relativamente aos marcadores genéticos convencionais (Gené e col., 1991).

1.3.2. DNA Minisatélite

1.3.2.1. Estudo do DNA minisatélite via RFLP

Apenas um número reduzido de RFLPs é multialélico, possuindo um poder informativo considerável. O primeiro locus hipervariável descrito (D14S1) foi detectado, por acaso, utilizando uma sonda de DNA arbitrária (Wyman e White, 1980). Posteriormente, foram identificadas outras regiões

hipervariáveis em distintos loci, como, por exemplo, o gene da insulina humana (Bell e col., 1982; Ulrich e col., 1982). Apesar do número total de loci hipervariáveis no DNA humano ser desconhecido, supunha-se que poderia conter pelo menos 1500 regiões altamente variáveis.

A análise das sequências nucleotídicas destas regiões revelou que a natureza estrutural dos seus polimorfismos era a presença de um número variável de nucleótidos repetidos em "tandem" (loci VNTR).

Aquelas sequências podem estudar-se mediante o uso de enzimas de restrição, cuja diana não se encontra dentro das unidades de repetição. O tamanho dos fragmentos de restrição é função do número de cópias presentes nos loci estudados. Este tipo de polimorfismo é determinado pelo número variável de unidades de repetição (alelos) que, à semelhança dos marcadores convencionais, são herdadas segundo as leis de Mendel, sendo mais informativo do que o anteriormente descrito, isto é, do que os RFLPs produzidos por troca de um par de bases (bialélicos).

A. DNA fingerprint (sondas multilocus)

A descoberta por Jeffreys e col. (1985a) de uma "região minisatélite" no primeiro intrão do gene da mioglobina humana marcou o começo da aplicação dos sistemas de DNA altamente polimórficos na identificação de indivíduos. Como foi atrás referido, o termo minisatélite refere-se a sequências de 10-70 pb, com uma unidade central chamada "core". As unidades de repetição dos minisatélites em vários loci apresentam sequências de bases similares, embora não idênticas.

A detecção das sequências faz-se com a utilização de sondas "policore" (multilocus), nas quais existe uma complementaridade apreciável, embora não total, entre a sequência de interesse e a sonda, pelo que se diz que a sonda é constituída por uma sequência "consensus". Ao modelo resultante do Southern blot, com a forma semelhante ao código de barras dos produtos existentes, por exemplo, num hipermercado, denomina-se DNA fingerprint (impressão digital genética) (Jeffreys e col., 1985 a,b), porque a sua especificidade individual é semelhante às impressões digitais. As sondas deste tipo que oferecem maiores vantagens são as denominadas por Jeffreys e col., 33.6 e 33.15, que detectam conjuntos de loci hipervariáveis diferentes, pelo que os DNA fingerprints obtidos podem considerar-se independentes.

Teoricamente, o número de bandas detectadas no DNA fingerprint seria muito elevado. Contudo, as limitações técnicas permitem apenas obter 15 a 40 bandas. Apesar deste número ser relativamente reduzido, a sua capacidade informativa é alta, pois a probabilidade de dois indivíduos não relacionados compartilharem todas as bandas é muito baixa, isto é, usando duas sondas é de 5.4×10^{-21} , o que permite concluir que os DNA fingerprints são específicos de cada indivíduo, com excepção dos gémeos monozigóticos (Jeffreys e col., 1985b).

Os modelos de DNA fingerprint mostram estabilidade somática e são idênticos nos gémeos monozigóticos. Apenas foram observados dois exemplos de variação somática, num dos quais foram detectadas pequenas alterações entre tecidos, usando determinadas enzimas de restrição. Esta variação no DNA fingerprint surgiu, provavelmente, pela diferença de metilação dos tecidos e pode ser obviada, utilizando-se enzimas de restrição que não sejam bloqueadas por aquele processo. A segunda excepção à estabilidade somática pode surgir em tumores.

O DNA fingerprint pode obter-se a partir de quantidades reduzidas como, por exemplo, 50 µl de sangue, 5 µl de sémen ou 15 raízes de cabelos. Se o DNA se mantiver suficientemente intacto é possível obter-se o DNA fingerprint a partir de sangue seco, manchas de sémen com 5 anos de antiguidade e de esperma de lavagens vaginais até 7 horas após a relação sexual (Gill e col., 1985). Esta metodologia constituiu uma grande inovação no campo das violações, porquanto o poder informativo obtido é bastante superior ao dos marcadores genéticos convencionais.

É também um método para o estabelecimento de relações familiares, por exemplo, em casos de disputa de paternidade (Jeffreys e col., 1985b). Comparando os DNAs fingerprint da mãe e do filho, é possível identificar os fragmentos de DNA ausentes na mãe e herdados do pai biológico. A possibilidade de um indivíduo, tirado ao acaso da população, possuir as mesmas bandas que o pai biológico é extremamente baixa (10^{-6} a 10^{-9}). Assim, pode estabelecer-se a paternidade com um grau de certeza que excede o que era possível obter com os marcadores genéticos convencionais (Dodd, 1985). Este método de estudo do DNA foi, também, usado em casos de imigração, quando o objectivo da análise era estabelecer se havia ou não grau de parentesco entre pessoas que pretendiam introduzir-se num país, na ausência de elementos de identificação apropriados. Dependendo dos familiares disponíveis, é também possível efectuar o estudo, quando o pai biológico já tenha

falecido, fazendo a análise em indivíduos com ele aparentados, para reconstruir o DNA fingerprint do pai faltoso.

B. Sondas de locus único

A técnica anteriormente referida é difícil de executar mesmo por um biologista molecular competente e a interpretação dos padrões de bandas gerados no DNA fingerprint requer bastante experiência. Contrariamente ao procedimento multilocus, uma sonda minisatélite de locus único detectará, para cada indivíduo, um máximo de duas bandas, se ele é heterozigótico e uma só banda se é homozigótico.

Estas sondas apresentam a grande vantagem de proporcionarem resultados, cuja leitura é menos complexa, permitindo, por outro lado, a determinação de frequências alélicas de locus específicos (Baird e col., 1986; Odellberg e col., 1989; Budowle e col., 1991; Deka e col., 1991).

Têm sido usadas várias probes unilocus que geram um DNA fingerprint similar ao das sondas multilocus. Se os referidos loci não estiverem em desequilíbrio de ligamento, a probabilidade combinada de que dois indivíduos não relacionados possuam o mesmo genótipo assemelha-se à probabilidade obtida pelas sondas multilocus (Wong e col., 1987).

Aprofundando o nível de variabilidade dos loci VNTR, a análise da sequência demonstrou que as unidades de repetição, num determinado minisatélite, raramente eram idênticas, isto é, essas unidades apresentavam, geralmente, certa variação na referida sequência (Wong e col., 1986, 1987).

Limitações da tecnologia multilocus e unilocus

As duas metodologias anteriormente referidas são empregues, por alguns laboratórios, na resolução de casos médico-legais, revestindo, contudo, algumas limitações.

As sondas multilocus hibridam com amostras não humanas, designadamente de plantas, de peixe e de gado (Georges e col., 1988), de cães (Jeffreys e Morton, 1987) e de arroz (Dallas, 1988). Isto pode

constituir um problema na análise de manchas para efeitos forenses, particularmente nos casos em que as referidas manchas pertençam a um animal doméstico ou de quinta. Pelo contrário, as sondas unilocus apenas revelam a existência de reacções cruzadas com o DNA de alguns primatas (Wong e col., 1990; Wolff e col., 1991; Watson e col., 1992).

No que se refere à quantidade de DNA requerida para análise, as sondas multilocus necessitam de pelo menos 500 ng de DNA (Jeffreys e col., 1985a), enquanto as sondas de locus único precisam de 60 ng de DNA (Wong e col., 1987). Todavia, a quantidade requerida em ambos os casos é apreciável, sobretudo na análise de vestígios, pois quando a quantidade de DNA é exígua, não é possível a realização de uma contraprova.

Em ambos os casos, o DNA não deve estar degradado, constituindo a degradação uma limitação acrescida à análise, porquanto, na maioria dos casos, raramente se obtém DNA de alto peso molecular. Foi demonstrado que a estabilidade do DNA em manchas de sangue revelou que apenas 41% das amostras continham DNA de alto peso molecular, enquanto que em 48%, o DNA se encontrava degradado ou não detectável (McNally e col., 1989).

Acresce ainda que, no caso das sondas multilocus, quando existe mistura de amostras provenientes de dois ou mais indivíduos, é difícil a interpretação dos resultados. É também um problema a sua aplicação, na investigação de paternidade, pois nos casos em que não há exclusão, torna-se muito complicado o cálculo da probabilidade de paternidade, porquanto certas bandas correspondem a loci ligados, impedindo a aplicação da regra do produto.

Existem outras dificuldades associadas ao uso do Southern blot na análise das regiões VNTR, como seja a baixa resolução para pequenas diferenças de tamanho entre fragmentos de DNA relativamente grandes (Baird e col., 1986; Boerwinkle e col., 1989; Odelberg e col., 1989), bem como as diferenças de migração do DNA num gel de agarose, por exemplo, "band shifting" (Lander, 1989; McNally e col., 1990), o que faz com que seja difícil a estandardização entre laboratórios.

Não obstante os esforços de diferentes laboratórios, no sentido da utilização de protocolos e metodologias idênticas, nem sempre é possível a determinação da distribuição exacta das frequências, para a maioria dos loci VNTR, mas apenas uma distribuição "quasi-continuous", o que é

devido às diferenças de mobilidade dos fragmentos no mesmo gel e em diferentes geis (Gill e col., 1990; Geisser e Johnson, 1992).

Em ambos os casos a técnica é laboriosa e demorada, não sendo possível a obtenção de resultados rápidos, o que constitui uma limitação em muitas situações em que a rapidez da análise é um factor importante, particularmente, nos casos do âmbito da criminalística biológica.

1.3.2.2. Estudo do DNA minisatélite via MVR

Os MVR (Minisatellite Variant Repeat) são polimorfismos de sequência descritos pela primeira vez por Jeffreys e col. em 1991 e a sua análise baseia-se no estudo das variações entre as sequências de diferentes unidades de repetição no locus D1S8, que é reconhecido pela sonda MS32.

A análise da sequência de alguns minisatélites demonstrou que as unidades de repetição dentro de cada minisatélite raras vezes são todas iguais, mostrando um certo grau de divergência entre elas (Wong e col., 1986 e 1987). Há evidências de que os loci que possuem um maior grau de variabilidade no número de cópias mostram um baixo nível de variabilidade nas sequências das suas unidades. Este facto, possivelmente, é consequência de uma homogeneização da sequência das unidades devido a fenómenos, como a recombinação desigual ou conversão génica.

Jeffreys e col., (1990, 1991) demonstraram a existência de duas classes de unidades de repetição que diferiam uma da outra na presença ou ausência de um local de restrição para a enzima Hae III. Os padrões de disposição destas unidades nos alelos do locus detectado pela sonda MS32 podem ser analisados por PCR, mediante a amplificação separada dos fragmentos resultantes em cada um dos tipos de unidades. A comparação de ambas as amplificações permite o estabelecimento de um código que identifica o par de alelos presente no DNA genómico de um indivíduo. Os autores encontraram 337 alelos com uma frequência alélica máxima de 0.009.

Não obstante o seu alto poder de discriminação a aplicação dos MVR à resolução de casos médico-legais tem um interesse limitado.

Assim, relativamente aos casos de filiação, a elevada taxa de mutação do locus D1S8 e a necessidade de identificar correctamente unidades de

repetição que parecem não corresponder a nenhuma das duas classes referidas, constituem alguns dos problemas no seu uso.

Relativamente à resolução de casos do âmbito da criminalística, os MVR mostram-se pouco eficientes, porquanto exigem uma quantidade apreciável de DNA, pelo menos 100 ng, para proporcionar um código completo e que o DNA não se encontre degradado, para permitir a tipagem correcta dos alelos de maior peso molecular.

1.3.3. Estudo dos loci VNTR e STR via PCR

Apesar da análise dos polimorfismos de DNA repetitivo via RFLP ter revolucionado a resolução dos casos médico-legais, o seu emprego levantou alguns problemas técnicos, como foi anteriormente referido, para além das dificuldades relativas ao cálculo das frequências dos alelos e aspectos bioestatísticos de elaboração dos resultados.

As limitações técnicas da metodologia anterior, nomeadamente o facto da técnica ser laboriosa e demorada exigir quantidades apreciáveis de DNA não degradado e a impossibilidade de distinção de alelos que diferem em poucas unidades de repetição, foram ultrapassadas com a aplicação de uma técnica, surgida em 1985, e descrita por Kary Mullis - a PCR (Polymerase Chain Reaction).

Esta técnica baseia-se na amplificação enzimática *in vitro* de um fragmento de DNA de interesse (target) que é flanqueado por 2 "primers" que hibridam com as extremidades 3' da dupla cadeia. Ciclos repetidos, consistindo na desnaturação do DNA, "annealing" dos "primers" e sua extensão, originam em cada ciclo a duplicação da sequência inicial, correspondendo a um crescimento exponencial da referida sequência. Isto é, decorridos 20 ciclos, o DNA em estudo delimitado pelos "primers", cuja sequência de bases foi previamente seleccionada, estará amplificado cerca de 1 milhão de vezes.

Nas primeiras experiências foi usado o fragmento Klenow da DNA Polimerase I da *Escherichia Coli* com uma extensão a 37°C. Todavia, após cada desnaturação tinha que ser adicionada enzima fresca, pois aquela não era resistente a temperaturas elevadas usadas na desnaturação do DNA (Mullis e col., 1986). O isolamento e clonagem de uma DNA polimerase termoestável, a partir da bactéria *Thermus aquaticus*, tornou possível

juntar a enzima antes do primeiro ciclo da reacção, sem necessidade de posteriores adições.

A automatização do processo, com a utilização dos termocicladores, proporcionou a simplificação de todo o procedimento (Saiki e col., 1988; Lawyer e col., 1989), constituindo também uma importante inovação.

Seguiu-se ainda, a melhoria da especificidade da reacção, usando temperaturas mais elevadas no "annealing" e extensão e o aumento da produção global na amplificação do DNA em estudo.

O uso da técnica de PCR requer que seja conhecida, pelo menos, a sequência de DNA que rodeia a região de interesse, para ser possível a construção dos "primers" usados na amplificação. Isto é, conhecendo-se a referida sequência, é possível escolher os "primers" por forma a permitirem a delimitação directa do local polimórfico.

Para os polimorfismos de inserção/delecção podem ser detectadas pequenas diferenças de um a dois nucleótidos, quando o fragmento amplificado é suficientemente pequeno para permitir a distinção num gel de electroforese de alto poder de resolução (Weber e May, 1989; Litt e Luty, 1989; Economou e col., 1990). Este alto poder de resolução é aplicável às regiões VNTR.

A variação do comprimento entre os alelos num determinado locus VNTR pode ser facilmente detectada por separação dos produtos amplificados, segundo o seu tamanho num gel analítico. Assim, os produtos amplificados podem ser analisados num gel de agarose com brometo de etídio ou num gel de poli-acrilamida com coloração de prata, uma vez que os alelos estão suficientemente amplificados, ficando superado o problema da sensibilidade que obrigava à utilização de substâncias radiactivas na análise dos loci VNTR via RFLPs.

Por se tratar de uma técnica muitíssimo sensível, é teoricamente possível estudar o DNA de um pêlo ou de qualquer outro tipo de amostra que tenha uma quantidade exígua de DNA.

Actualmente, são vários os polimorfismos de DNA com interesse médico-legal, que podem ser estudados por PCR, como polimorfismos de sequência, loci VNTR e loci STR.

O desenvolvimento da técnica de PCR tem também influenciado substancialmente a preparação das amostras para a subsequente análise de sequenciação. Assim, em lugar de se clonar o fragmento de DNA de interesse num plasmídeo e fazer crescer o produto resultante numa célula bacteriana hospedeira, é possível usar os produtos de PCR na análise de sequenciação enzimática (Gyllensten e Erlich, 1988).

A variação da sequência em segmentos de DNA altamente polimórficos, como o segundo exão dos genes do sistema HLA classe II (HLA DQA1) (Gyllensten e Erlich, 1988) ou da região não codificante do DNA mitocondrial humano (Aquadro e Greenberg, 1983) podem, agora, ser rapidamente identificados, após amplificação por PCR. Por isso, esta nova metodologia é relativamente simples de executar, proporcionando novos meios ao perito.

Das vantagens desta técnica, anteriormente citadas, destaca-se o facto da PCR possuir a capacidade para efectuar a análise de uma determinada sequência numa amostra exígua de DNA, qualquer que seja a quantidade e qualidade do citado DNA, desde que a amostra tenha, pelo menos, uma cadeia de DNA intacta, rodeando a região a ser amplificada. Esta sensibilidade tem permitido a tipagem de diferentes polimorfismos de DNA de um único cabelo (Higuchi e col., 1988), de um espermatozóide (Li e col., 1988) e de células somáticas individuais (Jeffreys e col., 1988). Foram efectuadas reacções de amplificação em DNA degradado de tecidos guardados em arquivo e fixados em formol ou embebidos em parafina, ou ainda, extraídos de peças antigas existentes em museus ou achados arqueológicos (Impraim e col., 1987; Pääbo, 1989).

Por tudo o que foi anteriormente referido, poder-se-á afirmar que a técnica de PCR se tornou um meio precioso para a análise de regiões polimórficas, em amostras de DNA humano, particularmente em criminalística, nos quais raramente se dispõe de DNA de alto peso molecular em quantidades apreciáveis. Trata-se de uma metodologia muito usada na resolução de casos médico-legais, sendo também utilizada no diagnóstico clínico (Brook e col., 1992; Hazan e col., 1992; Richards e Sutherland, 1992; Riggins e col., 1992).

1.3.3.1. Sistemas AMPFLP e STR estudados por PCR

Sistemas AMPFLP são os loci VNTR, cujos alelos possuem tamanhos moleculares, aproximadamente, de 100 a 2000 pb (Boerwinkle e col., 1989; Horn e col., 1989; Decorte e col., 1990; Kasai e col., 1990).

Os loci microsatélite podem definir-se como pequenas sequências de DNA (com menos de 350 pb) dispersas pelo genoma, repetidas em tandem, de 2 a 7 pb de tamanho, pelo que também são conhecidos por loci STR (Short Tandem Repeats). Calculou-se que o genoma humano contém, aproximadamente, 500.000 STRs, dos quais 6.000 a 10.000 são tri ou tetraméricos (Frégeau e Fourney, 1993). À semelhança dos sistemas VNTR minisatélites, os loci STR apresentam um elevado grau de polimorfismo, devido à variação no número de unidades de repetição (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989).

Os dois grupos de sistemas, AMPFLPs e STRs, em virtude do curto tamanho dos seus alelos, são susceptíveis de amplificação por PCR e visualização directa através do brometo de etídio ou do nitrato de prata.

Entre os sistemas minisatélites, com interesse médico-legal, destacam-se os loci D1S80, 3'ApoB e YNZ22 (Budowle e col., 1990; Rand e col., 1992; Sajantila e col., 1992; Pinheiro e col., 1996). Simultaneamente, foram sendo descobertos numerosos sistemas STR. Os STRs dinucleotídicos são pouco utilizados por apresentarem bandas secundárias, devido à "slippage" da Taq polimerase durante a amplificação (Litt e Luty, 1989). Por isso, actualmente, preferem-se os sistemas tri ou tetranucleotídicos, com os quais aquele problema não existe. Entre os loci STR descritos, seleccionaram-se quatro sistemas tetranucleotídicos, HUMVWA31A (Kimpton e col., 1992), HUMTH01 (Polymeropoulos e col., 1991a), HUMFES/FPS (Polymeropoulos e col., 1991b), HUMF13A1 (Polymeropoulos e col., 1991c). A maioria destes sistemas tem sido usada para a criação de bases de dados populacionais (Edwards e col., 1992; Kimpton e col., 1993; Hammond e col., 1994; Alonso e col., 1995; Pinheiro e col., 1997) e na identificação humana (Möller e col., 1993; Wiegand e col., 1993a,b; Alford e col., 1994; Sajantila e col., 1994; Lygo e col., 1994).

Características dos sistemas AMPFLP analisados

Locus	Localização cromossômica	Número de alelos (p.e.)	Intervalo (pb)	Unidade de repetição (pb)
pMCT118 (D1S80)	1p (distal)	23	224-640	16
3'ApoB	2p23-p24	17	570-900	2X15
D17S5 (YNZ22)	17p13.3	11	168-938	70

Características dos loci STR analisados

Locus	Localização cromossômica	Número de alelos (p.e.)	Intervalo (pb)	Unidade consenso
HUMVWA31A	12p12-12pter	9	135-167	TCTA, TCTG
HUMTH01	11p15.5	6	154-178	AATG
HUMF13A1	6p24-25	12	181-235	GAAA
HUMFES/FPS	15q25-qter	11	213-238	ATTT

A utilização da PCR para o estudo dos sistemas mini e microsatélite apresenta vantagens em relação à análise dos sistemas VNTR via RFLPs, uma das quais reside no facto de se encurtarem consideravelmente os tempos de estudo dos sistemas VNTR, pois, para além das técnicas envolvidas na caracterização serem rápidas, os sistemas AMPFLPs e STRs são susceptíveis de automatização.

No caso dos STRs, é inclusivamente possível proceder-se à amplificação simultânea de vários loci numa única reacção, PCR multiplex (Sullivan e col., 1992; Frégeau e Fourney, 1993; Kimpton e col., 1993).

Outra vantagem dos AMPFLP e STRs resulta do facto dos alelos correspondentes a estes sistemas serem entidades discretas. Para além dos STRs serem claramente identificáveis, permitindo a distinção de alelos que diferem apenas num nucleótido, é fácil a sua perfeita identificação

(Kimpton e col.,1993). Tal facto torna viável a comparação dos resultados obtidos por diferentes laboratórios.

É para notar que o estudo dos loci STR proporciona uma maior sensibilidade, devido ao pequeno tamanho dos produtos de amplificação permitindo, por conseguinte, uma amplificação mais eficaz em amostras degradadas.

O uso de tecnologia automatizada baseada na fluorescência para a detecção dos loci AMPFLP e STR foi descrita recentemente (Schwartz e col., 1992; Ziegle e col., 1992; Sullivan e col., 1992; Kimpton e col., 1993).

A utilização dos sequenciadores automáticos, do género do A.L.F.(Automatic Laser Fluorescent), comercializado pela Pharmacia, permite que a informação electroforética se vá armazenando à medida que decorre a migração, graças à utilização de um software apropriado, sendo os alelos detectados por laser, pois os “primers” usados são marcados com fluorescência. Para além de que, paralelamente à migração das amostras de DNA em estudo, migram vários padrões externos (“sizer” externo de 50-500 pb) e padrões internos adicionados a todas as mostras a estudar (“sizers” internos). Os referidos padrões são reconhecidos pelo software e servem para construir curvas de calibração. Deste modo, é possível eliminar automaticamente as variações da mobilidade electroforética, as quais podiam conduzir a uma tipagem errada dos alelos.

Com um sequenciador, com as características do anteriormente referido, é possível a amplificação simultânea de vários sistemas, pelo que é necessária uma quantidade inferior de DNA molde, o que constitui uma grande vantagem na resolução de casos com interesse forense em que se dispõe de pequenos vestígios, com quantidades exíguas de DNA. Todavia, nos sistemas a amplificar em simultâneo não deve haver sobreposição de alelos, isto é, alelos de diferentes loci com o mesmo número de pares de bases.

Não obstante todas as vantagens referidas no que respeita à utilização da técnica de PCR, para o estudo de vários sistemas, foi recentemente demonstrada a existência de microheterogeneidade ao nível da sequência, nos alelos dos loci STR (Urquhart e col., 1993; Möller e Brinkmann, 1994; Urquhart e col., 1994), devida à presença de alelos não consenso que podem diferir em tamanho em apenas um par de bases, ou que inclusivamente só diferem na sequência, sem apresentarem diferentes tamanhos. Este facto, se por um lado aumenta o grau de polimorfismo

destes sistemas e por conseguinte a capacidade de discriminação entre os indivíduos, por outro torna imprecisa a correcta identificação dos alelos. Além de que foi demonstrada a existência de mobilidades electroforéticas anómalas, dependendo do gel empregue na separação. Deste modo, é aconselhável a estandardização das condições experimentais (composição do gel, electroforese) e o uso de padrões alélicos consenso adequados e de sequência conhecida, assim como a uniformidade na nomenclatura dos alelos (Urquhart e col., 1994) (recomendações da EDNAP, 1994).

1.3.3.2. Polimorfismos de sequência estudados por PCR

A análise da sequência permite a detecção de outro tipo de polimorfismo não baseado no número de vezes que uma determinada sequência é repetida, mas nas variações ou trocas de nucleótidos que a própria sequência apresenta.

A. HLA DQA1

A análise da região DQ α do sistema HLA é um exemplo de polimorfismo, cujo estudo é baseado na variação da sequência. Os genes que codificam para os antígenos do sistema HLA classe II (HLA-D) estão localizados no braço curto do cromossoma 6, organizados em três regiões: HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ. Este sistema codifica para um conjunto de proteínas integrais de membrana, altamente polimórficas, que estão ligadas a fragmentos antigénicos peptídicos.

Devido ao facto deste locus possuir um grau de polimorfismo elevado, é um sistema importante na identificação genética dos indivíduos. Apesar da tipagem tradicional do sistema HLA ser levada a cabo mediante o uso de soros (HLA I), ou culturas mistas de linfócitos (HLA II), com a técnica de PCR foi possível estudar os diferentes alelos do gene HLA DQ α (Saiki e col., 1986; Higuchi e Blake, 1989).

O estudo do locus HLA DQA1 consiste na amplificação de fragmentos de 239 pb (alelos 2 e 4) e fragmentos de 242 pb (alelos 1 e 3) e na subtipagem do alelo 1 (1.1, 1.2, 1.3). É também possível subtipar outros alelos, utilizando enzimas de restrição, como, por exemplo, o alelo 4, usando as enzimas de restrição Fok I e Rsa I (Jung e col., 1991) ou o AmpliType PM+DQA1 da Perkin Elmer (N808-0094).

A detecção dos alelos faz-se por hibridação do DNA amplificado, usando “primers” biotinizados, em tiras que contêm as ASO “probes”(Allelic Specific Oligonucleotide) complementares às sequências do DNA em estudo. A detecção é efectuada por um processo colorimétrico que visualiza a presença da hibridação específica mediante conversão enzimática de um substrato incolor solúvel num precipitado azul, usando a peroxidase-estreptavidina. Aquela detecção é conhecida pelo nome de “dot-blot reverse”.

B. Polymarker (PM)

O “Amplitype PM” (Perkin-Elmer) (Saiki e col., 1989) permite a amplificação simultânea de 5 loci genéticos: LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor), GYPA (Glycophorin A), HBG (Hemoglobin G Gammaglobin), D7S8 e Gc (Group Specific Component), sendo os alelos facilmente identificados.

A técnica usada para o estudo destes loci é similar à anteriormente descrita para o HLA DQA1. Quando há complementaridade entre as “probes” e a sequência de DNA em estudo, os alelos são identificados por método colorimétrico que originam o aparecimento de “dots” coradas de azul.

1.3.4. DNA Mitocondrial

A sequenciação do DNA mitocondrial (mtDNA) é um procedimento útil na identificação genética humana. As mitocôndrias são formações citoplasmáticas autorreplicantes que contêm genes extranucleares. Cada célula humana contém 5.000-10.000 mitocôndrias, cada uma das quais possui até 10 moléculas de DNA de dupla cadeia de 16.569 pb, que codificam para dois RNA ribossómicos, 22 RNA de transporte e 13 proteínas, todos relacionados com a cadeia respiratória e fosforilação oxidativa.

A sequência completa do mtDNA foi integralmente estudada por Anderson e col. em 1981, tendo cada nucleótido sido identificado numericamente. As duas cadeias que a constituem foram chamadas H (heavy) e L (light), sendo a cadeia H rica em guaninas e timinas. Actualmente, existe um

consenso geral de empregar a sequência de Anderson (cadeia L) como termo de comparação relativamente às sequências em estudo (Anderson e col., 1981).

Os genomas mitocondriais são idênticos em quase toda a sua extensão para todos os indivíduos da mesma espécie. Contudo, a região D-loop, com um tamanho aproximadamente de 1.000 pb, é uma zona não codificante que possui um elevado polimorfismo, sendo, por isso, de interesse na identificação genética humana (Aquadro e Greenberg, 1983; Cann e col., 1987).

A sequenciação do mtDNA da região D-loop de vários indivíduos revelou que a probabilidade de dois indivíduos não aparentados serem geneticamente idênticos, para aquela região, é de 0.27% (Orrego e King, 1990).

O mtDNA é de herança materna (herança uniparental citoplasmática materna), pelo que o seu estudo não tem interesse na investigação biológica da paternidade. Todavia, possui especial relevância na identificação individual, uma vez que, todos os indivíduos aparentados pela linha materna possuem sequências de mtDNA idênticas (Hutchison e col., 1974; Giles e col., 1980). Assim, podem ser identificados restos cadavéricos, comparando a sua sequência de mtDNA, com a sequência do mtDNA de indivíduos aparentados, pela linha materna, com o falecido (King, 1991; Holland e col., 1993; Gill e col., 1994).

A análise da região D-loop do mtDNA em amostras para exame médico-legal é um procedimento alternativo ao estudo dos polimorfismos do DNA nuclear, uma vez que, existe um elevado número de cópias de mtDNA em cada célula, o que permite supôr que algumas dessas cópias se tenham mantido intactas ao longo do tempo, permanecendo disponíveis mesmo em vestígios com uma certa antiguidade.

Têm sido usadas várias metodologias para o estudo da variabilidade genética mitocondrial. A mais utilizada consiste no estudo por PCR, de duas regiões hipervariáveis amplificadas em separado, tendo na totalidade cerca de 800 nucleótidos, seguido da sequenciação dos produtos amplificados, usando, preferencialmente, a sequenciação cíclica directa, em sequenciadores automáticos.

Evoluções relativamente recentes na tecnologia fluorescente demonstraram que é possível a análise da sequência, usando métodos não radiactivos e automatizados, proporcionando a diminuição dos erros obtidos aquando do

manuseamento dos dados, uma vez que se dispõe de “software” adequado para a identificação dos alelos. Por outro lado, o maior rendimento, em termos de tempo, permite efectuar um maior número de análises de sequenciação (Hopgood, 1992).

Há vários casos internacionalmente famosos em que foi usada a metodologia anteriormente referida, isto é, a amplificação, sequenciação e comparação do DNA obtido a partir de restos cadavéricos antigos, com indivíduos aparentados pela linha materna com os falecidos. De entre esses casos podemos citar, a identificação dos restos cadavéricos de alguns membros da família do último Czar da Rússia, Nicolau II, assassinados pelos bolcheviques, em 1918, e cujos restos foram encontrados em Ekaterimburgo, em 1991. A referida identificação foi levada a cabo por Peter Gill e col.(1994). Outro caso não menos conhecido consistiu na identificação dos restos cadavéricos que se suspeitava pertencerem a Josef Mengele, “O Anjo da Morte”, do campo de concentração de Auschwitz, falecido no Brasil. Este estudo foi efectuado por Jeffreys e col.(1992).

1.3.5. Outras Alternativas

Actualmente, estão a ser desenvolvidos novos métodos de identificação, entre os quais se destaca a detecção simultânea de polimorfismos dialélicos pontuais de uma base, em diferentes cromossomas. Este método é susceptível de automatização, proporcionando uma elevada capacidade de discriminação entre indivíduos, através da detecção da variação de um nucleótido. A referida detecção das variações podia ser efectuada mediante hibridação ASO (Reynolds, 1991), por ensaios de ligamento oligonucleotídico (Nickerson e col., 1990) ou minisequenciação em fase sólida (Syvanen e col., 1993).

Foram também desenvolvidos novos métodos de sequenciação baseados na hibridação a vectores de oligonucleótidos, facilmente automatizados, de tal forma que é possível a análise de múltiplas amostras e de vários loci ao mesmo tempo (Maskos e Southern, 1993; Southern e col., 1992).

A electroforese capilar (Holland e col., 1994; Capon e col., 1994), a cromatografia líquida de alta resolução e a análise do polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP) (Suzuki e col., 1994; Monckton e Jeffreys, 1994), podem representar alternativas paralelas à análise dos polimorfismos de DNA no genoma humano.

Recentemente, tem sido tema de estudo, em várias populações, a análise de inserção de sequências Alu a qual, para além de proporcionar um grande potencial de identificação genética, sobretudo na investigação de filiação, possui outras vantagens em relação a outros polimorfismos estudados por PCR, designadamente rapidez da análise (aproximadamente metade do tempo requerido para o estudo dos STRs e AMPFLPs e um quinto do tempo da análise RFLP), facilidade de interpretação e custos muito reduzidos (Novick e col., 1994).

1.4. GENÉTICA POPULACIONAL

Uma vez concluído o estudo laboratorial, quer de investigação biológica da filiação, quer de casos no âmbito da criminalística, importa fazer a avaliação dos resultados obtidos.

Assim, nos casos de investigação de paternidade, que são quase exclusivamente os casos de filiação que nos são presentes, porquanto na casuística do Instituto de Medicina Legal do Porto apenas foi registado um caso de investigação de maternidade, as conclusões possíveis, são: exclusão de paternidade e não exclusão de paternidade.

Conclui-se por exclusão de paternidade, quando houver exclusão pelo menos por dois marcadores genéticos e preferentemente se uma das exclusões for de 1ª ordem. Relativamente aos casos de não exclusão, exprime-se o resultado em valor de probabilidade de paternidade, cujo cálculo se baseia no Teorema de Bayes. Para que a aplicação daquele teorema seja possível, é aconselhável a determinação antecipada das frequências dos alelos dos diferentes sistemas utilizados, na população de onde os intervenientes provêm, por isso estudou-se a população do Norte de Portugal.

Relativamente aos casos criminais há três conclusões possíveis, ou seja, os perfis de DNA do suspeito e dos vestígios (cujas características genéticas não são idênticas às da vítima e que há indícios de que possam pertencer ao suspeito) não são sobreponíveis; ou, há coincidência dos referidos perfis; e ainda, o estudo não é conclusivo, ou porque o DNA disponível não é em quantidade suficiente ou porque há problemas laboratoriais na extracção ou tipagem do DNA.

Assim, à semelhança dos casos de investigação de paternidade, quando não houver coincidência entre as características genéticas do suspeito e dos vestígios, no relatório devem ser referidos os polimorfismos que proporcionam a referida exclusão, sendo para notar que a exclusão deve ser feita, pelo menos, por dois sistemas. Relativamente ao caso dos perfis serem idênticos, o perito deve fazer a valorização da prova, que habitualmente é feita calculando o “likelihood ratio”, razão bayesiana de probabilidades ou valor incriminante. Para que essa determinação seja possível, são necessárias as frequências dos alelos na população, dos sistemas usados.

Por isso, antes de se proceder à utilização dos diferentes marcadores genéticos, sejam convencionais ou polimorfismos do DNA, é necessário efectuar o estudo populacional dos referidos marcadores, uma vez que as conclusões dos respectivos relatórios são baseadas na utilização de sistemas independentes e em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As aludidas frequências devem ser obtidas a partir de populações homogêneas, e se possível, populações de onde os intervenientes nas perícias são oriundos, como já foi referido.

Desde o famoso caso Castro (People v. Castro, 1989), já citado, que nos Estados Unidos se produziu um intenso debate sobre a admissibilidade jurídica das provas laboratoriais, tendo surgido em tribunal algumas questões relacionadas com a genética populacional.

Por vezes, aquando da identificação dos alelos, surgem problemas na determinação do seu tamanho, como, por exemplo, quando se usa o Southern blot. Deste modo, não é possível o cálculo correcto das suas frequências. Por isso, têm sido usados para o cálculo de probabilidade de coincidência, métodos “binning”, isto é, a associação de alelos, cujos tamanhos se situam entre dois tamanhos de fragmentos (Balazs e col., 1989; Budowle e col., 1991).

Em sistemas com um grande número de alelos, cuja base de dados possui poucas combinações genotípicas de entre as muitas combinações possíveis, a determinação das frequências dos alelos podia constituir um problema, pois habitualmente os estudos populacionais efectuados, afastavam-se do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos vários métodos estatísticos no sentido de tentarem obviar aquele problema, demonstrando o equilíbrio em diferentes loci (Deka e col., 1991; Devlin e col., 1991; Chakraborty e Daiger, 1991; Weir, 1992; Guo e Thompson, 1992).

Uma situação que também pode produzir desequilíbrio é o denominado efeito Wahlund, que ocorre quando a população estudada é formada por várias subpopulações, com diferentes frequências alélicas. Assim, havendo equilíbrio dentro de cada subpopulação, quando se calculam as frequências na população total, verifica-se o citado desequilíbrio.

Em face do exposto, surgiu a questão da influência da subestruturação nos cálculos (Brookfield, 1991). Lewontin, em 1972, estabeleceu que a maior diversidade humana residia na variação entre indivíduos da mesma população (85%), pois a origem étnica ou racial, apenas explicava 15 % das diferenças.

Na sequência do que se referiu anteriormente, foi proposto que sempre que possível, os cálculos se devam basear nas frequências dos grupos raciais e segundo a proporção das populações relevantes de cada grupo (Ceiling Principle - NRC, 1992), isto é, a frequência de um alelo para um grupo racial seria a máxima frequência encontrada entre os diferentes subgrupos que o integram. Tal facto obrigava ao estudo de cada um dos grupos supostamente homogêneos, que formam uma determinada raça para, em seguida, se proceder à determinação das frequências.

Contudo, as mais recentes publicações relativas a dados populacionais (Budowle e col., 1994) não apoiam aquela orientação, pois os referidos dados demonstram uma maior variação entre raças do que entre grupos étnicos. Por outro lado, foi também provado que não existe necessidade da aplicação do "Ceiling Principle", pois os métodos normalmente utilizados empregam cálculos suficientemente conservadores (Monson e Budowle, 1993).

Para obviar os problemas descritos, a Comissão de DNA da Sociedade Internacional de Hemogenética Forense (1993) emitiu um parecer, em que refere: "existem provas suficientes que demonstram que a diferença entre as frequências alélicas não têm efeitos significativos nos cálculos das frequências dos perfis de DNA, quando se comparam subgrupos de indivíduos que pertencem a uma população principal. As maiores diferenças nos cálculos surgem quando se efectuam comparações entre grandes grupos raciais. Tais factos não proporcionam indícios que indiquem a necessidade de incluir o *Ceiling Principle* nos procedimentos em uso".

1.5. ASPECTOS LEGAIS DA APLICAÇÃO DA ANÁLISE DO DNA AOS CASOS FORENSES

1.5.1. Legislação portuguesa (investigação de paternidade)

A reforma do Código Civil Português ocorrida em 1977 contribuiu para o incremento do número de exames de investigação de paternidade realizados nos Institutos de Medicina Legal. Até àquela data foram efectuados, em média, dois exames por ano, enquanto que na década de 80, 621 exames e desde 1990 até finais de 1996, foram concluídos 1762 casos.

Simultaneamente à entrada em vigor do “novo” Código Civil surgiram novas técnicas, designadamente a PCR, que contribuíram para a conclusão dos casos de uma forma mais consentânea com a realidade biológica.

Há sete artigos do Código Civil que se consideram mais relevantes relativamente aos casos de filiação, 1798º, 1801º, 1826º, 1839º, 1864º, 1865º e 1866º.

Artigo 1798º **(Concepção)**

O momento da concepção do filho é fixado, para os efeitos legais, dentro dos primeiros cento e vinte dias dos trezentos que precederam o seu nascimento, salvas as excepções dos artigos seguintes.

O sistema português, acompanhando a maioria dos ordenamentos jurídicos, estabelece a data da concepção em qualquer dos dias de um “período legal”, que é determinado a partir do nascimento do menor, com base na duração mínima e máxima da gravidez.

A fixação de um “período legal” ou período da concepção baseia-se nos ensinamentos das ciências médicas.

O limite mínimo de cento e oitenta dias parece corresponder aos dados da experiência, sendo muito excepcional uma gestação mais curta.

O limite máximo de trezentos dias não colhe, porém, a unanimidade dos peritos.

Por isso, se considera que esta norma vale como presunção legal, podendo ser ilidível mediante prova em contrário, como estabelece o art. 1800º deste mesmo Código.

Artigo 1801º

(Exames de sangue e outros métodos científicos)

Nas acções relativas à filiação são admitidos como meios de prova os exames de sangue e quaisquer outros métodos cientificamente comprovados.

Trata-se de um preceito novo introduzido pela Reforma de 1977.

Os meios de prova científica eram já admitidos no direito anterior, de acordo com os princípios da liberdade da prova e das regras gerais sobre a prova pericial.

Persistia, porém, alguma desconfiança pela intromissão de juízos periciais, de que são exemplo a não admissibilidade de fixação da época provável da concepção, dentro do período legal e a negação de eficácia jurídica à fecundação artificial.

As alterações introduzidas pela Reforma de 1977 vieram afirmar expressamente uma aceitação sem reservas dos métodos científicos, dignos de crédito.

Esta norma do art.1801º evidencia, por conseguinte, um espírito favorável, receptivo aos progressos científicos que auxiliem o reconhecimento da verdade biológica.

Artigo 1826º

(Presunção de paternidade)

- 1. Presume-se que o filho nascido ou concebido na constância do matrimónio da mãe tem como pai o marido.*
- 2. O momento da dissolução do casamento por divórcio ou da sua anulação é o do trânsito em julgado da respectiva sentença; o casamento católico, porém, só se considera nulo ou dissolvido por dispensa a partir do registo da sentença proferida pelas autoridades eclesíásticas.*

Esta norma, ao falar em “presunção da paternidade”, afasta a “presunção da legitimidade” do direito anterior, dando corpo aos preceitos constitucionais proibitivos do uso de designações discriminatórias para além de se integrar no abandono da tradicional discriminação dos filhos nascidos fora do casamento.

A presunção estabelecida neste artigo tanto existe nos casos em que o filho nasce durante o casamento mesmo tendo sido concebido antes, como nas hipóteses em que, embora concebido durante o casamento, vem a nascer depois da sua dissolução.

Parece que para o legislador de 1977 a atribuição da paternidade ao marido assenta numa forte probabilidade de ser ele o autor da fecundação, segundo juízos objectivos de experiência; este entendimento enfraquece, por sua vez, a presunção de paternidade, ampliando as possibilidades de se provar que o marido não é o pai.

Com efeito, aumentaram-se os casos de cessação daquela presunção (art. 1829º), criaram-se novos (art.1832º) e foi liberalizada a impugnação da paternidade (art.1839º), à qual se fará breve referência.

Artigo 1839º

(Fundamento e legitimidade)

- 1. A paternidade do filho pode ser impugnada pelo marido da mãe, por esta, pelo filho ou, nos termos do artigo 1801º, pelo Ministério Público.*
- 2. Na acção o autor deve provar que, de acordo com as circunstâncias, a paternidade do marido da mãe é manifestamente improvável.*
- 3. Não é permitida a impugnação de paternidade com fundamento em inseminação artificial ao cônjuge que nela consentiu.*

Trata-se igualmente de uma nova disposição, introduzida pela Reforma de 1977.

Por imposição dos preceitos constitucionais, conferiu-se também legitimidade quer à mãe, de acordo com o princípio da igualdade, quer ao filho, numa maior dimensão dos direitos à integridade e à identidade pessoais, de impugnarem a paternidade.

Consagrou igualmente o sistema da prova livre da não paternidade do marido.

Com a fórmula da manifesta probabilidade de o marido ser o pai, o legislador quis significar que os tribunais devem exigir mais do que uma improbabilidade simples e menos do que a impossibilidade estrita da paternidade marital.

Artigo 1864º

(Paternidade desconhecida)

Sempre que seja lavrado registo de nascimento de menor apenas com a maternidade estabelecida, deve o funcionário remeter ao tribunal certidão integral do registo, a fim de se averiguar oficiosamente a identidade do pai.

Esta norma é a responsável pelo incremento do elevado número de exames de investigação biológica de paternidade, solicitados aos Institutos de Medicina Legal.

No direito anterior supunha-se a perfilhação materna; agora não é possível a perfilhação pela mãe, pelo que nesta norma se utiliza a expressão "... apenas com a maternidade estabelecida..."

Impõe-se agora ao tribunal que investigue a identidade do pai, quando apenas é conhecida a da mãe.

O estabelecimento da averiguação oficiosa da paternidade apenas encontra eco nos ordenamentos jurídicos dos países escandinavos.

"A sua justificação pode encontrar-se no desejo de satisfazer o direito à identidade e à integridade moral, de tutelar o interesse geral da melhor socialização e amparo económico do filho; e na consciência de que não vale grande coisa garantir a todos os filhos a igualdade de direitos se não se fizerem os esforços possíveis no sentido de constituir as relações de filiação" (Krause, cit, por Guilherme de Oliveira)

Artigo 1865º
(Averiguação oficiosa)

1. *Sempre que possível, o tribunal ouvirá a mãe acerca da paternidade que atribui ao filho.*
2. *Se a mãe indicar quem é o pai ou por outro meio chegar ao conhecimento do tribunal a identidade do pretense progenitor, será este também ouvido.*
3. *No caso de o pretense progenitor confirmar a paternidade, será lavrado termo de perfilhação e remetida certidão para averbamento à repartição competente para o registo.*
4. *Se o presumido pai negar ou se recusar a confirmar a paternidade, o tribunal procederá às diligências necessárias para averiguar a viabilidade da acção de investigação da paternidade.*
5. *Se o tribunal concluir pela existência de provas seguras da paternidade, ordenará a remessa do processo ao agente do Ministério Público junto do tribunal competente, a fim de ser intentada a acção de investigação.*

Na averiguação oficiosa da paternidade avulta e predomina o interesse geral e de ordem pública que ao Estado cabe defender.

A relação jurídica estabelecida nestas acções entre o Ministério Público e o pretense pai, relação que se traduz no interesse daquele em fazer declarar o menor como filho deste é conexas e, por sua vez, radica um interesse jurídico da mãe traduzido sobretudo na vantagem económica de que

beneficiará com a procedência da causa na repartição dos encargos económicos da manutenção alimentar do menor com o investigando.

Curioso é observar a evolução da jurisprudência face à ausência de uma presunção legal de paternidade. Assim, durante bastante tempo exigia-se que o autor devia fazer prova da filiação biológica, cabendo-lhe provar não só que o réu manteve relações sexuais com a mãe do investigante como esta só com aquele as teve durante o período legal da concepção.

Paulatinamente foi dado crédito aos exames biológicos da paternidade, realizados nos Institutos de Medicina Legal, de modo que já procede a acção oficiosa em que se prova que a mãe do menor manteve relações sexuais com o réu no período legal de concepção se o exame biológico mostra uma alta probabilidade de paternidade.

Artigo 1866º

(Casos em que não é admitida a averiguação oficiosa as paternidade)

A acção a que se refere o artigo anterior não pode ser intentada:

- a) Se a mãe e o pretense pai forem parentes ou afins em linha recta ou parentes no segundo grau da linha colateral;*
- b) Se tiverem decorrido dois anos sobre a data do nascimento.*

O disposto na alínea a) constitue matéria inovadora. Com efeito, no direito anterior a filiação dos incestuosos só podia estabelecer-se relativamente a um dos progenitores.

Agora, em obediência ao princípio constitucional, estabelece-se igual tratamento dos filhos independentemente da sua ascendência, pelo que os filhos que resultem de incesto estão abrangidos pelo regime geral, podendo a sua maternidade e a paternidade ser estabelecidas, em princípio, por qualquer dos meios previstos na lei.

Porém, o legislador introduziu a excepção da alínea a) por que não pretendeu impôr aos particulares a revelação do incesto através de um procedimento oficioso.

Se a verdade biológica poderá sair beliscada certo é, porém, que é interesse superior evitar vexames ou qualquer tipo de traumatismos que aquela revelação poderia produzir.

Acresce que o conhecimento do incesto não satisfará qualquer interesse social que importe defender e promover oficiosamente.

A limitação estabelecida na alínea b) tem um duplo significado. Por um lado, uma cautela do Estado em não se aventurar em acções de resultado duvidoso face ao envelhecimento das provas. Por outro, um estímulo no sentido de a filiação ser estabelecida no mais curto espaço de tempo.

1.5.2. RECOMENDAÇÕES E NORMAS

1.5.2.1. Recomendações da ISFH (Carracedo e col., 1996)

Desde 1989 que a ISFH (International Society for Forensic Haemogenetics), através da “DNA Commission”, emite regularmente recomendações sobre o uso dos polimorfismos de DNA com fins médico-legais.

A. Recomendações de 1989

As primeiras recomendações da ISFH foram publicadas em 1989. Nestas normas é referido o uso dos polimorfismos do DNA, analisados com sondas.

Os aspectos estatísticos mais significativos destas primeiras recomendações são:

A.2.(iii). Exige-se que os “standards” bioestatísticos estabelecidos para os marcadores clássicos sejam aplicados ao uso médico-legal do DNA.

B-4.2. Constatam-se as dificuldades inerentes à valorização bioestatística do uso das sondas multilocus, o que faz com que sejam de difícil aplicação na resolução dos casos práticos.

C.2. Quando se usam sondas de locus único (SLP) a valorização bioestatística tem que ter em conta as variações posicionais das bandas inerentes ao método. Deve, por outro lado, estar sempre disponível uma cópia dos resultados e do método bioestatístico usado, para a realização de uma análise independente por um segundo perito.

B. Recomendações de 1991

São muitos os aspectos bioestatísticos que contêm estas recomendações. Estes aspectos referem-se, principalmente, aos métodos estatísticos usados para a estima de frequências dos SLPs. Tanto os métodos baseados nos “bins” fixos (fixed bins), como os que utilizam janelas deslizantes (sliding windows) ou ainda os bayesianos são aceitáveis quando cumprem as recomendações fixadas no capítulo 4.1.3. Geralmente, aconselham que se seja conservador na estima de frequências.

As frequências fenotípicas de vários sistemas podem ser combinadas por multiplicação a não ser que haja desequilíbrio entre os sistemas, o que não acontece entre os sistemas habitualmente usados na prática forense.

Finalmente, insiste-se na disponibilidade do método de valorização bioestatística para posteriores análises, se necessárias (contraprovas) (Capítulo 5.3.2).

C. Recomendações de 1992

Estas referem-se ao uso de polimorfismos de DNA analisados por PCR com fins médico-legais.

O ponto VII destas recomendações contempla os aspectos bioestatísticos, estabelecendo-se que a valorização e interpretação dos polimorfismos de DNA analisados mediante PCR não difere da dos marcadores tradicionais, pelo que se deve seguir o que foi estabelecido para os mesmos.

D. Recomendações de 1993

São recomendações da “DNA Commission” (DNA Commission of the ISFH, 1993) para evidenciar os graves erros já cometidos aquando da elaboração do relatório, em 1992, efectuado pelo “National Research Council” da Academia de Ciências dos Estados Unidos.

Em particular é criticado o “ceiling principle”, estabelecendo que não é necessário incluí-lo nos sistemas usados na prática corrente.

E. Recomendações de 1994

Estas recomendações (DNA Recommendations, 1994) não contêm dados significativos de interesse bioestatístico.

1.5.2.2. Recomendações e normativas do Grupo Espanhol e Português da ISFH

O grupo espanhol de Hemogenética Forense foi constituído em 1986, em Santiago de Compostela, com os objectivos básicos de: agrupar os especialistas deste campo; assegurar a qualidade, integridade e segurança da perícia nas questões relativas à Biologia Forense; unificar métodos e elaborar directrizes nas perícias; estabelecer as condições para a formação de peritos, definir quais as instituições que as podem realizar e, finalmente, coordenar a investigação e facilitar a formação de especialistas nesta área.

Em 1988, o grupo espanhol foi aceite como grupo de trabalho pela ISFH e em 1995 foi aprovada a substituição da sua denominação, para Grupo Espanhol e Português da ISFH.

Em Espanha, o grupo, desde a sua criação, emitiu recomendações e normas sobre a aplicação dos polimorfismos genéticos às perícias médico-legais (Carracedo e Montiel, 1988; Grupo espanhol da ISFH, 1993). Em Portugal, estas normas foram igualmente debatidas na 5ª Reunião do grupo Luso-Espanhol de Hemogenética (designação anterior), realizada no Instituto de Medicina Legal do Porto, em 1992, adiante transcritas. Desta reunião resultou a elaboração de conclusões baseadas nas normas já anteriormente estabelecidas pelo grupo espanhol, apenas com algumas diferenças resultantes da sua adaptação à realidade portuguesa.

Em Coimbra, em Junho de 1996, realizou-se a Reunião do Grupo Espanhol e Português, em que se procedeu, nomeadamente, a alterações de alguns pontos considerados importantes, já publicados no boletim informativo do grupo (Boletim informativo de la reunión del grupo español y portugués de la ISFH- Coimbra, 14-15 de Junio de 1996), que serão ainda revistos nas próximas reuniões.

1.5.2.3. Conclusões da 5ª Reunião do grupo Luso-Espanhol de Hemogenética Forense

Realizada no Instituto de Medicina Legal do Porto, em 4 de Dezembro de 1992.

1. Objectivos

- 1.1. - Assegurar a qualidade, integridade e segurança da perícia em matéria de Biologia Forense.
- 1.2. - Estabelecer os processos válidos para a perícia na investigação biológica da paternidade e criminalística.
- 1.3. - Estabelecer as condições a seguir pelos serviços onde se realizam estas perícias médico-legais.

2. Pessoal

- 2.1.- Os relatórios devem ser assinados por dois peritos, sendo um deles, sempre que possível, o Director do Serviço de Biologia Forense.
- 2.2. - Os peritos, não sendo técnicos superiores de Medicina Legal da área de Biologia Forense, são obrigados, para além de uma licenciatura adequada, a uma comprovada experiência mínima de 5 anos em Biologia Forense, ou grau de Doutor com tese naquela área.
- 2.3. - O Director do Serviço de Biologia Forense assim como os peritos que assinam os relatórios devem ser membros da ISFH (Sociedade Internacional de Hemogenética Forense).

3. Requisitos dos serviços

- 3.1. - Os Serviços de Biologia Forense incluem o Director de Serviços, peritos, técnicos e pessoal auxiliar.
- 3.2. - Nas investigações biológicas da paternidade deverão alcançar, pelo menos, 99,9% de probabilidade de exclusão *a priori*.
- 3.3. - Os serviços têm que sujeitar-se, periodicamente, a controlos de qualidade.

4. Investigação biológica da paternidade

4.1. - Marcadores genético-moleculares convencionais:

4.1.1. - Os marcadores genéticos convencionais que podem ser utilizados incluem antígenos eritrocitários, antígenos HLA, enzimas eritrocitárias e leucocitárias, proteínas e enzimas séricas, bem documentados na literatura, com locus génico perfeitamente ubicado, hereditariedade estabelecida e taxa de alelos raros ou silenciosos conhecida.

4.1.2. - As frequências génicas têm que estar determinadas na população onde se aplicam.

4.1.3. - Devem poder ser analisados noutra centro europeu para permitir a contraprova.

4.2. - Polimorfismos do DNA (RFLPs e PCR).

4.2.1. - Têm que ser cumpridas as recomendações da ISFH (Sociedade Internacional de Hemogenética Forense) e da EDNAP (European DNA Profiling Group).

4.2.2. - Os dados populacionais têm que estar determinados na população onde se aplicam e publicados em revistas nacionais ou internacionais para permitir a contraprova noutra centro europeu.

4.2.3. - Devem poder ser analisados noutra centro europeu para permitir a contraprova.

4.3. - Deve ser garantida plenamente a identificação dos interessados e respectivas amostras.

4.4. - No caso de exclusões isoladas (para um único marcador) pela 1ª Regra de Landsteiner, ou de unicamente duas exclusões pela 2ª Regra, será calculada a probabilidade de paternidade sem ter em conta os marcadores em que se verifica a exclusão, e adoptar então uma conclusão global.

4.5. - Quando o número de exclusões é superior ao indicado no ponto anterior, considera-se provada a exclusão.

- 4.6. - Nas condições assinaladas no ponto 4.4. e quando não há exclusão será obrigatório o cálculo estatístico dos resultados.
- 4.7. - Para o cálculo estatístico dos resultados devem ser utilizados a Logic I ou Logic II (Probability of Inclusion in Paternity Testing. The American of Blood Banks, Arlington, Virginia, 1982), ou qualquer outro sistema de cálculo, incluindo métodos computadorizados baseados nos mesmos princípios.
- 4.8. - As frequências génicas a utilizar terão de ter sido publicadas em revistas nacionais ou internacionais, e especificadas nos relatórios.
- 4.9. - A probabilidade de paternidade *a priori* estabelecida será 0.5.
- 4.10. - Para a análise de VNTRs ou DNA expressivo por PCR, serão válidos os mesmos métodos estatísticos e recomendações.
- 4.11. - Para o cálculo estatístico do DNA (RFLPs), têm que seguir-se as recomendações da ISFH e da EDNAP.
- 4.12. - A probabilidade de paternidade deve ser expressa em termos de W ($X/X+Y$), como índice de paternidade (X/Y) ou como valor EM ($\log Y/X+10$), e será sempre acompanhada pela correspondente tradução verbal de Hummel.
- 4.13. - Os relatórios compreenderão: a informação do caso, os marcadores e técnicas empregados, os resultados obtidos, eventualmente uma discussão, os resultados estatísticos e referências às frequências génicas e as conclusões.
- 4.14. - Em casos de situações particulares de difícil solução, cálculos estatísticos complexos ou exclusões isoladas, o Grupo Luso-Espanhol de Hemogenética Forense analisará o caso concreto propondo soluções e elaborará as conclusões finais.

5. Criminalística

- 5.1. - Os sistemas analisados têm que estar bem documentados na literatura científica, incluindo a análise da sua estabilidade e os problemas que podem apresentar-se com o seu emprego de rotina. Têm de poder ser analisados noutra centro europeu para permitir a contraperitagem. As frequências génicas devem estar determinadas na população onde se aplicam.

- 5.2. - Para a aplicação de polimorfismos do DNA, devem cumprir-se também as recomendações da ISFH e da EDNAP.
- 5.3. - Deverá ser garantida uma adequada identificação dos intervenientes e das amostras, mantendo as garantias processuais.
- 5.4. - As frequências génicas a utilizar têm de estar publicadas em revistas nacionais ou internacionais e especificadas nos relatórios.
- 5.5. - Os relatórios devem incluir os tipos de técnicas utilizadas, o fenótipo dos marcadores analisados e o cálculo estatístico adequado a cada caso.
- 5.6. - No caso de situações particulares de difícil solução o Grupo Luso-Espanhol de Hemogenética Forense analisará o caso concreto propondo soluções e elaborará as conclusões finais.

1.5.2.4. Recomendações N°R (92)I do Conselho da Europa - Comité de Ministros

Como se deixou anteriormente expresso o Grupo Espanhol e Português tem-se preocupado pela criação, em ambos os países, de condições que possibilitem a implementação de legislação referente aos exames periciais de biologia forense, designadamente, os relativos à criminalística biológica.

Por isso, enquanto não existir legislação, no nosso país, sobre a matéria, tem sido tomada em consideração a Recomendação N°R (92)I, sobre o uso do DNA no quadro do sistema de Justiça Criminal, adoptado pelo Conselho de Ministros de 10 de Fevereiro de 1992.

A. Objectivos

No preâmbulo da recomendação são tecidas considerações acerca da utilidade da aplicação das novas tecnologias do DNA, tendo sido destacada, todavia, a necessidade da protecção dos direitos humanos, designadamente, quando refere: “a introdução e o uso destas técnicas deve ter em atenção não atacar princípios fundamentais, tais como a inerente dignidade da pessoa humana e o respeito pelo corpo humano, os direitos da

defesa e o princípio da proporcionalidade na administração da justiça criminal e evitar atentar contra estes princípios”.

B. Princípios e recomendações

1. Definições

Para os fins desta recomendação:

“Análise de DNA” refere-se a qualquer procedimento que possa ser empregue na análise do ácido desoxirribonucleico (DNA), o material genético básico do homem e outros seres vivos.

“Amostras” refere-se a qualquer substância de origem viva que pode ser usada na análise de DNA.

“Ficheiro DNA” refere-se a qualquer colecção estruturada de resultados de testes de análise DNA conservados em forma material, quer em registos manuais ou de base de dados informatizada.

2. Âmbito e limitações

Esta recomendação aplica-se à recolha de amostras e uso de análises de DNA com o propósito de identificação de suspeitos ou qualquer outro indivíduo no quadro da investigação e do exercício da acção penal.

3. Uso de amostras e informações delas extraídas

As amostras colhidas para análise de DNA e as informações delas extraídas com fins de investigação criminal não devem ser usadas para outros fins. Contudo, quando a pessoa da qual foi extraída a amostra o desejar, devem as informações serem-lhe facultadas.

As amostras colhidas de pessoas vivas para a análise de DNA com fins médicos e as informações extraídas das mesmas não podem ser usadas para fins de investigação criminal a não ser em circunstâncias expressamente previstas na lei interna.

As amostras recolhidas para a análise de DNA e as suas informações podem ser necessárias para fins de pesquisa e de estatística. Tais usos poderão ser aceitáveis desde que a identidade da pessoa seja preservada. Nomes ou outras referências de identificação devem ser, por isso, retiradas antecipadamente àquela utilização

4. Extracção da amostra para análise de DNA

A extracção das amostras para análise de DNA deve ser apenas feita de acordo com as determinações de legislação interna; em alguns estados membros poderá ser necessária uma autorização judicial.

Quando a legislação interna o permita, as amostras podem ser extraídas sem consentimento do suspeito, mas tal só poderá ser feito quando as circunstâncias do caso o exigirem.

5. Recurso à análise do DNA

O recurso à análise do DNA deve ser possível em todos os casos apropriados, independentemente da gravidade do delito.

6. Acreditação dos laboratórios e instituições e controlo da análise do DNA

A análise do DNA é um procedimento científico sofisticado que deve ser apenas executado por laboratórios detentores de instalações e experiência adequadas.

Os estados membros devem assegurar-se de que os laboratórios e instituições acreditados devem satisfazer as seguintes condições:

- elevados conhecimentos profissionais e técnicos, acompanhados de procedimentos de controlo de qualidade apropriado;
- integridade científica;
- adequada segurança das instalações e das substâncias sob investigação;
- medidas adequadas que assegurem absoluta confidencialidade da identificação da pessoa a quem respeita a análise do DNA;
- garantia de que as condições determinadas nesta recomendação sejam seguidas;

Os estados membros devem instituir meios de exercício de uma supervisão regular dos seus laboratórios acreditados.

7. Protecção de dados

A colheita de amostras e uso da análise do DNA deve fazer-se em conformidade com os padrões de protecção de dados do Conselho da Europa de acordo com o previsto na Convenção de Protecção de Dados e nas recomendações sobre protecção de dados, em particular a Recomendação N°R (87), que regula o uso de dados pessoais no âmbito da polícia.

8. Conservação de amostras e dados

As amostras ou outros tecidos humanos extraídos de indivíduos para a análise do DNA não devem ser guardados depois de tomada a decisão final do caso para o qual foram usados, a não ser que sejam necessárias para objectivos directamente relacionados com aqueles para os quais foram colhidos.

Devem ser tomadas medidas para assegurar que os resultados da análise do DNA e as informações dela derivadas sejam apagados, quando já não forem necessários para os fins a que se destinavam. Os resultados da análise do DNA e as informações daí derivadas podem, contudo, ser conservados quando a pessoa em questão tenha sido condenada por graves delitos contra a vida, integridade ou segurança de pessoas. Nestes casos devem ser fixados por lei períodos precisos de conservação.

Amostras e outros tecidos humanos ou informações por eles proporcionadas podem ser guardadas por períodos mais longos:

- quando a pessoa em questão o requeira;
- quando a amostra não possa ser atribuída a um determinado indivíduo, por exemplo, quando seja encontrada na cena do crime.

Quando esteja envolvida a segurança do estado, a lei interna do estado membro pode permitir a retenção das amostras, os resultados das análises de DNA e a informação daí originada mesmo que a pessoa em causa não seja acusada ou condenada pela prática de qualquer ilícito. Em tais casos, devem ser fixados períodos precisos de conservação fixados pela lei interna.

O estabelecimento e a gestão de qualquer ficheiro de DNA, para efeitos da investigação e acção penal de delitos criminais, devem ser regulamentados pela lei.

9. Igualdade de armas

Os estados devem assegurar que a análise de DNA, como meio específico de prova, é igualmente acessível à defesa, através de decisão judiciária ou por intermédio de um perito independente.

Quando a quantidade de produtos disponíveis (vestígios) para a análise for limitada, devem ser tomadas precauções para que os direitos da defesa não sejam prejudicados.

10. Padrões técnicos

Os estados membros devem promover a padronização dos métodos de análise do DNA a nível nacional e internacional.

Isto pode envolver colaboração interlaboratorial na homologação dos procedimentos da análise e de controlo.

11. Propriedade intelectual

Quando haja conhecimento de que direitos de propriedade intelectual associados com métodos específicos da análise de DNA possam ser conferidos a certos laboratórios, os estados membros devem assegurar-se de que tal facto não impeça o acesso à utilização de análises de DNA.

12. Troca internacional de informações

Análises do DNA podem ser obtidas de um laboratório ou instituição que satisfaça todos os requisitos estabelecidos nesta recomendação.

A comunicação internacional de conclusões das análises do DNA só deve ser levada a efeito entre estados que aceitem as condições desta recomendação e em particular, de acordo com os tratados internacionais pertinentes sobre troca de informações em matéria criminal assim como com o artº 12 da Convenção de Protecção de Dados.

2. OBJECTIVOS E RAZÕES DO ESTUDO

O principal objectivo deste estudo residiu, fundamentalmente, no desenvolvimento de metodologias para a análise do DNA, a partir de amostras biológicas, para aplicação na determinação da relação de parentesco entre indivíduos (casos de filiação) e casos de identificação genética humana, em criminalística.

As questões levantadas e as desvantagens apontadas em relação ao uso dos marcadores genéticos convencionais e análise dos loci VNTR via RFLPs fizeram com que surgissem métodos mais eficazes que permitissem a identificação correcta dos alelos dos vários sistemas.

A descoberta da PCR para o estudo dos loci altamente polimórficos, designadamente loci VNTR e STR, constituiu uma inovação muito promissora em várias áreas da ciência e, em particular, na Medicina Legal.

O requisito mais importante para a escolha dos sistemas a utilizar para a análise de DNA por PCR é que segreguem independentemente uns dos outros, ou seja, devem ser usados polimorfismos cujos loci se situem em cromossomas diferentes ou, pelo menos, em braços distintos. Para além de que devem ser conhecidas as sequências que rodeiam a região de repetição, a fim de ser possível a construção dos "primers". Sendo também importante, no caso dos loci VNTR, que as unidades de repetição não sejam demasiado pequenas (≥ 15 pb), para que seja possível distinguir alelos que difiram numa unidade de repetição, nos sistemas de separação utilizados neste trabalho.

Relativamente aos loci STR, que neste estudo foram amplificados dois a dois (duplex), também tiveram que ser escolhidos aqueles em que não se verificasse sobreposição do tamanho dos respectivos alelos.

Neste contexto, foram seleccionados três sistemas AMPFLP: D1S80 (Kasai e col., 1990); 3'ApoB (Boerwinkle e col., 1989); YNZ22 (Horn e col., 1989) e quatro loci STR: HUMVWA31A (Kimpton e col., 1992); HUMTH01 (Polymeropoulos e col., 1991a; Edwards e col., 1992); HUMFES/FPS (Polymeropoulos e col., 1991b); HUMF13A1 (Polymeropoulos e col., 1991c).

Por outro lado, estes sistemas possuem elevado polimorfismo, proporcionando, por isso, um poder informativo apreciável, sendo relativamente fáceis de caracterizar.

Em face do exposto, foi deliniado um plano de trabalho que incluisse vários passos, designadamente:

1º - Da bibliografia disponível sobre os polimorfismos anteriormente referidos, iniciou-se uma investigação pormenorizada, relativamente aos protocolos a usar para a extracção do DNA. Na selecção dos referidos protocolos, teve-se em consideração o tipo de amostra e a rentabilidade obtida em termos de economia de tempo e laboriosidade da técnica empregue, não esquecendo a quantidade e qualidade do DNA.

2º - Optimização das condições de amplificação, separação dos produtos amplificados e identificação dos alelos, o que envolveu a variação e selecção adequada de alguns parâmetros, nomeadamente:

- *Concentrações do DNA a estudar e quantidades a utilizar na mistura de reacção de MgCl₂, dNTPs e Taq polimerase.*
- *Condições de amplificação (tempos e temperaturas de desnaturação, "annealing" dos "primers" e sua extensão).*
- *Tipo de meio a empregar para a separação dos produtos amplificados, ou seja, suporte a utilizar na electroforese, condições electroforéticas e visualização dos alelos.*
- *Metodologia empregue para a análise dos resultados.*

3º - Estudo do perfil genético da população do Norte de Portugal, tendo-se procedido à análise de um número relativamente elevado de amostras, para cada um dos polimorfismos.

4º - Determinação das frequências alélicas e genotípicas, estabilidade geracional e independência entre os loci estudados. Para tal, procedeu-se, em primeiro lugar, à determinação do ajuste às condições do equilíbrio de Hardy-Weinberg com a finalidade de calcular as frequências genotípicas. Estas frequências são imprescindíveis para o cálculo da probabilidade de exclusão a priori e do poder de discriminação, parâmetros indicativos da eficácia identificadora de um locus. Para além de que as frequências genotípicas são usadas para a determinação da probabilidade de paternidade e do valor incriminante. Este último valor indica a força da evidência, isto é, a força da prova dada a evidência, quando os perfis do DNA do vestígio e do suspeito são idênticos.

Em segundo lugar, analisou-se o conjunto dos vários loci a fim de se descartar a possibilidade da existência de associação alélica entre eles, para se poder assegurar que a utilização da regra do produto é correcta.

Finalmente, foram estimados os parâmetros estatísticos F e as distâncias genéticas, porquanto são valores importantes na análise do conjunto de

populações, tanto no que concerne à subestruturação como às diferenças populacionais. Quando se verificarem diferenças entre elas deve evitar-se o uso de bases de dados comuns.

5° - Comparação estatística, em termos de rentabilidade, destes polimorfismos entre si. Foram calculados parâmetros e índices de interesse médico-legal, como a probabilidade de exclusão a priori, que indica a eficácia de um locus na resolução dos casos de filiação, ou seja, o poder informativo por ele proporcionado e ainda o poder de discriminação na conclusão de perícias do âmbito da criminalística, já referidos anteriormente.

6° - Comparação da distribuição das frequências obtidas na população do Norte de Portugal com a de outras populações, a fim de pôr em evidência semelhanças e diferenças existentes entre as bases de dados genéticas, cujo interesse já foi anteriormente referido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras analisadas para o estudo populacional

As amostras estudadas (sangue) foram colhidas em EDTA-K3 e heparina-lítio, por punção venosa, a intervenientes não aparentados em casos de investigação biológica de filiação e provenientes da população do Norte de Portugal. Para cada um dos sistemas foram analisadas 397 amostras, excepto para a YNZ22 que apenas estudámos 146. De cada um dos indivíduos estudados foram acondicionadas, a -20°C, duas alíquotas de 700 µl de sangue (EDTA-K3). Paralelamente, foram efectuadas manchas de 500 µl de sangue (heparina-lítio) em pano de algodão branco.

Para o estudo populacional efectuámos sempre a extracção de DNA com Chelex, a partir das manchas efectuadas no laboratório.

3.2. Amostras de casos forenses

Foram concluídos no período de Dezembro de 1993 a Dezembro de 1996 742 casos de investigação biológica da paternidade. Dos referidos exames, 226 eram relativos a exclusão de paternidade e 553 a não exclusão, a maioria destes últimos (83%), com valores de probabilidade de paternidade superiores a 99.95%. É para notar que um exame pode incluir mais do que um filho e mais do que um pretenso pai. Para a resolução desses casos caracterizaram-se, geralmente, os 3 sistemas AMPFLP (D1S80, 3' ApoB e YNZ22), os 4 loci STR (VWA, TH01, F13A1 e FES) e vários marcadores genéticos convencionais. Nalguns casos, para além dos sistemas atrás mencionados, também se efectuou o estudo dos polimorfismos de sequência HLADQA1 (308) e o Polymarker (217).

Foram estudados 103 casos do âmbito da criminalística, no período atrás referido. A maioria dessas perícias incluiu a análise laboratorial de vestígios de natureza diversa, como aconteceu, por exemplo, em casos de violação, em que para além do exsudato vaginal da violada também foram enviados, para exame, o sangue e mancha ou manchas suspeitas, normalmente existentes em peças de vestuário e ainda nalguns casos, sangue de um ou mais suspeitos.

Os exames solicitados em maior número foram os relativos a suspeita de violação (62 casos).

Do total das 103 perícias solicitadas, 26 eram referentes a casos de autópsias em que foram enviados, para exame, instrumentos e/ou peças de vestuário com manchas para comparação com sangue da vítima e nalguns casos com sangue de um suspeito. À semelhança com as perícias médico-legais relativas a violações, foi-nos presente o suspeito apenas em 8 casos. Em 4 dos 26 exames realizados foi solicitado o estudo de pêlos e em 3 casos a análise de pontas de cigarros (saliva) para comparação com a vítima e o suspeito ou suspeitos.

Ainda dos 103 casos, 6 eram relativos a ofensas corporais cujas vítimas foram examinadas no Serviço de Clínica-Médico-Legal, tendo-lhes sido colhido sangue para comparação com as manchas existentes, na maioria dos casos, em peças de vestuário e ou instrumentos.

Os restantes casos (9) eram de natureza diversa e não implicaram o estudo do DNA.

3.3. Extracção do DNA

Reagentes

Cloreto de sódio

Merck (6404)

Citrato trissódico

Riedel-de Haen (32320)

Acetato de sódio

Merck (6267)

Ácido acético glacial

Merck (0063)

Proteinase K

Sigma (P0390)

SDS

Sigma (L-4390)

Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

USB (20084)

Etanol absoluto

Merck (0983)

Tris

Sigma (T-8524)

EDTA-dissódico

Sigma (E-5134)

Chelex

Sigma (7901)

Ditiotreitol

Sigma (D-0632)

Glicogénio

Sigma (G-8876)

Soluções

SSC 20X pH 7	TE
SSC 1X	Chelex 5%
Acetato de sódio 0.2M pH 7	Buffer de lise
Solução de proteinase K 10mg/ml	Ditiotreitol (DTT) 1M
SDS 10%	Glicogénio 20mg/ml
Etanol 80%	

3.3.1. Extração de DNA de sangue periférico com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

O método usado baseou-se no descrito por Smith e col. (1990)¹.

Descongelaram-se os tubos (1.5 ml) contendo 700 µl de sangue à temperatura ambiente antes de se iniciar o processo e ajustou-se o volume da amostra a 1,5 ml com SSC 1X. Misturaram-se usando o vórtex, durante 10-15 s.

Centrifugaram-se em microcentrífuga a 13.000 r.p.m. durante 1 m.

Colheu-se 1 ml do sobrenadante de cada um dos tubos e rejeitou-se, tendo o cuidado de não se alterar o sedimento de leucócitos.

Juntou-se 1 ml de SSC 1X a cada tubo. Ressuspendeu-se suavemente o sedimento de células, invertendo os tubos várias vezes e centrifugou-se a 13.000 r.p.m.

Retirou-se o sobrenadante, cuidadosamente, até que o nível daquele estivesse justamente por cima do sedimento.

Juntaram-se 375 µl de acetato de sódio 0.2M a pH 7 a cada sedimento de leucócitos e ressuspendeu-se suavemente em agitador. Adicionaram-se 10 µl de uma solução de proteinase K a 10 mg/ml em Tris 10 mM a pH 8 a cada amostra e misturou-se brevemente no vórtex.

Juntaram-se 25 µl de SDS 10% a cada amostra e misturou-se no vórtex.

¹ A composição das soluções utilizadas encontra-se na última página de Material e Métodos.

Incubaram-se os tubos durante cerca de 1h num b.m. a 56°C com agitação. As amostras foram agitadas cada 30 m. Pode-se aumentar o tempo de incubação até que o sedimento esteja completamente dissolvido. Centrifugaram-se os tubos durante 1 s.

Juntaram-se 120 µl de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) a cada tubo e misturaram-se durante aproximadamente 10 s no agitador até se ter obtido uma emulsão com aspecto leitoso. Centrifugaram-se 3 m a 13.000 r.p.m.

Separou-se a fase aquosa superior de cada amostra para um tubo (1.5 ml), tendo o cuidado de não arrastar material da interfase ou das fases orgânicas inferiores. Os volumes correspondentes à referida fase aquosa foram de 200-400 µl.

Recuperou-se o DNA de cada amostra adicionando dois volumes de etanol (± 800 µl) frio (-20°C). Inverteram-se os tubos suavemente até que o DNA fosse visível e formasse uma nuvem (DNA).

Centrifugaram-se a 13.000 r.p.m. durante 1 m. Colheu-se o sobrenadante de cada amostra, tendo tido o cuidado de não alterar o precipitado de DNA, e rejeitou-se.

Juntaram-se 200 µl de acetato de sódio 0.2 M pH 7 a cada tubo. Misturou-se brevemente e colocou-se num b.m. a 56°C durante pelo menos 30 m ou até que o DNA estivesse completamente dissolvido. As amostras foram agitadas cada 15 m.

Misturou-se suavemente o conteúdo de cada tubo. Para recuperar o DNA juntaram-se a cada amostra 400 µl de etanol a 100% frio (-20°C) e inverteu-se suavemente o tubo até que se formasse uma nuvem (DNA).

Centrifugaram-se a 13.000 r.p.m. durante 30 s. Retirou-se o sobrenadante de cada amostra e rejeitou-se. Juntou-se 1 ml de etanol a 80% frio (-20°C) a cada tubo. Descolou-se o "pellet". Centrifugaram-se a 13.000 r.p.m. durante 1 m e retirou-se o sobrenadante rejeitando-o.

Centrifugaram-se novamente durante uns segundos e retirou-se o sobrenadante, tendo o cuidado de não afectar o precipitado de DNA. Os restos de etanol podem eliminar-se por evaporação debaixo de uma lâmpada de 100 W ou preferencialmente utilizando o Speed Vac, pois não

é necessário retirar todo o sobrenadante, não se correndo o risco de alterar o precipitado.

Logo que o sedimento secou, dissolveu-se em 40 µl de TE. As amostras podem ser armazenadas a 4°C durante uma semana ou a -70°C indefinidamente.

3.3.2. Extracção de DNA de manchas de sangue com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

Cortaram-se cerca de 2 mm² da superfície manchada e colocaram-se num tubo (1.5 ml) juntando-se 500 µl de solução de lise à qual se adicionaram 2% de SDS. Antes de se usar esta solução, juntaram-se 2% de proteinase K e 4% de DTT (estas soluções devem ser conservadas a -20°C). Incubou-se toda a noite a 37°C.

Recuperou-se a solução de lise por centrifugação a 12.000 r.p.m. durante 3 m, colocando-se o tubo que contém a amostra dentro de um segundo tubo, tendo-se previamente perfurado o primeiro tubo com uma agulha estéril.

Após a centrifugação toda a solução ficou no segundo tubo e foi a partir desta que se procedeu à extracção do DNA. Juntaram-se 200 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) agitou-se e centrifugou-se a 12.000 r.p.m. durante 5 m.

Retirou-se a fase aquosa para outro tubo e precipitou-se o DNA juntando 1/10 do volume de acetato de sódio 2M, 1 µl de solução de glicogénio e dois volumes de etanol absoluto frio (-20°C). Misturou-se invertendo-se cuidadosamente os tubos.

Se o DNA não for visível coloca-se o tubo a -20°C durante 1 hora.

Centrifugou-se durante 20 m a 12.000 r.p.m., retirou-se o sobrenadante e lavou-se o "pellet" com etanol a 80%, também frio. Centrifugou-se a 12.000 r.p.m., retirou-se o sobrenadante e secou-se o "pellet". Esta secagem é efectuada de preferência no Speed Vac, ressuspendo-se em seguida no volume adequado de TE (± 20 µl).

3.3.3. Extração de DNA de sangue líquido ou manchas de sangue com Chelex

O Chelex 100 (Singer-Sam e col., 1989) é uma resina quelante com grande afinidade para iões polivalentes, por isso previne a degradação do DNA em presença de iões metálicos a altas temperaturas e em condições de baixa força iónica.

Pipetou-se 1 ml de água destilada estéril para cada tubo (1.5 ml).

Juntaram-se 3 mm² de mancha ou 4 µl de sangue total. Agitaram-se cuidadosamente e incubaram-se à temperatura ambiente durante 30 m.

Agitaram-se os tubos em vórtex 10 s e centrifugaram-se durante 3 m a 13.000 r.p.m.

Eliminou-se o sobrenadante com micropipeta, excepto 30 µl. Se se tratar de uma mancha, deve conservar-se dentro do tubo.

Juntou-se Chelex a 5% até atingir um volume de 200 µl (cerca de 170 µl) e incubaram-se em b.m. a 56°C durante 30 m.

Agitaram-se em vórtex 10 s e colocaram-se os tubos em água a ferver durante 8 m, tendo-se previamente perfurado a tampa com uma agulha estéril.

Agitaram-se em vórtex 10 s e centrifugaram-se durante 3 m a 13.000 r.p.m.

Conservou-se o DNA extraído a 4°C (cerca de 1 mês) ou a -20°C ou a temperaturas inferiores quando se pretendeu conservar durante mais tempo.

3.3.4. Extração de DNA de raízes de pêlos

Lavou-se o pêlo inteiro em água destilada, cortou-se cerca de um centímetro de extensão incluindo a raiz e colocou-se num tubo ao qual se adicionaram 200 µl de Chelex a 5%. Incubou-se a 56°C durante 6-8 horas ou toda a noite.

Agitou-se o tubo no vórtex durante cerca de 5-6 s e colocou-se em água a ferver durante 8 m, tendo o cuidado de manter o pêlo sempre submerso na solução.

Agitou-se em vórtex durante 5-6 s. Centrifugou-se durante 2-3 m a 13.000 r.p.m.

Procedeu-se ao acondicionamento da amostra, como foi anteriormente referido, até se efectuar a amplificação.

3.3.5. Extracção de DNA de exsudatos vaginais ou de manchas de esperma

A partir do exsudato vaginal e/ou lavado vaginal colhido à vítima, fez-se uma mancha em pano de algodão branco.

Cortaram-se quadrados de tecido manchado com cerca de 2 mm² de área e colocaram-se em tubos (1.5 ml). Juntaram-se 500 µl de buffer de lise, 15 µl de proteinase K e 35 µl de SDS. Incubaram-se a 56°C durante 2 horas.

Recuperou-se a mistura de reacção por centrifugação, tendo-se previamente perfurado o tubo na tampa e na parte inferior e introduzido num outro tubo. Neste último tubo obtivemos um sobrenadante contendo células vaginais e no fundo do tubo um "pellet" de células espermáticas.

O sobrenadante (fase vaginal) foi transferido para outro tubo e guardado a 4°C até que se procedeu à extracção com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.

Ressuspendeu-se o "pellet" espermático em 400 µl de acetato de sódio 0.2M. Agitou-se em vórtex e juntaram-se 20 µl de proteinase K, 20 µl de DTT e 30 µl de SDS. Agitou-se em vórtex e incubou-se toda a noite a 37°C.

Juntaram-se 200 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) ao tubo que continha a fase vaginal e ao da fase espermática e misturou-se em vórtex. Centrifugou-se durante 2 m a 1.300 r.p.m.

Recolheu-se a fase superior à qual se adicionou 1 μ l de glicogénio e 2 volumes de etanol absoluto ($\pm 900 \mu$ l) para precipitar o DNA. Inverteu-se suavemente o tubo.

Quando o DNA não era visível, o que ocorreu na maioria das vezes por se tratar de quantidades exíguas de DNA, colocou-se o tubo durante 2 horas a -20°C .

Centrifugou-se durante 20 m a 12.000 r.p.p. , retirou-se o sobrenadante e rejeitou-se.

Lavou-se o “pellet” de DNA com 1 ml de etanol a 80% frio (-20°C). Agitou-se suavemente em vórtex.

Centrifugou-se durante 2 m a 12.000 r.p.m., retirou-se o sobrenadante e rejeitou-se. Secou-se o “pellet” debaixo de uma lâmpada ou preferencialmente no Speed Vac.

Ressuspendeu-se o “pellet” num volume adequado de TE ($\pm 20 \mu$ l).

Microcon 100

Uma alternativa ao uso do etanol para a precipitação do DNA é a utilização do Microcon 100 que, teoricamente, possibilita a obtenção de DNA mais puro.

Após a adição do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e depois da separação da fase superior colocou-se esta fase no Microcon 100 e juntou-se 100 μ l de TE. Centrifugou-se durante 10 m a 3.200 r.p.m.. Rejeitou-se o tampão.

Juntou-se ao DNA existente no Microcon 200 μ l de TE e centrifugou-se durante 10 m a 3.200 r.p.m. e rejeitou-se o tubo com tampão.

Adicionou-se ao tubo com filtro 20-200 μ l de TE e inverteu-se num tubo limpo. Centrifugou-se 5 m a 3.200 r.p.m.

Retirou-se o tubo com o filtro, pois o DNA encontrava-se no tubo inferior. Acondicionou-se a amostra até à sua utilização ou a 4°C ou a temperaturas inferiores.

3.4. QUANTIFICAÇÃO DO DNA

3.4.1. Quantificação espectrofotométrica do DNA

A estima da quantidade e pureza do DNA extraído apenas se efectuou naquelas amostras que foram extraídas com fenol-clorofórmio. A valorização realizou-se analisando o espectro de absorção a 260 e 280 nm da solução que continha o DNA em estudo.

O valor de absorção a 260 nm indica a concentração da amostra analisada, uma vez que uma unidade de absorvância a 260 nm equivale a uma concentração de DNA de dupla cadeia de 50 µg/ml. Para estimar a concentração de DNA preparou-se uma diluição 1/100 da amostra problema dissolvendo 4 µl de amostra em 396 µl de água estéril. O "branco" foi preparado a partir de uma diluição 1/100 do solvente em que se encontrava o DNA em estudo (TE).

A concentração do DNA na amostra em estudo é dada directamente pelo aparelho (Pharmacia LKB Ultrospec III).

Para se saber a pureza do DNA calcula-se a relação:
 $R = (Abs_{260}) / (Abs_{280})$.

Este valor indica se o DNA da amostra se encontra puro, uma vez que a absorvância a 280 nm corresponde à quantidade de restos proteicos misturados com o DNA. Um DNA de cadeia dupla de grande pureza proporciona valores de R entre 1.8 e 2.

3.4.2. Valorização fluorimétrica do DNA

A bisbenzimidazida, vulgarmente conhecida por corante Hoechst 33258, apresenta variações de fluorescência em presença do DNA. Utilizando esta propriedade é possível valorizar amostras que contenham pequenas quantidades de DNA.

O espectro de excitação do Hoechst 33258 é 365 nm e emite a 458 nm. A exposição da amostra de DNA com a solução de Hoechst 33258 a um comprimento de onda de 365 nm, mediante uma lâmpada de mercúrio, provoca uma excitação da amostra com emissão de luz (458 nm). O

aparelho regista a emissão a este comprimento de onda e a medida de fluorescência permite a quantificação directa do DNA.

Para se conhecer a concentração de uma amostra é necessário em primeiro lugar utilizar um "branco" que não contenha DNA e posteriormente calibrar o aparelho com uma solução padrão de concentração conhecida, obtendo-se directamente a concentração do DNA da amostra em estudo.

Este método é usado para vestígios biológicos em que as concentrações de DNA são baixas (< 10 ng/μl).

3.5. Loci analisados por PCR: AMPFLP e STR

Foram analisados três sistemas AMPFLP: D1S80 (Kasai e col., 1990); 3'ApoB (Boerwinkle e col., 1989); YNZ22 (Horn e col., 1989) e quatro loci STR: HUMVWA31A (Kimpton e col., 1992); HUMTH01 (Polymeropoulos e col., 1991a; Edwards e col., 1992); HUMFES/FPS (Polymeropoulos e col., 1991b); HUMF13A1 (Polymeropoulos e col., 1991c).

Para o estudo populacional foram apenas usadas amostras extraídas com Chelex, como foi anteriormente referido.

3.5.1. Amplificação do DNA

A extracção do DNA, preparação da PCR e tipagem dos produtos amplificados efectuou-se em áreas separadas do laboratório, usando-se luvas em todos os passos e diferentes micropipetas, consoante a área de trabalho, para evitar o fenómeno de "carry-over". O material utilizado, isto é, tubos e pontas de pipetas eram descartáveis. Usaram-se pontas de pipetas com filtro, principalmente, para o manuseamento dos produtos de amplificação, ou seja, buffer, MgCl₂, "primers", dNTPs e Taq polimerase.

A preparação das amostras para PCR efectuou-se em câmara de fluxo laminar.

Para além das normas descritas, foram tomadas outras precauções, como descreveram Kwok e Higuchi (1989).

3.5.1.1. "Primers"

Os "primers", com excepção do D1S80 (Perkin Elmer), foram sintetizados pela Pharmacia, cujas sequências tinham sido previamente publicadas. A amplificação para este sistema foi efectuada usando o Kit de amplificação da Perkin Elmer (N808-0054), cuja mistura de reacção inclui "primers", AmpliTaq DNA polimerase e dNTPs, sendo apenas necessária, aquando da preparação das amplificações, a adição de MgCl 5 mM, que também faz parte do Kit.

A concentração dos "primers" foi, para a 3'ApoB e YNZ22, de 300 ng/μl, tendo-se, após a obtenção daquela concentração, aliquotado pequenas quantidades em diferentes tubos e conservado a -20°C. Para os loci STR foram usadas concentrações finais dos "primers" de 10 pmol.

As sequências dos "primers" foram para cada um dos sistemas:

D1S80 (Budowle e col., 1991)

primer A (28 mer): 5'-GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G-3'

primer B (29 mer): 5'-GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC-3'

3'ApoB (Boerwinkle e col., 1989)

primer A (20 mer): 5'-ATG GAA ACG GAG AAA TTA TG-3'

primer B (20 mer): 5'-CCT TCT CAC TTG GCA AAT AC-3'

YNZ22 (Horn e col., 1989)

primer A (20 mer): 5'-CGA AGA GTG AAG TGC ACA GC-3'

primer B (21 mer): 5'-CAC AGT CTT TAT TCT TCA GCG-3'

HUMVWA31A (Kimpton e col., 1992)

primer A (24 mer): 5'-CC TAG TGG ATG ATA AGA ATA ATC-3'

primer B (30 mer): 5'-GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG-3'

HUMTH01 (Edwards e col., 1992)

primer A (24 mer): 5'-GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT-3'

primer B (24 mer): 5'-GTG ATT CCC ATT GGC CTG TTC CTC-3'

HUMF13A1 (Polymeropoulos e col., 1991)

primer A (19 mer): 5'-ATG CCA TGC AGA TTA GAA A-3'

primer B (20 mer): 5'-GAG GTT GCA CTC CAG CCT TT-3'

HUMFES/FPS (Kimpton e col., 1992)

primer A (20 mer): 5'-GGG ATT TCC CTA TGG ATT GG-3'

primer B (20 mer): 5'-GCG AAA GAA TGA GAC TAC AT-3'

Os "primers" A dos loci STR são marcados com fluorescência.

Reagentes

DIS80

Kit Perkin Elmer (N808-0054) constituído por:

Buffer 1X (10mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatina)

dNTPs 200 µM

Primer 1 µM de cada

AmpliTaq 2.5 U

3'ApoB e YNZ22

Buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCL)

+

MgCl₂ 25 mM

Perkin Elmer (N808-0130)

dNTPs-dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10 mM em H₂O, pH 7

Perkin Elmer (808-0007)

AmpliTaq 5U/µl

Perkin Elmer (N801-0060)

STRs

Buffer 10X (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ e 100 mM Tris-HCl, pH 9)

Pharmacia (27-0799A)

dNTPs-dATP, dGTP, dCTP, dTTP 100 mM em H₂O, pH 7.5

Pharmacia (27-2035-02)

Taq 5 U/µ

Pharmacia (27-0799-03)

3.5.1.2. Misturas de reacção

DIS80

Utilizaram-se 20 µl de mistura de reacção incluída no Kit, aos quais se juntaram 10 µl de MgCl₂ 5 mM e 20 µl de Chelex (DNA).

3'ApoB e YNZ22

	3'ApoB/tubo	YNZ22/tubo
Buffer 10X	5 µl	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	3 µl	3 µl
dNTPs 10 mM	5 µl	5 µl
Primer A	1.6 µl	1 µl
Primer B	1.6 µl	1 µl
Taq 5U/µl	0.3 µl	0.3 µl
DNA (Chelex)	33.5 µl (10-50 ng DNA)	34.7 µl (10-50ng DNA)

STRs

	VWA + F13A1/tubo
Buffer 10X	5 µl
dNTPs 100 mM	5 µl (1:10)
Primer A (VWA)	0.6 µl
Primer B (VWA)	0.6 µl
Primer A (F13A1)	0.9 µl
Primer B (F13A1)	0.9 µl
Taq 5U/µl	0.25 µl
DNA (Chelex)	10 µl
H ₂ O	até volume final de 50 µl

	TH01 + F13A1/tubo
Buffer 10X	5 μ l
dNTPs 100 mM	5 μ l (1:10)
Primer A (TH01)	1 μ l
Primer B (TH01)	1 μ l
Primer A (FES)	0.75 μ l
Primer B (FES)	0.75 μ l
Taq 5 U/μl	0.25 μ l
DNA (Chelex)	10 μ l
H2O	até volume final de 50 μ l

As misturas de reacção foram preparadas em conjunto e posteriormente distribuídas pelos tubos correspondentes ao número de amostras de DNA a analisar, tendo-se tido o cuidado de manter os produtos em gelo até serem usados.

Adicionou-se a cada tubo uma gota de óleo mineral, antes de serem colocados no termociclador, a fim de se evitar a evaporação.

Incluiu-se nas reacções de amplificação um "controlo negativo" e um "controlo positivo". O primeiro continha a mistura de reacção e água e servia para detectar uma possível contaminação. O segundo era constituído por uma amostra já amplificada e tipada, para comprovar se a amplificação foi correctamente efectuada.

3.5.1.3. Condições de amplificação

AMPFLP

<i>DIS80</i>		<i>3'ApoB</i>		<i>YNZ22</i>	
94°C 1 m	x 29 ciclos	94°C 8 m	x 26 ciclos	95°C 7 m	x 30 ciclos
65°C 1 m		94°C 1 m		95°C 1 m	
72°C 1 m		60°C 6 m		60°C 1 m	
72°C 10 m		72°C 1 m		72°C 3 m+10s/ciclo	
			72°C 7 m		

STRs

94°C 45s	x 30 ciclos
54°C 1 m	
72°C 1 m	

As amplificações processaram-se no termociclador da Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480.

As amostras depois de amplificadas foram acondicionadas a 4°C até à comprovação da amplificação e/ou tipagem.

3.5.2. Marcadores de pesos moleculares

Para a identificação dos diferentes alelos de cada sistema prepararam-se "ladders" alélicos.

Os referidos "ladders" obtiveram-se misturando os produtos amplificados de todos os alelos de um sistema ou pelo menos dos alelos mais frequentes, tendo o cuidado de seleccionar o menor número possível de indivíduos com genótipos distintos.

DIS80

Usou-se o "ladder" alélico fornecido pela Perkin Elmer e incluído no Kit de amplificação, contendo alelos de 14 a 41 unidades de repetição, excepto o de 15 unidades de repetição, por ser muito raro.

3'ApoB e YNZ22

Para além do "ladder" alélico preparado no laboratório, como foi anteriormente referido, usou-se o 100 base pair ladder (1:10) da Pharmacia.

STRs

Como os loci STR foram analisados no sequenciador automático da Pharmacia (Pharmacia LKB-ALF DNA Sequencer) utilizaram-se padrões internos (100 pb e 300 pb) adicionados a todas as amostras estudadas, assim como vários padrões externos (50 pb-500 pb), em cada corrida.

O uso dos padrões internos permitiu eliminar diferenças de mobilidade entre os diferentes poços (lanes). Aqueles foram escolhidos por forma a que o seu tamanho (pb) não se sobrepusesse ao dos fragmentos de PCR a analisar.

3.5.3. Comprovação da amplificação

Antes de se efectuar a tipagem das amostras é conveniente verificar se estas se encontram bem amplificadas e nos casos em que não se efectue a quantificação do DNA após a extracção, a intensidade das bandas dá-nos uma indicação da quantidade de produto amplificado a usar, quando se fizer a aplicação das amostras no gel definitivo.

Para isso, utilizou-se um pequeno volume de amplificado (3-5 µl) ao qual se juntou uma pequena quantidade de azul de bromofenol (0.3-0.5 µl). Aplicaram-se as amostras em minigeis de agarose a 2.5% ou 2% com brometo de etídio.

3' ApoB, YNZ22 e STR

Reagentes

Agarose

FMC Seakem GTG (50074)

Ácido bórico

J.T. Baker (0055)

Brometo de etídio

Sigma (E-8751)

EDTA dissódico

Sigma (E-5134)

Tris

Sigma (T-8524)

100 Base pair ladder

Pharmacia (27-4001-01)

Azul de bromofenol

Sigma (B-6896)

Soluções

TBE 10X

TBE 1X

Brometo de etídio 10 mg/ml

Azul de bromofenol

3.5.3.1. Composição do gel

	2.5 %	2%
Agarose Seakem GTG	1.25 g	1 g
TBE 1X +Brometo etídio	50 ml	50 ml
Brometo de etídio	2.5 µl	2.5 µl

À solução tampão de TBE 1X usada na preparação do gel juntou-se brometo de etídio ($\pm 40 \mu\text{l/l}$).

Para efectuar a comprovação dos produtos amplificadas usou-se uma tina da Pharmacia LKB, modelo GNA 100.

3.5.3.2. Preparação do gel

O molde (10.5 cm x 8 cm) da tina onde se fez o gel, foi previamente preparado aplicando em cada uma das extremidades duas tiras de fita cola sobrepostas. Colocou-se o pente na posição conveniente, junto do cátodo. Dissolveu-se a agarose na solução tampão de TBE 1X e aqueceu-se até ferver. Arrefeceu-se a $\pm 60^{\circ}\text{C}$ e juntou-se o brometo de etídio.

Lançou-se o gel no molde, previamente colocado sobre uma superfície nivelada, e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente ($\pm 30\text{ m}$).

3.5.3.3. Preparação das amostras

Juntaram-se 0.3-0.5 μl de azul de bromofenol a 3-5 μl de cada produto amplificado.

3.5.3.4. Aplicação das amostras

Retirou-se a fita cola das extremidades do molde contendo o gel e colocou-se dentro da tina, onde se pôs a solução tampão (300 ml).

Tirou-se cuidadosamente o pente na vertical, por forma a não afectar os poços.

Aplicaram-se as amostras nos poços, reservando pelo menos um deles para migrar um marcador de pesos moleculares. Neste estudo, utilizou-se o "100 base pair ladder".

3.5.3.5. Condições electroforéticas

Depois das amostras aplicadas colocou-se a tampa da tina, ligaram-se os eléctrodos e seleccionaram-se as condições electroforéticas: 35 V durante ± 2 horas.

3.5.4. Electroforese dos produtos amplificados

3.5.4.1. Composição do gel

DIS80

A electroforese e revelação dos produtos amplificados foi realizada no PhastSystem da Pharmacia LKB. Trata-se de um aparelho de electroforese que integra sistemas automáticos que permitem efectuar: a aplicação das amostras, a separação electroforética e a revelação ou coloração, num único sistema.

Este equipamento consiste numa câmara de separação termostaticada Peltier, numa fonte de alimentação programável e numa unidade de revelação.

A combinação deste sistema com o uso de phast-geis e buffer strips proporciona vantagens relativamente aos sistemas convencionais de electroforese, nomeadamente a rapidez das separações e a redução da possibilidade de erros humanos, uma vez que o sistema é automatizado.

Os phast-geis são geis nativos de poliacrilamida (Native PAGE) os quais, em combinação com o sistema "SDS buffer strip", proporcionam separações de alta resolução.

Trata-se de geis ultrafinos de poliacrilamida (4.5% T, 3% C) que ao serem submetidos a altas voltagens desenvolvem um mínimo de calor e permitem a separação dos produtos amplificados numa pequena distância. As tinas de separação são termostaticadas e refrigeradas por elementos Peltier o que torna possível aumentar a intensidade da corrente e obter boas resoluções em curtos períodos de tempo.

O tamanho dos geis é de 43x50x0.45 mm, podendo usar-se simultaneamente dois geis, o que permite analisar 16 amostras de DNA e 8 "ladders", com o aplicador 12/0.3 µl.

Reagentes

Phastgeis gradiente 10-15
Pharmacia (57-6781-02)

Nitrato de prata
Merck (01512)

SDS buffer strips
Pharmacia (17-0516-01)

Carbonato de sódio
Merck (6392)

Etanol absoluto
Merck (0983)

Formaldeído 35%
Merck (4001)

Ácido acético glacial
Merck (0063)

Glicerol
Merck (4094)

Soluções

Etanol 50% + Ácido acético 1%

Carbonato de sódio 3%

Etanol 10% + Ácido acético 5%

Ácido acético 10%+ glicerol 5%

Nitrato de prata 0.25%

Ácido acético 5%

3' ApoB e YNZ22

Reagentes e soluções

Os reagentes e soluções usados foram os mesmos utilizados para fazer o gel de comprovação dos produtos amplificados, apenas variaram as quantidades.

	3' ApoB (2.5%)	YNZ22 (2%)
Agarose Seakem GTG	5 g	4 g
TBE 1X + Brometo de etídio	200 ml	200 ml
Brometo de etídio	10 µl	10 µl

STRs

O uso de tecnologia automatizada baseada em fluorescência para a detecção dos loci AMPFLP e STR foi recentemente descrita (Schwartz e col., 1992; Ziegle e col., 1992).

No presente estudo os loci STR foram analisados no sequenciador automático da Pharmacia LKB, ALF DNA Sequencer. Trata-se de um sistema idealizado para sequenciação e análise de fragmentos, consistindo em três componentes: um módulo para electroforese, uma fonte de alimentação e um computador.

O módulo de electroforese possui um laser fixo de argon, para além de uma placa termostaticada acoplada a um sistema onde circula água a temperatura regulável, o que minimiza o "smiling", habitualmente observado quando se efectua uma electroforese, evitando erros de leitura.

O computador é IBM compatível, possui um sistema operativo OS/2 e o "software" ALF Manager. Este "software" permite a determinação directa do tamanho dos produtos de PCR.

Relativamente à composição dos geis, foram usados geis de Ready Mix e geis de Hydrolink.

Reagentes

Ready Mix

Pharmacia (17-1035)

TEMED

Pharmacia (17-1312-01)

Persulfato de amónio

Pharmacia (17-1311-01)

Bind Silane

Pharmacia (17-1330-01)

Long Ranger 50%

FMC (50611)

Etanol absoluto

Merck (0983)

Ureia ALF grade

Pharmacia (17-0889-01)

Ácido acético glacial

Merck (0063)

Soluções

TBE 10X

Persulfato de amônio 10%

Gel de Ready Mix		Gel de Hydrolink	
Ready Mix	37.5 ml	Long Ranger 50%	4 ml
Persulfato amônio 10%	275 µl	Ureia ALF grade	16.8 g
		TBE 10X	2.4 ml
		H2O	até 40 ml
		TEMED	20 µl
		Persulfato amônio 10%	225 µl

3.5.4.2. Preparação do gel

DIS80

Como foi anteriormente referido os geis para tipagem do DIS80 já vêm preparados.

3'ApoB e YNZ22

A forma de preparação dos geis para tipagem dos produtos amplificados (identificação dos alelos) é idêntica à seguida para os geis de comprovação dos produtos amplificados, apenas o molde de preparação do gel tem maiores dimensões (20 cm x 20 cm), assim como a tina usada, pois neste caso é uma tina da Pharmacia LKB GNA-200.

STRs

Para este estudo foram utilizadas placas curtas (20x34cm), fornecidas pela Pharmacia (Short plate Kit 18-1100-88), tendo sido a espessura do gel usada de 0.35 mm. A distância de migração dos produtos amplificados dos poços ao laser foi de 10 cm.

Antes de ter procedido à montagem do conjunto onde polimerizou o gel e de acordo com as indicações do fornecedor (placa refrigerada e vidro),

aplicou-se, na zona onde encaixava o pente e onde foram aplicadas as amostras, uma solução constituída por: Bind Silane (1.87 μ l), etanol absoluto (500 μ l) e ácido acético a 10% (125 μ l).

Gel de Ready Mix

Usou-se a embalagem onde esta solução é fornecida e juntou-se o volume de solução anteriormente indicada e o persulfato de amónio.

Agitou-se cuidadosamente e com o auxílio do bico da embalagem, lançou-se a solução entre o conjunto formado pelo vidro e placa, tendo tido o cuidado de evitar a formação de bolhas.

Hydrolink

Desgazeificou-se por filtração a solução contendo o Long Ranger, a ureia, o TBE 10X e a H₂O, durante 3-5 m. Juntaram-se 20 μ l de TEMED e 225 μ l de persulfato de amónio e procedeu-se como foi anteriormente descrito.

3.5.4.3. Preparação das amostras

DIS80

Colocaram-se 2 μ l de cada uma das amostras (8 para cada gel) a estudar sobre um suporte fornecido juntamente com o equipamento e 5 μ l de "ladder", uma vez que foi aplicado oito vezes.

3'ApoB e YNZ22

Prepararam-se as amostras juntando a 15 μ l dos produtos amplificados 1.5 μ l de azul de bromofenol.

STRs

Reagentes

Sizer 100 5 fmol/ μ l em TE (10 mM Tris-HCl pH 7.6) e 1 mM EDTA
Pharmacia (27-4523-01)

Sizer 300 5 fmol/ μ l em TE (10mM Tris-HCl pH 7.6) e 1 mM EDTA
Pharmacia (27-4528-01)

Loading Dye (formamida desionizada a 100% e azul de dextrano 2000 5 mg/ml)
Pharmacia (27-4528B)

Sizer 50-500 cada fragmento com uma concentração de 5 fmol/ μ l em TE (10 mM Tris-HCl pH 7.6) e 1 mM de EDTA
Pharmacia (27-4525-01)

Soluções

TBE 0.6X

TE

O sizer 50-500 pb é uma mistura de dez fragmentos marcados com fluoresceína.

As amostras foram preparadas adicionando a 1-2 μ l do produto amplificado em "duplex" (VWA + F13A1 e TH01 + FES), 4 μ l de "Loading Dye" e 1 μ l de cada um dos padrões internos (100 pb e 300 pb).

Em cada gel usaram-se pelo menos dois padrões externos, preparados do seguinte modo: 2 μ l de "Sizer" 50-500 pb, 6 μ l de "Loading Dye" e 6 μ l de TE.

Antes de se efectuar a aplicação das amostras, procedeu-se à sua desnaturação a 95° C, durante 3 m.

3.5.4.4. Aplicação das amostras

DIS80

Colocaram-se os geis na câmara de separação, seguindo as normas indicadas pelo fornecedor, mergulhou-se o pente na amostra respectiva, tendo o cuidado de tocar com cada "dente" apenas numa amostra, seguindo a ordem previamente estabelecida.

Colocou-se o "pente" já carregado com as amostras junto do cátodo, tendo sido o próprio sistema que automaticamente as aplicou.

3'ApoB e YNZ22

A aplicação das amostras foi feita de forma similar à descrita para o gel de comprovação.

STRs

Depois de se ter colocado o conjunto vidro-placa termostática, seguiram-se as instruções do manual de utilização, no que respeita à programação das condições de corrida e ao ajuste do "laser". Antes de se ter procedido à aplicação das amostras, colocou-se o reservatório superior contendo a solução tampão, retirou-se o "pente" e com a mesma solução lavaram-se os poços.

Aplicaram-se as amostras da esquerda para a direita, seguindo uma ordem previamente estabelecida.

3.5.4.5. Condições electroforéticas

DIS80

As condições electroforéticas foram: 250 V, 10 mA e 3 W a uma temperatura de 15°C até atingir 100Vh.

3'ApoB e YNZ22

As condições electroforéticas foram:

3'ApoB 70 V, durante \pm 6 h e 30 m

YNZ22 90V, durante \pm 2h e 45 m

STRs

As condições electroforéticas foram:

Ready Mix

Voltagem	600 V	Potência do laser	3 mW
Intensidade	60 mA	Int. de aplicação	0.84 s
Potência	50 W	Tempo de corrida	200 m
Temperatura	50°C		

Hydrolink

Voltagem	1000 V	Potência do laser	3 mW
Intensidade	35 mA	Int. de aplicação	2 s
Potência	25 W	Tempo de corrida	300 m
Temperatura	50°C		

3.5.4.6. Revelação

DIS80

Colocaram-se os geis na câmara de revelação e os tubos de entrada da câmara mergulhados nas respectivas soluções, seguindo as instruções indicadas pelo fornecedor. Previamente foi programado o processo de revelação que, neste estudo, foi constituído pelos seguintes passos:

Soluções	Tempo	Temperatura
Etanol 50%+Ácido acético 1%	2 m	50°C
Etanol 10%+Ácido acético 5%	2 m	50°C
Etanol 10%+Ácido acético 5%	4 m	50°C
Água	6 m	50°C
Etanol 10%+Ácido acético 5%	3 m	50°C
Etanol 10%+Ácido acético 5%	5 m	50°C
H2O	2 m	50°C
H2O	2 m	50°C
Nitrato de prata 0.25%	13 m	40°C
H2O	30 s	30°C
H2O	30 s	30°C

Depois de finalizado este processo, retiraram-se os geis da câmara e colocaram-se em placas de Petri, às quais se juntaram as soluções de carbonato de sódio e formaldeído. Esta operação foi feita no escuro, agitando-se cuidadosamente os geis até aparecerem as bandas.

Para parar a reacção juntou-se ácido acético a 5% e para conservar os geis ácido acético a 10% e glicerol a 5%.

3'ApoB e YNZ22

Depois de terminada a electroforese colocou-se o gel sobre um transiluminador de U.V. (Macrovue 2011 da LKB), efectuando-se directamente a leitura.

STRs

Os STRs não necessitam de revelação, porquanto o "software" fornece directamente o tamanho dos fragmentos (pb).

3.5.4.7. Determinação da precisão (%) das análises efectuadas no sequenciador automático (ALF)

A análise dos loci STR (VWA, TH01, F13A1 e FES) foi efectuada, neste estudo, no sequenciador automático da Pharmacia (ALF). No cálculo da precisão apenas foram incluídos geis desnaturantes de Hydrolink a 5%, por ser o tipo de gel mais frequentemente utilizado naquela análise. O tamanho dos fragmentos dos produtos amplificados foi determinado através do "Fragment Manager Software" (Microsoft Windows 3.1.), tendo-se usado os padrões internos de 100 pb e 300 pb e o padrão externo de 50-500 pb.

A precisão em percentagem foi calculada a partir de 30 determinações, correspondentes a diferentes amostras analisadas para cada alelo em distintos geis. É para notar que efectuámos, habitualmente, duas corridas no mesmo gel, ou seja, realizámos duas aplicações de amostras amplificadas em "duplex" no mesmo gel ("reloading"), tendo-se constatado haver perfeita identificação dos alelos, uma vez que se verificou que os tamanhos dos alelos (pb), na 1ª e 2ª corridas eram idênticos (Pestoni e col., 1995). Não foi calculada a precisão para os alelos menos frequentes (< de 30 determinações).

A precisão foi determinada para cada locus e para os distintos sistemas, usando a fórmula (Kimpton e col., 1993):

$$P(\%) = \left[1 - \frac{dp}{esp} \right] \times 100$$

dp é o desvio padrão dos tamanhos observados para um dado alelo; esp é o tamanho teórico do alelo.

O desvio padrão (dp) foi determinado pela fórmula:

$$dp = \sqrt{\frac{\sum (obs - média)^2}{n}}$$

obs representa o valor do tamanho do fragmento observado para cada alelo; média é a média dos valores dos tamanhos dos fragmentos observados; n é o número de determinações para cada alelo (30 neste estudo).

3.5.5. Soluções

SSC 20X

NaCl 175.3 g
Citrato trissódico 88.2 g

Juntar H₂O até 1000 ml (autoclavar)

TE

Tris 0.122 g
Na₂EDTA 0.037 g
H₂O 60 ml

Ajustar pH=7.5 perfazer o volume de 100 ml

SSC 1X

SSC 20X 5 ml
H₂O 95 ml

Chelex 5%

Chelex 100 5 g
H₂O 100 ml

Acetato de sódio

Acetato de sódio 13.6 g
H₂O 200 ml

Buffer (solução) de lise

Tris 0.24 g
EDTA 0.74 g
NaCl 0.117 g

Ajustar pH=7 perfazer o volume de 500 ml (autoclavar)

Ajustar o pH=8 perfazer o volume de 200 ml (autoclavar)

<u>Proteinase K</u>		<u>Ditiotreitol</u>	
Proteinase K	10 mg	Ditiotreitol	0.154 mg
H2O	1 ml	H2O	1 ml

<u>SDS</u>		<u>Glicogénio</u>	
Lauril sulfato	10 g	Glicogénio	20 mg
H2O até 100 ml		H2O	1 ml

<u>Etanol 80%</u>		<u>TBE 10X</u>	
Etanol absoluto	80 ml	Tris	162 g
H2O	20 ml	Ácido bórico	46.3 g
		Na2EDTA	9.5 g
		Ajustar o pH=8.8 perfazer o volume de 1000 ml	

<u>TBE 1X</u>		<u>Carbonato de sódio</u>	
TBE 10X	50 ml	Carbonato de sódio	3 g
H2O	450 ml	H2O	100 ml

<u>Etanol 50%+Ácido acético 1%</u>		<u>Ácido acético 5%</u>	
Etanol absoluto	50 ml	Ácido acético glacial	5 ml
Ácido acético	1 ml	H2O	95 ml
H2O	49 ml		

<u>Etanol 10%+ Ácido acético 5%</u>		<u>Ácido acético 10%+ glicerol 5%</u>	
Etanol absoluto	10 ml	Ácido acético	10 ml
Ácido acético glacial	5 ml	glicerol	5 ml
H2O	85 ml	H2O	85 ml

<u>Nitrato de prata</u>		<u>TBE 0.6X</u>	
Nitrato de prata	0.25g	TBE 10X	120 ml
H2O	100 ml	H2O	1880 ml

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.1. Determinação do número de alelos

Nos sistemas AMPFLPs e STRs os alelos são entidades discretas e é possível realizar a determinação directa das frequências (Li, 1976):

$$\text{frequência do alelo } i = \frac{2Hom_{ii} + Het_{ij}}{2N}$$

N é o número de indivíduos que compõem a amostra.

Em ambos os casos o erro padrão (ep), usado no cálculo das frequências, foi determinado pela equação:

$$ep = \sqrt{\frac{p(1-p)}{2N}}$$

p representa a frequência do alelo.

4.2. Heterozigocidade

Calculou-se uma estima enviesada da heterozigocidade de acordo com o proposto por Nei (1978), segundo a fórmula:

$$h = \left[\frac{2N}{2N-1} \right] (1 - \sum p_i^2)$$

p_i representa a frequência do alelo i na amostra populacional.

A variância desta estima é dada por:

$$v(h) = \frac{\left\{ \sum p_i^2 - (\sum p_i^2)^2 + 4(N-1) \left[\sum p_i^3 - (\sum p_i^2)^2 \right] \right\}}{N(2N-1)}$$

Usou-se o programa Biosys-1 (Swofford, 1989), para este cálculo.

4.3. Conteúdo em informação polimórfica (PIC)

A capacidade informativa de um locus analisa-se mediante o conteúdo em informação polimórfica (PIC), segundo a fórmula de Botstein e col. (1980):

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

p_i é a frequência do alelo i e n o número de alelos.

4.4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

4.4.1. Teste exacto de Odelberg

Dado que alguns génotipos têm frequências esperadas menores do que 5, devido ao facto desses sistemas possuírem um grande número de alelos, não é possível usar a distribuição χ^2 como aproximação à distribuição estatística de χ^2 . Por isso, realizámos o teste exacto de homogeneidade, proposto por Odelberg e col. (1989), para comprovar as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Este teste combina as frequências de todos os homozigóticos e heterozigóticos, separadamente, e realiza um χ^2 de homozigóticos e heterozigóticos observados e esperados. O nível de significância é calculado a partir da distribuição binomial dos homozigóticos e heterozigóticos possíveis, numa amostra de tamanho igual ao da nossa amostra populacional. A soma das probabilidades dos sucessos, cujo valor de χ^2 seja menor do que o valor original, indicar-nos-á o grau de significância.

$$\chi^2 = \frac{(Hom_{obs} - Hom_{esp})^2}{Hom_{esp}} + \frac{(Het_{obs} - Het_{esp})^2}{Het_{esp}}$$

$$P(\chi^2 \leq x) = \sum_{[(h_1, h_2), x^2(h_1, h_2) \leq x]} P(Hom = h_1, Het = h_2)$$

4.4.2. Teste G

Um segundo teste de equilíbrio, mais exacto do que o anterior, é o teste da razão de verossimilhanças (likelihood ratio) ou teste G (Sokal e Rohlf, 1979), que tem em conta as frequências genótípicas sem agrupar:

$$G = 2 \sum_{i=1}^a f_i \ln \left(f_i / \hat{f}_i \right)$$

f_i é a frequência observada do genótipo i e \hat{f}_i é a frequência esperada correspondente, para um sistema com "a" genótipos.

Para obter a significância estatística geram-se 1000 combinações genótípicas aleatórias, mantendo as frequências alélicas e para cada combinação calcula-se o valor de G . O valor de p é determinado a partir do número de combinações em que os valores de G obtidos são superiores ao original (Chakraborty e col., 1991).

4.4.3. Teste de Guo e Thompson

O teste de Guo e Thompson (1992) é, geralmente, utilizado quando a amostra populacional é pequena e/ou algumas das frequências dos genótipos são baixas.

Guo e Thompson propuseram dois algoritmos para estimar o nível de significância para o teste de Hardy-Weinberg, os quais são aplicáveis aos loci com múltiplos alelos, sendo possível a sua determinação em computador.

Há dois métodos para calcular os níveis de significância do teste exacto para o HWE para múltiplos alelos: o método convencional de Monte Carlo descrito por Joe Felsenstein e um outro adaptado do algoritmo Metropolis (Metropolis e col., 1953; Binder e Heermann, 1989). O último baseia-se na construção de cadeias de Markov com uma distribuição aleatória das probabilidades dos genótipos, cujas amostras possuem as mesmas frequências alélicas da amostra populacional em estudo, verificando-se,

posteriormente, se esta não se afasta do HWE. Este método é uma variante do proposto por Guo e Thompson e foi o usado neste estudo.

O método das cadeias de Markov possui a vantagem relativamente ao de Monte Carlo de não requerer o cálculo das probabilidades das proporções de HWE de cada nova determinação e, por isso, o tempo dispendido em cada estudo é independente do tamanho da tabela. Esta metodologia é a indicada para grandes amostras populacionais, como no presente estudo. Usou-se o programa Genepop para efectuar aquele cálculo.

4.5. Teste de associação alélica

4.5.1. Desequilíbrio de ligamento

Para comprovar o equilíbrio de ligamento, isto é, a independência alélica entre os loci, utilizou-se o teste do programa Genepop. Este teste toma como hipótese nula a independência dos genótipos de um locus relativamente aos genótipos do outro locus e cria tabelas de contingência para todos os pares de loci. Posteriormente realiza um teste de probabilidade ou teste exacto de Fisher para cada tabela, usando cadeias de Markov. Obtém-se a significância estatística mediante o valor de P.

4.6. Comparações entre populações

Realizaram-se comparações populacionais duas a duas mediante o teste de χ^2 para comprovar a homogeneidade das suas frequências alélicas, eliminando-se aqueles alelos com frequências esperadas menores de 5 nalgumas das duas populações a comparar. A significância estatística obteve-se a partir da distribuição χ^2 , em que os graus de liberdade foram determinados, usando a fórmula: (número de filas -1) x (número de colunas -1).

4.7. Estatísticos F

Uma população apresenta subestruturação se é constituída por subpopulações em que as frequências genótípicas na população total não podem ser deduzidas a partir das frequências alélicas, usando os princípios de Hardy-Weinberg. Por isso, é de grande interesse calcular se numa população existe subestruturação. Há autores que consideram que a existência de possíveis níveis de diferenciação na população podem anular a prova pericial (Lewontin e Hartl, 1991). Por outro lado, também há a opinião de que os referidos níveis de diferenciação são suficientemente reduzidos por forma a que não se devam ter em consideração (Chakraborty e Kidd, 1991; Roeder, 1994).

Para solucionar o problema da subestruturação o comité americano NRC (National Research Council) propôs o "Ceiling Principle", que consiste em utilizar a máxima frequência conhecida em várias subpopulações. Posteriormente surgiram outras alternativas, porque foi considerado que este procedimento era demasiado conservador, designadamente a determinação da subestruturação das populações mediante o cálculo dos estatísticos F (Budowle, 1994), uma vez que as diferenças genéticas inter-populacionais podiam ser estimadas mediante os estatísticos F (Wright, 1965, 1978; Nei, 1977).

Os estatísticos F, segundo Wright (1965), proporcionam uma medida da heterogeneidade, permitindo o estudo de relações entre subpopulações como medida do grau de deriva que teve lugar entre populações ou dentro de uma população ao largo do tempo (Tills, 1977).

Nei, em 1972, estudou a diversidade génica das populações, dividida em vários componentes, a diversidade intra-subpopulacional e inter-subpopulacional, sendo essa diversidade génica definida como a heterozigocidade esperada (frequência de heterozigóticos esperados) segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Utilizam-se as frequências génicas da presente geração sem ter em conta a selecção e a migração em gerações anteriores.

F_{st} e G_{st} , como denomina Nei, é a relação entre a diversidade génica esperada entre diferentes subpopulações no que diz respeito à diversidade génica da população total.

O cálculo dos F_{st} foi efectuado utilizando o programa Biosys-1 (Swofford, 1989), segundo a fórmula:

$$1 - F_{st} = \frac{1 - F_s}{1 - F_t}$$

4.8. Distâncias genéticas

As distâncias genéticas são usadas para medir as diferenças globais entre duas populações. Assim, a distância genética expressa, mediante um número, a diferença entre duas populações (Smith, 1977). Se não há diferenças a distância será zero. Pelo contrário, se as populações não têm alelos em comum para nenhum locus estudado aquele valor alcança um máximo de um. Por isso, a distância genética é uma medida de divergência entre populações.

As árvores são o método mais usado para análise filogenética.

De entre os múltiplos métodos que existem para medir diferenças entre populações analisou-se a distância de Reynolds (1983).

Estas distâncias foram calculadas mediante o programa Gendist em Phylip 3.5.

4.8.1. Distância de Reynolds

Este método calcula a distância genética entre populações a partir do coeficiente de coancestralidade $\theta = F_{st}$. Esta distância genética é útil em períodos curtos de evolução, quando a divergência a partir da população ancestral se produziu apenas devido à deriva.

O valor de θ para s populações, é:

$$b = 2 \sum_{j=1}^s n_j h_j / s(2\bar{n} - 1)$$

n_j é o tamanho da amostra j , $\bar{n} = \sum_{j=1}^s n_j / s$, $h_j = 1 - H_j e H_j = \sum_{i=1}^L p_{ij}^2$

$$a+b = \frac{\sum_{j=1}^s n_j \sum_{i=1}^L (p_{ij} - \bar{p}_i)^2}{n^*(s-1)} + \frac{(2n^*-1)b}{2n^*}$$

$$\text{onde } n^* = \frac{\bar{n}s}{s-1} - \frac{\sum_{j=1}^s n_j^2}{\bar{n}s(s-1)} \text{ e } \bar{p}_i = \sum_{j=1}^s p_{ij} / s$$

$a+b$ é uma estima da heterozigocidade total, b é a heterozigocidade dentro de cada população e a diferença entre ambas é a , sendo esta a heterozigocidade entre populações, a estima de $\hat{\theta}$, para um determinado locus, é:

$$\hat{\theta} = \frac{a}{a+b}$$

A distância determinada a partir do estimador $\hat{\theta}$, é:

$$D = -\ln(1 - \hat{\theta})$$

A distância de Reynolds é mais apropriada que a distância de Nei, quando apenas tenha ocorrido um pequeno número de mutações no período evolutivo estudado. Esta é a situação para o período de evolução dos humanos modernos (Cavalli-Sforza e col., 1994).

4.9. Parâmetros de interesse médico-legal

4.9.1. Probabilidade de exclusão “a priori”

A probabilidade de exclusão “a priori” (P_{ex}) de um marcador numa determinada população é um parâmetro importante em Medicina Legal, no que concerne à investigação biológica de paternidade. Este valor de probabilidade pode ser definido como sendo a proporção de perícias em que a suposta paternidade de um indivíduo poderá ser definitivamente descartada, com base nesse marcador.

No caso do marcador em questão ser um sistema codominante com dois alelos, os cálculos são simples de efectuar, sendo dada pela fórmula:

$$P_{ex} = pq(1 - pq)$$

p é a probabilidade de que um indivíduo seja transmissor do alelo 1 e q a probabilidade de que um indivíduo seja transmissor do alelo 2.

Aquela fórmula deduz-se a partir da análise estatística dos sucessos de incompatibilidade genética que podem surgir na perícia.

Quando o marcador em estudo é um sistema com N alelos codominantes, há quatro situações possíveis a considerar, dependendo dos genótipos do pretense pai e do filho.

Ohno e col., (1982) desenvolveram uma fórmula para n alelos, que pode ser facilmente aplicada, quando usada num programa de computador:

$$P_{ex} = \sum_{i=1}^n p_i (1 - p_i)^2 (1 - p_i + p_i^2) + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n p_i p_j (p_i + p_j) (1 - p_i - p_j)^2$$

n é o número de alelos e p_i as respectivas frequências génicas.

A probabilidade de exclusão “a priori” é um valor percentual que é função directa do polimorfismo do sistema sendo, por outro lado, tanto maior quanto mais equilibradas forem as frequências dos seus alelos na população.

Há um outro valor de probabilidade, a probabilidade de exclusão “a priori” acumulativa, que traduz a eficácia de um laboratório na resolução de casos de filiação. É internacionalmente considerado que um laboratório está capacitado para realizar provas de paternidade, quando atinge, pelo menos, um valor de probabilidade de exclusão “a priori” acumulativa de 99,9%.

A fórmula usada para efectuar aquele cálculo, é:

$$P_{ex} = 1 - (1 - P_1) \times (1 - P_2) \times \dots \times (1 - P_n)$$

P_1, P_2, \dots, P_n , são as probabilidades de exclusão “a priori” individuais de cada um dos sistemas usados pelo laboratório, na perícia.

4.9.2. Probabilidade de discriminação/coincidência

Uma medida relativa da eficácia de um sistema genético com fins de identificação em criminalística é a probabilidade de discriminação (Fisher, 1991), que é a probabilidade de que dois indivíduos tirados ao acaso da mesma população não coincidam relativamente a uma série de fenótipos. O oposto de probabilidade de discriminação é a probabilidade de coincidência (matching-pM):

$$P(\text{Discriminação}) = 1 - P(\text{matching})$$

A probabilidade de “matching” é o produto de uma série de probabilidades Q_j , e define-se como:

$$P(\text{matching}) = Q_j = \sum_{i=1}^n P_i^2$$

P_i representa as frequências fenotípicas do fenótipo i para o marcador j e n o número de fenótipos do sistema.

Seguindo a definição, anteriormente descrita, a probabilidade de discriminação, será:

$$P(\text{Discriminação}) = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

Quando se calculam os valores de Q para cada sistema analisado, a probabilidade de matching para m sistemas é:

$$P(\text{matching}) = Q_1 Q_2 Q_3 \dots Q_m$$

A probabilidade de discriminação para m sistemas:

$$P(\text{Discriminação})_{\text{acum}} = 1 - Q_1 Q_2 Q_3 \dots Q_m$$

A probabilidade de que dois indivíduos tenham os mesmos fenótipos, para uma série de marcadores, é função da frequência dos fenótipos na população. Se todos os indivíduos têm o mesmo fenótipo, a probabilidade de discriminação é zero, para esse sistema. Pelo contrário, atinge-se a máxima probabilidade de discriminação, quando todas as frequências

génicas são igualmente frequentes. Este máximo teórico, na realidade, não se alcança. No entanto, proporciona a base para valorizar a eficácia relativa de vários marcadores para a identificação individual. Um valor de probabilidade de discriminação de 0,0 P(matching) = 1,0) é a situação mais desfavorável. À medida que as frequências alélicas se aproximam, a sua eficácia relativamente a um dado sistema atinge a sua utilidade máxima. A capacidade global de um laboratório para discriminar indivíduos, como é óbvio, aumenta com cada marcador adicional usado.

4.9.3. Cálculo da probabilidade em criminalística

Quando se estudam polimorfismos genéticos no âmbito da criminalística biológica, o objectivo da análise é comparar as características genéticas de um vestígio biológico, com as mesmas características de um indivíduo suspeito. Deste modo, podem suceder duas situações:

→ Não haver coincidência para alguns dos marcadores estudados entre as características genéticas do vestígio biológico e as características genéticas do suspeito.

→ Haver coincidência para todos os marcadores estudados entre as características genéticas do vestígio biológico e as características genéticas do suspeito.

No primeiro caso, podemos dizer que o vestígio analisado não corresponde ao suspeito com uma margem de erro praticamente desprezível.

No segundo caso, há necessidade de se proceder à valorização probabilística da coincidência, isto é, determinar a probabilidade de que o vestígio provenha do suspeito.

Para valorizar, de forma objectiva, a prova científica, determina-se o valor incriminante, razão bayesiana de probabilidades ou “likelihood ratio”, que é dado pela fórmula:

$$LR = \frac{\text{Probabilidade da evidência científica se } C \text{ é verdade}}{\text{Probabilidade da evidência científica se } \bar{C} \text{ é verdade}}$$

Expressando aquela fórmula sob a forma matemática, designando a evidência E:

$$LR = \frac{p(E / C)}{p(E / \bar{C})}$$

A probabilidade de que esse vestígio provenha do suspeito se C é verdade, ou seja, a probabilidade daquele ter cometido o crime, é 1. Se pelo contrário, \bar{C} é verdade, isto é, se o vestígio não for do suspeito, ou seja, na hipótese de não culpabilidade, esse vestígio pertencerá a um indivíduo tirado ao acaso da população.

Assim, se forem utilizados loci independentes, o cálculo do valor incriminante ou “likelihood ratio”, seria simplesmente o produto do inverso da frequência na população.

I. Evett (1987), à semelhança de Hummel para os casos de filiação, elaborou uma tabela em que figuram os valores de “LR” obtidos e os correspondentes predicados verbais, que indicam a força da prova.

Tabela de Evett

Likelihood Ratio	Evidência da prova
1 - 33	Fraca
33 - 100	Regular
100 - 330	Boa
330 - 1000	Forte
Mais de 1000	Muito forte

O uso da tabela de Evett deve ser evitado, uma vez que é difícil transmitir o significado dos predicados verbais usados, para além de hipervalorizar a prova científica. Do ponto de vista prático, tais predicados podem induzir o juiz a tomar uma decisão baseada nos referidos predicados que correspondem a valores de LR que, em determinadas circunstâncias (se o suspeito para alguns dos sistemas utilizados possui alelos pouco frequentes na população), não correspondem à realidade biológica.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação da precisão (%) das análises efectuadas no sequenciador automático (ALF)

Nesta determinação apenas foram incluídos os geis de Hydrolink a 5%, que foram os usados a maioria das vezes.

Tabela 5.1. Precisão na determinação do tamanho dos alelos dos loci STR no sequenciador automático ALF em geis desnaturantes de Hydrolink 5%

Locus	Alelo ^a	Tamanho esp. (pb) ^b	Média obs ± dp (pb)	Precisão (%)
VWA	14	139	139.03 ± 0.02	99.98
	15	143	143.14 ± 0.03	99.98
	16	147	147.41 ± 0.10	99.93
	17	151	151.45 ± 0.03	99.98
	18	155	155.67 ± 0.03	99.98
	19	159	159.85 ± 0.06	99.96
TH01	6	158	158.29 ± 0.05	99.97
	7	162	162.26 ± 0.20	99.88
	8	166	166.59 ± 0.06	99.96
	9	170	170.75 ± 0.11	99.94
	9.3	173	173.57 ± 0.05	99.97
F13A1	3.2	181	182.45 ± 0.08	99.96
	4	183	184.40 ± 0.11	99.94
	5	187	188.47 ± 0.10	99.95
	6	191	192.67 ± 0.04	99.98
	7	195	196.79 ± 0.03	99.99
FES	10	221	221.42 ± 0.05	99.98
	11	225	225.39 ± 0.03	99.99
	12	229	229.40 ± 0.06	99.98
	13	233	233.16 ± 0.22	99.91

^a Tamanho dos alelos de acordo com o número de unidades de repetição.

^b Tamanho dos alelos de acordo com as sequências descritas, respectivamente, por: Kimpton e col., 1992 (VWA); Edwards e col., 1992 (TH01); Polymeropoulos e col., 1991 (F13A1); Kimpton e col., 1992 (FES).

O valor mínimo de precisão registou-se para o alelo com 7 unidades de repetição do locus TH01.

A maioria (75%) das precisões calculadas para os 4 loci STR apresentavam valores superiores a 99.95%, o que indica que a identificação dos alelos através do sequenciador automático ALF é precisa, mesmo quando se realizam duas corridas no mesmo gel.

O facto da precisão observada ser elevada, usando esta tecnologia, é de especial interesse no âmbito da criminalística biológica, particularmente, quando não é possível realizar simultaneamente o estudo de um vestígio e do suspeito. Isto é, a grande maioria das vezes o suspeito surge muito depois da realização da análise do vestígio o que, dada a precisão dos resultados obtidos, como ficou anteriormente demonstrado, não constitui inconveniente para a adequada conclusão do caso.

5.2. Distribuição das frequências dos loci AMPFLP e STR

5.2.1. Características da amostra populacional estudada

Efectuou-se uma análise populacional de indivíduos da população do Norte de Portugal, não aparentados e intervenientes em casos de filiação. Para essa análise foram estudados os sistemas AMPFLP: D1S80, 3'ApoB e YNZ22. Dos loci STR foram analisados os sistemas: HUMVWA31A, HUMTH01, HUMF13A1 e HUMFES/FPS.

Estudaram-se 146 indivíduos para a YNZ22 e para todos os outros sistemas 397 indivíduos.

As frequências dos alelos para os sistemas estudados encontram-se na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. *Frequências dos alelos dos loci AMPFLP (D1S80, 3'ApoB, YNZ22) e loci STR (VWA, TH01, F13A1 e FES) no Norte de Portugal*

<u>D1S80</u>			<u>VWA</u>		
Alelo	Frequência	ep	Alelo	Frequência	ep
17	0.003	±0.002	13	0.003	±0.002
18	0.252	±0.015	14	0.102	±0.010
19	0.004	±0.002	15	0.127	±0.012
20	0.016	±0.005	16	0.212	±0.014
21	0.035	±0.007	17	0.291	±0.016
22	0.039	±0.007	18	0.176	±0.014
23	0.003	±0.002	19	0.069	±0.010
24	0.361	±0.002	20	0.018	±0.005
25	0.025	±0.006	21	0.003	±0.002
26	0.013	±0.004			
27	0.018	±0.005			
28	0.054	±0.008			
29	0.062	±0.009			
30	0.011	±0.004			
31	0.063	±0.009			
32	0.010	±0.002			
33	0.003	±0.002			
34	0.005	±0.003			
35	0.001	±0.001			
36	0.013	±0.004			
37	0.006	±0.003			
38	0.003	±0.002			
41	0.001	±0.001			

<u>TH01</u>		
Alelo	Frequência	ep
6	0.204	±0.014
7	0.169	±0.013
8	0.131	±0.012
9	0.186	±0.014
9.3	0.305	±0.016
10	0.005	±0.003

3' ApoB

Alelo	Frequência	ep
21	0.004	±0.002
23	0.001	±0.001
27	0.001	±0.001
29	0.006	±0.003
31	0.079	±0.009
33	0.045	±0.007
35	0.223	±0.015
36	0.005	±0.003
37	0.380	±0.017
39	0.030	±0.006
41	0.019	±0.005
43	0.008	±0.003
45	0.011	±0.004
47	0.067	±0.009
49	0.100	±0.011
51	0.015	±0.004
53	0.004	±0.002

F13A1

Alelo	Frequência	ep
3.2	0.098	±0.011
4	0.034	±0.006
5	0.185	±0.014
6	0.285	±0.016
7	0.348	±0.017
8	0.006	±0.003
12	0.004	±0.002
13	0.006	±0.003
14	0.005	±0.003
15	0.015	±0.004
16	0.011	±0.004
17	0.003	±0.002

YNZ22

Alelo	Frequência	ep
2	0.188	±0.023
3	0.154	±0.021
4	0.274	±0.026
5	0.051	±0.013
6	0.082	±0.016
7	0.007	±0.050
8	0.021	±0.008
9	0.045	±0.012
10	0.127	±0.019
11	0.041	±0.012
12	0.010	±0.006

FES

Alelo	Frequência	ep
7	0.001	±0.001
8	0.016	±0.005
9	0.001	±0.001
10	0.296	±0.016
11	0.378	±0.017
12	0.254	±0.015
13	0.047	±0.007
14	0.005	±0.003
15	0.001	±0.001

5.2.2. Frequências génicas dos loci AMPFLP e STR

A análise foi realizada a partir de sangue periférico, colhido por punção venosa; a extracção do DNA foi feita com Chelex; as amplificações foram efectuadas separadamente para os AMPFLPs (monoplex) e duas a duas para os STRs (duplex). Relativamente à tipagem, esta foi levada a cabo, respectivamente, em geis de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de coloração pelo nitrato de prata, para o D1S80; em geis de agarose com brometo de etídio, para a 3'ApoB e YNZ22 e em geis de desnaturantes de acrilamida (Hydrolink ou Ready Mix) no sequenciador automático de DNA, para os STRs (Material e Métodos).

Os alelos dos sistemas AMPFLP foram identificados pelo número de repetições que apresentavam. Em relação aos loci STR a nomenclatura usada foi a recomendada pela ISFH (DNA recommendations-1994 report concerning further recommendations of de DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (Short Tandem Repeat) system). No primeiro grupo de sistemas estudados (AMPFLP), concretamente para a 3'ApoB e YNZ22 além do 100 Base Pair Ladder da Pharmacia, foram usados "ladders" alélicos feitos no laboratório; para o D1S80 utilizou-se o "ladder" alélico fornecido com o kit de amplificação, pela Perkin Elmer. Relativamente aos STRs foram usados pelo menos dois padrões externos (50-500 pb) em cada corrida e padrões internos (100 pb e 300 pb), adicionados a todas as amostras.

O sistema **D1S80** foi genotipado por comparação com o ladder alélico, já mencionado, tendo-se detectado 23 alelos diferentes entre 17 e 41 repetições. Neste intervalo não foram encontrados, na nossa população, os alelos 39 e 40. A distribuição das frequências é multimodal (Fig.5.1.) com as frequências máximas para o alelo 24 (0.361 ± 0.041) e alelo 18 (0.252 ± 0.02). Estes dois alelos acumulam 61% da frequência, os restantes têm frequências inferiores a 0.1 (Tabela 5.2.).

Observaram-se 70 genótipos diferentes, sendo as combinações mais frequentes: 18-24 (0.164), 24-24 (0.121) e 18-18 (0.068).

A **3'ApoB** apresenta 17 alelos distintos, quatro dos quais (21 unidades de repetição, 23, 27 e 53) com uma frequência inferior a 0.005. A distribuição das frequências é multimodal (Fig.5.1.), com frequências máximas para os alelos com 37 repetições (0.380 ± 0.017) e o de 35 repetições (0.223 ± 0.015). Estes dois alelos acumulam 60% da frequência. Em relação aos restantes alelos apenas o de 49 repetições apresenta uma frequência

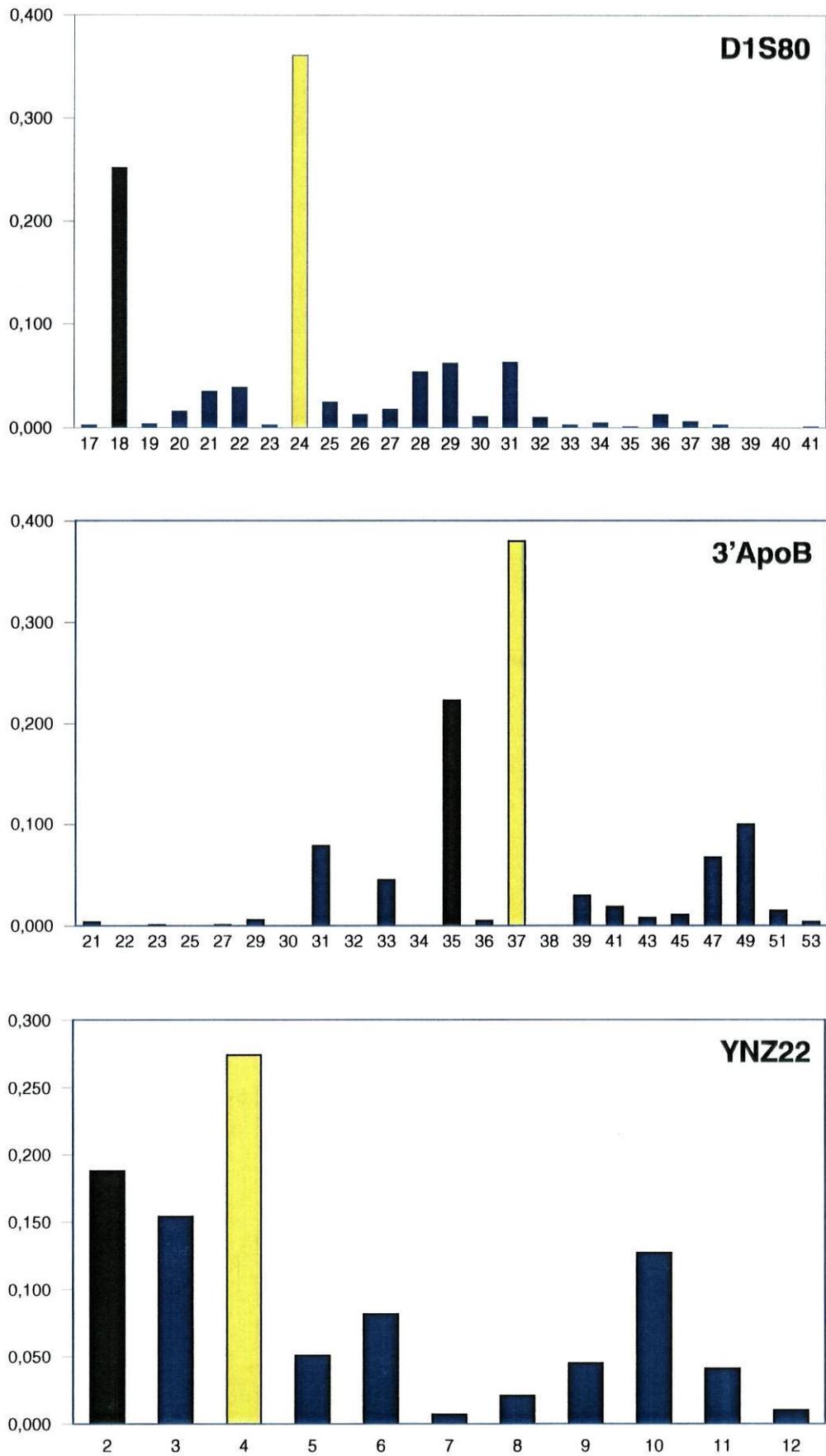


Fig. 5.1. - Distribuição das frequências dos alelos dos sistemas AMPFLP no Norte de Portugal

superior a 0.1 (Tabela 5.2.). Foram identificados 95 genótipos, sendo os mais frequentes: 35-37 (0.159), 37-37 (0.156) e 35-35 (0.055).

Para a **YNZ22** foram encontrados 11 alelos diferentes, não se tendo verificado a presença do alelo 1. A distribuição das frequências para este sistema é multimodal (Fig.5.1.), com frequências máximas para os alelos com 4 repetições (0.274 ± 0.016), 2 repetições (0.188 ± 0.014), 3 repetições (0.154 ± 0.013) e 10 repetições (0.127 ± 0.012). As frequências dos demais alelos são inferiores a 0.1 (Tabela 5.2.). Foram tipados 40 genótipos com a máxima frequência para: 2-4 (0.116), 4-10 (0.082) e 4-4 (0.075).

Os loci STR possuem um número de alelos inferiores ao sistema D1S80 e as suas frequências encontram-se mais repartidas.

No estudo populacional foram detectados para o **HUMVWA31A** 9 alelos, sendo os mais frequentes os alelos 17 (0.291 ± 0.016), 16 (0.212 ± 0.014), 18 (0.176 ± 0.014) e 15 (0.127 ± 0.012). A distribuição das frequências é unimodal, com a moda para o alelo 17 (Fig.5.2.). Dos restantes alelos apenas o 14 apresenta um valor superior a 0.1 (0.102 ± 0.012) (Tabela 5.2.). Encontraram-se na população 30 genótipos diferentes, sendo os mais frequentes: 16-17 (0.249), 17-17 (0.096) e 17-18 (0.091).

Para o **HUMTH01** detectaram-se 6 alelos, sendo os mais frequentes os alelos 9.3 (0.305 ± 0.016), 6 (0.204 ± 0.014), 9 (0.186 ± 0.014) e 7 (0.169 ± 0.013). A distribuição das frequências é bimodal (Fig.5.2.) com modas para os alelos 6 e 9.3. Foram detectados 18 genótipos, sendo os mais frequentes: 9.3-9.3 (0.113), 7-9.3 (0.108) e 6-9.3 (0.106).

Relativamente ao **HUMF13A1** encontraram-se 12 alelos, os mais frequentes dos quais, são: 7 (0.348 ± 0.017), 6 (0.285 ± 0.016), 5 (0.185 ± 0.014), 3.2 (0.098 ± 0.011) e o 15 (0.015 ± 0.004). A maior parte dos alelos concentra-se em tamanhos inferiores a 8 repetições, sendo a distribuição bimodal (Fig.5.3.). Observaram-se 36 genótipos, sendo os mais frequentes: 6-7 (0.249), 5-6 (0.123) e 5-7 (0.116).

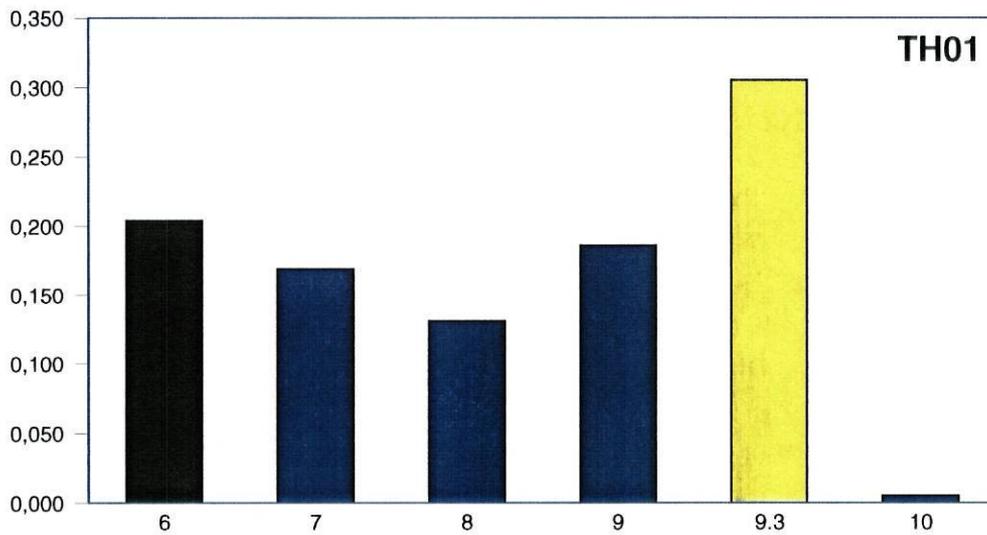
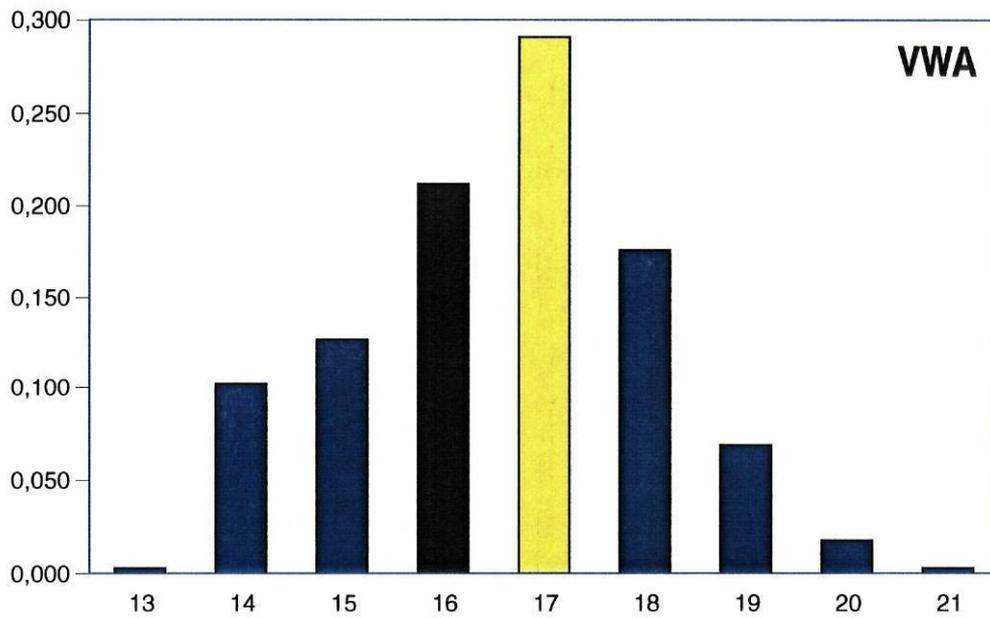


Fig. 5.2. - Distribuição das frequências dos alelos dos loci HUMVWA31A e HUMTH01 no Norte de Portugal

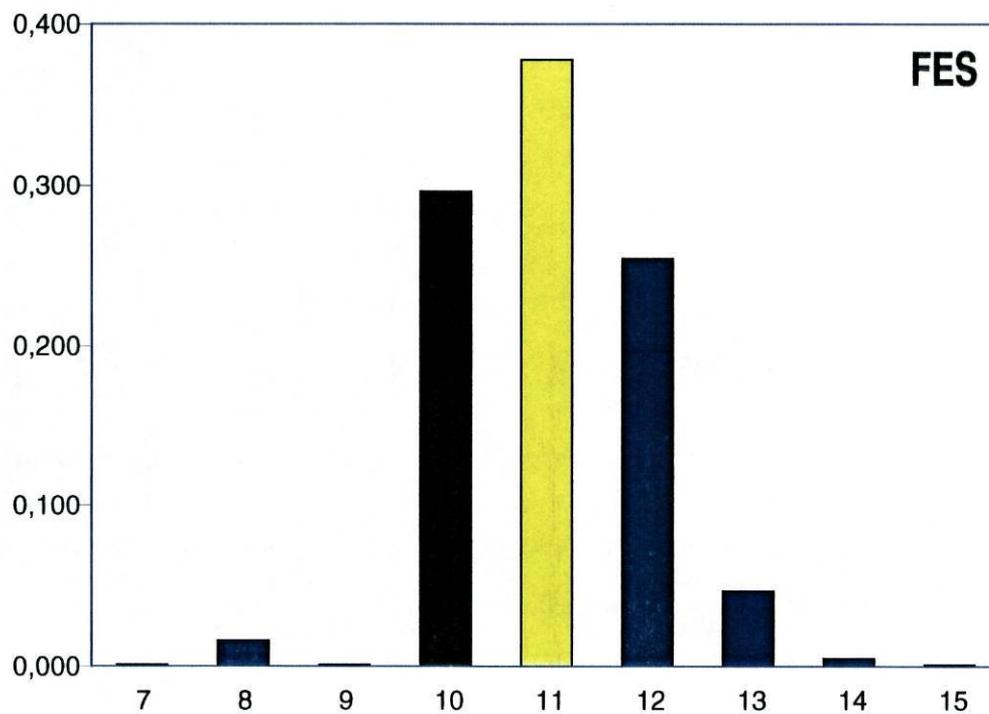
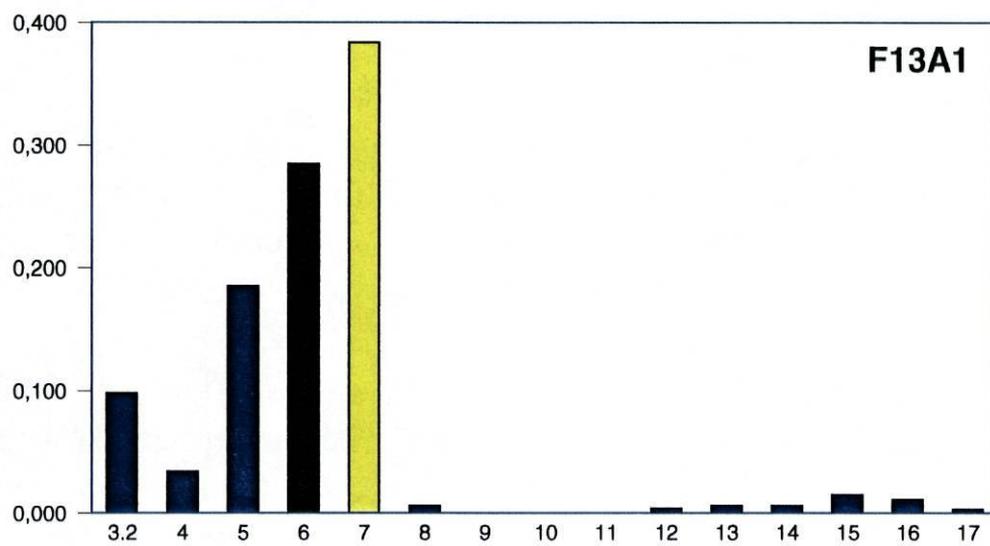


Fig. 5.3. - Distribuição das frequências dos alelos dos loci *HUMF13A1* e *HUMFES/FPS* no Norte de Portugal

No **HUMFES/FPS** determinaram-se 9 alelos, sendo os mais frequentes: 11 (0.378 ± 0.017), 10 (0.296 ± 0.016) e o 12 (0.254 ± 0.015). A distribuição das frequências é unimodal (Fig.5.3.), com a moda para o alelo 11. Foram observados 18 genótipos, com a máxima frequência para os genótipos 10-11 (0.227), 11-12 (0.179) e 11-11(0.149).

O estudo populacional permitiu conhecer a heterozigocidade observada para estes sete sistemas. Como se mostra na Tabela 5.3. o sistema que apresenta uma maior heterozigocidade observada corresponde ao locus F13A1 (0.82). No entanto, a heterozigocidade esperada mais alta é a do locus YNZ22 (0.84).

Tabela 5.3. Heterozigocidade: observada e esperada

	Heterozigocidade Observada	ep	Heterozigocidade Esperada
D1S80	0.79	± 0.01	0.79
3'ApoB	0.75	± 0.01	0.78
YNZ22	0.80	± 0.01	0.84
VWA	0.79	$\pm 4 \times 10^{-3}$	0.81
TH01	0.76	$\pm 5 \times 10^{-3}$	0.79
F13A1	0.82	$\pm 8 \times 10^{-3}$	0.75
FES	0.68	$\pm 6 \times 10^{-3}$	0.70

5.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para estimar o ajuste ao equilíbrio de Hardy-Weinberg da nossa amostra populacional, uma vez que alguns genótipos têm frequências esperadas menores do que 5 e não é correcto usar uma distribuição de χ^2 , efectuaram-se três testes:

1 - O teste exacto de homogeneidade proposto por **Odelberg e col.**, (1989) utiliza as frequências de heterozigóticos e homozigóticos observados e esperados.

2 - O teste **G** proposto por Sokal e Rohlf (1979) é mais exacto que o primeiro e tem em conta as frequências genotípicas sem agrupar. A significância estatística consegue-se mediante 1000 agrupamentos aleatórios, conservando-se as frequências alélicas. Assim, para cada

combinação, estimou-se um valor G. O número de combinações no qual o valor G é superior ao original é o valor de p (Chakraborty e col., 1991).

3 - O teste de Guo e Thompson (1992) é também baseado nas frequências gênicas sem agrupar e estima a probabilidade da amostra da população, baseando-se nas cadeias de Markov.

A aplicação de cada um dos testes permitiu concluir que a população do Norte de Portugal, segundo o teste exacto de Odelberg e col. (1989), está em equilíbrio em todos os loci, não existindo excesso nem defeito de heterozigóticos em nenhum deles. Com o teste G e o teste de Guo e Thompson (1992) obtiveram-se resultados similares, isto é, todos os sistemas analisados na nossa população estão em equilíbrio, excepto o locus 3'ApoB, cujas frequências genotípicas se afastam apenas ligeiramente das frequências segundo Hardy-Weinberg (Tabela 5.4.).

Tabela 5.4. Testes de equilíbrio: Odelberg, G e Guo e Thompson

	Teste 1		Teste 2		Teste 3	
	χ^2	p	G	p	p	ep
D1S80	0.06	0.76	75.29	1	0.99	6×10^{-3}
3'ApoB	1.78	0.16	10.35	0.002	0.03	0.01
YNZ22	1.25	0.22	16.94	1	0.49	0.02
VWA	1.04	0.28	20.72	1	0.92	0.01
TH01	1.81	0.16	17.26	1	0.27	0.02
F13A1	9.16	2×10^{-3}	55.46	1	0.10	0.02
FES	0.98	0.30	23.51	1	0.45	0.03

5.4. Teste de associação alélica

5.4.1. Desequilíbrio de ligamento

Foi determinada a independência alélica entre os loci estudados, excepto para a YNZ22, porquanto os indivíduos analisados neste locus (146) não coincidem com os demais sistemas (397).

Os sistemas estudados, dois a dois, não mostram diferenças estatisticamente significativas, excepto os loci D1S80 e F13A1. Em face do exposto, podemos dizer que a maioria dos loci estudados mostra

independência alélica e que o teste não parece indicar que exista desequilíbrio de ligamento (Tabela 5.5.)

Tabela 5.5. Teste de equilíbrio de ligamento

Combinações	χ^2	g.l.	p
VWA - TH01	1.46	2	0.48
VWA - F13A1	1.10	2	0.58
TH01 - F13A1	5.13	2	0.08
VWA - FES	0.35	2	0.84
TH01 - FES	1.06	2	0.59
F13A1 - FES	0.44	2	0.80
VWA - D1S80	0.20	2	0.91
TH01 - D1S80	1.45	2	0.48
F13A1 - D1S80	8.78	2	0.01
FES - D1S80	0.93	2	0.63
VWA - 3'ApoB	3.62	2	0.16
TH01 - 3'ApoB	0.60	2	0.74
F13A1 - 3'ApoB	2.71	2	0.26
FES - 3'ApoB	3.60	2	0.17
D1S80 - 3'ApoB	5.71	2	0.06

5.5. Comparações populacionais

Foram efectuadas comparações entre a população estudada, Norte de Portugal, com outras zonas do país (centro e sul) e ainda com outras populações europeias, designadamente Espanha, para além de outros grupos raciais (japoneses e negros), mediante os testes de χ^2 . As populações foram comparadas duas a duas, tendo sido incluídas todas as da Península Ibérica das quais possuímos resultados e as dos países europeus, cujos valores de p eram inferiores a 0.05 (Tabela 5.6.). Das populações seleccionadas foram eliminados os alelos, cujas frequências absolutas esperadas eram inferiores a 5.

Tabela 5.6. Comparações populacionais: Norte de Portugal / Japoneses e Negros

	Japoneses			Negros		
	χ^2	p	g.l.	χ^2	p	g.l.
D1S80	245.100	0.0001	12	160.890	0.0001	10
3'ApoB	-	-	-	142.419	0.0001	10
YNZ22	-	-	-	11.729	0.1637	8
VWA	77.376	0.0001	6	28.848	0.0001	3
TH01	341.309	0.0001	4	85.022	0.0001	4
F13A1	31.778	0.0001	3	274.637	0.0001	3
FES	-	-	-	26.084	0.0001	4

A distribuição das frequências do **D1S80** na população do Norte de Portugal é similar à de outras zonas do país, ou seja, não se registam diferenças significativas na distribuição das frequências nas três zonas de Portugal (Fig.5.4.). Relativamente à mesma distribuição no Norte de Portugal, comparativamente com as regiões estudadas de Espanha, verifica-se também não haver diferenças notórias, excepto para o País Basco que possui um valor de frequência um pouco mais reduzido do alelo 18 e uma frequência muito mais elevada do alelo 25 ($p=0.006$) (Fig.5.5.). Por outro lado, a população estudada apresenta diferenças na distribuição das frequências em relação a Inglaterra ($p=0.001$), Alemanha ($p=0.023$), Hungria ($p=0.001$), Finlândia ($p=0.0001$), Polónia ($p=0.037$) e Turquia ($p=0.013$) (Fig.5.6.). Essas diferenças são maiores para os alelos cujas frequências são inferiores a 0.1, sendo para notar que essa diferença não pode ser atribuída a nenhum alelo em particular. Também se observam diferenças significativas com populações de outros grupos raciais, designadamente, japoneses e negros ($p=0.0001$ para ambos) (Tabela 5.6.).

Não dispomos de valores da distribuição das frequências no centro e sul do país, para a **3'ApoB**. Por isso, apenas se compararam as referidas distribuições com algumas regiões de Espanha, das quais possuímos resultados e, também, com vários países europeus. Assim, registam-se diferenças relativamente ao País Basco ($p=0.0001$), Galiza ($p=0.0001$), Catalunha ($p=0.0001$), França ($p=0.0001$) e Itália ($p=0.0001$). As principais diferenças entre o Norte de Portugal e as populações espanholas registam-se nos alelos com menor número de repetições e nos alelos com mais repetições (Fig.5.7.). Nos alelos com um número de repetições intermédias (35 e 37), os mais frequentes, a distribuição das frequências é bastante similar.

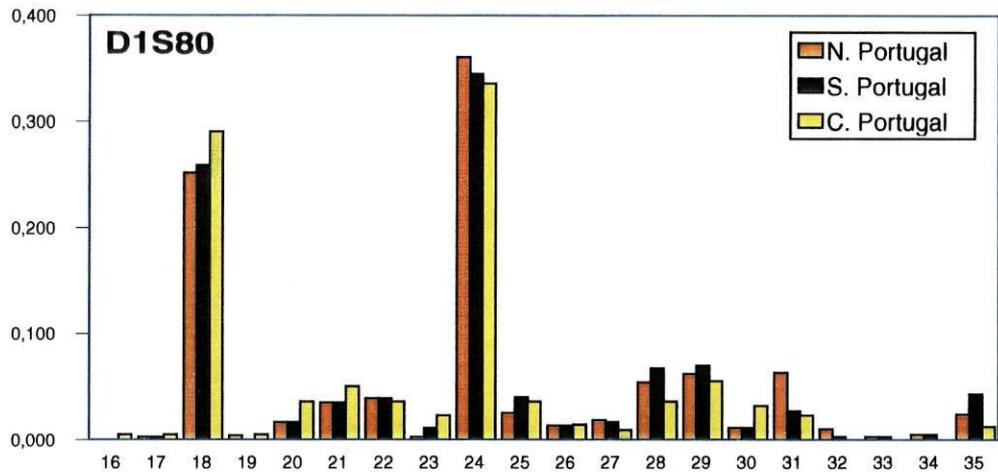


Fig. 5.4. - Distribuição das frequências dos alelos do locus *D1S80* em Portugal

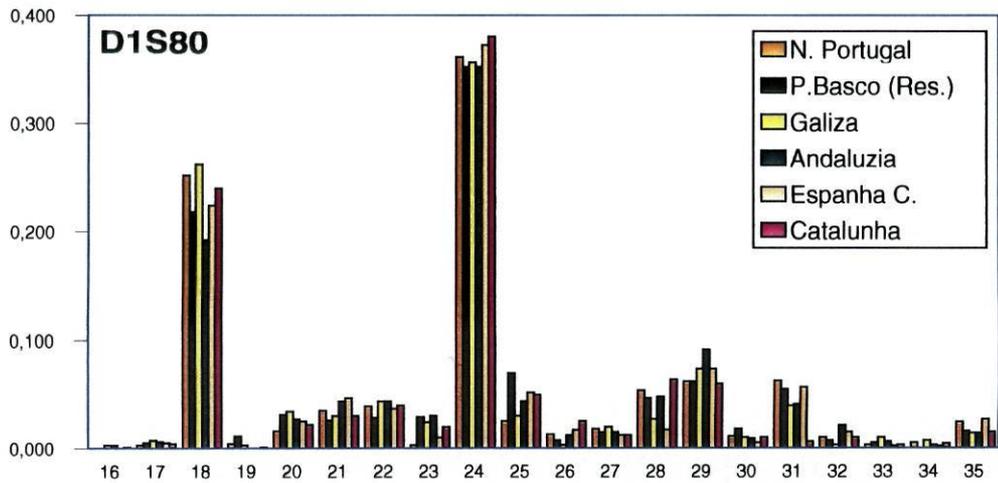


Fig. 5.5. - Distribuição das frequências dos alelos do locus *D1S80* no Norte de Portugal e em populações de Espanha

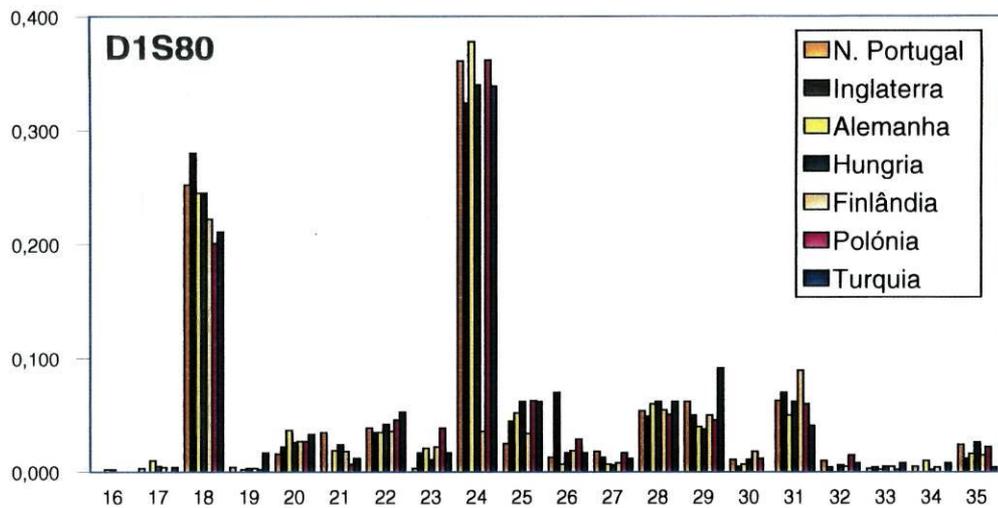


Fig. 5.6. - Distribuição das frequências dos alelos do locus *D1S80* em populações europeias que mostram diferenças significativas com a população do Norte de Portugal

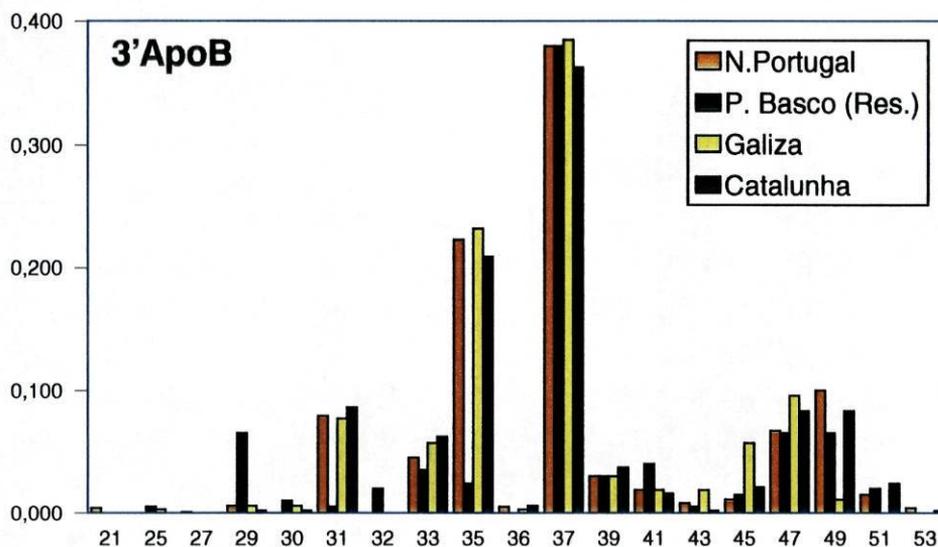


Fig. 5.7. - Distribuição das frequências dos alelos do locus 3'ApoB no Norte de Portugal e em populações de Espanha

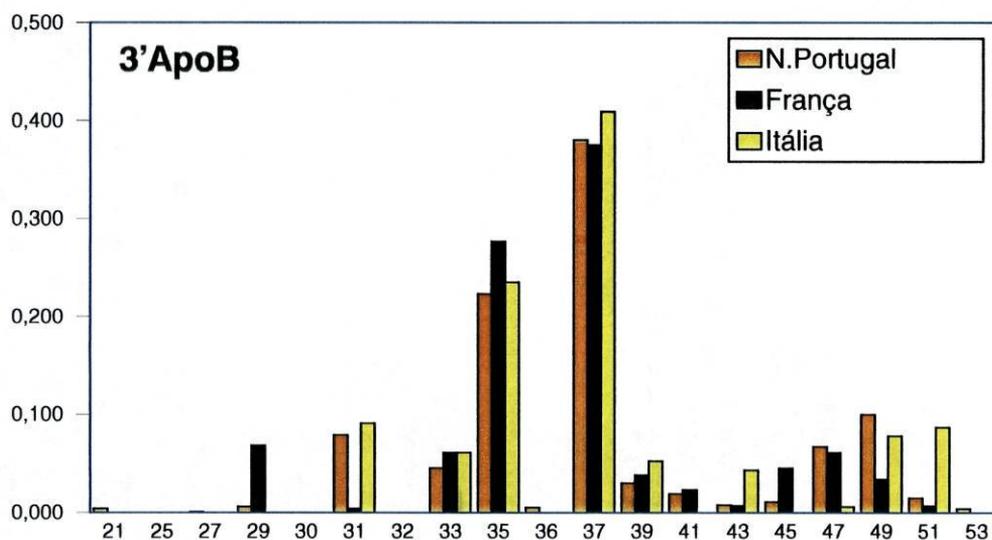


Fig. 5.8. - Distribuição das frequências dos alelos do locus 3'ApoB em populações europeias que mostram diferenças significativas com a população do Norte de Portugal

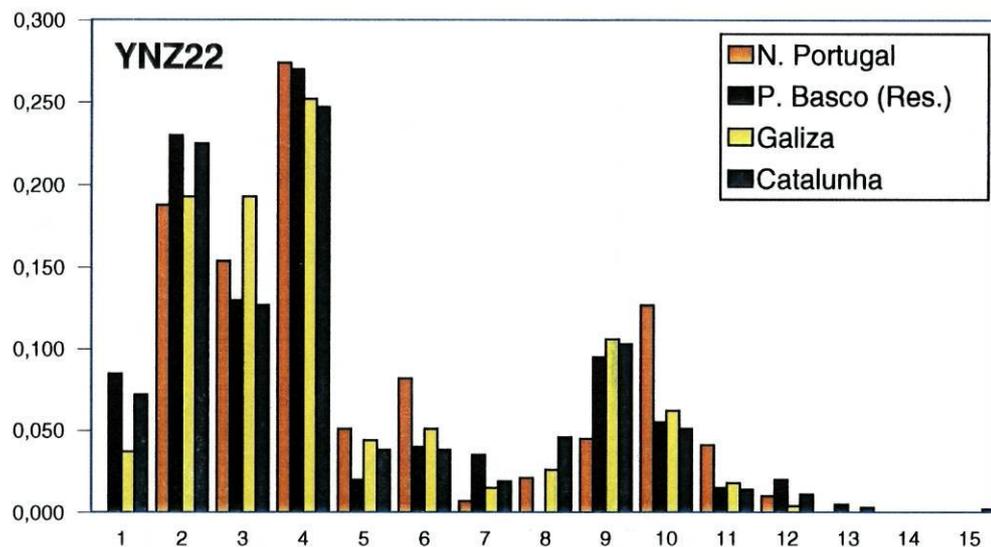


Fig. 5.9. - Distribuição das frequências dos alelos da YNZ22 no Norte de Portugal e em populações de Espanha

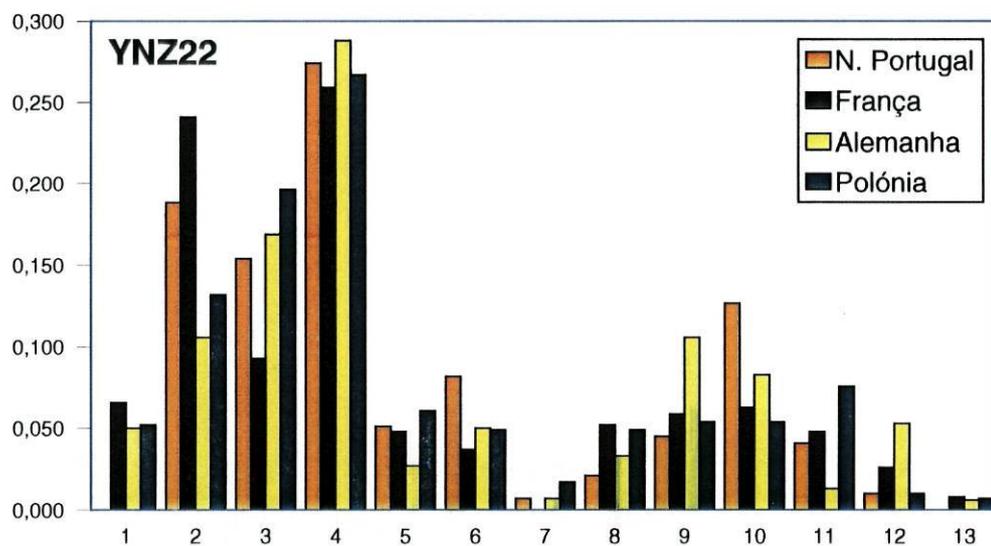


Fig. 5.10. - Distribuição das frequências dos alelos da YNZ22 em populações europeias que mostram diferenças significativas com a população do Norte de Portugal

Com os países europeus há uma marcada diferença para o alelo 29, pois a França regista para este alelo uma frequência relativamente elevada, enquanto para o Norte de Portugal é baixa, não se encontrando este alelo na amostra populacional de Itália (Fig.5.8.). Todavia, esta população evidencia uma frequência mais elevada para os alelos com um maior número de repetições do que as anteriores. À semelhança do que ocorre na Península Ibérica, as frequências dos alelos mais frequentes é similar. O único grupo racial não caucasiano, do qual temos resultados é o dos negros, que também difere significativamente do Norte de Portugal ($p=0.0001$) (Tabela 5.6.).

A **YNZ22**, à semelhança da 3'ApoB, como não possuímos frequências das restantes zonas de Portugal, só podemos compará-las com algumas populações de Espanha, registando-se diferenças significativas com o País Basco ($p=0.008$), Galiza ($p=0.016$) e Catalunha ($p=0.0001$) (Fig.5.9.). Tais diferenças são devidas em primeiro lugar à ausência do alelo 1 na população do Norte de Portugal. Para além de que no caso da Galiza os alelos 3 e 10 e no caso do País Basco e Catalunha os alelos 2 e 10 apresentam também diferenças nas suas frequências. Em relação a outros países europeus, as diferenças mais significativas, são com a França ($p=0.019$), Alemanha ($p=0.003$) e Polónia (0.001), apresentando o Norte de Portugal uma frequência mais elevada do alelo 10 (Fig.5.10.). Relativamente a França outras diferenças importantes produzem-se em relação aos alelos 2 e 3 e aos alelos 2 e 9, no caso da Alemanha. Ao contrário de todos os outros sistemas estudados, a **YNZ22** não regista diferenças significativas entre a população do Norte de Portugal e a população negra ($p=0.1637$) (Tabela 5.6.). Em relação à população japonesa não possuímos valores de frequências.

As frequências dos alelos do locus **HUMVWA31A** também se assemelham em todas as zonas de Portugal (Fig.5.11.), assim como com as regiões de Espanha, sendo, por isso, possível deduzir que a Península Ibérica apresenta distribuições das frequências, para este sistema, muito semelhantes (Fig.5.12.). Relativamente a outros países da Europa, apenas se verificam diferenças com a Holanda ($p=0.004$), Suíça ($p=0.015$), Finlândia ($p=0.0001$) e Polónia ($p=0.045$) (Fig.5.13.). As diferenças entre o Norte de Portugal e os países europeus estão distribuídas por todos os alelos. Aquelas diferenças também são significativas com populações pertencentes a outros grupos raciais, designadamente o Japão ($p=0.0001$) e a população negra ($p=0.0001$) (Tabela 5.6.).

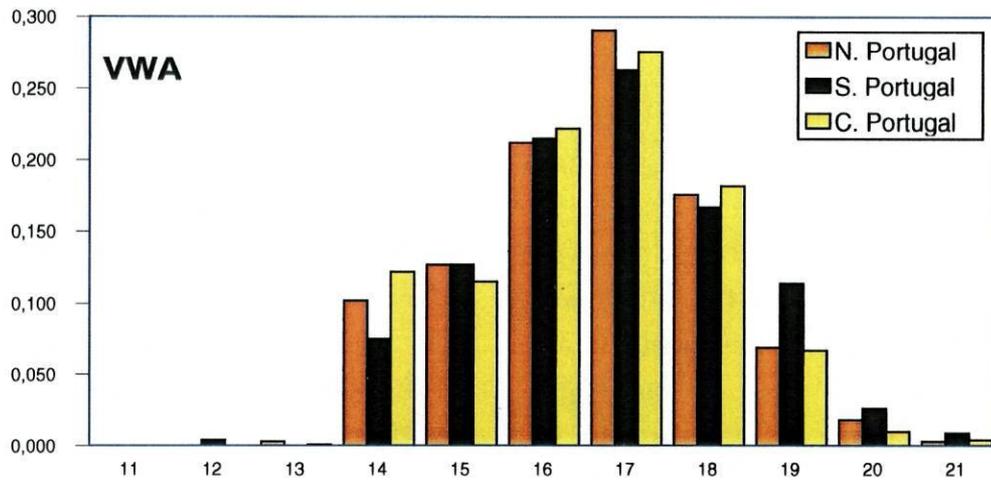


Fig. 5.11. - Distribuição das frequências dos alelos do locus HUMVWA31A em Portugal

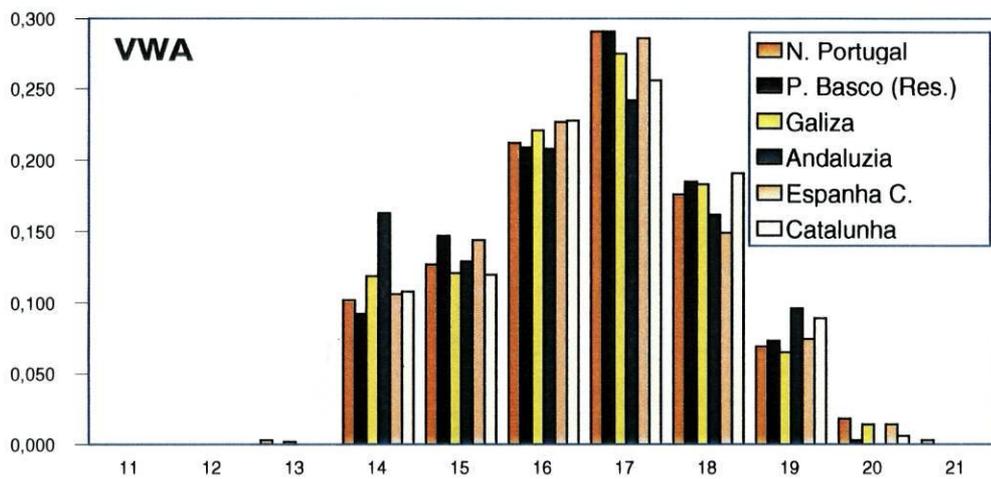


Fig. 5.12. - Distribuição das frequências dos alelos do locus HUMVWA31A no Norte de Portugal e em populações de Espanha

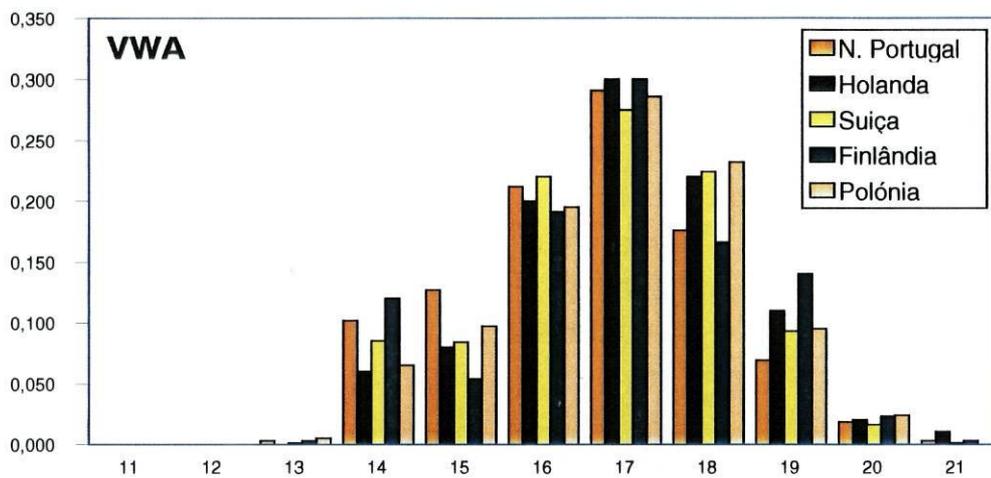


Fig. 5.13. - Distribuição das frequências dos alelos do locus HUMVWA31A em populações europeias que mostram diferenças significativas com a população do Norte de Portugal

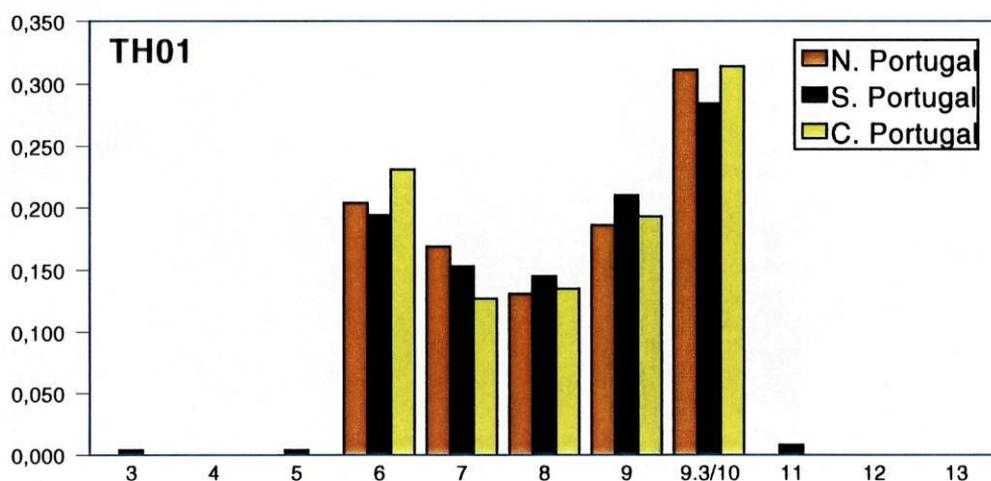


Fig. 5.14. - Distribuição das frequências dos alelos do locus HUMTH01 em Portugal

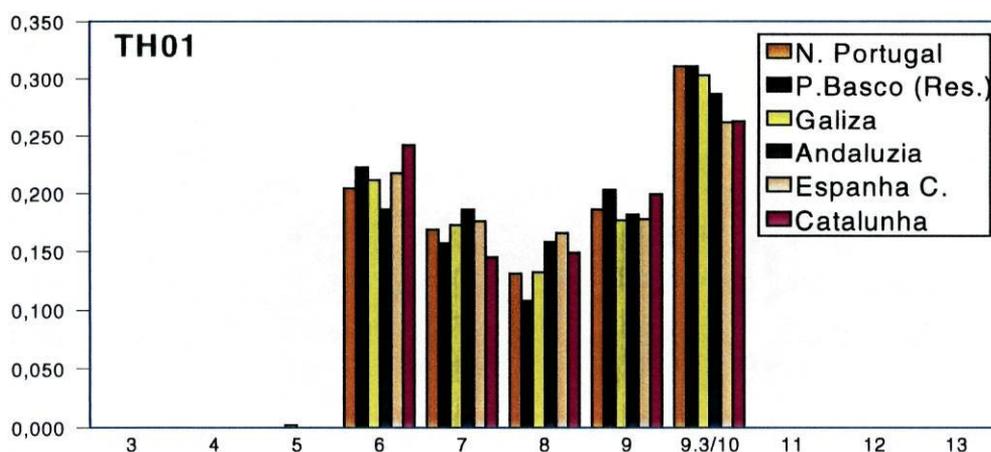


Fig. 5.15. - Distribuição das frequências dos alelos do locus HUMTH01 no Norte de Portugal e em populações de Espanha

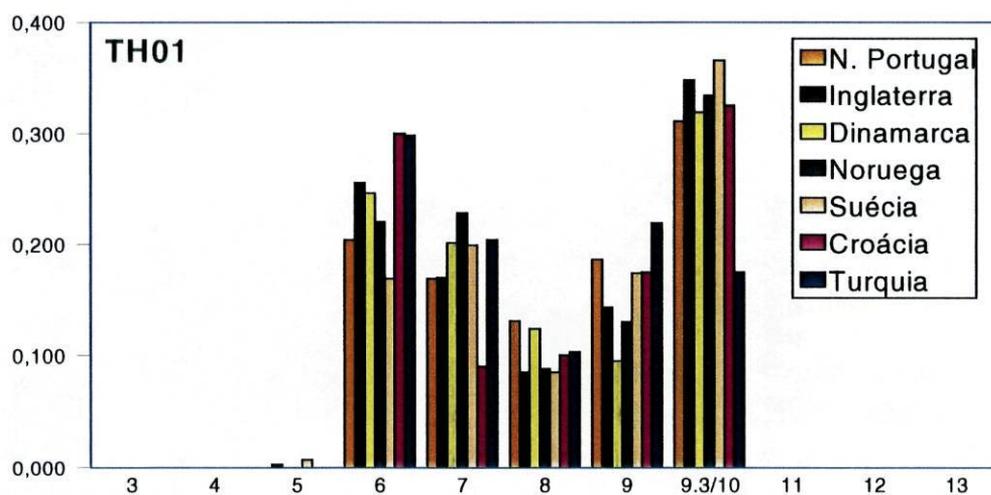


Fig. 5.16. - Distribuição das frequências dos alelos do locus HUMTH01 em populações europeias que mostram diferenças significativas com a população do Norte de Portugal

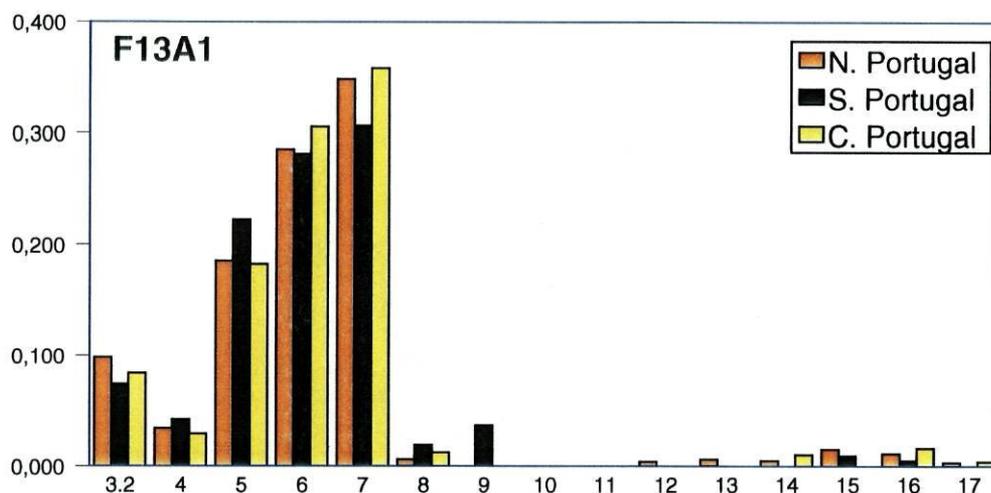


Fig. 5.17. - Distribuição das frequências dos alelos do locus *HUMF13A1* em Portugal

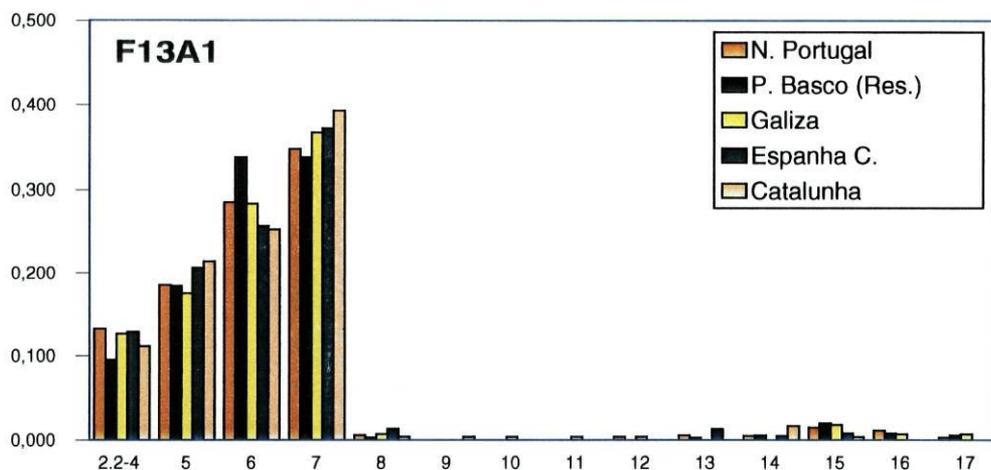


Fig. 5.18. - Distribuição das frequências dos alelos do locus *HUMF13A1* no Norte de Portugal e em populações de Espanha

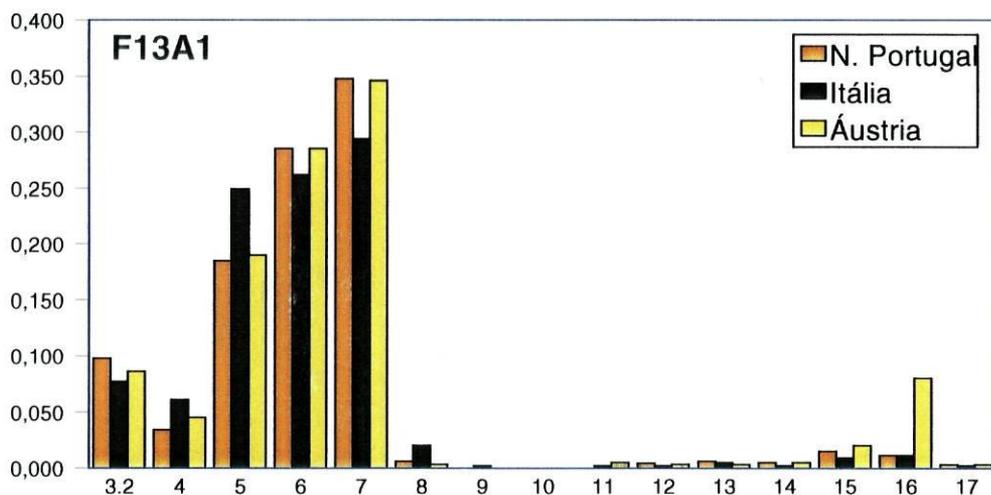


Fig. 5.19. - Distribuição das frequências dos alelos do locus *HUMF13A1* em populações europeias que mostram diferenças significativas com a população do Norte de Portugal

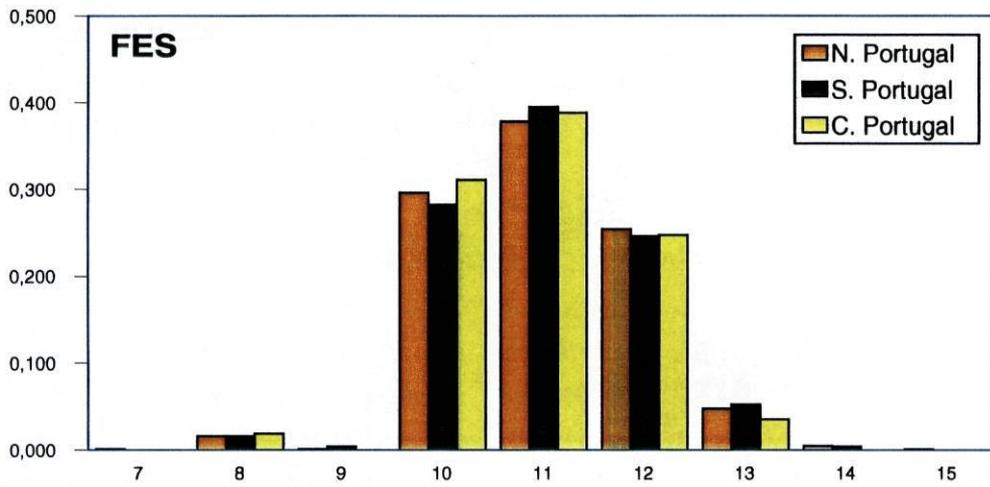


Fig. 5.20. - Distribuição das frequências dos alelos do locus HUMF13A1 em Portugal

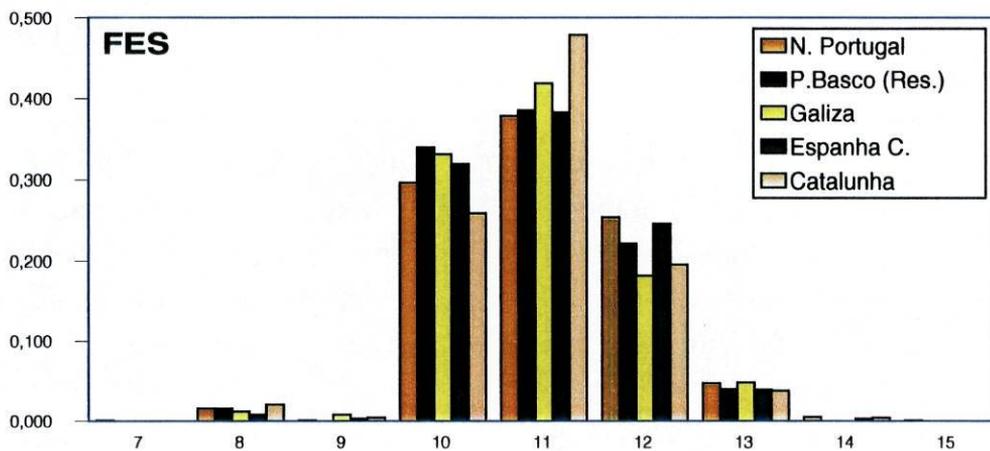


Fig. 5.21.- Distribuição das frequências dos alelos do locus HUMF13A1 no Norte de Portugal e em populações de Espanha

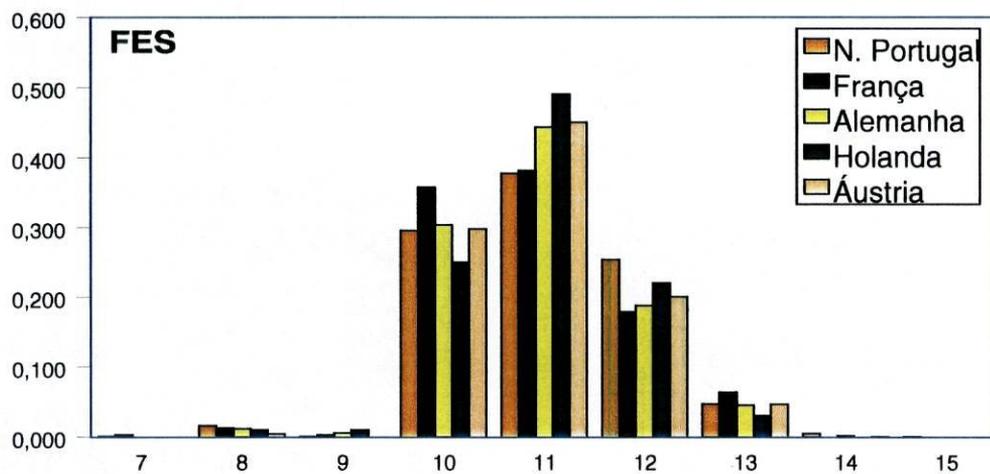


Fig. 5.22. - Distribuição das frequências dos alelos do locus HUMF13A1 em populações europeias que mostram diferenças significativas com a população do Norte de Portugal

Para a obtenção de resultados das comparações das frequências para o **HUMTH01** com outras populações a partir do teste de χ^2 foi necessário, nalguns casos, agrupar os alelos 9.3 e 10 numa única classe, uma vez que parte das populações estudadas era dessa forma que apresentavam os resultados. Não se registam diferenças entre as zonas norte, centro e sul do país (Fig.5.14.). Em relação às populações de Espanha a principal diferença foi observada para o alelo mais frequente e fundamentalmente entre o Norte de Portugal, o Centro de Espanha e a Catalunha (Fig.5.15.). A Inglaterra ($p=0.0001$), a Dinamarca ($p=0.002$), a Noruega ($p=0.0007$), Suécia ($p=0.008$), Croácia ($p=0.006$) e a Turquia ($p=0.0001$) mostram diferenças com a população estudada (Fig.5.16.). O Norte de Portugal tem frequências dos alelos intermédias relativamente a outras populações europeias, surgindo diferenças significativas com aquelas que têm frequências extremas nos alelos 6, 7 ou 9.3/10. As populações do Japão e os Negros também registam diferenças estatisticamente significativas ($p=0.0001$ para as duas populações) (Tabela 5.6.).

Para a determinação da distribuição das frequências do locus **HUMF13A1** e uma vez que havia populações que não faziam a discriminação para alelos inferiores a 4 unidades de repetição, procedeu-se à associação dos referidos alelos, excepto na população portuguesa, pois neste caso possuíamos todos os valores, que eram similares nas três zonas do país (Fig.5.17.). Quanto às restantes populações não se observam diferenças estatisticamente significativas (Fig.5.18. e Fig.5.19.), excepto nas amostras da população japonesa e negra ($p=0.0001$ para ambas as populações) (Tabela 5.6.).

O **HUMFES/FPS**, à semelhança dos outros sistemas atrás referidos, também tem frequências parecidas nas três zonas do país (Fig.5.20.), verificando-se o mesmo em relação a Espanha (Fig.5.21.). A França ($p=0.027$), Alemanha ($p=0.012$), Holanda ($p=0.006$) e a Áustria ($p=0.02$) registam algumas diferenças em relação ao Norte de Portugal, sendo, fundamentalmente, devidas aos alelos mais frequentes (10,11 e 12) (Fig.5.22.). A amostra da população negra regista igualmente diferenças ($p=0.0001$) (Tabela 5.6.).

De uma forma genérica, podemos dizer que as populações estudadas do nosso país apresentam para os sistemas D1S80, HUMVWA31A, HUMTH01, HUMF13A1 e HUMFES/FPS distribuições de frequências similares. No entanto, as semelhanças são mais significativas entre o Norte

de Portugal e o Centro, o que é perfeitamente lógico dada a proximidade geográfica das duas zonas.

O Norte de Portugal regista maiores semelhanças com a população galega relativamente aos loci STR do que com as restantes regiões espanholas. No caso dos sistemas AMPFLP as diferenças observadas com a Galiza e outras regiões espanholas são maiores.

Os STRs registam maiores diferenças estatisticamente significativas nas populações europeias, relativamente à população estudada, do que em relação às populações da Península Ibérica.

Os sistemas AMPFLP foram estudados num número reduzido das populações referenciadas. Nas que existem resultados, encontraram-se numerosas diferenças.

5.6. Estatísticos F

Com o objectivo de calcular a existência de subestruturação populacional entre diferentes populações calcularam-se os F_{st} (Tabela 5.7.).

1º Para **6** populações europeias (7 sistemas) e para estas mesmas populações e uma amostra de população negra. Os resultados indicam que não existe subestruturação entre as populações caucasianas consideradas, ao contrário do que ocorre com a população negra. O locus F13A1 proporciona o valor de F_{st} mais elevado tanto intra como inter-racial.

2º Também se determinaram os valores de F_{st} para **10** populações caucasianas europeias (4 loci STR e D1S80). Os valores de F_{st} obtidos são menores do que no caso anterior. À semelhança do que foi anteriormente dito, o sistema F13A1 mostra também maiores valores de diversidade intra e inter-racial.

3º Por último os F_{st} foram determinados também em **12** populações europeias e numa população negra (4 loci STR). De novo a subestruturação populacional é muito reduzida dentro das populações caucasianas europeias.

Tabela 5.7. *Fst* para 4 loci STR, 4 loci STR e D1S80 e 7 loci

	Fst 4 loci		Fst 5 loci		Fst 7 loci	
	Negros incluídos	Negros não incluídos	Negros incluídos	Negros não incluídos	Negros incluídos	Negros não incluídos
D1S80	-	-	0.009	0.001	0.013	0.001
3' ApoB	-	-	-	-	0.011	0.004
YNZ22	-	-	-	-	0.008	0.005
VWA	0.002	0.001	0.001	0.000	0.002	0.000
TH01	0.008	0.001	0.010	0.001	0.015	0.001
F13A1	0.011	0.005	0.013	0.006	0.020	0.008
FES	0.003	0.003	0.003	0.002	0.004	0.002

5.7. Distâncias genéticas

Com o objectivo de estimar as variações genéticas existentes entre diversas populações europeias, calculou-se a distância de Reynolds (1983) em 6 populações, das quais se dispõe de dados para todos os sistemas. Efectuou-se o mesmo cálculo para 10 populações europeias para os sistemas: STR e D1S80 e, por fim, para 13 populações apenas com os loci STR. Em todos os casos representaram-se as distâncias, utilizando o método de Fitch e Margoliash (1967).

1º-Os valores de distância, segundo Reynolds, para todos os loci analisados entre 6 populações europeias (Fig.5.23.), mostram um valor mínimo entre a Galiza e a nossa população. O máximo valor dentro das populações estudadas é para a França e para a população da Catalunha, exibindo o Norte de Portugal distâncias intermédias com as outras populações europeias.

2º-As distância calculadas, segundo o mesmo procedimento para o sistema D1S80 e os 4 loci STR (Fig.5.24.), evidenciam que as populações mais próximas do Norte de Portugal são o Centro de Portugal, o Centro de Espanha e a Galiza. Quanto ao Sul de Portugal, a distância genética é maior. Por outro lado, a nossa população mostra a maior distância com a população de França, seguida de outras populações distintas da Península Ibérica, excepto com a população da Catalunha.

3º-Por outro lado, calculou-se a distância genética correspondente aos 4 loci STR, analisando-se, neste caso, 13 populações europeias (Fig.5.25.). As mínimas distâncias correspondem de novo ao Norte e Centro de Portugal, agrupando-se o Sul de Portugal, uma vez mais, com a Itália.

Existem também pequenas distâncias com outras populações da Península Ibérica e notavelmente maiores com a Catalunha e a Holanda.

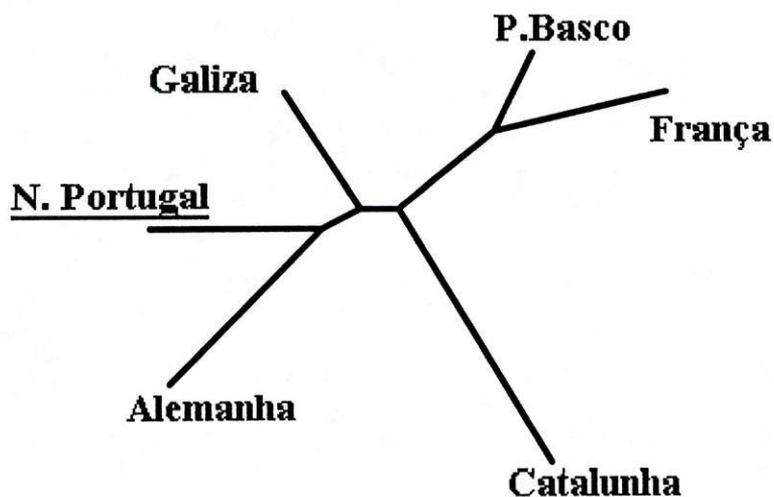


Fig. 5.23. - Árvore segundo Fitch Margoliash (1967) para os 3 sistemas AMPFLP e os 4 loci STR

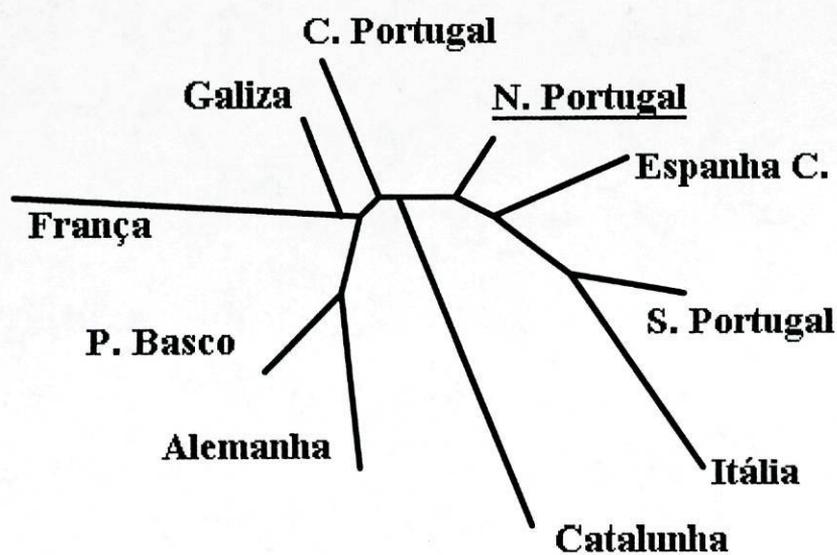


Fig. 5.24. - Árvore segundo Fitch Margoliash (1967) para o DIS80 e os 4 loci STR

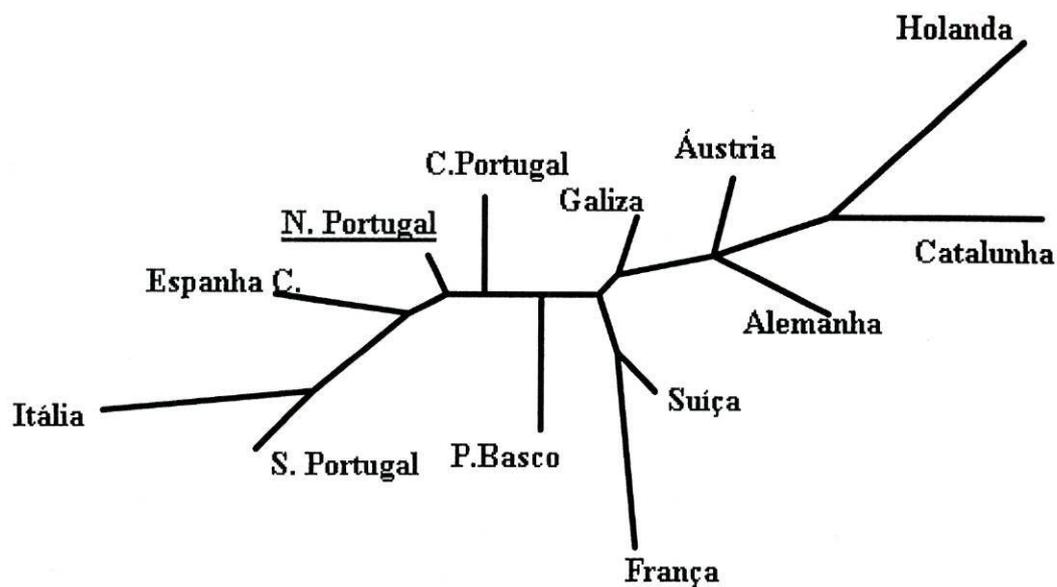


Fig. 5.25. - Árvore segundo Fitch Margoliash (1967) para os 4 loci STR

5.8. Aplicações médico-legais

5.8.1. Investigação de paternidade

No período de tempo relativo à realização deste trabalho, ou seja, de Dezembro de 1993 a Dezembro de 1996, foram efectuados 742 casos de investigação biológica de paternidade. Não foram detectadas, em nenhum dos sistemas, mutações, no total de 741 pares mãe/filho. No entanto, as amostras seleccionadas para o estudo populacional (397 para os 3 sistemas AMPFLP e os 4 loci STR, excepto para a YNZ22 em que apenas foram estudadas 146), são relativas a um período diferente do mencionado.

As 397 amostras estudadas para os 6 polimorfismos já referidos eram de intervenientes não aparentados em 193 casos de paternidade (pretensos pais e mães). Desses 193 casos registamos 54 exclusões de paternidade (23%), 9 das quais com mais de um pretenso pai e uma com 2 filhos. Em relação à YNZ22, foram apenas estudadas 146 amostras referentes a 67 casos de paternidade, sendo 10 desses casos de exclusão de paternidade (Tabela 5.9.).

Foi calculado o valor da probabilidade de exclusão a priori para cada um dos sistemas, verificando-se que o maior valor é o da YNZ22, seguido do VWA. Estes valores confirmam o que se disse anteriormente, isto é, que o poder informativo de um sistema depende não só do número de alelos que o sistema possui, mas também do facto dessas frequências serem equilibradas (Tabela 5.8.).

Foi também determinada a probabilidade de exclusão a priori acumulativa, que indica a eficácia a priori que um laboratório possui, que é, neste caso, de 99,8%. Este valor demonstra que o conjunto destes sistemas é de grande interesse na resolução dos casos de paternidade e que apenas com estes 7 polimorfismos quase se atinge o valor de 99,9%, o aconselhado e considerado adequado para os laboratórios que realizam este tipo de perícias (Tabela 5.8.).

Tabela 5.8. Probabilidade de exclusão a priori dos sistemas AMPFLP e loci STR

Locus	Pex
D1S80	0.618
3'ApoB	0.600
YNZ22	0.678
VWA	0.622
TH01	0.576
F13A1	0.532
FES	0.442
Pex Acumulada	0.998

Ainda relativamente a estes sistemas foi efectuado um estudo comparativo, tendo em linha de conta não só os valores de probabilidade de exclusão a priori individual, mas também a probabilidade de exclusão a priori acumulativa e ainda o número de exclusões observado e esperado, assim como o valor de χ^2 , para cada sistema (Tabela 5.9.).

Tabela 5.9. Probabilidade de exclusão a priori individual e acumulativa. Número de exclusões observado e esperado e χ^2 para os 7 sistemas

Locus	Pex Individual	Pex Acumulativa	NºExclusões Observado	NºExclusões Esperado	χ^2
D1S80	0.6183		30 (54)	33	0.34
3'ApoB	0.6001	0.8474	26 (54)	32	1.26
YNZ22	0.6785	0.9509	6 (10)	7	0.09
VWA	0.6224	0.9815	28 (54)	33	0.94
TH01	0.5757	0.9922	32 (54)	31	0.03
F13A1	0.5322	0.9963	25 (54)	29	0.49
FES	0.4117	0.9980	25 (54)	22	0.34

Da análise dos valores anteriormente referidos, podemos constatar que a 3'ApoB e o VWA são os sistemas que possuem maiores valores de χ^2 , ou seja, estes dois loci são os que possuem maiores discrepâncias entre o número de exclusões observado e esperado. Os restantes sistemas apresentam valores inferiores a 0.5.

As conclusões possíveis de um caso de investigação de paternidade, são: não exclusão de paternidade e exclusão de paternidade.

5.8.1.1. Prova positiva de paternidade

Nos casos da prova positiva de paternidade, isto é, quando não se verificar a existência de exclusão de paternidade por nenhum dos sistemas estudados, calcula-se a probabilidade de paternidade, com base no Teorema de Bayes.

A fórmula que expressa a probabilidade (a posteriori) de paternidade contém um parâmetro para poder ser simplificada, que é a probabilidade a priori de paternidade. Assim, se se atribuir a este valor de probabilidade 0.5, isto é, considera-se que o pretense pai tem tantas probabilidades de ser o pai como de não ser, surge uma fórmula simplificada:

$$W = \frac{X}{X + Y}$$

Também conhecida por equação de Essen-Möller, em que W é a probabilidade de paternidade, X é a probabilidade de que o pai biológico seja o pretense pai ou probabilidade de que se verifique a paternidade e Y é a probabilidade de que o pai biológico seja um indivíduo tirado ao acaso da população ou probabilidade de não paternidade.

Para além do valor de probabilidade de paternidade, também são usados outros parâmetros, como o índice de paternidade, que é o cociente $\frac{X}{Y}$ e ainda o valor EM (Essen-Möller), que é dado pela expressão: $\log Y/X + 10$.

Nas conclusões dos relatórios de investigação de paternidade em que não se verifique exclusão de paternidade por nenhum dos sistemas estudados deve ser indicado o valor da probabilidade de paternidade. Para que esses resultados sejam facilmente entendíveis por parte dos juristas, deve ser anexada a Tabela de Hummel. Nessa tabela para intervalos de valores de probabilidade de paternidade são atribuídos predicados verbais. Actualmente, usa-se a tabela de Hummel modificada em que apenas figuram valores de probabilidade de paternidade superiores a 99%, pois com as novas tecnologias empregues é pouco provável não se atingir este valor.

Tabela de Hummel modificada

Probabilidade de Paternidade	Predicado verbal
$W \geq 99.73\%$	Paternidade praticamente provada
$99.73\% > W \geq 99\%$	Paternidade extremamente provável

5.8.1.2. Exclusão de paternidade

Quando se caracterizam laboratorialmente os diferentes polimorfismos que constituem a prova pericial, pode ocorrer que se encontre exclusão por um sistema, várias exclusões ou nenhuma. Todavia, nem todos os tipos de exclusão têm o mesmo valor.

Assim, conclui-se por exclusão de paternidade, quando houver exclusão pelo menos por dois sistemas, sendo uma delas de 1ª ordem (directa ou pela 1ª regra de Landsteiner), como foi atrás referido.

Os casos mais frequentes de exclusão de 1ª ordem para um dado sistema são, quando o filho possui um alelo ausente na mãe e no pretense pai ou quando o pretense pai é heterozigótico e o filho não possui nenhum dos seus alelos. É para notar que apenas existe exclusão de 1ª ordem aparente, quando houver um erro técnico ou quando existir uma mutação, contudo, a taxa de mutação geral para a espécie humana é muito baixa.

As exclusões de 2ª ordem (indirectas ou pela 2ª regra de Landsteiner) são aquelas em que pode existir a possibilidade de erro, ou seja, a exclusão aparente de paternidade, quando para o sistema em questão existem alelos silenciosos ou que se comportem como tal. O caso mais frequente deste género de exclusões ocorre quando o pretense pai e o filho são homozigóticos para alelos diferentes.

Há alguns anos entendia-se que só se podia concluir com certeza os casos de exclusão de paternidade. Hoje, dado o avanço da ciência neste campo, considera-se que um resultado positivo de paternidade, devidamente documentado, é tão seguro como o de exclusão de paternidade.

Por outro lado, o antigo argumento usado pela defesa de que podia existir um indivíduo geneticamente igual ao pretense pai, tem cada vez menos

valor. Pois, um resultado de paternidade próximo de 99.99% pressupõe a utilização de um conjunto de sistemas suficientemente alargado, pelo que será na prática impossível encontrar um indivíduo geneticamente igual ao pretense pai, com excepção dos gémeos monozigóticos.

5.8.2. Criminalística

A resolução dos casos médico-legais do âmbito da criminalística implica, na maior parte dos casos, o estudo de vestígios biológicos e a comparação das suas características genéticas com as da vítima e suspeito ou suspeitos.

Tradicionalmente, aquelas perícias realizavam-se mediante o estudo exclusivo de marcadores genéticos convencionais. Todavia, visto que a maior parte destes marcadores são proteínas que proporcionam, neste campo, informação reduzida por possuírem uma escassa variação (baixo polimorfismo) e porque se degradam rapidamente, é preferível o estudo dos polimorfismos de DNA.

A conclusão deste tipo de perícia médico-legal é muito mais complexa do que os casos de investigação de filiação, porquanto nestes últimos o perito colhe quantidade suficiente de sangue aos intervenientes para a realização do estudo e as amostras são preservadas nas condições ideais (arca congeladora a -20°C ou a temperaturas inferiores). Por outro lado, os vestígios recebidos para a resolução de casos ligados à criminalística são de diferentes origens (manchas de sangue, esperma, pêlos etc.), para além de que as suas quantidades são exíguas e o seu estado de conservação é deficiente, na maior parte dos casos.

Dadas as características dos vestígios anteriormente mencionadas, o perito necessita de desenvolver diferentes protocolos de extracção do DNA, conforme o produto a analisar e o seu estado de conservação. Não raras vezes, tem também de lançar mão de métodos que lhe permitam fazer a concentração e purificação das amostras de DNA, após a extracção.

Nos casos de violação em que são colhidos exsudatos vaginais, em que há mistura com o sémen do violador, têm sido desenvolvidas técnicas no sentido de possibilitar a separação das células espermáticas das células vaginais.

Nas perícias relativas à identificação individual, em restos cadavéricos antigos, têm sido introduzidas técnicas de extracção e purificação complexas. Com este tipo de material têm de ser tomadas com mais acuidade todas as precauções sugeridas aos laboratórios que fazem PCR, para evitar a contaminação.

O relatório neste género de perícia deve ser exaustivo, referindo e descrevendo todo o material recebido, técnicas usadas na extracção do DNA, métodos de tipagem e resultados obtidos. As conclusões devem incluir as comparações das características genéticas dos vestígios com as mesmas características do sangue do suspeito ou suspeitos e vítima, para além da valorização da prova em termos de valor incriminante, razão bayesiana de probabilidades ou "likelihood ratio". A valorização da prova pressupõe que haja coincidência entre os genótipos do vestígio e os do suspeito.

O cálculo do valor incriminante, se forem utilizados na resolução do caso loci independentes, é o produto do inverso da frequência dos genótipos dos sistemas analisados, como já foi referido anteriormente. Uma vez que ficou demonstrado, por este estudo, tratar-se de loci independentes poder-se-á usar a regra do produto para aquela determinação.

Em face do exposto pode inferir-se que o valor incriminante depende da capacidade informativa proporcionada pelo conjunto de sistemas utilizado na resolução da perícia e que obviamente variará consoante a capacidade informativa de cada sistema, ou seja, com o conteúdo em informação polimórfica (PIC) por ele proporcionado.

Por isso, efectuou-se o cálculo dos valores de PIC para os sistemas em estudo (Tabela 5.10.), verificando-se que a YNZ22 e o VWA são os polimorfismos que apresentam valores mais elevados, à semelhança do que ficou demonstrado no cálculo da probabilidade de exclusão a priori.

Um outro parâmetro de grande interesse médico-legal é a probabilidade de coincidência por acaso ou probabilidade de "matching" (pM). Este valor indica a probabilidade de que haja coincidência de genótipos em dois indivíduos tirados ao acaso da população. Os valores obtidos para os loci analisados na população do Norte de Portugal mostram que a probabilidade de coincidência para os 7 sistemas estudados é de 2.5×10^{-8} . O estudo da população do Norte de Portugal, para este parâmetro, realizou-se a partir de um número médio de 146 indivíduos para cada um dos 7 loci analisados. Com esta amostra as comparações possíveis entre os indivíduos

são de $n(n-1)/2$, sendo n o tamanho da amostra. O número de comparações possíveis na nossa amostra foi de 10.585, o número de coincidências esperadas dos genótipos foi, para os sistemas AMPFLP, de 3 e para os loci STR de 0.84, sendo para o conjunto dos 7 loci de 0.003.

Tabela 5.10. Conteúdo em informação polimórfica (PIC) para os 7 sistemas estudados

Locus	PIC	pM
D1S80	0.77	0.08
3ÁpoB	0.76	0.09
YNZ22	0.82	0.05
VWA	0.78	0.06
TH01	0.75	0.08
F13A1	0.72	0.11
FES	0.65	0.15
pM Acumulada		2.5×10^{-8}

Foram efectuados 103 exames do âmbito da criminalística biológica no período de Dezembro de 1993 a Dezembro de 1996, tendo sido os casos de violação os mais frequentemente solicitados (62).

As amostras enviadas para exame, na generalidade desses casos, foram sangue e o exsudato vaginal da vítima, colhidos aquando da realização do exame de Clínica Médico-Legal. Em número reduzido de casos essa colheita foi efectuada no hospital onde foi prestada assistência médica à vítima.

Nalguns casos (12), para além das amostras anteriormente mencionadas foram também examinadas cuecas e outras peças de vestuário que a vítima envergava aquando da violação.

Dos 62 casos registados, apenas em 10 nos foi presente o suspeito ou suspeitos. Em 3 casos havia dois suspeitos. Nos 52 casos restantes como não havia suspeito, foi enviado, à entidade requisitante, apenas o relatório referente à pesquisa de espermatozóides no exsudato vaginal da vítima, não obstante termos procedido, nalguns casos, à extracção e tipagem do DNA da fase vaginal e espermática.

Em 3 casos, a colheita do exsudato vaginal foi feita em cadáveres. Em 2 desses casos procedeu-se, posteriormente, à colheita de sangue dos respectivos suspeitos.

A pesquisa de espermatozóides em 9 dos casos foi realizada nos exsudatos anais, tendo sido a colheita efectuada em cadáveres, na sua maioria (7).

Foi também pedida a pesquisa de espermatozóides, apenas em peças de vestuário, em 3 casos.

Dos casos em que a pesquisa de espermatozóides no exsudato vaginal foi positiva, efectuámos a extracção e análise do DNA em 17.

Em 4 casos, não obstante aquela pesquisa ter sido negativa, seguimos o mesmo procedimento, tendo os resultados, em 2 deles, revelado a presença de células com DNA diferente do da vítima. Ou seja, apesar do exame microscópico não ter mostrado a presença de espermatozóides, aquando do estudo do DNA foram encontradas células com características genéticas distintas das da vítima. Nestes dois casos, o DNA extraído é proveniente de espermatozóides que não foram detectados pelo exame microscópico, por serem em pequena quantidade, ou que pode corresponder a células seminais de um indivíduo azoospermico.

Dos 103 exames pedidos no âmbito da criminalística, 26 eram de instrumentos ou peças de vestuário com manchas, relativos a casos de autópsias, enviados para exame para comparação com o sangue da vítima e nalguns casos com o sangue de um suspeito. Tal como nos casos de violação, apenas em 8 casos nos foi presente o suspeito. Em 4 dos 26 exames realizados foi solicitado o estudo de pêlos e em 3 casos a análise de pontas de cigarro (saliva), para comparação com a vítima e o suspeito ou suspeitos.

Ainda dos 103 casos, 6 eram relativos a ofensas corporais, tendo as vítimas sido examinadas no Serviço de Clínica Médico-Legal, onde lhes foi colhido sangue para comparação com as manchas existentes, na maioria dos casos, em peças de vestuário e instrumentos.

Na generalidade dos casos concluídos antes de 1996, os polimorfismos do DNA usados foram: HLADQA1, D1S80, Polymarker (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 e GC) e excepcionalmente a 3'ApoB (3 casos). A partir do início de 1996, foi introduzido o estudo dos 4 loci STR neste tipo de perícias médico-legais, tendo-se verificado um aumento considerável do poder informativo proporcionado pelo laboratório e, conseqüentemente, obtiveram-se valores incriminantes mais elevados.

Os restantes casos (9) eram de natureza diversa e não implicaram o estudo do DNA.

Para a resolução dos casos criminais a extracção do DNA foi realizada usando directamente os vestígios ou a partir de manchas feitas no laboratório. Estas últimas foram efectuadas, quando os vestígios enviados para exame eram de sangue seco em suportes não porosos ou quando se tratava de exsudatos vaginais ou lavados vaginais. A referida extracção efectuou-se usando o Chelex ou o fenol-clorofórmio.

6. DISCUSSÃO

A resolução das perícias médico-legais fundamenta-se na identificação genética dos indivíduos implicados em casos de filiação ou de criminalística biológica. Hoje, a identificação é realizada sobretudo mediante a análise do DNA, baseada na variabilidade do genoma individual.

Os primeiros loci utilizados com fins forenses foram os VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) mediante a técnica de Southern (Eisenberg e col., 1991). Não obstante esta metodologia ter permitido obter resultados muito mais aproximados da realidade biológica do que os marcadores genéticos convencionais, ela levantou alguns problemas não só de natureza técnica, mas também quanto aos resultados.

A introdução da técnica de PCR e a descoberta dos loci minisatélite e microsatélite amplificáveis, denominados, respectivamente, AMPFLPs e STRs, vieram obviar as limitações das metodologias anteriormente usadas, constituindo um grande avanço na identificação genética (Frégeau e Fourny, 1993). As vantagens desta técnica consistem, basicamente, na rapidez de execução, sensibilidade e na distribuição discretas dos alelos, o que facilita e possibilita a sua correcta identificação e cálculo das suas frequências na população.

A aplicação da técnica de PCR ao estudo dos sistemas AMPFLP demonstrou ser eficaz particularmente nos casos de investigação biológica da paternidade, porquanto, relativamente à resolução de casos do âmbito da criminalística biológica, os polimorfismos 3'ApoB e YNZ22 revelaram possuir um interesse limitado. Em relação aos loci STR estudados (VWA, TH01, F13A1 e FES), constatou-se que se podia obter resultados a partir de quantidades exíguas de DNA em deficiente estado de conservação e no caso de mistura de amostras foi possível identificar os indivíduos que originaram essa mistura. É de salientar a precisão proporcionada pelo sequenciador automático de DNA na identificação dos alelos, pois na maior parte das determinações foi superior a 99.95%.

Todavia, antes de se iniciar uma perícia médico-legal tem de se proceder à selecção adequada dos sistemas a usar. Assim, os critérios a utilizar na escolha dos loci aplicados à identificação genética são: elevados valores de probabilidade de exclusão a priori (investigação de paternidade) e poder de discriminação (criminalística); ausência de ligamento entre os sistemas; ajuste às condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg; adequado tamanho

dos alelos para permitir a amplificação de vários loci em simultâneo (Urquhart e col., 1994).

A verificação daqueles critérios pressupõe a realização antecipada do estudo da população na qual vão ser aplicados os polimorfismos. Por isso, é necessário conhecer as frequências dos alelos de cada sistema e verificar se os loci cumprem as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Também tem interesse saber se existe associação alélica entre os loci já que, se tal se verificar, não é possível o cálculo do valor da probabilidade de paternidade mediante o uso combinado desses sistemas nem que se utilize a regra do produto no cálculo do valor incriminante, em criminalística. Por outro lado, a comparação da nossa população com outras previamente estudadas, permitirá conhecer a possibilidade da aplicação da nossa base de dados a indivíduos procedentes de outras populações, solucionando, desta forma, o problema da inexistência de dados de populações com características semelhantes à nossa.

Depois de efectuado o estudo populacional, devem ser escolhidos os loci, para a resolução dos casos de paternidade, cuja probabilidade de exclusão a priori seja elevada e os que proporcionem um alto poder de discriminação para a conclusão de casos de criminalística biológica.

A técnica de PCR tem demonstrado ser, particularmente no campo da criminalística, extremamente importante, porquanto permite a utilização de loci com alelos pequenos susceptíveis de serem amplificados por PCR, o que é de grande utilidade no estudo de amostras degradadas e com quantidades exíguas de DNA.

O principal objectivo deste estudo consistiu na análise de vários loci minisátelite e microsátelite para aplicação à resolução de casos forenses. A sua concretização implicou em primeiro lugar a adaptação de distintos protocolos de extracção de DNA, consoante a natureza das amostras a analisar. Em seguida, foi necessário efectuar o estabelecimento das condições mais favoráveis de amplificação e electroforese dos produtos amplificados, para os diferentes sistemas. Procedeu-se, ainda, à análise genética da população do Norte de Portugal e à comparação das características com as de outras populações da Península Ibérica, de outras populações europeias e ainda de outros grupos raciais como japoneses e negros. Referiu-se ainda a casuística registada no Serviço de Biologia Forense no período relativo à duração deste estudo e dos resultados obtidos.

6.1. Extracção e quantificação do DNA

As amostras analisadas eram de natureza diversa, tendo sido usados diferentes protocolos para a extracção do DNA (Material e Métodos - pág. 50-56).

Assim, relativamente ao **estudo populacional** (Norte de Portugal) para os 3 sistemas AMPFLP e 4 loci STR e na resolução dos **casos de investigação de paternidade**, foi usado o Chelex.

A principal razão do uso desta resina quelante residiu no facto da técnica ser bastante mais rápida em relação aos protocolos que utilizam o fenol-clorofórmio, tendo-se registado bons resultados mesmo na análise dos AMPFLPs. Há autores, designadamente Lareu e col., (1994), que consideram este tipo de extracção mais vantajoso do que a extracção fenólica. Entre essas vantagens referem que o uso da resina Chelex proporciona um processo de extracção mais rápido e fácil relativamente a outros métodos, uma vez que o número de passos é mais reduzido o que, por outro lado, reduz o risco de contaminação, porquanto a pipeta é introduzida dentro do tubo menos vezes; a utilização do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico não melhora a intensidade do produto amplificado a partir de 50 ng de DNA; pelo contrário, o DNA extraído pelo Chelex mostra um aumento da intensidade de amplificação, sendo, também, um método mais eficiente na obtenção de DNA a partir de pequenas quantidades de amostra. Há outros autores que são de opinião de que os métodos de extracção com resinas quelantes e diálise/concentração pelo Centricon ou a combinação de ambos demonstram um aumento da proporção de sucessos em manchas de sangue simuladas no laboratório (Comey e Budowle, 1991; Jung e col., 1991).

Um dos inconvenientes da extracção mediante o uso do Chelex é o facto do DNA extraído a partir de manchas de sangue ser mais rapidamente degradável do que o obtido pela extracção fenólica. A degradação ocorre cerca de um mês após a extracção do DNA e subsequentemente é impossível realizar a amplificação. Acresce ainda o facto dos fragmentos obtidos serem inferiores a 5 Kb, o que é explicado pela fervura a que são submetidas as amostras, não constituindo, no entanto, para os sistemas em questão, um grande inconveniente, porque os produtos de amplificação para estes loci são relativamente pequenos.

No estudo de **manchas de sangue** foi usada a extracção pelo Chelex ou a extracção com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. O primeiro método é mais rápido, tendo dado bons resultados na maioria dos casos. Quando os

resultados obtidos com aquela metodologia não eram satisfatórios, foi usada a extracção fenólica. Não obstante estar estabelecido que com esta última técnica se obtém uma maior quantidade de DNA e mais puro, nem sempre os resultados foram melhorados. Este facto, possivelmente, resultou do DNA das amostras ser exíguo e estar bastante degradado, para além das razões anteriormente apontadas e defendidas por vários autores. Em relação à maioria dos casos de criminalística biológica, como já foi referido, usou-se o método de Chelex, tendo-se procedido à amplificação do DNA o mais rapidamente possível, para se evitar a degradação.

Para a extracção do DNA em **pêlos** foi também utilizada aquela resina. No entanto, nem sempre os resultados da tipagem do DNA foram conclusivos, especialmente para os sistemas AMPFLP. Os polimorfismos de sequência e os loci STR deram melhores resultados. A reduzida quantidade de DNA que é possível obter a partir de pêlos que caíram espontaneamente é a principal razão dos insucessos. Brinkmann e col., (1993) obtiveram amplificações em cabelos sem raiz analisando conjuntos (cada um dos pêlos com 5 cm de comprimento), efectuando reamplificações das amostras. Todavia, segundo Uchihi e col., (1992) quando se utilizam fragmentos demasiado grandes de pêlos pode haver inibição da Taq polimerase, devido à grande quantidade de melanina. Na maioria das perícias médico-legais que envolviam o estudo de pêlos, foi solicitado o estudo de pêlos isolados e não de conjuntos, pelo que o procedimento seguido por Brinkmann e col., não se ajusta à nossa realidade. Por outro lado, tratou-se sempre de pêlos que caíram espontaneamente e não de pêlos arrancados, por isso, com quantidades exíguas de DNA.

Relativamente aos **casos de violação** em que nos foram presentes os exsudatos vaginais das vítimas e/ou as peças de vestuário que aquelas envergavam aquando da ocorrência do crime, foi sempre utilizado um método diferencial de lise celular que, para além do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico usa um detergente (SDS) e uma proteinase (Proteinase K), cuja função consiste na libertação das células vaginais da vítima, enquanto as cabeças dos espermatozóides se mantêm intactas em virtude do seu revestimento proteico conter pontes dissulfito (Calvin e Bedford, 1971). As células seminais são posteriormente recuperadas por centrifugação e subsequentemente lisadas na presença de ditioneitol (DTT). O uso desta metodologia demonstrou ser eficaz, pois verificou-se que mesmo nos casos em que a quantidade de espermatozóides observados ao microscópio era escassa, conseguiu-se efectuar a tipagem do DNA da fase espermática.

Na maioria das perícias médico-legais usou-se para a extracção do DNA, a resina quelante Chelex. Com este tipo de extracção não é possível a valorização do DNA, pois trata-se de um DNA de cadeia simples (Prinz e col., 1990). Por isso, na maioria dos casos de criminalística estudados, efectuou-se, após a amplificação, a comprovação da amplificação em gel de agarose com brometo de etídio.

A quantificação espectrofotométrica ou fluorimétrica realiza-se em DNAs obtidos a partir das extracções com fenol-clorofórmio, não sendo possível efectuarla em DNAs extraídos com Chelex, por serem de cadeia simples. Estas valorizações não são exactas nos casos de amostras muito contaminadas com microrganismos. No trabalho presente, e em relação às amostras para o estudo populacional, não se procedeu à quantificação, porquanto, como foi já referido, os DNAs usados foram obtidos com Chelex. As quantidades aproximadas de DNA foram estimadas a partir da observação da intensidade das bandas obtidas no gel de comprovação da amplificação, tendo-se constatado que este procedimento dá uma ideia bastante precisa da quantidade de DNA a usar na tipagem, permitindo simultaneamente inferir sobre a sua qualidade. Apenas se efectuou a quantificação fluorimétrica numa minoria de amostras (criminalística biológica).

6.2. Amplificação do DNA

Neste estudo foi confirmado o que já tinha sido constatado em estudos anteriores, ou seja, que a amplificação dos sistemas AMPFLP é consideravelmente mais complexa do que a dos loci STR, uma vez que neste último caso os alelos possuem um menor tamanho (< 300 pb).

Relativamente ao **D1S80** constatou-se que a amplificação efectuada com o Kit comercial fornecido pela Perkin-Elmer era perfeita o que ficou demonstrado com a facilidade e objectividade com que se visualizavam e identificavam os alelos, especialmente nos casos de investigação de paternidade. Em relação aos outros casos forenses os resultados obtidos nem sempre foram conclusivos, uma vez que numa apreciável percentagem dos casos estudados a quantidade e qualidade do DNA extraído não era susceptível de permitir melhores resultados.

No caso da **3'ApoB** e **YNZ22** a optimização dos processos de amplificação foi mais laboriosa, particularmente para o último sistema. Todavia, neste

estudo conseguiu-se melhorar as condições de amplificação e tipagem de tal forma que não se verificou a existência de excesso de homozigóticos. Tal facto foi demonstrado pelo não afastamento das condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg, para além de que nos 67 casos de investigação de paternidade em que este polimorfismo foi incluído não se registaram exclusões de paternidade apenas por este sistema ou exclusões de maternidade.

Quanto aos casos forenses ligados à criminalística, estes 2 sistemas revelaram proporcionar apenas bons resultados em amostras recentes e possuindo quantidades de DNA apreciáveis.

A PCR “multiplex” ou amplificação simultânea de vários polimorfismos, permite a amplificação de vários sistemas usando uma única mistura de reacção, desde que sejam escolhidos os loci em que não haja sobreposição dos tamanhos dos alelos. Neste estudo foram efectuados “duplex” dos loci STR: HUMVWA31A + HUMF13A1 e HUMTH01 + HUMFES/FPS, uma vez que possuem alelos entre, respectivamente, HUMVWA31A: 135pb-167pb; HUMTH01: 154pb-178pb; HUMF13A1: 181pb-235pb; HUMFES/FPS: 213pb-238pb. O uso do “duplex” constitui uma vantagem, especialmente, em termos de economia de tempo dispendido quer na amplificação quer na tipagem. Os resultados obtidos da aplicação do estudo destes sistemas aos casos criminais foram, de uma forma geral, conclusivos, porquanto se trata de pequenas sequências de DNA (4pb) mais fáceis de amplificar do que os sistemas AMPFLP (10-70 pb).

Nos casos de violação realizou-se a amplificação da amelogenina na fase espermática para nos assegurarmos da existência de células masculinas, com uma banda específica X com 212 pb e uma outra Y com 218 pb.

6.3. Electroforese dos produtos amplificados

A identificação dos alelos do **D1S80** foi feita em minigeis de poliacrilamida no Phastsystem. Este sistema mostrou ser rápido e preciso, proporcionando bons resultados. Não obstante os geis usados serem de pequenas dimensões a leitura dos genótipos não ofereceu qualquer problema, pois foi utilizado o “ladder alélico” de dois em dois poços.

A tipagem dos produtos amplificados da **3'ApoB** e **YNZ22** foi efectuada em geis de agarose com brometo de etídio, tendo-se usado o 100 Base Pair Ladder (Pharmacia) e um “ladder alélico” feito no laboratório. Na generalidade dos casos a visualização e identificação dos alelos foi

objectiva e a resolução era boa mesmo para o alelo intermediário 36 da 3'ApoB.

Quanto aos loci **STR** a referida identificação foi realizada em geis desnaturantes de poliacrilamida (Ready Mix ou Hydrolink) no sequenciador automático da Pharmacia (ALF). Ao contrário das técnicas convencionais de tipagem este sistema permite a identificação segura dos alelos, porquanto a leitura é fornecida directamente pelo equipamento, ou seja, não são necessárias manipulações do gel para detectar os produtos de PCR, pois a análise dos dados é também automatizada, graças ao software apropriado que permite armazená-los, para posteriores análises estatísticas. Neste estudo foi calculada a precisão na determinação do tamanho dos alelos para os 4 loci STR que foi, na maioria dos casos, superior a 99.95%, o que demonstra o rigor desta metodologia na sua identificação. Conclusões similares foram obtidas por outros autores (Kimpton e col., 1994; Pestoni e col., 1995; Ambach e col., 1995; Andersen e col., 1996).

Vantagens do uso da tecnologia automatizada na análise de fragmentos

Para além da identificação precisa dos alelos, quando se usam placas curtas (10 cm do ponto de aplicação ao laser) e voltagens relativamente altas, os tempos de análise são consideravelmente diminuídos, sendo inclusivamente possível a reutilização do gel, sem prejuízo da qualidade dos resultados obtidos. É também de interesse relevante o facto desta tecnologia obviar a necessidade da manipulação do gel após a electroforese para a detecção dos produtos de PCR, ao contrário do que ocorre quando a técnica empregue não é automática, sendo necessária a exposição autorradiográfica do gel ou a coloração com nitrato de prata.

Outra vantagem a registar é o facto da análise dos resultados ser também automatizada através da utilização de software adequado, permitindo armazenar os dados em bases de dados para posteriores análises estatísticas.

Uma vez que o sequenciador de DNA ALF possui placas termostaticamente controladas na unidade de electroforese, é possível aumentar a velocidade de migração usando altas voltagens, o que possibilita diminuir substancialmente os tempos de corrida. A utilização de placas curtas, em que a distância do poço ao laser é de 10 cm, permite que aqueles tempos sejam ainda mais reduzidos.

Este tipo de equipamento proporciona uma alta resolução, pois permite distinguir diferenças apenas num nucleótido (Edwards e col., 1991; Ziegle e col., 1992; Kimpton e col., 1993).

Finalmente, os sinais de fluorescência são conhecidos por serem lineares num maior grau de intensidades do que as autorradiografias convencionais (Porcher e col., 1992; Ziegle e col., 1992). Por isso, aqueles sistemas de detecção são, provavelmente, mais úteis para a quantificação directa dos produtos de PCR. Este facto revela-se de especial interesse quando se possui mistura de amostras provenientes de mais de um indivíduo, pois o tamanho dos picos obtidos dá uma ideia do material celular existente de cada indivíduo (Decorte, 1994).

6.4. Análise genético-populacional

6.4.1. Distribuição das frequências dos sistemas AMPFLP e STR

Os sistemas AMPFLP e STR possuem alelos discretos pelo que as suas frequências se determinam por contagem directa dos alelos na amostra estudada.

O alto grau de heterogeneidade associado com o elevado número de alelos para o **D1S80** faz com que este locus seja muito útil na identificação forense (Deka e col., 1994). Apesar do **D1S80** possuir um número mais elevado de alelos (23) do que os restantes sistemas AMPFLP, **3'ApoB** (17) e **YNZ22** (11), tendo em conta que apenas 5 daqueles alelos têm frequências superiores a 0.05, e que os outros sistemas possuem frequências homogeneamente distribuídas, o poder informativo é similar para os três polimorfismos (Tabelas 5.2.). A distribuição das frequências para todos eles é multimodal (Fig.5.1.).

Os loci **STR** mostram dois tipos diferentes de distribuições de frequência na nossa população: unimodal, bimodal (Fig.5.2. e Fig.5.3.). Alguns autores, como Edwards e col., (1992), sugerem que tais variações podem representar a história evolutiva dos alelos em diferentes populações. A existência de alelos modais comuns em diferentes grupos raciais parece indicar que estes alelos são os mais antigos. Para além de que se supõe que as distribuições bimodais dos alelos compartilhados por todas as raças teriam aparecido antes da dispersão geográfica das mesmas (Alonso S., 1995).

Os valores das heterozigocidades para os 7 sistemas estudados são elevadas, entre 68% e 82% (Tabela 5.3.). Em nenhum dos casos existe diferenças significativas entre os valores de heterozigocidade observada e esperada, apesar de se registarem pequenas variações entre esses valores (excepto para o D1S80 que é igual). Verificou-se, também, que essas variações são em ambos os sentidos, ou seja, tanto existe um valor maior de esperados como de observados, como o contrário, o que permite deduzir que essas tendências são aleatórias e que reflectem pequenos desvios próprios da amostra populacional.

6.4.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para se efectuar a valorização das provas periciais tanto referentes às investigações de filiação como às de criminalística biológica, nos casos em que se verifique, respectivamente, não exclusão de paternidade e coincidência entre os genótipos do suspeito e do vestígio, é necessário verificar se essas situações ocorrem por acaso ou, se pelo contrário, existem evidências de que no primeiro caso, o pretense pai seja o pai biológico e no segundo caso que a coincidência se deva ao facto de se tratar da mesma pessoa.

Em ambas as situações atrás referidas, isto é, tanto no cálculo da probabilidade de paternidade (investigação de paternidade), como na determinação do valor incriminante, é necessária a utilização das frequências dos alelos dos sistemas usados na resolução dos casos. Por isso, essas frequências têm de ser previamente calculadas mediante o estudo da população de onde provêm os intervenientes nas referidas perícias. No caso do Instituto de Medicina Legal do Porto, o Norte de Portugal. Contudo, aquelas frequências só podem ser usadas se a população estudada cumpre as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os testes de Odelberg e col., G e de Guo e Thompson, cujo cálculo tem como objectivo analisar as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicam que em nenhum dos sistemas estudados existe desvio do referido equilíbrio, excepto para a 3'ApoB (Tabela 5.4.), o que permite afastar a possibilidade da existência de subestruturação na população. Nestas circunstâncias, torna-se possível o uso das frequências alélicas obtidas no cálculo da probabilidade de paternidade e valor incriminante.

6.4.3. Equilíbrio de ligamento

Outra das condições necessárias que devem cumprir os marcadores genéticos para serem usados na resolução das perícias médico-legais, é que não estejam ligados entre si.

A aplicação do teste de não associação alélica entre os loci proposto por Risch e Devlin (1992) mostra que não existe tal associação, excepto para o par D1S80-F13A1 (Tabela 5.5.), tendo-se usado o programa Genepop para a sua realização. Este facto é provavelmente devido a que ambos os sistemas possuem um elevado número de alelos com baixas frequências, motivo pelo qual a prova de χ^2 , mediante a qual se estabelece a presença ou ausência de associação alélica, não é a adequada.

O uso da regra do produto, para combinar frequências genotípicas de loci analisados, não pode ser levado a efeito no caso de populações geneticamente subestruturadas ou loci ligados (Budowle, 1994; Hammond e col., 1994). Uma vez que a população em estudo, o Norte de Portugal, cumpre as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg e mostra ausência de ligamento entre os loci, é correcto o uso destes sistemas combinados na obtenção do cálculo de resultados das perícias médico-legais.

6.4.4. Comparações populacionais

As análises genético-populacionais proporcionam um meio de comparação entre diferentes populações para se poder inferir acerca das semelhanças ou diferenças existentes entre elas.

O locus **D1S80** mostra uma distribuição multimodal em todas as populações caucasianas estudadas (Fig.5.4., Fig.5.5. e Fig.5.6.), sendo os alelos mais frequentes o 18 e o 24. Os restantes alelos têm uma baixa frequência, sendo para as populações analisadas, inferior a 0.1. Não se verificaram diferenças significativas na distribuição dos alelos mais comuns nas populações caucasianas europeias. As maiores discrepâncias residem, particularmente, nos alelos menos frequentes. Todavia, essas diferenças devem ser assinaladas com certa precaução, já que nalguns estudos populacionais o número de indivíduos estudados foi de cerca de 100, o que é notoriamente insuficiente para este sistema, porque para além

desequilibradas. Assim, seria necessário analisar um grande número de indivíduos em cada população para se determinar se as diferenças encontradas nas frequências dos alelos menos comuns são específicas da população ou são devidas ao baixo número de indivíduos estudados (Alonso e col., 1993).

A distribuição das frequências dos alelos deste sistema na população do Norte de Portugal apresenta diferenças consideráveis com os negros e japoneses (Tabela 5.6.), porquanto a distribuição das frequências nos negros é mais homogênea, uma vez que é unimodal, com a moda para o alelo 24, embora este alelo não seja tão frequente como nos caucasianos.

Relativamente aos japoneses as diferenças também são significativas, pois a distribuição das frequências neste grupo é trimodal, sendo os alelos mais frequentes o 18, o 24 e 30. O facto da distribuição dos alelos neste sistema ser mais equilibrada faz com que para este locus o valor da heterozigocidade seja mais elevado. Por isso, o D1S80 nesta população é mais informativo na identificação genética do que nos caucasianos (Sugiyama e col., 1993; Nagai e col., 1994).

Segundo vários autores (Watterson e Guess, 1977; Nei e Chakraborty, 1976) é possível que o alelo mais antigo seja o mais frequente, ou seja, a elevada frequência dos alelos 18 e 24 nas diferentes populações estudadas pode indicar que estes sejam evolutivamente os mais antigos e os alelos com um tamanho próximo destes, pouco representados, terem surgido como resultado de mutações consecutivas (Deka e col., 1994).

A **3'ApoB** possui uma distribuição multimodal das frequências dos alelos em todas as populações caucasianas analisadas (Fig.5.7. e Fig.5.8.), sendo os alelos mais frequentes o 35 e o 37.

Em relação à distribuição dos outros alelos na população em estudo e nas regiões de Espanha há a registar algumas discrepâncias, designadamente, a baixa frequência do alelo 35 no País Basco e a frequência relativamente elevada do alelo 41 na mesma população. No que respeita à população da Galiza também há diferenças a assinalar, como sejam, a alta frequência do alelo 45, a baixa frequência do alelo 49 e a inexistência do alelo 51.

Quanto à comparação da referida distribuição entre a população do Norte de Portugal e a de outros países europeus, constatou-se que existe uma alta frequência do alelo 29 na população de França e baixa frequência do alelo 31 na mesma população. Em relação a Itália regista-se uma alta frequência do alelo 51 e ausência dos alelos 41 e 45.

A distribuição das frequências nos negros é também multimodal, embora seja mais homogênea do que na população caucasiana, havendo bastantes diferenças entre as duas raças (Tabela 5.6.). Os alelos mais frequentes são, de igual modo, o 35 e o 37, todavia, com frequências mais baixas.

Da população japonesa não possuímos dados deste sistema.

A **YNZ22**, à semelhança da 3'ApoB apresenta, também, em todas as populações caucasianas estudadas, uma distribuição multimodal (Fig. 5.9. e Fig.5.10.), sendo os alelos mais frequentes para a população em estudo e para as populações de Espanha estudadas o 4 e o 2, sendo para notar que a frequência do alelo 2 na Galiza é igual à do alelo 3, registando este último alelo, nos galegos, a maior frequência. Por outro lado, é de realçar a ausência do alelo 1 na nossa população e uma frequência relativamente elevada do alelo 10, comparativamente, não só com as populações de Espanha mas, também, com as de outros países europeus, nomeadamente, França, Alemanha e Polónia. O alelo 9 apresenta uma baixa frequência na nossa população em comparação com a de outras populações espanholas, no entanto, em relação aos outros países europeus mencionados, é similar, excepto a Alemanha que mostra um valor de frequência, para este alelo, semelhante ao das populações de Espanha. Para além disso, aquele país possui uma elevada frequência do alelo 12 e uma baixa frequência do alelo 11. É também de assinalar uma frequência relativamente elevada dos alelos 2 e 6 na população em estudo, e em França do alelo 1.

As diferenças nas citadas distribuições com a população negra não são significativas, ao contrário dos outros sistemas estudados, observando-se apenas uma frequência mais elevada dos alelos 5 e 7 e uma frequência mais baixa do alelo 10 em relação à população do Norte de Portugal (Tabela 5.6.).

Em relação à população japonesa não temos dados.

Da análise da distribuição das frequências dos alelos nos sistemas AMPFLP, entre os distintos grupos raciais, confirmou-se o que já tinha sido constatado por vários autores, isto é, que as diferenças entre os grupos raciais são consideravelmente maiores do que entre populações da mesma raça. Em relação às diferenças registadas nas populações caucasianas analisadas as variações existentes poderão ser devidas não só ao escasso número de indivíduos estudados para alguns sistemas, designadamente o D1S80, mas também às diferentes técnicas usadas na identificação dos alelos.

O locus **HUMVWA31A** exhibe uma distribuição unimodal das frequências dos alelos, com a máxima frequência para o alelo 17, nas três zonas do país e nas populações espanholas (Fig.5.11. e Fig.5.12.), excepto na Andaluzia em que a distribuição é bimodal, com as modas para os alelos 14 e 17, embora este último alelo seja mais frequente que o anterior. O mesmo tipo

de distribuição ocorre noutros países europeus (Fig.5.13.), sendo os alelos mais frequentes igualmente o 14 e o 17. Existem também algumas diferenças entre o Norte de Portugal e a Holanda, Suíça e Polónia, nos quais há uma menor frequência dos alelos 14 e 15 e uma maior frequência dos alelos 18 e 19, comparativamente com a nossa população. A Finlândia possui uma frequência mais elevada dos alelos 14 e 19 e uma menor frequência do alelo 15 em relação à nossa população.

Observa-se na população negra uma distribuição unimodal das frequências, todavia com a frequência mais elevada para o alelo 16, ao contrário da população caucasiana, registando ainda uma frequência menor do alelo 14 em relação à população em estudo e similar à da Holanda, Suíça e Polónia. A distribuição das frequências na população asiática é também bimodal, assemelhando-se a distribuição dos alelos mais frequentes à das populações europeias da Andaluzia e Finlândia.

A distribuição das frequências dos alelos do locus **HUMTH01** é bimodal para o Norte, Centro e Sul de Portugal, com as modas para os alelos 6 e 9.3, sendo as frequências de todos os outros alelos bastante similares (Fig.5.14.). O mesmo tipo de distribuição é o observado para as populações de Espanha e de outros países europeus (Fig.5.15. e Fig.5.16.), onde os alelos mais frequentes são também o 6 e o 9.3/10, embora existam algumas diferenças na distribuição das frequências destes alelos. Assim, em relação ao alelo 6, a Croácia e a Turquia exibem uma frequência notoriamente superior à da nossa população e, pelo contrário, a Suécia possui uma frequência bastante inferior. Por outro lado, a Turquia apresenta uma frequência do alelo 9.3/10 consideravelmente inferior à da população em estudo e a outras populações europeias.

A população negra mostra uma distribuição unimodal com a frequência máxima para o alelo 7.

Na população asiática a distribuição é bimodal, com as modas para os alelos 7 e 9, sendo o alelo 9 o que apresenta a máxima frequência.

Da análise das distribuições das frequências nos três grupos raciais deduz-se que estes não compartilham os mesmos alelos modais. Por outro lado, as referidas distribuições sugerem que durante a evolução a distribuição bimodal dos caucasianos teria origem a partir da distribuição unimodal dos negros, podendo ter ocorrido o mesmo com os asiáticos em que a frequência do alelo 7 foi diminuindo em favor do aumento da frequência do alelo 9 (Alonso e col., 1995).

A distribuição das frequências dos alelos no sistema **HUMF13A1** para as três zonas do nosso país é bimodal (Fig.5.17.), com as modas para os alelos

3.2 e 7, com frequências dos alelos muito semelhantes. No entanto, onde se registam maiores diferenças é na população do sul e especialmente para os alelos 5 e 9, em que a frequência é mais elevada para esta última população, ao contrário da frequência do alelo 7, que é mais baixa. Para se efectuar a comparação com as populações espanholas, procedeu-se à associação dos alelos de tamanho inferior a 4 unidades de repetição, por isso, a distribuição das frequências, neste caso, passou a ser unimodal (Fig.5.18.), com a moda para o alelo 7, apresentando todas as populações frequências alélicas muito semelhantes, sendo apenas de registar uma frequência superior do alelo 6 no País Basco relativamente às outras populações analisadas, sendo para notar que aquele alelo possui igual valor de frequência que o alelo 7 para esta população.

Relativamente aos outros países europeus e uma vez que não se associaram os alelos com menos de 4 unidades de repetição, a distribuição era bimodal (Fig.5.19.), à semelhança da distribuição obtida no nosso país, registando a Itália maiores diferenças em relação à nossa população, particularmente para os alelos 5 e 7, ou seja, aquela população tem uma frequência superior do alelo 5 e inferior do alelo 7.

Os outros dois grupos raciais estudados apresentam diferenças grandes com a população caucasiana (Tabela 5.6.), sendo feita a distinção nas populações analisadas entre o alelo 3.2 e 4. Assim, na raça negra a distribuição é multimodal, sendo os alelos mais frequentes o 3.2, 5 e 7, com o máximo valor para o alelo 5.

Observam-se também bastantes discrepâncias entre a população caucasiana e a asiática, todavia exibem o mesmo tipo de distribuição.

O locus **HUMFES/FPS** mostra uma distribuição das frequências dos alelos unimodal no Norte, Centro e Sul de Portugal (Fig.5.20.), sendo o alelo mais frequente o 11, com valores de frequências muito semelhantes para as três zonas do país.

O mesmo tipo de distribuição é o observado nas populações de Espanha (Fig.5.21.), sendo o alelo mais frequente também o 11. As diferenças mais notórias entre a população em estudo e estas populações são com a Catalunha, porquanto esta região mostra uma menor frequência dos alelos 10 e 12 em relação à nossa população e uma maior frequência do alelo modal. Relativamente às outras populações europeias a distribuição também é unimodal (Fig.5.22.), com a moda para o alelo 11. As principais diferenças recaem no alelo mais frequente e entre a população do Norte de Portugal e a Alemanha, Holanda e Áustria, pois nestes últimos países a frequência do alelo modal é bastante mais elevada.

À semelhança do observado na população caucasiana a distribuição das frequências dos alelos nos negros é também unimodal, sendo o alelo mais

frequente o 11 e não havendo grandes diferenças na frequência dos restantes alelos (Tabela 5.6.).

Sendo o alelo 11 o modal para os dois grupos raciais, caucasianos e negros, é provável que se trate do alelo mais antigo.

Quanto à população japonesa não possuímos resultados.

Da análise da distribuição das frequências dos alelos dos loci STR, concluímos que é bastante semelhante para as três zonas do país, sendo essa semelhança, em termos de valores de frequências, muito mais acentuada para o centro de Portugal. O sistema HUMFES/FPS é o que possui frequências mais parecidas. É de assinalar que a metodologia empregue para a identificação dos alelos, para estes sistemas, é similar para aquelas três zonas (geis desnaturantes e sequenciador automático de DNA), o que pode explicar, em parte, a semelhança dos resultados obtidos. Em relação às outras populações caucasianas analisadas e aos outros grupos raciais as diferenças são tão mais evidentes quanto mais afastadas do nosso país se encontram.

6.4.5. Estatísticos F

A análise da estrutura genética de populações interessa não só ao estudo dos aspectos evolutivos da humanidade, mas também a outros campos, nomeadamente à aplicação do estudo do DNA à resolução de perícias médico-legais, cujos resultados se têm manifestado bastante controversos, nos últimos anos (Chakraborty e Kidd, 1991; Lewontin e Hartl, 1991).

Foram efectuados diversos estudos dos F_{st} para vários polimorfismos do DNA codificante e não codificante em diferentes raças (Cavalli-Sforza e Piazza, 1993; Morton, 1992; Collins e Balazs, 1993; Weber e Wong, 1993; Budowle, 1995).

Nichols e Balding (1991) e Balding e Nichols (1994) defendem a utilização, na rotina, de valores relativamente altos de F_{st} (0.05). Pelo contrário, Morton (1992) sugere que os loci usados em casos forenses devem ter em todas as populações F_{st} menores do que 0.01 e Brookfield (1991) considera também 0.05 um valor bastante elevado, propondo valores entre 0.01-0.02.

No presente estudo os valores de F_{st} obtidos, segundo as fórmulas utilizadas por Crow e Denniston, em 1993, baseados nos estudos de Malécot, Cotterman, Maruyama e Nei, para as três situações analisadas na população caucasiana e descritas na Tabela 5.7. são, na maioria dos casos, inferiores a 0.005, o que revela a inexistência de subestruturação. O valor conjunto para os 7 loci estudados é de 0.003, que é igual ao obtido por Gill e Evett (1995), para loci STR. Budowle obteve, no mesmo ano, valores similares, analisando o locus HLA DQ α e Polymarker, em vários grupos raciais.

Não é necessário o uso dos F_{st} , quando não existam indícios de subestruturação na população a partir da qual vão ser realizadas as perícias médico-legais, ou seja, sempre que aquela não se afaste das condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os loci estudados. Neste caso, é correcto o uso directo da regra do produto.

6.4.6. Distâncias genéticas

Observou-se que as distribuições de frequências intra-raciais são similares locus a locus e variam bastante mais entre grupos raciais. Para analisar conjuntamente os loci estudados usou-se a distância de Reynolds aplicada, respectivamente: **6** populações europeias, para os 3 sistemas AMPFLP e os 4 loci STR; **10** populações europeias para os 4 loci STR e o D1S80 e **13** populações europeias, apenas para os 4 loci STR. Utilizou-se a distância genética de Reynolds, porque se baseia nos valores de F_{st} relacionados com as subdivisões das populações.

Os resultados genéricos obtidos para as três situações (Fig.5.23.-Fig.5.25.) atrás referidas indicam que as distâncias genéticas entre as populações do Norte e Centro de Portugal são as que registam os valores mínimos, sendo esses valores também baixos relativamente à população da Galiza e ao Centro de Espanha. As distâncias são maiores comparando a população em estudo com o Sul do país, que se aproxima da população de Itália, o que é lógico dada a proximidade geográfica entre as duas populações. Relativamente a Espanha e a outros países europeus, essa distância é maior para a população da Catalunha, França, Alemanha e Holanda.

6.5. Aplicações médico-legais

Há dois parâmetros estatísticos com interesse relevante em Medicina Legal: a probabilidade de exclusão a priori (casos de filiação) e o poder ou probabilidade de discriminação (casos de criminalística biológica).

Constatou-se que dos **AMPFLPs** estudados, o sistema que apresenta maiores valores para aqueles parâmetros foi a YNZ22, seguida do D1S80 e 3'ApoB. Resultados idênticos foram obtidos noutras populações: Münster (Rand S. e col., 1992); Barcelona (Huguet e col., 1993); Itália (Tagliabracci e col., 1993); Galiza (Pestoni e col., 1995). Para os loci **STR** os valores daqueles parâmetros distribuem-se, por ordem decrescente, da seguinte forma: VWA, TH01, F13A1 e FES. Conclusões idênticas foram registadas noutras populações: Inglaterra (Kimpton e col., 1993); Noruega (Dupuy e col., 1993); Áustria (Ambach e col., 1995); França (Rousselet e col., 1995); Galiza (Pestoni e col., 1995); Holanda (Sjerps e col., 1995); Suíça (Coquoz e col., 1995).

Não obstante, como ficou anteriormente demonstrado, se verificar a existência de grandes semelhanças genéticas relativamente a todos os loci estudados entre populações europeias é importante que cada laboratório, que realiza perícias médico-legais, efectue os seus próprios estudos. Uma das razões que se nos afigura de grande importância para a realização dos referidos estudos populacionais é a aquisição de experiência, manifestamente importante para bem servir a Justiça.

7. CONCLUSÕES

1ª - O estudo dos sistemas AMPFLP revelou ser de grande interesse na resolução dos casos de filiação, apresentando, no entanto, certas limitações no âmbito da criminalística biológica. Pelo contrário, os loci STR estudados demonstraram ser eficazes na conclusão de ambos os tipos de perícias médico-legais. Por isso, constituem uma boa alternativa relativamente aos marcadores genéticos convencionais.

2ª - O uso do Chelex para a extracção do DNA proporcionou, na maioria dos casos, bons resultados em amostras de natureza diversa, tendo-se obtido, na generalidade das perícias, resultados conclusivos.

3ª - A amplificação simultânea de vários loci, usada neste estudo para os STRs, demonstrou ser vantajosa relativamente à usada para os AMPFLPs, porquanto representa uma economia de tempo dispendido quer na amplificação quer na tipagem.

4ª - Das metodologias empregues para a electroforese dos produtos amplificados, ou seja, geis de poliacrilamida-nitrato de prata, geis de agarose-brometo de etídio, geis desnaturantes de poliacrilamida-sequenciador automático, a última mostrou ser a mais segura na identificação dos alelos. Foi feita a determinação da precisão das análises efectuadas no sequenciador usado neste estudo (ALF) que foi, na maioria dos casos, superior a 99.95%. Este método de estudo dos polimorfismos de DNA demonstrou proporcionar outras vantagens relativamente às técnicas tradicionais, nomeadamente rapidez e possibilidade de reutilização dos geis sem prejuízo da qualidade dos resultados obtidos; automatização da análise dos resultados e alta resolução, sendo possível distinguir diferenças apenas num nucleótido.

5ª - Parece correcto o uso da regra do produto das frequências genotípicas dos sistemas em estudo, quando estes são utilizados em conjunto na resolução dos casos médico-legais, porquanto todos eles se ajustam às condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg, para além de não existir entre eles associação alélica e de não revelarem sinais de subestruturação.

6ª - As distribuições das frequências dos AMPFLP e STRs revelaram ser semelhantes nas três zonas do país, sendo, todavia, mais próximas as do Norte e Centro de Portugal o que, provavelmente, se deve à proximidade geográfica das duas regiões. Por outro lado, o estudo das distâncias genéticas permitiu também deduzir que as mínimas distâncias correspondiam àquelas duas populações. As mesmas distribuições não

mostraram discrepâncias entre a população em estudo e outras populações caucasianas europeias, sendo para notar que, pelo contrário, se observaram diferenças notórias com a população negra e japonesa. Assim, verificou-se que as diferenças intra-raciais são muito menos acentuadas do que as inter-raciais.

7ª - Os sete sistemas estudados proporcionam elevados valores de heterozigocidade, não se tendo registado a existência de diferenças significativas entre as heterozigocidades observadas e esperadas.

8ª - Os sistemas AMPFLP e os loci STR demonstraram possuir especial relevância em Medicina Legal, porquanto são susceptíveis de ser analisados mesmo em vestígios biológicos com quantidades exíguas de DNA degradado tendo, no entanto, os últimos sistemas proporcionado melhores resultados. No que concerne aos casos de filiação os polimorfismos estudados mostraram ser úteis, não obstante o D1S80 e os 4 loci STR serem sistemas mais fáceis de amplificar e caracterizar, permitindo a obtenção de melhores resultados. É para notar que não se detectaram mutações nos 741 pares mãe/filho analisados.

9ª - Dada a importância dos STRs em Medicina Legal, como perspectiva futura, seria de grande interesse o estudo de mais polimorfismos deste tipo na população do Norte de Portugal. Por isso, procedeu-se ao estudo populacional de outros STRs, designadamente os tetranucleotídicos D12S391 (Lareu e col., 1995), TPOX, CSF1PO, F13B e LPL (Promega) e o pentanucleotídico CD4 (Edwards, 1991b).

O uso de sistemas que exibem um alto grau de polimorfismo, devido à ocorrência de alelos intercalares, como seja, o D18S51 e Fibra, são de grande interesse nesta área, pelo que está em conclusão o estudo populacional destes dois sistemas, bem como de mais três STRs não complexos, o D3S1358, o D8S1179 e o D19S253.

8. BIBLIOGRAFIA

- Alford R.L., Hammond H.A., Coto I., Caskey C.T.** (1994). Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, 55: 190-195
- Alonso A., Martin P., Albarrán C., Sancho M.** (1993). Amplified fragment length polymorphism analysis of the VNTR locus D1S80 in central Spain. *Int. J. Leg. Med.*, 105: 311-314
- Alonso S.** (1995). Regiones hipervariables del genoma humano. Aplicación al Diagnóstico de la Paternidad Biológica. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco
- Alonso S., Castro A., Fernández I., Gómez de Cédron M., García-Orad A., Meyer E., Martínez de Pancorbo M.** (1995). Population study of three STR loci in the Basque Country (Northern Spain). *Int. J. Med.*, 107: 239-245
- Ambach E., Parson W., Niederstätter H., Budowle B.** (1995). *Advances in Forensic Haemogenetics*, 6: 483-485
- Andersen L., Juhl M., Solheim T., Bornman H.** (1995). Odontological identification of fire victims-potentialities and limitations. *Int. J. Med.*, 107: 229-234
- Andersen J.F., Greenhalgh M.J., Butler H.R., Kilpatrick S.R., Piercy R.C., Way K.A., Myhill H.S., Wright J.C., Hallett R., Parkin B.H.** (1996). Further validation of a multiplex STR system for use in routine forensic identity testing. *Forensic Science International*, 78: 47-64
- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young I.G.** (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457-465
- Aquadro C.F., Greenberg B.D.** (1983). Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103: 287-312
- Baird M., Balazs I., Giusti A., Miyazaki L., Nicholas L., Wexler K., Kanter E., Glassberg J., Allen F., Rubinstein P., Sussman L.** (1986). Allele frequency distribution of two highly polymorphic DNA sequences

in three ethnic groups and its applications to the determination of paternity. *Am. J. Hum. Genet.*, 39: 489-501

Balazs I., Baird M., Clyne M., Meade E. (1989). Human population genetic studies of five hypervariable DNA loci. *Am. J. Hum. Genet.*, 4: 182-190

Balding D.J., Nichols R.A. (1994). DNA profile match probability calculation: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands. *Forensic Science International.*, 64: 125-140

Bell G.I., Selby M.J., Rutter W.J. (1982). The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*, 295: 31-35

Binder K., Heermann D.W. (1988). Monte Carlo Methods in Statistical Physics. Berlin: Springer-Verlag

Black W.C., Krafur E.S. (1985). A fortran program for the calculation of two linkage disequilibrium coefficients. *Theor. Appl. Genet.*, 70: 491-496

Boerwinkle E., Xiong W., Fourest E., Chan L. (1989). Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: Application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 212-216

Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314-331

Brinkmann B., Wiegand P. (1993). Medicolegal implications of PCR based VNTRs. Fourth International Symposium on Human Identification 1993. Promega Corporation, 149-160

Brook J.D., McCurrach M.E., Harley H.G., Buckler A.J., Church D., Aburatani H. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 68: 799-808

Brookfield J. (1991). The effect of population subdivision on estimates of the likelihood rates using single locus DNA probes. *Heredity*, 69: 97-100

Budowle B., Allen R.C. (1987). Electrophoresis reliability: I. The contaminant issue. *J. Forensic Sci.*, 32: 1537-1550

Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg J., Allen R.C. (1990). Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Genet.*, 48: 137-144

Budowle B., Giusti A.M., Wayne J.S., Baechtel F.S., Fournery R.M., Adams D.E., Presley L.A., Deadman H.A., Monson K.L. (1991). Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci, for use in forensic comparisons. *Am. J. Hum. Genet.*, 48: 841-855

Budowle B., Monson K.L. (1994). Greater differences in forensic DNA profile frequencies estimated from racial groups than from ethnic subgroups. *Clin. Chim. Acta*, 228: 3-18

Budowle B., Baechtel S., Smerick J.B., Presley K.M., Giusti A.M., Parsons G., Alevy M.C., Chakraborty R. (1995). D1S80 population data in Africans americans, caucasians, Southeastern hispanics, and orientals. *J. Forensic Sci.*, 40: 38-44

Calvin H.I., Bedford J.M. (1971). Formation of disulphide bonds in the nucleous and accessory strutures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 13: 65-75

Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325: 31-36

Capon F., Novelli G., Dallapiccola B. (1994). Application of the capillary DNA chromatography in the paternity testing using ApoB amplified alleles. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 5: 136-138

Carracedo A. (1981). Sociología y psicología jurídicas (1981). *Anuario*: 133-143

Carracedo A., Montiel M.D. (1988). Protocolos de investigación biológica de la paternidad. Huguet E., Carracedo A., Gené M. Introducción a la investigación biológica de la paternidad. *PPU*. Barcelona. Cáp. 13.

Carracedo A., Barros F. (1996). Problemas bioestadísticos en genética forense

Castro A., (1996). Evaluación de los polimorfismos de loci minisatélite y microsatélite en la identificación genética humana. Tesis doctoral.

Cavalli-Sforza L.L., Piazza A. (1993). Human genomic diversity in Europe: a summary of recent research and prospects for the future. *Eur. J. Hum Gen.*, 1: 3-18

Cavalli-Sforza L.L., Menozzi P., Piazza A. (1994). The history and geography of human genes. *Princeton, N.J.: Princeton University Press*

Chakraborty R. (1991). Statistical interpretation of DNA typing data. *Am. J. Hum. Genet.*, 49: 895-897

Chakraborty R., Daiger S. (1991). Polymorphisms at VNTR loci suggest homogeneity of the white population of Utah. *Hum. Biol.*, 63: 571-587

Chakraborty R., Kidd K.K. (1991). The Utility of DNA Typing in Forensic Work. *Science*, 254: 1735-1739

Chakraborty R., Fornage M., Gueguen R., Boerwinkle E. (1991). Population genetics of hypervariable loci: analysis of PCR based VNTR polymorphism within a population. *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*. Burke T., Dolf G., Jeffreys A.J., Wolff R. (Eds.). Birhäuser, Switzerland. 127-143

Coquoz R. (1995). Evaluation of new STR loci for forensic DNA typing. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 6: 171-173

Comey C.T., Budowle B.(1991). Validation studies on the analysis of the HLA DQ α locus using the polymerase chain reaction. *J. Forensic Sci.*, 36: 1633-1648

Dallas J.F. (1988). Detection of DNA "fingerprints" of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6831-6835

Decorte R., Cuppens H., Marynen P., Cassiman J.J. (1990). Rapid detection of hypervariable regions by the polymerase chain reaction technique. *DNA and Cell Biology*, 9: 461-469

Decorte R. (1994). Application of the polymerase chain reaction to forensic DNA analysis in Belgium. Doctoral thesis. Leuven University.

- Deka R., Chakraborty R., Ferrell R.E.** (1991). A population genetic study of six VNTR loci in three ethnically defined populations. *Genomics*, 11: 83-92
- Deka R., De Croo S., Jin L., McGarvey S.T., Rothhammer F., Ferrell R.E., Chakraborty R.** (1994). Population genetics characteristics of the D1S80 locus in seven human populations. *Hum. Genet.*, 252-258
- Denault G.C., Takimoto H.H., Kwan Q.Y., Pallos A.** (1980). Detectability of selected genetic markers in dried blood on aging. *J. Forensic Sci.*, 25: 479-498
- Devlin B., Risch N., Roeder K.** (1991). Estimation of allele frequencies for VNTR loci. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 662-676
- DNA Commission of the ISFH** (1993). DNA recommendations-statement by the DNA Commission of the ISFH concerning the National Academy of Science Report on DNA technology in Forensic Science in USA. *Int. J. Leg. Med.* 105: 361
- DNA Recommendations-1994.** Report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems. *Forensic Sci. Int.* 69: 103-104
- Dodd B.E.** (1985). DNA fingerprint in matters of family and crime. *Nature*, 318: 506-507
- Dupuy B.M., Berg E.S., Olaisen B.** (1993). Four STRs in 300 Norwegians. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 5: 539-541
- Economou E.P., Bergen A.W., Warren A.C., Antonarakis S.E.** (1990). The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive elements is polymorphic in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6465-6469
- Edwards A., Clivitelo A., Hammond H.A., Caskey C.T.** (1991a). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, 49: 746-756
- Edwards M.C., Clemens P.R., Tristan M., Pizzuti A., Gibbs R.A.** (1991b). Pentanucleotide repeat length polymorphisms at the human CD4 locus. *Nucleic Acids Res.*, 19: 47-91

Edwards A., Hammond H.A., Jin L., Caskey T., Chakraborty R. (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 12: 241-253

Fitch W. M. e Margoliash M. (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science*, 155: 279-284

Frégeau C.J., Fourney R.M. (1993). DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. *BioTechniques*, 15: 100-119

Geisser S., Johnson W. (1992). Testing Hardy-Weinberg equilibrium on allelic data from VNTR loci. *Am. J. Hum. Genet.*, 51: 1084-1088

Gené M., Huguet E., Mezquita J. (1991). Polimorfismo del DNA en la investigación biológica de la paternidad. Estado actual. *Med. Clin. (Barc.)*, 97: 110-114

Georges M., Lequarré A.S., Castelli M., Hanset R., Vassart G. (1988). DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 47: 127-131

Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6715-6719

Gill P., Jeffreys A.J., Werret D.J. (1985). Forensic application of DNA "fingerprints". *Nature*, 318: 577-579

Gill P., Sullivan K., Werret D.J. (1990). The analysis of hypervariable DNA profiles: problems associated with the objective determination of the probability of a match. *Hum. Genet.*, 85: 75-79

Gill P., Ivanov P.L., Kimpton C., Piercy R., Benson N., Tully G., Evett I., Hagelberg E., Sullivan K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics*, 6: 130-135

Giusti A., Baird M., Pasquale S., Balazs I., Glassberg J. (1986). Application of deoxyribonucleic acid (DNA) polymorphisms to the analysis of DNA recovered from sperm. *J. Forensic Sci.*, 31: 409-417

Grupo Espanol de la ISFH (1993). Utilización de material genético en la criminalística y pruebas de paternidad. Aspectos éticos, técnicos y legales. *Pharmagen*. Madrid

- Guo S.W., Thompson E.A.** (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372
- Gyllensten U.B., Erlich H.A.** (1988). Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7652-7656
- Hagelberg E., Clegg J.B.** (1991). Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 244: 45-50
- Hammond H.A., Jin L., Zhong Y., Caskey C.T., Chakraborty R.** (1994). Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am. J. Hum. Genet.*, 55: 175-189
- Hazan J., Dubay C., Pankowiak M.P., Becuwe N., Weissenbach J.** (1992). A genetic linkage map of human chromosome 20 composed entirely of microsatellite markers. *Genomics*, 12: 183-189
- Higuchi R., von Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., Erlich H.A.** (1988). DNA typing from single hairs. *Nature*, 332: 543-546
- Higuchi R., Blake E.T.** (1989). Application of the polymerase chain reaction in forensic science. *Banbury Report 32: DNA Technology and Forensic Science*, Ballantyne J., Sensabaugh G., Wikowski J. (Eds.), 265-281
- Holland M.M., Fisher D.L., Mitchell L.G., Rodriguez W.C., Canik J.J., Merril C.R., Weedn V.W.** (1993). Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: Identification of remains from the Vietnam war. *J. Forensic Sci.*, 38: 542-553
- Holland M.M., Turni L.A., Rio S. del, Marino M., Lofts R.S., Fisher D.L., Ross J., Shumm J.W., Williams P.L.** (1994). Typing human DNA using capillary electrophoresis: comparison of slab gel and capillary formats. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 5: 156-163
- Hopgood R., Sullivan K.M., Gill P.** (1992). Strategies for automated sequencing of human mitochondrial DNA directly from PCR products. *BioTechniques*, 13: 82-92
- Horn G.T., Richards B., Klinger K.W.** (1989). Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, 17: 2140

Huguet E., Gené M., Medallo J., Sánchez García C., Corbella J., Mezquita J. (1993). PCR polymorphisms compared to others genetic markers in the paternity testing. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 5: 214-215

Hutchison III C.A., Newbold J.E., Potter S.S., Edgell M.H. (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251: 536-538

Impraim C.C., Saiki R.K., Erlich H.A., Teplitz R.L. (1987). Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem. Biophys Res. Commun*, 142: 710-716

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985a). Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985b). Individual-specific "fingerprint" of human DNA. *Nature*, 316: 76-79

Jeffreys A.J., Morton D.B. (1987). DNA fingerprint of dogs and cats. *Anim. Genet.*, 18: 1-15

Jeffreys A.J., Royle N.J., Wilson V., Wong Z. (1988). Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature*, 332: 278-281

Jeffreys A.J., Neumann R., Wilson V. (1990). Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell*, 60: 473-485

Jeffreys A.J., MacLeod A., Tamaki K., Neil D.L., Monckton D.G. (1991). Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*, 354: 204-209

Jeffreys A.J., Allen M.J., Hagelberg E., Sonnberg A. (1992). Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci. Int.*, 56: 65-76

Jeffreys A.J., Tamaki K., MacLeod A., Monckton D.G., Neil D.L., Armour J.A.L. (1994). Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nat. Genet.*, 6: 136-145

- Jung J.M., Comey C.T., Baer D.B., Budowle B.** (1991). Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA DQ α gene. *Int. J. Leg. Med.*, 104: 145-148
- Kasai K., Nakamura Y., White R.** (1990). Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *J. Forensic Sci.*, 35: 1196-1200
- Kimpton C., Walton A., Gill P.** (1992). A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum. Molec. Genet.*, 1: 287
- Kimpton C.P., Gill P., Walton A., Urquhart A., Millican E.S., Adams M.** (1993). Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods and Applications*, 3: 13-22
- Kimpton C., Fisher D., Watson S., Adams M., Urquhart A., Lygo J., Gill P.** (1994). Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int J Leg Med*, 106: 302-311
- King M.C.** (1991). An application of DNA sequencing to a human rights problem. *Molecular genetic medicine, vol.1*, 117-131
- Kwok S., Higuchi R.** (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339(18): 237-238
- Lander E.S.** (1989). DNA fingerprinting on trial. *Nature*, 339: 501-505
- Lareu M.V., Phillips C.P., Carracedo A., Lincoln P.J., Syndercombe D., Thomson J.A.** (1994). Investigation of the STR locus HUMTH01 using PCR and two electrophoresis formats: UK and Galician Caucasian population surveys and usefulness in paternity investigations. *Forensic Sci. Int.*, 66: 41-52
- Lareu M.V., Barros F., Salas A., Pestoni C., Munoz I., Rodriguez-Calvo M.S., Carracedo A.** (1995). D12S391: A highly useful STR for forensic purposes. *Advances in Forensic Haemogenetics* 6: 69-71
- Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D.H.** (1989). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.*, 264: 6427-6437

Lewontin R.C., Hartl D.L. (1991). Population genetics in forensic DNA typing. *Science*, 254: 1745-1750

Li C.C. (1976). First course in population genetics. *Boxwood, Pacific Grove, C.A.*

Li H., Gyllensten U.B., Cui X., Saiki R.K., Erlich H.A., Arnheim N. (1988). Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature*, 335: 414-417

Litt M., Luty J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44: 397-401

Lygo J.E., Johnson P.E., Holdaway D.J., Wooddroffe S., Whitaker J.P., Clayton T.M., Kimpton C.P., Gill P. (1994). The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int. J. Leg. Med.*, 107: 77-89

Maskos U., Southern E.M. (1993). A novel method for parallel analysis of multiple mutations in multiple samples. *Nucleic Acids Res.*, 21: 2269-2270

Mc Nally L., Shaler R., Baird M., Balazs I., -Kobilinski L., De Forest P. (1989). The effects of the environment and substrates on DNA: the use of casework samples from New York city. *J. Forensic Sci.*, 34: 1070-1077

McNally L., Baird M., McElfresh K., Eisenberg A., Balazs I. (1990). Increased migration rate observed in DNA from evidentiary material precludes the use of sample mixing to resolve forensic cases of identity. *Appl. Theor. Electrophoresis*, 1: 267-272

Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.H., Teller E. (1953). Equations of state calculations by fast computing machines. *Journal of Chemical Physics*, 21: 1087-1092

Möller A., Wiegand P., Seuchter S.A., Bauer M.P., Brinkmann B. (1993). Population data and forensic deficiency values for the STR systems HumVWA, HumMBP and HumFABP. *Int. J. Leg. Med.*, 106: 183-189

Möller A., Brinkmann B. (1994). Locus ACTBP2 (SE33) Sequencing data reveal considerable polymorphism. *Int. J. Med.*, 106: 262-267

Monckton D.G., Jeffreys A.J. (1994). Minisatellite isoalleles can be distinguished by single-stranded conformational polymorphism analysis in agarose gels. *Nucleic Acids Res.*, 22: 2155-2157

Monson K.L., Budowle B. (1993). VNTR population frequency estimation for forensics: effect of reference population and calculation method. *J. Forensic Sci.*, 38: 1037-1050

Morton N.E. (1992). Genetic structure of forensic populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 2556-2560

Morton N.E., Collins A., Balazs I. (1993). Kinship bioassay on hypervariable loci in Blacks and Caucasians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 1892-1896

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263-273

Nagai A., Yamada S., Bunai Y., Ohya I. (1994). Analysis of the VNTR locus D1S80 in a Japanese population. *Int. J. Legal Med.*, 106 (5): 268-270

Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolf R., Holm T., Culver M. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235: 1616-1622

Nei M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 106: 283-292

Nei M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.*, 41: 225-233

Nei M., Chakraborty R. (1976). Electrophoretically silent alleles in a finite population. *J. Mol. Evol.*, 8: 381-385

Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590

Nichols R.A., Balding D.J. (1991). Effects of population structure on DNA fingerprinting analysis in forensic science. *Heredity*, 66: 297-302

Nickerson D.A., Kaiser R., Lappin S., Stewart J., Hood L., Landergren U. (1990). Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8923-8927

Novick G.E., Menendez C.M., Novick C.C., Duncan G., Yunis J., Yunis E., Deininger P.L., Batzer M.A., Herrera R.J.(1994). The use of polymorphic Alu insertions as a new methodological alternative in human paternity testing and child identification. *International Pediatrics*, 9: 60-68

Odelberg S.J., Plaetke R., Eldridge J.R., Ballard L., O'Connell P., Nakamura Y., Leppert M., Lalouel J.M., White P. (1989). Characterization of eight VNTR loci agarose gel electrophoresis. *Genomics*, 5: 915-924

Oliveira G. (1979). Estabelecimento da filiação.

Ohno Y., Sebetan I.M., Akaishi S. (1982). A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles. *Forensic Sci. Int.*, 19: 93-98

Ohta T. (1982). Linkage disequilibrium due to random genetic drift in finite subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 1940-1944

Orrego C., King M.C. (1990). Determination of familial relationships PCR protocols. A guide to methods and applications., Innis. G.D. Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.). *Academic Press, London*: 416-426

Pääbo S. (1985). Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314: 644-645

Pääbo S., Gifford J.A., Wilson A.C. (1988). Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res.*, 16: 9775-9787

Pääbo S. (1989). Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1939-1943

People v. Castro, 144 Misc. 2d 956, 545 N.Y.S. 2d 965 (Bronx County Sup. Ct. 1989)

Pestoni C., García-Rivero A., Bellas S., Lareu M.V., Rodríguez-Calvo M.S., Barros F., Munoz I., Carracedo A. (1995). Allele frequency distribution of 15 PCR-based DNA polymorphisms in the population of Galicia (NW Spain). *Advances in Forensic Haemogenetics*, 6: 595-597

Pestoni C., Lareu M.V., Rodríguez M.S., Munoz I., Barros F., Carracedo A. (1995). The use of the STRs HUMTH01, HUMVWA31A, HUMF13A1, HUMFES/FPS in forensic application:

validation studies and population data for Galicia (NW Spain). *Int. J. Legal Med.*, 107: 283-290

Pinheiro M.F., Pontes L., Huguet E., Gené M., Pinto da Costa J., Moreno P. (1996). Study of three AMPFLPs (D1S80, 3'ApoB and YNZ22) in the population of the North of Portugal. *Forensic Science International*, 79: 23-29

Pinheiro M.F., Pontes L., Gené M., Huguet E., Pinto da Costa J., Moreno P. (1997). Population study of the HUMTH01, HUMVWA31A, HUMF13A1 and HUMFES/FPS STR polymorphisms in the North of Portugal. *Journal of Forensic Sciences*, 42: 121-124

Polymeropoulos M.H., Xiao H., Rath D.S., Merrill C.R. (1991a). Tetranucleotide repeat polymorphism at the tyrosine hidrolase gene (TH). *Nucleic Acids Res.*, 19: 3753

Polymeropoulos M.H., Rath D.S., Xiao H., Merrill C.R. (1991b). Tetranucleotide repeat polymorphism at the c-fes/fps proto-oncogen (FES). *Nucleic Acids Res.*, 19: 4018

Polymeropoulos M.H., Rath D.S., Wiao H., Merrill C.R. (1991c). Tetranucleotide repeat polymorphism at the human coagulation factor XIII A subunit gene (F13A1). *Nucleic Acids Res.*, 19: 4036

Porcher C., Malinge M.C., Picat C., Grandchamp B. (1992). A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer. *BioTechniques*, 13: 106-114

Prinz M., Berghaus G. (1990). The effect of various stain carriers on the quality and quantity of DNA extracted from dried blood stains. *Z-Rechtsmed.*, 103: 191-197

Rand S., Puers C., Skowasch K., Wiegand P., Budowle B., Brinkmann B. (1992). Population genetics and forensic efficiency data of 4 AMPFLP's. *Int. J. Legal Med.*, 104: 329-333

Reynolds J., Weir B.S., Cockerham C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779

Reynolds R., Sensabaugh G. (1991). Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polymerase chain reaction. *Anal. Chem.*, 63: 2-15

Richards R.L., Sutherland G.R. (1992). Fragile X syndrome: the molecular picture comes into focus. *Trends Genet.*, 8: 249-255

Riggins G.J., Lokey L.K., Chastain J.L., Leiner H.A., Sherman S.L., Wilkinson K.D., Warren S.T. (1992). Human genes containing polymorphic trinucleotide repeats. *Nat. Genet.*, 2: 186-191

Risch N.J., Devlin B. (1992). On the probability of matching DNA fingerprints. *Science*, 255: 717-720

Rousselet F., Pfitzinger H., Mangin P. (1995). Multiplex amplification and automated fluorescent typing of short tandem repeat (STR) loci: The French experience. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 6: 139-141

Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1986). Analysis of enzymatically amplified b-globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324: 163-166

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491

Saiki R.K., Walsh P.S., Levenson C.H., Erlich H.A. (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86: 6230-6234

Sajantila A., Budowle B. (1991). Identification of individuals with DNA testing. *Ann. Medicine*, 23: 637-642

Sajantila A., Budowle B., Strom M., Johnson V., Lukka M., Peltonen L., Ehnholm C. (1992). PCR amplification of alleles at the D1S80 locus: comparison of a finnish and north american caucasian population sample, and forensic casework evaluation. *Am. J. Hum. Genet.*, 50: 816-825

Sajantila A., Pacek P., Lukka M., Syvanen A.C., Nokelainen P., Sistonen P., Peltonen L., Budowle B. (1994). A microsatellite polymorphism in the von Willebrand Factor gene: comparison of the allele

frequencies in different population samples and evaluation for forensic medicine. *Forensic Sci., Int.*, 68: 91-102

Schwartz L.S., Tarleton J., Popovich B., Seltzer W.K., Hoffman E.P. (1992). Fluorescent multiplex linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, 51: 721-729

Singer-Sam J., Tanguay R.L. e Riggs A.D. (1989). Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications*, 3: 11

Sjerps M., Geest N., Pieron C., Gajadhar M., Kloosterman A. (1995). A Dutch population study of the STR loci HUMTH01, HUMFES/FPS, HUMVWA31/1 and HUMF13A1, conducted for forensic purposes. *Int j Med*, 108:127-134

Smith J.C., Newton C.R., Alves A., Anwar R., Jenner D., Markham A.F. (1990). Highly polymorphic minisatellite DNA probes. Further evaluation for individual identification and paternity testing. *J. Forensic Sci.*, 30: 3-18

Sokal R.R., Rohlf F.J. (1979). *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica.* H. Blume Ediciones. Madrid

Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503

Southern E.M., Maskos U., Elder J.K. (1992). Analysis of nucleic acids sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics*, 20: 1675-1678

Sugiyama E., Honda K., Katsuyama Y., Uchiyama S., Tsuchikane A., Ota M., Fukushima H. (1993). Allele frequency distribution of D1S80 (pMCT118) locus polymorphism in the Japanese. *Int. J. Med.*, 106(3): 111-114

Sullivan K.M., Pope S., Gill P., Robertson J.M. (1992). Automated DNA profiling by fluorescent labelling of PCR products. *PCR Methods Applic.*, 2: 34-40

Suzuki K., Ito S., Matsui K., Fujita K., Miyazaki T., Matsumoto H., Mizoi Y. (1994). DNA typing of coagulation factor XIII "a" subunit by PCR-RFLP and SSCP. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 5: 173-175

Syvänen A.C., Sajantila A., Lukka M. (1993). Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. *Am. J. Hum. Genet.*, 52: 46-59

Swofford D.L. (1989). A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Illinois, USA.

Tagliabracci A., Buscemi L., Cucurachi N., Giorgetti R., Ferrara S.D. (1993). Suitability and efficiency of PCR systems in Forensic. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 5: 387-389

Uchihi R., Tamaki K., Kojima T., Toshimichi Y., Katsumata Y. (1992). DNA typing of Human Leukocyte Antigen (HLA)- DQA1 from single hairs in Japanese. *Journal of Forensic Sciences*, 37(3): 853-859

Ulrich A., Dull T.J., Gray A., Philips J.A. III, Peter S. (1982). Variation in the sequence and modification state of the human insulin gene flanking regions. *Nucleic Acids Res.*, 10: 2225-2240

Urquhart A., Kimpton C.P., Gill P. (1993). Sequence variability of the tetranucleotide repeat of the human b-actin related pseudogene H-beta-Acpsi-2 (ACTBP2) locus. *Hum. Genet.*, 92: 637-638

Urquhart A., Kimpton C.P., Downws T.J., Gill P. (1994). Variation of short tandem repeat sequences -a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Nucleic Acids Res.*, 107: 13-20

Villanueva Canadas E. (1979). *Medicina Legal y Toxicologia-Gisbert Calabuig 3ª Edição; Cáp. 57: 635-664*

Walsh D.J., Corey A.C., Cotton R.W., Forman L., Herrin G.L., Word C.J., Garner D.D. (1992). Isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva. *J. Forensic Sci.*, 37: 387-395

Watson S.M., Ban J.D., Duncan G.T., Noppinger K.E., Saxner D.J. (1992). Restriction fragment length polymorphism analysis of zoo animals using Hae III and four single-locus probes. *Appl. Theoret. Electrophoresis*, 3: 109-114

Watterson G.A., Guess H.A. (1977). Is the most frequent allele the oldest? *Theor. Popul. Biol.*, 11: 141-160

- Weber J.L., May P.E.** (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, 44: 388-396
- Weber J.L., Wong C.** (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genetics*, 2: 1123-1128
- Weir B.S.** (1992). Population genetics in the forensic DNA debate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 11654-11659
- Wiegand P., Lorente J., Brinkmann B.** 1991). DNA investigations on fetal material from paternity cases. *Int. Leg. Med.*, 104: 277-280
- Wiener A.S., Socha W.W.** (1976). Methods available for solving medicolegal problems of disputed parentage. *J. Forensic Sci.*, 21: 42-64
- Wiegand P., Bajanowski T., Brinkmann B.** (1993a). DNA typing of debris from fingernails. *Int. J. Med.*, 106: 81-83
- Wiegand P., Budowle B., Rand S., Brinkmann B.** (1993b). Forensic validation of the STR systems SE 33 and TC 11. *Int. J. Med.*, 105: 315-320
- Wolff R., Nakamura Y., Odelberg S., Shiang R., White R.** (1991). Generation of variability at VNTR loci in human DNA. *DNA Fingerprinting: approaches and applications*, Burke T., Dolf G., Jeffreys A.J., Wolff R. (Eds.). Birkhäuser Switzerland. 20-38
- Wong Z., Wilson V., Jeffreys A.J., Thein S.L.** (1986). Cloning a selected fragment from a human DNA fingerprint: isolation of an extremely polymorphic minisatellite. *Nucleic Acids Research*, 14: 4605-4616
- Wong Z., Wilson V., Patel I., Povey S., Jeffreys A.J.** (1987). Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann. Hum. Genet.*, 51: 269-288
- Wong Z., Royle N.J., Jeffreys A.J.** (1990). A novel human DNA polymorphism resulting from transfer of DNA from chromosome 6 to chromosome 16. *Genomics* 7, 222-234
- Wright S.** (1965). The interpretation of population structure by F-statistics whith special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420
- Wright S.** (1978). Evolution and the genetics of populations Vol. 4. Variability within and among natural populations. University Chicago press, Chicago

Wyman A.R., White R. (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6754-6758

Ziegle J.S., Su Y., Corcoran K.P., Nie L., Mayrand P.E., Hoff L.B., McBride L.J., Kronick M.N., Diehl S.R. (1992). Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics*, 14: 1026-1031