

TESE DE MESTRADO

de

PEDRO MANUEL OLIVEIRA E SOUSA DE ALBERGARIA RESENDE

Licenciado em Medicina

**INTERESSE DO ESTUDO DE STRs NA
INVESTIGAÇÃO MÉDICO-LEGAL**

Orientador da Dissertação: Prof. Doutora Maria de Fátima Terra Pinheiro

ICBAS Universidade do Porto

Dezembro de 2003

TESE DE MESTRADO

de

PEDRO MANUEL OLIVEIRA E SOUSA DE ALBERGARIA RESENDE

Licenciado em Medicina

**INTERESSE DO ESTUDO DE STRs NA
INVESTIGAÇÃO MÉDICO-LEGAL**

Orientador da Dissertação: Prof. Doutora Maria de Fátima Terra Pinheiro

ICBAS – Universidade do Porto

Dezembro de 2003

Resumo:

O rápido crescimento da Genética e Biologia Forense nos últimos anos, deve-se, em grande parte, ao desenvolvimento de novas metodologias para o estudo pormenorizado do DNA, a partir de amostras biológicas.

Os STRs (*short tandem repeat*) são polimorfismos do DNA muito utilizados no campo forense, não só em casos de investigação biológica da paternidade, criminalística biológica e identificação genética individual, como também em estudos genético-populacionais humanos. A análise dos STRs foi facilitada devido à introdução de sistemas de amplificação simultânea múltipla (*multiplex*).

Obtiveram-se amostras de sangue de 325 indivíduos, saudáveis, sem relação de parentesco, envolvidos em casos de investigação biológica da paternidade, onde se efectuou a análise de 15 *loci* STR incluídos no sistema PowerPlex® 16. Foram calculadas as frequências alélicas dos 15 STRs, foi testado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, assim como a Independência Alélica entre os *loci*. Alguns parâmetros de interesse médico-legal foram, também, determinados. Descreveram-se três casos práticos nos quais se utilizou o sistema *multiplex* atrás referido.

Os marcadores incluídos no *kit* PowerPlex® 16 demonstraram ser altamente discriminativos e reproduzíveis, na resolução de perícias médico-legais.

Summary:

The fast growth of Forensic Genetics and Biology in last years, is due, largely, to the development of new methodologies for the detailed study of DNA, starting from biological samples.

STRs (*short tandem repeat*) are polymorphisms of DNA used frequently in the forensic field, not only in cases of biological investigation of paternity, biological criminalistics and individual genetic identification, as well as in human genetic-population studies. The analysis of STRs was facilitated due to the introduction of systems of multiple simultaneous amplification (*multiplex*).

Blood samples were obtained from 325 individuals, healthy and without any relationship between them, involved in cases of biological investigation of paternity; in

these samples, the analysis of 15 STR *loci* included in the system PowerPlex® 16, were made. The allelic frequencies of the 15 STRs were calculated, Hardy-Weinberg's conditions were tested, as well as the allelic independence among the *loci*. Some parameters of forensic interest were, also, determined. Three practical cases, in which the *multiplex* system referred was used, were described.

The markers included in the kit PowerPlex® 16 demonstrated to be highly discriminative and reproducible, in the resolution of forensic expertise.

Résumé:

L'augmentation rapide de la Génétique et Biologie Judiciaire dans les années dernières, est due, pour une grande part, au développement de nouvelles méthodologies pour l'étude détaillée d'ADN, à partir d'échantillons biologiques.

Les STRs (*short tandem repeat*) sont des polymorphismes de DNA utilisées fréquemment dans le champ judiciaire, pas seul dans cas d'enquête biologique de paternité, criminalistique biologique et identification génétique individuelle, mais aussi bien que dans les études génétiques de populations humaines. L'analyse de STRs a été facilitée dû à l'introduction de systèmes de amplification simultanée multiple (*multiplex*).

Les échantillons du sang ont été obtenus de 325 individus, sains et sans relations de famille, dans cas d'enquête biologique de paternité; ont a fait, avec ces échantillons, l'analyse de 15 *loci* STR avec le système PowerPlex® 16. Ont a calculé les fréquences des allèles des 15 STRs, les conditions de Hardy - Weinberg ont été testées, aussi bien que la indépendance des allèles parmi les *loci*. Quelques paramètres d'intérêt judiciaire ont été, aussi, déterminés. Ont a décrit trois cas pratiques où ont a utilisé le système *multiplex* PowerPlex® 16.

Les marqueurs inclus dans le *kit* PowerPlex® 16 ont démontré être hautement discriminatives et reproductibles, dans la résolution de compétences judiciaires.

Agradecimentos

Ao Senhor Professor Doutor Pinto da Costa (em primeiro lugar), pela oportunidade que me foi concedida de frequentar este Curso de Mestrado.

À Senhora Professora Doutora Fátima Pinheiro, pela sugestão do tema do trabalho, assim como pelos conselhos, condução, estímulo e disponibilidade constante para a elaboração do mesmo.

A todas as pessoas do Serviço de Genética e Biologia Forense, a quem importunei, de quando em vez, em busca de respostas para toda e qualquer questão.

À Laurinha, por isso e por tudo.

Aos meus Avós, que, sem dúvida, ficariam satisfeitos, se ainda aqui se achassem.

Aos meus Pais, pelo incentivo, desde a primeira hora, para que me abalançasse a este trabalho.

À minha Esposa – estranha em terra estrangeira - pelo carinho, ajuda e apoio, sempre dado, nunca rateado; quando deveria ser o inverso...

Índice

1. Justificação do Estudo e Objectivos	1
2. Introdução	4
2.1. Polimorfismos do DNA	6
2.2. Genética Populacional	12
2.3. Parâmetros estatísticos com interesse médico-legal	15
3. Material e Métodos	20
3.1. Colheita de manchas sanguíneas	21
3.2. Extracção do DNA	22
3.3. Amplificação do DNA	25
3.4. Tipagem do DNA	29
3.5. Análise estatística	38
4. Resultados	40
4.1. <i>Locus</i> D3S1358	42
4.2. <i>Locus</i> vWA	44
4.3. <i>Locus</i> D16S539	47
4.4. <i>Locus</i> D8S1179	49
4.5. <i>Locus</i> D21S11	52
4.6. <i>Locus</i> D18S51	56
4.7. <i>Locus</i> TH01	60
4.8. <i>Locus</i> FGA	62
4.9. <i>Locus</i> D5S818	66
4.10. <i>Locus</i> D13S317	68
4.11. <i>Locus</i> D7S820	71
4.12. <i>Locus</i> TPOX	74
4.13. <i>Locus</i> CSF1PO	77
4.14. <i>Locus</i> Penta D	79
4.15. <i>Locus</i> Penta E	82

4.16. Teste da Independência Alélica	88
4.17. Comparações Genético-Populacionais	91
4.18. Aplicação do estudo do PowerPlex® 16 na conclusão de perícias médico-legais	94
5. Discussão	105
5.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Independência Alélica	107
5.2. Parâmetros de interesse Médico-Legal	109
5.3. Comparações Genético-Populacionais	112
5.4. Aplicação do estudo do PowerPlex® 16 na conclusão de perícias médico-legais	115
6. Conclusões	134
Referências Bibliográficas	136

1. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO E OBJECTIVOS

Medicina Legal é a ciência que tem como objectivo a aplicação de conhecimentos médicos e biológicos à resolução de problemas jurídicos (J. A. Gisbert Calabuig).

Dentro do conjunto dos vários tipos daqueles conhecimentos – talvez por inclinação/gosto pessoal - destacamos a Genética e Biologia Forense, nas suas diversas vertentes da criminalística biológica, da identificação genética individual e da investigação de filiação. A evolução constante dos saberes teóricos e técnicos é um facto, mas nesta área, em particular, verificou-se nos últimos 20 anos um avanço considerável, sendo hoje possível a resolução de perícias, impensável há escassos anos.

O médico que trabalha na área da Patologia Forense, nos países de inspiração mediterrânea chamada, classicamente, Tanatologia Forense, não está só no necrotério a fazer uma autópsia, no gabinete a estudar o seu relatório, no Foro a explicar as conclusões a que porventura haja chegado.

Depara-se muitas vezes com a precisão de recorrer a profissionais de outras áreas para conseguir responder a questões da sua missão, designadamente, as relacionadas com:

- a Informação que lhe chega, antes e após a feitura da necrópsia;
- os Registos Imagiológicos que se efectuam (para memória futura, na identificação, para melhor explicação dos achados);
- os Exames Complementares de Diagnóstico (para confirmar/infirmar um diagnóstico, para comparação de vestígios biológicos).

Como exemplo do que foi dito, cita-se o caso dos restos cadavéricos (que é necessário identificar), homicídios (em que se fazem colheitas de tecidos biológicos que possam ser usados para comparação), ou no âmbito das agressões sexuais (colheita de amostras biológicas à suposta vítima, entre outras).

Por isso, um dos principais objectivos deste trabalho é realçar o interesse da Genética e Biologia Forense em diversos actos da Investigação Médico-Legal.

Assim, tentou-se aumentar o conhecimento, no sentido de saber como são/funcionam estas técnicas, para delas tirar melhor partido, no futuro (sem, com isto, se tentar fazer qualquer mistura entre os diferentes misteres).

O mesmo é dizer que – por um pouco – se buscou ‘*vestir a pele*’ de um Técnico de um Serviço de Genética e Biologia Forense, para compreender o trajecto de um vestígio biológico (desde a sua recolha, passando pelo seu tratamento e da informação que comporta, até ao relatório pericial final).

A escolha do Norte de Portugal, como grupo populacional para estudo, deveu-se ao facto de estar inserido – familiar e profissionalmente - nesta área geográfica, que corresponde à da competência territorial da Delegação do Porto do Instituto Nacional de Medicina Legal.

Os principais objectivos deste estudo foram:

- Analisar as características da população do Norte de Portugal, nomeadamente para a obtenção de frequências alélicas dos quinze *loci* incluídos no *kit* da Promega, PowerPlex® 16, com vista à criação de uma base de dados que permita a valorização da prova pericial em casos de interesse forense;
- Fazer uma comparação genético-populacional entre o Norte de Portugal e outras populações (com dados de outros autores), com base nos resultados obtidos dos *loci* analisados neste trabalho.

O desiderato é, então, o patologista forense compreender como se alcança um resultado específico, relativo à perícia do âmbito da Genética e Biologia Forense, que vai juntar ao seu relatório final. E, desta forma, entender (e fazer entender) cabalmente o seu significado.

2. INTRODUÇÃO

A Genética e Biologia Forense é o ramo da Medicina Legal que estuda amostras biológicas, com o objectivo de estabelecer a sua identidade genética (perfil genético).

Esta, pressupõe o estabelecimento da individualidade biológica que cada ser humano representa e fundamenta-se na exclusividade do seu DNA e na igualdade e imutabilidade deste, em todas as células do organismo, ao longo da vida.

Ou seja, o DNA é único para cada ser humano, sendo que este fica perfeitamente identificado através do seu estudo, em qualquer vestígio biológico que lhe pertença (qualquer célula nucleada do seu organismo).

Assim, Perfil Genético, do ponto de vista médico-legal, pode ser definido como sendo o conjunto das características hereditárias ou padrões fenotípicos que um indivíduo possui, para um determinado número de marcadores genéticos, detectável em qualquer amostra biológica que lhe pertença. Este perfil ficará definido mediante a análise laboratorial das amostras referidas.

A análise do DNA permitiu identificar:

- DNA expressivo ou codificante (muito importante do ponto de vista clínico; com pouca utilidade forense por ser pouco polimórfico).
- DNA não expressivo ou não codificante, o DNA repetitivo, que tem grande importância forense, dado o seu elevado polimorfismo.

A descoberta da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e a sua utilização no estudo de *loci* altamente polimórficos, nomeadamente *loci* STR (*Short Tandem Repeats*), veio dar um enorme contributo a várias áreas científicas e, dentro destas, à Medicina Legal.

2.1. Polimorfismos do DNA

Os fundamentos das técnicas de análise dos polimorfismos do DNA, designadamente da PCR (Kary Mullis, 1985) baseiam-se, fundamentalmente, em dois princípios: o da complementaridade das bases azotadas, em que o processo de emparelhamento das mesmas não é aleatório (a adenina e a timina ligam-se de forma específica, o mesmo acontecendo entre a guanina e a citosina); e a desnaturação e hibridação do DNA, que podem ocorrer num ambiente alcalino ou a determinadas temperaturas, provocando a ruptura das pontes de hidrogénio entre as bases e a separação das duas cadeias de DNA. Este processo é reversível.

A variabilidade genética existente no DNA de cada indivíduo, pode ser investigada experimentalmente usando várias metodologias.

Numa perspectiva histórica, os procedimentos clássicos são os da análise do DNA via RFLP (*Restriction Length Fragment Polymorphisms*), usando sondas *multilocus* ou *unilocus* (*DNA Fingerprinting* e *DNA Profiling*)

Os primeiros polimorfismos de DNA a serem descobertos foram os de comprimento dos fragmentos de restrição, RFLPs, por Botstein em 1980.

Estes, são geralmente causados por alterações de um único par de bases, nas sequências de DNA não codificante, que levam à remoção ou introdução dum local de reconhecimento de uma endonuclease de restrição (enzimas que reconhecem e cortam sequências específicas de bases na dupla cadeia de DNA), causando aumentos ou diminuições no comprimento dos fragmentos de restrição (Botstein e col., 1980).

Estas variações do tamanho dos fragmentos de DNA são, assim, causadas por diferenças no número de locais de clivagem, reconhecidos por uma determinada endonuclease de restrição. Por isso, neste tipo de polimorfismos, os alelos possíveis dependem da presença ou ausência de locais de corte da endonuclease de restrição.

Os RFLPs têm sido usados 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 (Gené e col., 1991).

Com a técnica de *DNA Fingerprinting* a detecção das sequências de bases similares, faz-se utilizando sondas (*probes*) *multilocus*. Estas apresentam uma complementaridade muito apreciável entre a sequência de interesse e a sonda. O modelo resultante do *Southern Blot*, tem a forma semelhante a um código de barras, daqui a designação do método (Jeffreys e col., 1985 a, b), porque a sua especificidade individual é semelhante às impressões digitais.

Na prática, conseguem-se detectar com esta técnica, 15/40 bandas. Apesar deste número ser relativamente reduzido, a sua capacidade informativa é alta, pois a probabilidade de dois indivíduos diferentes, não aparentados, compartilharem todas as bandas é muito baixa (utilizando duas sondas será de $5,4 \times 10^{-21}$). Por isso, quase que se pode afirmar que o *DNA Fingerprint* é específico para cada indivíduo, com a excepção dos gémeos monozigóticos (Jeffreys e col., 1985b).

A técnica atrás referida, é de difícil execução e a interpretação dos padrões de bandas gerados requer muita experiência.

Ao contrário, uma sonda de *locus* único detectará, para cada indivíduo, um máximo de duas bandas (heterózigótico) ou apenas uma (homozigótico).

Estas sondas proporcionam a vantagem de produzirem resultados de leitura 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).

Foram usadas, por diversos laboratórios, várias sondas *unilocus* que geravam um *DNA Fingerprint* similar ao das *multilocus*. Pois, se os *loci* não estivessem em desequilíbrio de ligamento, a probabilidade acumulada de dois indivíduos não aparentados possuírem o mesmo genótipo assemelhava-se à probabilidade obtida pelas sondas *multilocus* (Wong e col., 1986, 1987).

Os RFLPs são, actualmente, pouco utilizados na resolução de casos médico-legais, porque, entre outras razões, requerem uma quantidade apreciável de DNA de alto peso molecular não degradado. Assim, apenas apresentaram grandes vantagens em relação aos marcadores genéticos convencionais, particularmente no que se referia ao poder informativo proporcionado, apesar de se tratar de uma metodologia bastante laboriosa e demorada.

A técnica de PCR foi descrita, em 1985, por Kary Mullis. Trata-se da amplificação, enzimática, *in vitro*, de sequências específicas de DNA pelo método da reacção em cadeia da polimerase.

Esta, baseia-se na amplificação enzimática *in vitro* de um fragmento de DNA, cuja sequência de bases foi previamente seleccionada (*target*), usando dois iniciadores de cadeia (*primers*) que vão hibridar com as extremidades 3' da dupla cadeia.

Ciclos repetidos, consistindo na desnaturação do DNA, hibridação (*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.

Para se utilizar esta técnica, há necessidade de se conhecer a sequência de DNA que rodeia a região de interesse, a fim de ser possível a construção de *primers* específicos que vão delimitar o local polimórfico.

A automatização do processo, com o uso de termocicladores, veio permitir a simplificação deste processo (Saiki e col., 1988; Lawyer e col., 1989). Essa automatização tornou-se possível graças ao isolamento da DNA Polimerase, a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (Taq) e ao aparecimento dos referidos termocicladores. Este aparelho obvia a intervenção do operador, nos diferentes ciclos em que se desenrola a PCR.

Das vantagens desta técnica, são de nomear a capacidade para analisar uma determinada sequência em quantidades muito pequenas de DNA, desde que a amostra tenha, pelo menos, uma cadeia intacta de DNA a rodear a região a amplificar. Esta sensibilidade tem permitido a tipagem de diferentes polimorfismos de DNA de um cabelo (Higuchi e col., 1988), de um espermatozóide (Li e col., 1988) e de células somáticas individuais (Jeffreys e col., 1988). Há autores que referem ter obtido resultados efectuando reacções de amplificação com DNA degradado a partir de tecidos guardados em arquivo e fixados em formol ou em parafina ou, ainda, extraídos de peças

antigas existentes em museus ou achados arqueológicos (Impraim e col., 1987; Pääbo, 1989).

Para além de, na generalidade dos casos, se obter resultados em amostras degradadas.

Ou seja, a técnica de PCR é um meio valioso para o estudo de regiões polimórficas em amostras de DNA, sobretudo em criminalística, onde raramente se dispõe de DNA de alto peso molecular em quantidades apreciáveis. Trata-se duma metodologia muito usada na resolução de perícias médico-legais do âmbito da Genética e Biologia Forense, assim como em casos de diagnóstico clínico (Brook e col., 1992; Hazan e col., 1992; Richards e Sutherland, 1992; Riggins e col., 1992).

Os *loci* STR foram, pela primeira vez, usados como marcadores polimórficos em 1989 (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989), consistindo em curtas sequências repetidas em 'tandem', cuja unidade de repetição tem entre 3 a 7 pares de bases. Estas repetições encontram-se dispersas por todo o genoma humano, sendo marcadores altamente polimórficos, os quais podem ser analisados usando a técnica de PCR.

Como o tamanho dos *loci* STR é relativamente pequeno, menor do que 350 pb (Brinkmann, 1966), a sua análise é bastante sensível e rápida, podendo ser estudados a partir de amostras com quantidades muito pequenas de DNA.

Assim, e devido ao elevado grau de polimorfismo de um grande número de regiões microssatélites, resultante da variação no número de unidades de repetição, os STRs são, neste momento, os marcadores mais usados em Genética e Biologia Forense (Edwards e col., 1991; Alford e col., 1994).

Um dos requisitos para se escolher os sistemas a usar, nomeadamente STRs, através da PCR, é que segreguem independentemente uns dos outros; por isso, devem ser preferencialmente seleccionados polimorfismos cujos *loci* se encontrem em diferentes cromossomas, ou, pelo menos, em braços diferentes.

Para além disso, é mandatório que sejam conhecidas as sequências que rodeiam a região de repetição, com o fim de se poderem sintetizar *primers*.

No processo de análise dos produtos de amplificação dos STRs podem surgir bandas secundárias ou *sombra*, que se formam, talvez, como consequência da

desnaturação incompleta dos produtos da reacção em cadeia da polimerase, ou devido ao fenómeno de *slippage* (deslizamento da cadeia) da DNA Polimerase (Hauge e Litt, 1993).

Nos STRs com unidades de repetição de dois nucleotídeos, este tipo de artefactos é muito frequente (Hauge e Litt, 1993), o que dificulta a designação alélica, razão pela qual são pouco usados para fins forenses (Brinkmann, 1996).

Nos STRs com unidades de repetição de três ou de quatro nucleotídeos, estes produtos secundários não são tão frequentes. Por isso, são estes os que se utilizam em Genética e Biologia Forense, pois os resultados da amplificação são facilmente reproduzíveis, fiáveis e de fácil interpretação.

O polimorfismo dos microssatélites é devido, principalmente, ao número variável de repetições em tandem. Em muitos casos, a isto, junta-se uma microvariação da sequência ou da estrutura das unidades de repetição.

De acordo com as recomendações internacionais, designadamente da Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG), a denominação dos alelos dos STRs deve fazer-se de acordo com o número de unidades de repetição.

Se um alelo apresentar uma unidade de repetição incompleta, será designado pelo número de unidades de repetição completas e pelo número de pares de bases da unidade de repetição incompleta, separados por um ponto (Bär e col, 1997).

O estudo de STRs foi bastante facilitado, devido à introdução de sistemas de amplificação simultânea (*multiplex*). Estes sistemas, permitem obter informação de vários *loci* numa única reacção, diminuindo o tempo de estudo, assim como da quantidade de DNA e de reagentes. Além destas vantagens, acresce o facto da análise dos produtos amplificados ser, actualmente, feita em sequenciadores automáticos, o que permite a armazenagem dos resultados em ficheiros, graças ao uso de um *software* apropriado. O facto de estarem disponíveis diversos *kits* comerciais validados, fornecidos por várias empresas, que permitem a amplificação de múltiplos *loci*, constitui um considerável avanço na resolução de perícias do âmbito da Genética e Biologia Forense, mesmo as situações mais complexas.

O Sistema PowerPlex®16, é um exemplo, pois permite a amplificação e análise simultânea de 15 *loci* STR e de um fragmento do gene da Amelogenina.

Treze destes *loci*, encontram-se incluídos numa base de dados, criada em 1998, pelo *Federal Bureau of Investigation* (FBI) e usada por outros laboratórios forenses nos Estados Unidos, que seleccionaram um conjunto de treze *loci* STR, para criar uma base de dados nacional, o CODIS (*Combined DNA Index System*).

O Sistema PowerPlex®16 contém, ademais, dois novos *loci* pentanucleotídeos, altamente polimórficos, o Penta D e o Penta E que, por tal facto, permitem um aumento significativo do seu poder informativo.

2.2. Genética Populacional

O estudo genético de populações humanas é de grande interesse em Antropologia e em Medicina Legal, porquanto quando se efectua a valorização da prova pericial, é necessário conhecer alguns parâmetros estatísticos da população referência.

A Genética Populacional tem como um dos objectivos, analisar as consequências da aplicação dos princípios mendelianos, em determinada população, estudando os efeitos das mutações, selecção natural, migração e deriva genética.

A população em estudo foi a da área geográfica de influência da Delegação do Porto do Instituto Nacional de Medicina Legal (INML), a do Norte de Portugal que conta, segundo o último Censo de 2001, com 3.615.720 Portugueses, sendo 48% do sexo masculino e 52% do sexo feminino.

Para além dos serviços técnicos do INML de cada Delegação (*Tanatologia Forense, Clínica Médico-Legal, Toxicologia Forense, Psiquiatria Forense, Anatomia Patológica e Genética e Biologia Forense*), existem os Gabinetes Médico-Legais, cujas competências relativas à realização de autópsias, bem como à identificação de cadáveres e execução de embalsamamentos e, ainda, exames e perícias em pessoas, para descrição e avaliação dos danos provocados na integridade psico-física, nos diversos domínios do Direito Penal, Civil e do Trabalho, são similares às dos referidos serviços técnicos das Delegações, exceptuando as que dizem respeito às daqueles serviços onde se efectuam perícias que envolvem exames laboratoriais, como o de Toxicologia Forense, o de Anatomia Patológica e o de Genética e Biologia Forense.

Acresce que os exames e perícias realizados por todos eles podem ser solicitados pelos Tribunais, Polícia Judiciária, Polícia de Segurança Pública, Guarda Nacional Republicana, bem como outras entidades públicas, privadas e particulares (Artigo 2º alínea i, da legislação relativa à organização médico-legal em Portugal, depois da entrada em vigor do Decreto-Lei nº 96/2001, de 26 de Março que prevê a existência do Instituto Nacional de Medicina Legal, com Delegações no Porto, Coimbra e Lisboa, cuja sede é em Coimbra).

O genótipo de um indivíduo é imutável ao longo da vida, mas a composição genética da população em que este se insere pode mudar de geração em geração.

Para que se possa usar um marcador genético, como por exemplo um dos STRs atrás mencionados, na resolução de perícias médico-legais do âmbito da Genética e Biologia Forense, tem que se efectuar um estudo desse marcador na população de onde são oriundos os intervenientes da referida perícia.

Desse estudo genético-populacional faz parte, entre outros factores, determinar se o marcador está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg¹.

Se todas as condições do Equilíbrio de Hardy-Weinberg se verificassem, as frequências alélicas num *locus* autossómico não sofreriam alterações, ou seja, o processo de evolução não ocorreria.

Uma vez que, na realidade, as condições atrás referidas não se verificam na totalidade, há necessidade de determinar se num estudo populacional concreto a proporção dos genótipos na população se ajusta ao referido equilíbrio.

Outro aspecto importante é verificar a ausência de ligações preferenciais entre dois ou mais *loci*.

Da relação entre as frequências genotípicas e alélicas, pode-se averiguar se os alelos de um determinado *locus* em equilíbrio se distribuem ao acaso, ou se há associações preferenciais entre eles. Sendo certo que os genótipos de diferentes marcadores, numa população, devem ser independentes entre si, para que se verifique equilíbrio de ligamento. Se este equilíbrio for satisfeito, a frequência encontrada para dois genótipos, de diferentes *loci*, é igual ao produto das suas frequências respectivas.

Em estudos populacionais, poderá ter também interesse a determinação das distâncias genéticas. Estas, são utilizadas para medir as diferenças globais entre duas populações.

¹ A Lei de Hardy-Weinberg refere que numa população de grande tamanho e em panmixia (as uniões entre os indivíduos dessa população efectuam-se ao acaso, ou seja de forma independente), as frequências alélicas e genotípicas permanecem constantes de geração em geração. Para que uma população se encontre em equilíbrio de Hardy-Weinberg é necessário que: - seja de grande tamanho (assim não existe deriva genética, já que as flutuações são tanto menores quanto maior for o tamanho da população); - todos os cruzamentos se façam ao acaso; - ausência de mutações (ou seja, não há acrescento de novos alelos por alteração molecular dos gametas); - ausência de migrações (não são incorporados alelos novos por influência de populações externas); - ausência de selecção (os alelos não têm vantagem diferencial em relação ao êxito reprodutivo).

Se não há diferenças, a distância será igual a zero. Ao contrário, se as populações não têm alelos em comum para nenhum *locus*, aquele valor alcança um máximo de um.

Por isso, a distância genética é uma medida de divergência entre populações, sendo as árvores o método mais usado para a análise filogenética.

2.3. Parâmetros estatísticos com interesse médico-legal

Existem diversos parâmetros estatísticos para determinar a eficácia de um marcador genético na conclusão de casos da área da Genética e Biologia Forense, sendo diferentes para cada situação (investigação biológica de filiação, criminalística biológica, identificação genética individual).

Classificam-se em *a priori*, quando são aplicados para determinar a capacidade do laboratório para concluir essas perícias e *a posteriori*, quando aplicados aos resultados obtidos em cada caso, ou seja para, efectuar a valorização da prova científica.

- Probabilidade de exclusão *a priori* (P_{ex}):

A P_{ex} de um marcador genético numa população determinada, é um parâmetro importante no que concerne à investigação biológica da paternidade. Pode ser definido como a percentagem de indivíduos falsamente acusados, cuja paternidade ficaria excluída, com base nesse marcador.

No caso do marcador em questão ser um sistema codominante, com dois alelos é dada pela fórmula:

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

Em que p e q são as frequências dos alelos.

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

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

A probabilidade de exclusão *a priori* é um valor percentual, que é função directa do polimorfismo do sistema e é tanto maior quanto mais equilibradas forem as frequências dos seus alelos, numa população.

A eficácia de vários sistemas genéticos – usados em conjunto – para excluir um indivíduo, pode ser expressa através da probabilidade de exclusão *a priori* acumulativa:

$$Pex_{cum} = 1 - (1-Pex_1) \times (1-Pex_2) \times \dots \times (1-Pex_m).$$

Em que $Pex_1, Pex_2, \dots, Pex_m$ são as probabilidades de exclusão *a priori* individuais de cada um dos sistemas usados.

A probabilidade de exclusão *a priori* desejável, é a máxima possível, devendo ser, pelo menos, de 99.9%, segundo a ISFG.

- Probabilidade de Discriminação (PD):

É uma medida relativa de eficácia de um sistema genético, em criminalística biológica. É um parâmetro estatístico *a priori* que se define como a probabilidade de dois indivíduos, retirados ao acaso da mesma população, não aparentados entre si, se possam diferenciar geneticamente, mediante a análise de um sistema ou conjunto de sistemas genéticos.

O oposto da probabilidade de discriminação é a probabilidade de coincidência (probabilidade de *Matching* – *PM*):

$$PD = 1 - PM = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

Sendo P_i as frequências genótípicas do alelo i de 1 a n .

Quando se consideram vários sistemas genéticos, o poder de discriminação acumulado (PD_{acum}) é dado por:

$$PD_{acum} = 1 - PM_{acum} = 1 - PM_1 \times PM_2 \times \dots \times PM_m$$

Sendo $1, 2, \dots, m$ os vários sistemas genéticos.

Assim, quanto maior for o número de sistemas genéticos considerados, maior o valor de PD, existindo maior capacidade de discriminar vários indivíduos de uma população.

- Heterozigosidade (H):

Trata-se de um parâmetro que representa a probabilidade de dois alelos do mesmo *locus*, escolhidos ao acaso na população, serem diferentes (Fernández, 1999).

A heterozigosidade observada (para um determinado *locus*) define-se como o número de indivíduos heterozigóticos observados, relativamente ao número total de indivíduos da população (Nei, 1978):

$$H_{obs} = \frac{\text{Número total de heterozigóticos observados}}{\text{Número total de genótipos}}$$

Ou,

$$H = 2n/(2n-1) (1 - \sum p_i^2)$$

Onde p_i representa a frequência do alelo i na amostra populacional e n o número de indivíduos da amostra.

A variabilidade genética de uma população é quantificada pela heterozigosidade média por *locus*. Este valor consiste na média aritmética dos valores de heterozigosidade dos vários *loci* analisados.

Contudo, quando o número de *loci* não é elevado, ou quando estes não são escolhidos ao acaso, a heterozigosidade não fornece indicação relevante acerca da variabilidade real (Fernández, 1999).

- Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC):

A capacidade informativa de um *locus* analisa-se mediante o conteúdo em informação polimórfica, segundo a fórmula de Bostein et al. (1980):

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

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

- Likelihood Ratio (LR) [Razão de Verossimilhança]:

Quando se analisam perfis genéticos, no âmbito da Criminalística Biológica, o objectivo é a comparação entre as características genéticas de um vestígio biológico com as mesmas características de um indivíduo suspeito, na tentativa de identificação do autor do crime.

Se não houver concordância, para alguns dos marcadores estudados, entre as características genéticas do vestígio biológico e as do suspeito, podemos afirmar que aquele não pertence a este.

Se houver concordância, para todos os marcadores estudados, das características genéticas de ambos, duas hipóteses se põem: O acusado cometeu o crime (C), ou é inocente ($\hat{C}$).

Em Criminalística Biológica, para valorizar de forma objectiva a prova científica, utiliza-se o LR (razão bayesiana de probabilidades).

Este parâmetro, pode formular-se da seguinte forma:

$$LR = \frac{\text{Probabilidade da Evidência Científica dada a Culpabilidade}}{\text{Probabilidade da Evidência Científica dada a Inocência}}$$

Ou, numa fórmula matemática:

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

Esta fórmula permite-nos comparar a probabilidade de que o vestígio biológico seja do suspeito se **C** é verdade (caso em que é igual a 100%), com a probabilidade de inocência $\hat{C}$.

Quando são utilizados *loci* independentes, o cálculo do valor do 'likelihood ratio' será, tão somente, o produto do inverso das frequências fenotípicas, dos sistemas estudados, na população.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Colheita de Manchas Sanguíneas

As 325 amostras sanguíneas que se utilizaram neste estudo, foram colhidas, por punção venosa, em tubos com o anti-coagulante EDTA-K₃, a indivíduos, não aparentados, intervenientes em investigações biológicas da paternidade, provenientes do Norte de Portugal.

As colheitas foram efectuadas no Serviço de Genética e Biologia Forense, da Delegação do Porto, do Instituto Nacional de Medicina Legal.

A partir do referido sangue, foram efectuadas manchas em cartões apropriados, devidamente identificados, nas respectivas áreas delimitadas nestes; foram secas ao ar, antes de se proceder ao seu acondicionamento no correspondente envelope.

3.2. Extracção do DNA

Antes de se proceder à caracterização dos polimorfismos do DNA, efectuou-se a sua extracção, existindo vários métodos, entre os quais, o que usa o Chelex[®] e a extracção orgânica.

Quando não é exigida a obtenção de DNA de alto peso molecular, utiliza-se o Chelex[®] 100, tratando-se de uma técnica de extracção de DNA mais rápida, fácil de executar e eficiente.

Introduzido, em 1991, o Chelex[®] (Walsh e col., 1991), é uma resina quelante com grande afinidade para iões metálicos polivalentes. Por isso, previne a degradação do DNA em presença de iões metálicos a altas temperaturas e em condições de baixa força iónica.

Este tipo de extracção, nalguns casos, é mais vantajoso do que a extracção fenólica.

Entre essas vantagens (Lareu e col., 1996) referem-se:

- 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 diminui o risco de contaminação, porquanto a pipeta é introduzida no tubo menos vezes.

- O DNA extraído com Chelex[®] mostra um aumento da intensidade de amplificação, a partir de 50 ng de DNA, ao contrário da utilização do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (extracção orgânica), em que para quantidades iguais ou superiores àquela, não melhora a intensidade do produto amplificado.

- É um método mais eficiente na obtenção de DNA, a partir de pequenas quantidades de amostra.

Os inconvenientes da extracção mediante o uso do Chelex[®], são:

- O DNA extraído a partir de manchas de sangue, é mais rapidamente degradável do que o obtido pela extracção fenólica, pois a degradação pode ocorrer cerca de um mês, após a extracção do DNA.

- Os fragmentos obtidos são inferiores a 5 Kb, o que é explicado pela fervura a que são submetidas as amostras, não constituindo, no entanto, para os sistemas usados (STRs), um grande inconveniente, porque os produtos de amplificação para estes *loci* são pequenos.

- Com este tipo de extracção não é possível a quantificação do DNA, pois trata-se de um DNA de cadeia simples.

Os procedimentos foram realizados da seguinte forma:

1. Pipetou-se 1 ml de H₂O desionizada para um tubo *Eppendorf* estéril de 1,5 ml.
 2. Adicionou-se cerca de 3 mm² de tecido com mancha ou 4 µl de sangue total e agitou-se suavemente.
 3. Incubou-se à temperatura ambiente durante 30 min.
 4. Agitou-se em 'vortex' 10 seg (cuidadosamente, ou inverteu-se periodicamente).
 5. Centrifugou-se 3 min a 12000 rpm.
 6. Com micropipeta, eliminou-se todo o sobrenadante, à excepção de cerca de 30 µl, deixando o tecido ou papel no tubo, quando se tratava de uma mancha.
 7. Adicionou-se Chelex[®] a 5% (w/v) (170 µl) até atingir um volume final de 200 µl, com uma ponta de 1 ml, com a extremidade cortada para que tenha maior diâmetro.
 8. Incubou-se a 56° durante 30 min em banho – maria.
 9. Agitou-se vigorosamente em 'vortex' durante 10 seg.
 10. Mergulhou-se em água a ferver durante 8 min, em flutuadores.
- NOTA: com uma agulha esterilizada perfuraram-se as tampas dos tubos, antes do os levar à ebulição.
11. Agitou-se vigorosamente em 'vortex' durante 10 seg.
 12. Centrifugou-se 3 min a 12000 rpm.
 13. Recolheu-se o sobrenadante e colocou-se noutro tubo, tendo o cuidado de não arrastar a resina.

14. Adicionou-se uma parte do sobrenadante aos tubos que já continham os reagentes necessários para efectuar a PCR (até 20% do volume total da mistura).

Reagentes: Chelex[®] Sigma (7901).

Soluções: Solução stock de Chelex[®] 100 a 5% ((w/v) em H₂O desionizada (ponta de pipeta de 1 ml).

3.3. Amplificação do DNA

Foi utilizado um sistema *multiplex* (PowerPlex® 16, da Promega) para amplificar os quinze *loci* STR e um fragmento do gene homólogo da Amelogenina.

A utilidade deste, resulta do facto de permitir a identificação do sexo numa determinada amostra, porquanto com o uso deste *kit* surge uma banda específica do cromossoma X, com 106 pb e uma específica do cromossoma Y, com 112 pb (O DNA feminino, apresenta a banda X-específica).

Os *loci* a amplificar com o sistema PowerPlex® 16, para além da **Amelogenina** (HUMAMEL, gene do cromossoma Y humano para a proteína Amelogenina) [Sullivan e col., 1993], foram: **D3S1358** [Li e col., 1993], **vWA** (HUMVWFA31, gene do factor de von Willebrand humano) [Kimpton e col., 1992], **D16S539** (Cooperative Human Linkage Center), **D8S1179** [Oldroyd e col., 1995], **D21S11** (HUMD21LOC), **D18S51** (HUMUT574), **TH01** (HUMTH01, gene da tirosina hidroxilase humana) [Edwards e col., 1992], **FGA** (HUMFIBRA, gene da cadeia alfa do fibrinogénio humano) [Mills e col., 1992], **D5S818**, **D13S317** [Hudson e col., 1995], **D7S820** [Green e col., 1991], **TPOX** (HUMTPOX, gene da peroxidase tiroideia humana) [Anker e col., 1992], **CSF1PO** (HUMCSF1PO, c-fms proto-oncogene humano para o receptor CSF-1) [Hammond e col., 1994], **PENTA D** (Hattori e col., 2000), **PENTA E** (Birren e col., 2000).

Principais características dos *loci* do sistema *PowerPlex® 16*

(*Promega Corporation – Technical Manual*)

Locus STR	Marcação fluorescente	Localização cromossômica	Unidade Repetitiva (5' -> 3')	Tamanho (pb)
D3S1358	FL	3p	Complexo TCTA	115-147
VWA	TMR	12p12-pter	Complexo TCTA ⁽¹⁹⁾	123-171
D16S539	JOE	16q24-qter	GATA	264-304
D8S1179	TMR	8q	Complexo TCTA ⁽¹⁹⁾	203-247
D21S11	FL	21q11-21q21	Complexo TCTA ⁽¹⁹⁾	203-259
D18S51	FL	18q21.3	AGAA (19)	290-366
TH01	FL	11p15.5	AATG (19)	156-195
FGA	TMR	4q28	Complexo TTTC ⁽¹⁹⁾	322-444
D5S818	JOE	5q23.3-32	AGAT	119-155
D13S317	JOE	13q22-q31	TATC	169-201
D7S820	JOE	7q11.21-22	GATA	215-247
TPOX	TMR	2p23-2pter	AATG	262-290
CSF1PO	JOE	5q33.3-34	AGAT	321-357
PENTA D	JOE	21q	AAAGA	376-449
PENTA E	FL	15q	AAAGA	379-474
Amelogenina	TMR	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	---	106 112

Os procedimentos de amplificação foram efectuados de acordo com o protocolo descrito no manual técnico:

1. Efectuar os seguintes cálculos em função do número de amostras de DNA que se pretende amplificar + 2. Assim, se se quiser amplificar 10 amostras dever-se-á efectuar os cálculos para 12:

2,5 µl de Gold ST★R Buffer 10X/amostra (para 12= 30 µl)

0,8 µl de TaqGold/amostra (para 12= 9.6 µl)

2,5 µl Primer Pair Mix 10X /amostra (para 12= 30 µl)

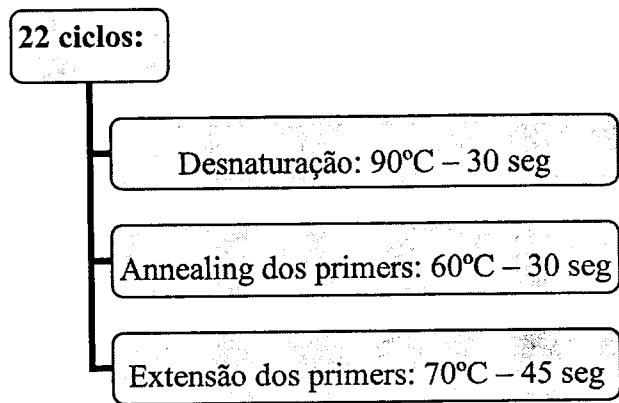
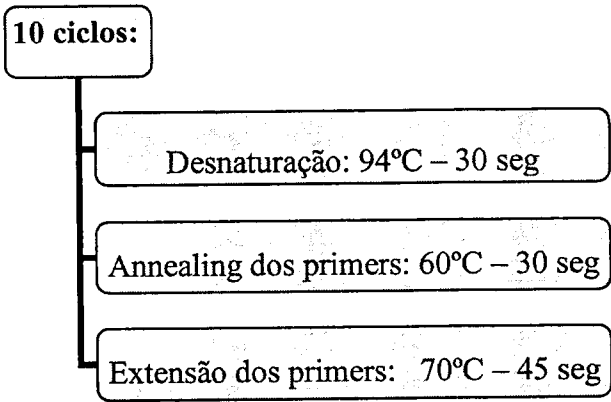
17,2 µl de H₂O MilliQ

Misturar cuidadosamente.

2. Aliquotar 23 µl desta mistura para cada tubo, incluindo o do controlo positivo
3. Adicionar 2 µl de DNA, extraído com Chelex[®], a cada um dos tubos
4. Colocar os tubos no termociclador modelo GeneAmp[®] PCR System 9600 (Perkin-Elmer), usando as seguintes condições:

Incubação inicial 1: 95°C – 11 min

Incubação inicial 2: 96°C – 1 min



Extensão final: 60°C – 30 min

3.4. Tipagem do DNA

Esta tipagem foi efectuada no sequenciador automático, modelo *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Seguiram-se as instruções do *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer User's Manual*.

1. Activação e preparação do sequenciador

Ligar o interruptor do sequenciador (luz verde acende) e o computador Macintosh; o “Data Collection software” é activado automaticamente.

2. Preparação da “Sample Sheet” e da “Injection List”

- No menú “File” seleccionar “New” e “Sample Sheet 48 Tubes” (suporte para 48 amostras).

- Digitar as referências das amostras, escolher as cores da matriz e seleccionar a cor do “Size Standard”, caso esta não tenha sido já automaticamente seleccionada:

	POWERPLEX 16
cores da matriz	B,G,Y,R
cor do “Size Standard”	R

- Fechar e salvar a “Sample Sheet”.

- Ir novamente ao menú “File”, fazer “New” e seleccionar “GeneScan Injection List”.

- Escolher a “Sample Sheet” respectiva, seleccionar o módulo e a matriz:

	POWERPLEX 16
módulo	GSPOP4 (1 mL) A16
matriz	Matrix A16

- No início de cada corrida é aconselhável executar os módulos “Seq Fill Capillary” e “Test CCD 4 Colors”.

3. Lavagem do bloco e acessórios

- Abrir a janela “Manual Control”, escolher “Syringe Home” e executar.
- Na janela “Manual Control” escolher “Autosampler Home X,Y” e executar.
- Escolher “Autosampler Home Z” e executar.
- Pressionar o botão “Tray” do sequenciador; o “Autosampler” avança o tabuleiro (“tray”) com as amostras.
- Retirar os tubos (ver abaixo) colocados nas posições 1, 2 e 3 do “Autosampler”, rejeitar o tubo 3, reutilizar, após lavagem com H₂O desionizada, o tubo 2, e utilizar preferencialmente um tubo 1 pré-lavado e esterilizado.
- Remover o reservatório anódico de tampão e lavá-lo como acima indicado.
- Desenroscar a seringa do topo do bloco e lavá-la com H₂O desionizada ou arrumá-la convenientemente (N.B.: quando não for lavada e ainda contiver polímero, a armazenagem prolongada deve ser feita por colocação no frigorífico, com “Parafilm” a vedar a extremidade).
- Remover o capilar, desapertando o parafuso que o fixa ao bloco, a fita adesiva que o fixa à placa térmica e, depois de removido do sequenciador, manipulando-o apenas pelas extremidades, colocar cada uma destas, temporariamente, no interior dum tubo com H₂O desionizada. (N.B.: Cuidado para não tocar a janela do capilar).
- Remover o bloco, puxando-o horizontalmente na direcção do operador.
- Desenroscar e retirar o parafuso e as válvulas do bloco, colocá-las em H₂O quente e passar o bloco por água quente corrente por alguns instantes.

- Lavar os canais do bloco por injeção de 30 mL de H₂O quente; para que a H₂O quente passe num canal específico, é necessário vedar as aberturas exteriores dos canais restantes.

- Lavar as válvulas e parafuso por injeção de H₂O quente.

- Verificar se existe polímero seco nos canais do bloco (resíduo de cor branca); caso exista, lavar novamente.

- Lavar os canais do bloco, as válvulas e o parafuso com H₂O desionizada, conforme descrito anteriormente.

- Remover a H₂O do bloco e acessórios com papel absorvente; N.B.: é importante assegurar que cavidade de cor dourada do bloco, que estabelece o contacto da fonte do aparelho com o eléctrodo do ânodo, esteja seca .

- Injectar ar nos canais do bloco e acessórios até estarem secos.

4. Instalação do bloco e do capilar

- Alinhar os orifícios maiores (laterais) do bloco com as hastes de aço do sequenciador, sem empurrar o bloco totalmente.

- Na janela “Manual Control” seleccionar “Buffer Valve Open”.

- Alinhar o “colar” da válvula de tampão anódica com a extremidade em forma de “U” do braço activador da válvula, e empurrar totalmente o bloco.

- Abrir o parafuso que fixa o capilar ao bloco.

- Inserir o capilar sem sobrepor ou ultrapassar o cruzamento dos canais.

- Apertar o parafuso de modo a que o capilar fique firmemente fixo.

- Abrir as portas da placa térmica e do laser e colocar o capilar de forma a que a parte não protegida (janela) do capilar fique em frente ao detector.

- Fechar a porta do laser e verificar a presença duma marca de cor verde do capilar exposta imediatamente acima da porta; esta marca indica o posicionamento correcto do capilar.

- Dobrar o capilar parabólicamente sobre a placa térmica, dirigindo a extremidade livre para o orifício apropriado, existente no suporte do eléctrodo catódico.

- Descer o capilar através do orifício, até que ultrapasse a extremidade do eléctrodo do cátodo em cerca de 0.5 mm; N.B.: ter o cuidado de o manter na direcção mais paralela possível relativamente ao eléctrodo.

- Fixar o capilar à placa térmica, na posição referida, com a fita adesiva.
- Fechar a porta da placa térmica.

5. Enchimento dos reservatórios de tampão e água

- Preparar 15 mL de tampão de electroforese (“10X Genetic Analyser EDTA Buffer”, Applied Biosystems) : 1.5 ml + 13.5 ml de H₂O desionizada.
- Encher o reservatório do ânodo até à linha vermelha com o tampão 1X e colocá-lo no bloco.
- Encher um tubo apropriado com tampão de electroforese até à linha negra, encaixar o adaptador branco e o septo cinzento correspondentes. Colocar este na posição 1 do “Autosampler”.
- Encher até pouco mais de 2/3 um tubo apropriado com H₂O desionizada e fechá-lo com a respectiva tampa septada. Colocá-lo na posição 2 do “Autosampler”.
- Encher um tubo eppendorf sem tampa com água destilada, e colocá-lo na posição 3 do autosampler.

N.B.: O tampão deve ser substituído ou ao fim duma semana ou ao fim de 200 migrações.

6. Calibração do “Autosampler”

- Escolher “Autosampler Calibration” no menú “Instrument”.
- Aparece no ecrã a janela da calibração. Clicar “Start” e seguir as instruções.
- Usar as setas do ecrã ou as teclas correspondentes do teclado do computador. Para movimentos de dimensão intermédia, usar a tecla “Shift” e a seta correspondente.
- Centrar e aproximar (0.5 mm) o capilar aos pontos metálicos situados na parte frontal e traseira da bandeja.
- Seguir as instruções do ecrã para completar a calibração.

7. Instalação da seringa

- Após a lavagem da seringa com H₂O desionizada, não secar completamente a seringa; a secagem excessiva pode provocar desgaste considerável do êmbolo.

- Retirar o polímero (“POP 4”, análise de fragmentos; “POP 6”, sequenciação, Applied Biosystems) do frigorífico para a temperatura ambiente, 30 minutos antes da sua utilização.

- Misturar o polímero cuidadosamente por inversão, deixando-o repousar 5 minutos antes da sua deposição na seringa.

- Com a seringa, aspirar uma pequena quantidade de polímero (máximo de 0.20 mL) e levar o êmbolo até à marca de 0.60 mL da escala da seringa.

- Inverter a seringa cerca de seis vezes de modo a revestir as paredes internas do reservatório com polímero, após o que este é rejeitado.

- Aspirar a quantidade de polímero necessária (cerca de 0.1 mL para encher o bloco e 6 a 8 µL por amostra a analisar).

- Limpar a parte exterior da seringa, lavando-a com água desionizada, e secá-la bem, com papel absorvente, antes de a instalar.

- Enroscar a seringa no respectivo orifício do bloco, apertando-a firmemente.

- Escolher “Buffer Valve Close” no “Manual Control” e fazer “Execute”.

- Encher o bloco – até cerca de metade do comprimento da porção horizontal do canal – empurrando levemente o êmbolo da seringa com a mão.

- Escolher “Buffer Valve Close” no “Manual Control” e fazer “Execute”.

- Encher os restantes canais do bloco, empurrando a seringa, até o polímero chegar ao reservatório de tampão anódico. N.B.: No caso da formação de bolhas de ar nos canais, estas deverão ser expulsas pelas saídas das válvulas.

- Escolher novamente “Buffer Valve Close” e executar.

- Orientar a extremidade móvel do braço mecânico da seringa.

No “Manual Control” escolher “Syringe Down”, estabelecer um valor razoável e clicar “Execute”. Repetir o processo até conseguir uma elevada proximidade entre a extremidade do braço e o êmbolo da seringa.

8. Selecção da temperatura

- Na janela “Manual Control” seleccionar “Temperature Set”, inscrever o valor “60” (análise de fragmentos) ou “50” (sequenciação) e clicar “Execute”.
- Fechar as portas do aparelho; N.B.: o aparelho executará esta função apenas quando as portas estiverem fechadas.

9. Preparação das amostras

Análise de fragmentos:

- Efectuar a mistura da formamida desionizada e do “sizer” em quantidade suficiente para o número de amostras em causa:

1. Mistura total: $20\mu\text{L}$ de formamida $\times$ (número de amostras(n)+ 2) + $1\mu\text{L}$ $\times$ (n + 2) “ILS-600” (Internal Lane Standard).

2. Distribuir $21\mu\text{L}$ de mistura por tubo, $1\mu\text{L}$ de cada amostra e $1\mu\text{L}$ de “PowerPlex 16 Allelic Ladder”.

- Colocar as tampas (septos) cinzentas nos tubos e agitá-los no Vortex.
- Centrifugar os tubos .
- Aquecer durante 3 minutos a 95°C no termociclador.
- Colocar os tubos imediatamente no gelo e mantê-los 5 a 10 minutos nessas condições.
- Carregar as amostras na bandeja e introduzi-la no “autosampler” do aparelho.
- Após fechar a porta, clicar “Run” na “Injection List”.

10. Como desligar o aparelho sem desmontar o capilar

- Após término da corrida, fechar e salvar a “Injection List”.
- Fazer “Quit” no menu “File”, para abandonar o software “Data Collection”.

- Desligar o ABI 310; após desligar o sequenciador, o “autosampler” desce, deixando exposta ao ar a extremidade catódica do capilar. Colocar um tubo (de septo cinzento) com água na extremidade do capilar, para evitar a desidratação.

- Tomar todas as precauções quanto à existência doutros softwares ainda activos, e proceder de modo a encerrá-los em segurança.

- No software geral “Finder” escolher o menu “Special” e seleccionar “Shut Down”. O computador fica então desligado.

Na Figura 1 está representado um exemplo de um electroforetograma de uma amostra de DNA (0.5ng), amplificada com o Sistema PowerPlex® 16, onde se podem observar os picos dos *loci* marcados com fluoresceína [A], JOE [B], TMR [C] e os fragmentos do Standard Interno [D].

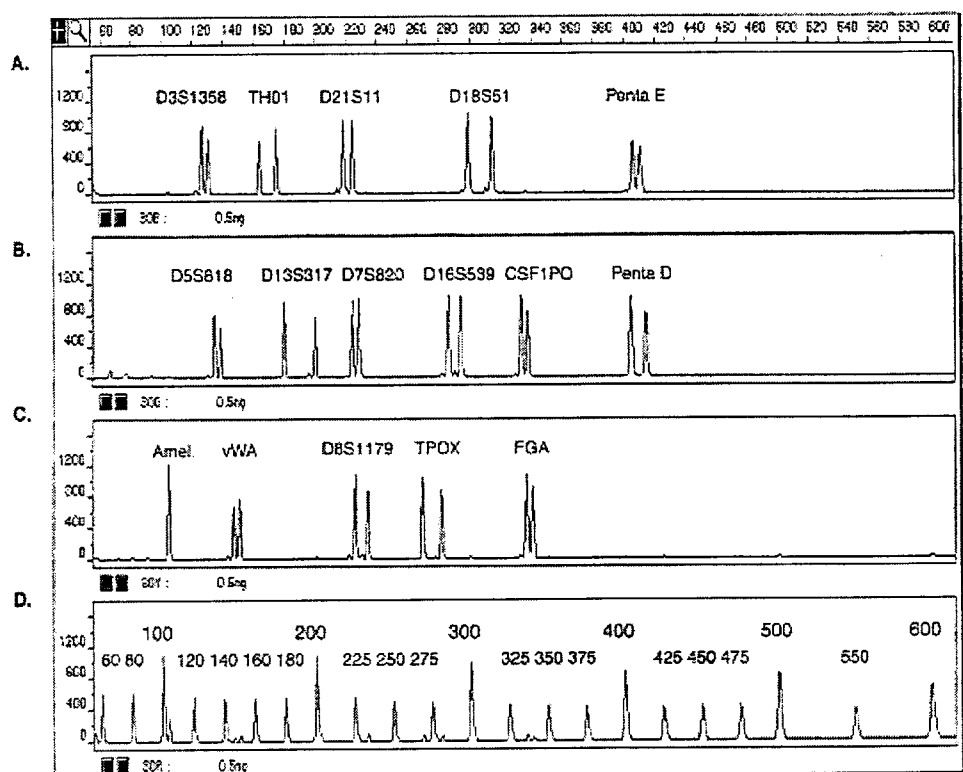


Figura 1 - Electroforetograma de uma amostra de DNA (0.5ng) [Retirado do Manual do kit do PowerPlex® 16]

Na Figura 2 estão representados os ladders alélicos para cada um dos marcadores do referido sistema.

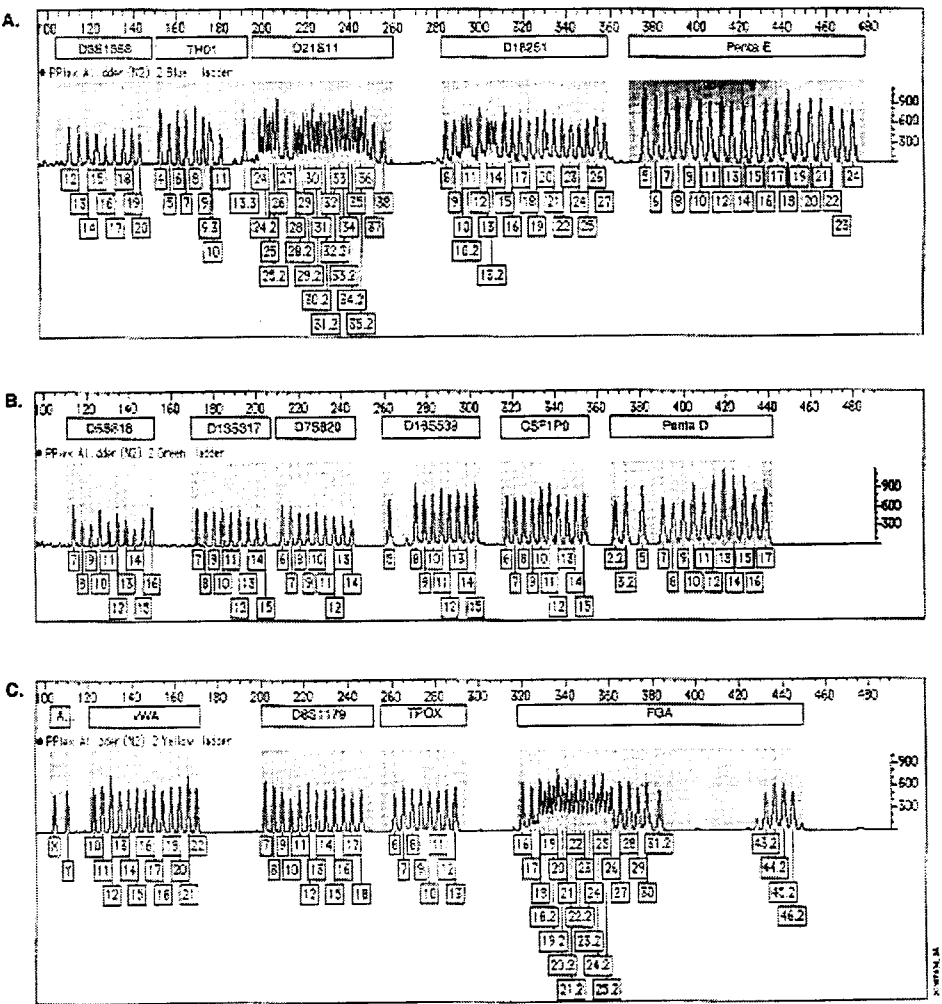


Figura 2 - Ladders Alélicos [Retirado do Manual do kit do PowerPlex® 16]

3.5. Análise Estatística

O programa de análise estatística usado foi o **GENEPOP**, versão 3.3 (Raymond e Rousset, 1995) que permitiu:

- Obter as frequências alélicas observadas (para cada *locus*), os genótipos observados e esperados e o número de homozigotos e de heterozigotos observados e esperados.

- Testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, tomando como hipótese nula a união ao acaso dos gametas, estimado mediante o uso de uma variante do teste exacto de Guo e Thompson (Guo e Thompson, 1992), que recorre à construção de cadeias de Markov com uma distribuição aleatória das probabilidades dos genótipos.

- Testar a independência alélica (equilíbrio de ligamento), tomando como hipótese nula a independência dos genótipos de um *locus* relativamente aos genótipos de outro *locus*, estimada com recurso à criação de tabelas de contingência para os pares de *loci* e à realização do teste de probabilidade (exacto de Fisher) para cada uma destas tabelas, usando o método das cadeias de Markov.

O nível de significância para os testes efectuados foi de 0.05.

Os parâmetros estatísticos de interesse médico-legal foram determinados através do programa **GWBASIC - HTZPEX**, baseado nas fórmulas anteriormente descritas para estes parâmetros, na Introdução.

O pacote estatístico de análise filogenética **PHYLIP**, versão 3.5c (Felsenstein, 1986) permitiu:

- Calcular a matriz das distâncias genéticas de Nei das populações comparadas, através das frequências alélicas, usando o programa *Gendist*.

Esta distância assume que as diferenças entre as populações se produzem como consequência da deriva genética e que todos os *loci* têm igual taxa de mutações neutras (www.eez.csic.es).

- Obter, a partir das distâncias de Nei, a árvore filogenética usando o programa *Neighbor*, método Neighbor-Joining (Nei e Saitou, 1987).

- Realizar uma análise de *bootstrapping* (Efron, 1982; Felsenstein, 1985), com 1000 iterações, através dos programas *Seqboot* e *Consense*.

O *bootstrap* permite confirmar o significado dos resultados da análise filogenética.

O programa *Consense* cria dois ficheiros contendo o mesmo resultado final (a árvore filogenética), sendo um visualizado com o programa *Microsoft® Notepad* e o outro visualizado usando o programa *TreeView*, versão 1.6.6 (Page, 1986).

4. RESULTADOS

Das 325 amostras, pertencentes a indivíduos residentes no Norte de Portugal, analisados com o Sistema *PowerPlex*[®] 16, os resultados obtidos foram os que se seguem.

4.1. Locus D3S1358Tabela 4.1.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* D3S1358:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
12 - 12	0	0,000
13 - 12	0	0,003
13 - 13	0	0,002
14 - 12	0	0,111
14 - 13	0	0,222
14 - 14	4	3,938
15 - 12	0	0,257
15 - 13	0	0,515
15 - 14	19	18,527
15 - 15	19	21,357
16 - 12	0	0,271
16 - 13	2	0,542
16 - 14	21	19,525
16 - 15	35	45,288
16 - 16	28	23,729
17 - 12	0	0,174
17 - 13	0	0,348
17 - 14	14	12,536
17 - 15	32	29,077
17 - 16	30	30,644
17 - 17	9	9,750
18 - 12	1	0,169
18 - 13	0	0,339
18 - 14	8	12,203
18 - 15	39	28,305
18 - 16	31	29,831
18 - 17	17	19,153
18 - 18	7	9,237
19 - 12	0	0,014
19 - 13	0	0,028
19 - 14	2	0,998
19 - 15	4	2,316
19 - 16	1	2,441

19 - 17	2	1,567
19 - 18	0	1,525
19 - 19	0	0,055

Tabela 4.1.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* D3S1358:

Alelo	n	Frequência
12	1	0,00154
13	2	0,00308
14	72	0,11077
15	167	0,25692
16	176	0,27077
17	113	0,17385
18	110	0,16923
19	9	0,01385

Tabela 4.1.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* D3S1358:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
258	256,9307

Tabela 4.1.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* D3S1358:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,3707 \pm 0,0224$

Tabela 4.1.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* D3S1358:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,7906	PD = 0,9215	Pex = 0,5833	PIC = 0,7566

4.2. Locus vWATabela 4.2.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* vWA:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
13 - 13	0	0,000
14 - 13	0	0,094
14 - 14	2	2,820
15 - 13	1	0,131
15 - 14	7	7,989
15 - 15	3	5,501
16 - 13	0	0,240
16 - 14	18	14,663
16 - 15	25	20,431
16 - 16	17	18,629
17 - 13	0	0,260
17 - 14	12	15,884
17 - 15	26	22,134
17 - 16	40	40,622
17 - 17	21	21,874
18 - 13	0	0,193
18 - 14	13	11,749
18 - 15	12	16,371
18 - 16	24	30,046
18 - 17	39	32,550
18 - 18	13	11,941
19 - 13	0	0,063
19 - 14	7	3,854
19 - 15	5	5,370
19 - 16	12	9,855
19 - 17	8	10,676
19 - 18	8	7,897
19 - 19	0	1,263
20 - 13	0	0,015
20 - 14	0	0,940
20 - 15	3	1,310
20 - 16	3	2,404
20 - 17	2	2,604

20 - 18	1	1,926
20 - 19	1	0,632
20 - 20	0	0,069
21 - 13	0	0,003
21 - 14	0	0,188
21 - 15	0	0,262
21 - 16	0	0,481
21 - 17	0	0,521
21 - 18	2	0,385
21 - 19	0	0,126
21 - 20	0	0,031
21 - 21	0	0,002

Tabela 4.2.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* vWA:

Alelo	n	Frequência
13	1	0,00154
14	61	0,09385
15	85	0,13077
16	156	0,24000
17	169	0,26000
18	125	0,19231
19	41	0,06308
20	10	0,01538
21	2	0,00308

Tabela 4.2.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* vWA:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
269	262,9014

Tabela 4.2.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* vWA:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,5822 \pm 0,0242$

Tabela 4.2.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o locus vWA:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,8089	PD = 0,9340	Pex = 0,6198	PIC =0,7803

4.3. Locus D16S539Tabela 4.3.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* D16S539:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
8 - 8	0	0,085
9 - 8	1	1,322
9 - 9	3	4,627
10 - 8	1	0,559
10 - 9	7	3,966
10 - 10	1	0,814
11 - 8	3	3,712
11 - 9	31	26,320
11 - 10	8	11,136
11 - 11	40	36,781
12 - 8	3	3,119
12 - 9	19	22,114
12 - 10	12	9,356
12 - 11	55	62,089
12 - 12	33	25,941
13 - 8	3	1,644
13 - 9	9	11,658
13 - 10	0	4,932
13 - 11	34	32,732
13 - 12	24	27,501
13 - 13	10	7,174
14 - 8	0	0,475
14 - 9	5	3,365
14 - 10	3	1,424
14 - 11	8	9,448
14 - 12	5	7,938
14 - 13	7	4,185
14 - 14	0	0,582

Tabela 4.3.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* D16S539:

Alelo	n	Frequência
8	11	0,01692
9	78	0,12000
10	33	0,05077
11	219	0,33692
12	184	0,28308
13	97	0,14923
14	28	0,04308

Tabela 4.3.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* D16S539:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
238	248,9954

Tabela 4.3.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* D16S539:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,1057 \pm 0,0094$

Tabela 4.3.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* D16S539:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,7661	PD = 0,9034	Pex = 0,5536	PIC = 0,4297

4.4. Locus D8S1179Tabela 4.4.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* D8S1179:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
8 - 8	0	0,043
9 - 8	0	0,099
9 - 9	0	0,043
10 - 8	0	0,641
10 - 9	2	0,641
10 - 10	2	2,043
11 - 8	1	0,789
11 - 9	1	0,789
11 - 10	4	5,128
11 - 11	0	3,106
12 - 8	2	0,974
12 - 9	0	0,974
12 - 10	5	6,330
12 - 11	16	7,790
12 - 12	1	4,747
13 - 8	2	2,293
13 - 9	1	2,293
13 - 10	8	14,903
13 - 11	21	18,342
13 - 12	20	22,641
13 - 13	28	26,510
14 - 8	2	1,726
14 - 9	2	1,726
14 - 10	15	11,217
14 - 11	11	13,806
14 - 12	16	17,042
14 - 13	48	40,123
14 - 14	12	14,992
15 - 8	1	1,072
15 - 9	2	1,072
15 - 10	9	6,971
15 - 11	6	8,579
15 - 12	15	10,590

15 - 13	25	24,934
15 - 14	15	18,767
15 - 15	6	5,764
16 - 8	0	0,308
16 - 9	0	0,308
16 - 10	5	2,003
16 - 11	3	2,465
16 - 12	3	3,043
16 - 13	5	7,165
16 - 14	7	5,393
16 - 15	2	3,351
16 - 16	0	0,462
17 - 8	0	0,012
17 - 9	0	0,012
17 - 10	0	0,080
17 - 11	1	0,099
17 - 12	0	0,122
17 - 13	0	0,287
17 - 14	0	0,216
17 - 15	0	0,134
17 - 16	0	0,039
17 - 17	0	0,000

Tabela 4.4.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* D8S1179:

Alelo	n	Frequência
8	8	0,01231
9	8	0,01231
10	52	0,08000
11	64	0,09846
12	79	0,12154
13	186	0,28615
14	140	0,21538
15	87	0,13385
16	25	0,03846
17	1	0,00154

Tabela 4.4.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* D8S1179:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
276	267,2881

Tabela 4.4.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* D8S1179:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,1016 \pm 0,0133$

Tabela 4.4.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* D8S1179:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
$H = 0,8224$	$PD = 0,9425$	$Pex = 0,6502$	$PIC = 0,7987$

4.5. Locus D21S11Tabela 4.5.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* D21S11:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
24.2 - 24.2	0	0,002
24.2 - 26	0	0,006
24.2 - 27	0	0,074
24.2 - 28	0	0,234
24.2 - 29	1	0,508
24.2 - 30	0	0,453
24.2 - 31	0	0,129
24.2 - 32	0	0,015
26 - 26	0	0,002
27 - 26	0	0,074
27 - 27	0	0,425
28 - 26	0	0,234
28 - 27	4	2,810
28 - 28	2	4,391
29 - 26	0	0,508
29 - 27	7	6,102
29 - 28	26	19,322
29 - 29	21	20,847
30 - 26	1	0,453
30 - 27	7	5,436
30 - 28	16	17,214
30 - 29	30	37,373
30 - 30	18	16,535
30.2 - 24.2	0	0,083
30.2 - 26	0	0,083
30.2 - 27	0	0,998
30.2 - 28	1	3,162
30.2 - 29	10	6,864
30.2 - 30	8	6,116
30.2 - 30.2	0	0,541
30.2 - 31	4	1,747
30.2 - 32	0	0,208

31 - 26	0	0,129
31 - 27	2	1,553
31 - 28	4	4,918
31 - 29	13	10,678
31 - 30	9	9,513
31 - 31	0	1,327
31.2 - 24.2	1	0,237
31.2 - 26	1	0,237
31.2 - 27	1	2,847
31.2 - 28	9	9,017
31.2 - 29	14	19,576
31.2 - 30	17	17,441
31.2 - 30.2	3	3,203
31.2 - 31	3	4,983
31.2 - 31.2	8	4,508
31.2 - 32	0	0,593
32 - 26	0	0,015
32 - 27	0	0,185
32 - 28	3	0,586
32 - 29	0	1,271
32 - 30	1	1,133
32 - 31	0	0,324
32 - 32	0	0,015
32.2 - 24.2	0	0,191
32.2 - 26	0	0,191
32.2 - 27	3	2,293
32.2 - 28	8	7,260
32.2 - 29	15	15,763
32.2 - 30	13	14,043
32.2 - 30.2	1	2,579
32.2 - 31	5	4,012
32.2 - 31.2	12	7,356
32.2 - 32	1	0,478
32.2 - 32.2	1	2,914
33.2 - 24.2	0	0,062
33.2 - 26	0	0,062
33.2 - 27	0	0,740
33.2 - 28	1	2,342
33.2 - 29	6	5,085
33.2 - 30	9	4,530
33.2 - 30.2	0	0,832
33.2 - 31	2	1,294
33.2 - 31.2	0	2,373
33.2 - 32	0	0,154
33.2 - 32.2	2	1,911
33.2 - 33.2	0	0,293

34.2 - 24.2	0	0,003
34.2 - 26	0	0,003
34.2 - 27	0	0,037
34.2 - 28	0	0,117
34.2 - 29	1	0,254
34.2 - 30	0	0,227
34.2 - 30.2	0	0,042
34.2 - 31	0	0,065
34.2 - 31.2	0	0,119
34.2 - 32	0	0,008
34.2 - 32.2	0	0,096
34.2 - 33.2	0	0,031
34.2 - 34.2	0	0,000

Tabela 4.5.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* D21S11:

Alelo	n	Frequência
24.2	2	0,00308
26	2	0,00308
27	24	0,03692
28	76	0,11692
29	165	0,25385
30	147	0,22615
30.2	27	0,04154
31	42	0,06462
31.2	77	0,11846
32	5	0,00769
32.2	62	0,09538
33.2	20	0,03077
34.2	1	0,00154

Tabela 4.5.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* D21S11:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
275	273,2004

Tabela 4.5.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* D21S11:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
P = 0,5395 ± 0,0312

Tabela 4.5.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* D21S11:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,8406	PD = 0,9532	Pex = 0,6846	PIC =0,8208

4.6. Locus D18S51Tabela 4.6.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* D18S51:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
10 - 10	0	0,032
11 - 10	0	0,108
11 - 11	0	0,069
12 - 10	2	1,068
12 - 11	3	1,525
12 - 12	10	7,475
13 - 10	0	0,841
13 - 11	1	1,202
13 - 12	13	11,898
13 - 13	4	4,627
14 - 10	0	1,046
14 - 11	2	1,495
14 - 12	16	14,797
14 - 13	12	11,658
14 - 14	5	7,174
15 - 10	0	0,831
15 - 11	2	1,186
15 - 12	14	11,746
15 - 13	7	9,254
15 - 14	14	11,508
15 - 15	3	4,508
16 - 10	2	1,003
16 - 11	1	1,433
16 - 12	8	14,186
16 - 13	17	11,177
16 - 14	11	13,900
16 - 15	12	11,034
16 - 16	6	6,592
17 - 10	1	0,971
17 - 11	1	1,387
17 - 12	13	13,729
17 - 13	5	10,817

17 - 14	15	13,451
17 - 15	12	10,678
17 - 16	17	12,897
17 - 17	7	6,171
18 - 10	0	0,475
18 - 11	0	0,678
18 - 12	7	6,712
18 - 13	6	5,288
18 - 14	8	6,576
18 - 15	4	5,220
18 - 16	5	6,305
18 - 17	5	6,102
18 - 18	3	1,458
19 - 10	1	0,356
19 - 11	0	0,508
19 - 12	1	5,034
19 - 13	7	3,966
19 - 14	5	4,932
19 - 15	2	3,915
19 - 16	7	4,729
19 - 17	5	4,576
19 - 18	2	2,237
19 - 19	1	0,814
20 - 10	1	0,151
20 - 11	0	0,216
20 - 12	1	2,136
20 - 13	2	1,683
20 - 14	1	2,092
20 - 15	2	1,661
20 - 16	1	2,006
20 - 17	2	1,941
20 - 18	1	0,949
20 - 19	1	0,712
20 - 20	0	0,140
21 - 10	0	0,076
21 - 11	0	0,108
21 - 12	1	1,068
21 - 13	0	0,841
21 - 14	3	1,046
21 - 15	1	0,831
21 - 16	0	1,003
21 - 17	0	0,971
21 - 18	0	0,475
21 - 19	0	0,356
21 - 20	2	0,151
21 - 21	0	0,032

22 - 10	0	0,011
22 - 11	0	0,015
22 - 12	0	0,153
22 - 13	0	0,120
22 - 14	0	0,149
22 - 15	1	0,119
22 - 16	0	0,143
22 - 17	0	0,139
22 - 18	0	0,068
22 - 19	0	0,051
22 - 20	0	0,022
22 - 21	0	0,011
22 - 22	0	0,000

Tabela 4.6.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* D18S51:

Alelo	n	Frequência
10	7	0,01077
11	10	0,01538
12	99	0,15231
13	78	0,12000
14	97	0,14923
15	77	0,11846
16	93	0,14308
17	90	0,13846
18	44	0,06769
19	33	0,05077
20	14	0,02154
21	7	0,01077
22	1	0,00154

Tabela 4.6.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* D18S51:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
286	285,9076

Tabela 4.6.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* D18S51:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
P = 0,5505 ± 0,0280

Tabela 4.6.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* D18S51:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,8797	PD = 0,9728	Pex = 0,7529	PIC =0,8658

4.7. Locus TH01Tabela 4.7.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* TH01:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
6 - 6	14	13,322
7 - 6	17	21,763
7 - 7	8	8,738
8 - 6	17	14,441
8 - 7	14	11,706
8 - 8	2	3,829
9 - 6	27	26,034
9 - 7	22	21,103
9 - 8	20	14,003
9 - 9	10	12,524
9.3 - 6	40	41,085
9.3 - 7	37	33,304
9.3 - 8	14	22,099
9.3 - 9	37	39,840
9.3 - 9.3	36	31,280
9.3 - 10	2	3,112
10 - 6	3	2,034
10 - 7	1	1,649
10 - 8	2	1,094
10 - 9	2	1,972
10 - 10	0	0,069

Tabela 4.7.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* TH01:

Alelo	n	Frequência
6	132	0,20308
7	107	0,16462
8	71	0,10923
9	128	0,19692
9.3	202	0,31077
10	10	0,01538

Tabela 4.7.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* TH01:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
255	255,2373

Tabela 4.7.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* TH01:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,5824 \pm 0,0156$

Tabela 4.7.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* TH01:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,7853	PD = 0,9177	Pex = 0,5762	PIC = 0,7509

4.8. Locus FGATabela 4.8.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* FGA:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
18 - 18	0	0,102
19 - 18	0	0,721
19 - 19	1	1,142
20 - 18	2	1,831
20 - 19	6	5,949
20 - 20	6	7,475
21 - 18	2	1,812
21 - 19	5	5,889
21 - 20	16	14,949
21 - 21	9	7,324
22 - 18	2	2,256
22 - 19	8	7,331
22 - 20	14	18,610
22 - 21	15	18,422
22 - 22	16	11,373
22.2 - 18	0	0,055
22.2 - 19	0	0,180
22.2 - 20	2	0,458
22.2 - 21	0	0,453
22.2 - 22	1	0,564
22.2 - 22.2	0	0,005
22.2 - 23	0	0,388
22.2 - 24	0	0,421
22.2 - 25	0	0,310
22.2 - 26	0	0,106
22.2 - 27	0	0,037
22.2 - 28	0	0,005
23 - 18	1	1,553
23 - 19	3	5,048
23 - 20	15	12,814
23 - 21	14	12,684
23 - 22	13	15,790
23 - 23	10	5,371

23.2 - 18	0	0,055
23.2 - 19	1	0,180
23.2 - 20	1	0,458
23.2 - 21	1	0,453
23.2 - 22	0	0,564
23.2 - 22.2	0	0,014
23.2 - 23	0	0,388
23.2 - 23.2	0	0,005
23.2 - 24	0	0,421
23.2 - 25	0	0,310
23.2 - 26	0	0,106
23.2 - 27	0	0,037
23.2 - 28	0	0,005
24 - 18	4	1,683
24 - 19	3	5,468
24 - 20	11	13,881
24 - 21	16	13,741
24 - 22	17	17,106
24 - 23	10	11,778
24 - 24	8	6,310
25 - 18	0	1,239
25 - 19	8	4,026
25 - 20	13	10,220
25 - 21	10	10,117
25 - 22	10	12,595
25 - 23	7	8,672
25 - 24	9	9,394
25 - 25	3	3,407
26 - 18	1	0,425
26 - 19	3	1,382
26 - 20	6	3,508
26 - 21	1	3,473
26 - 22	6	4,324
26 - 23	1	2,977
26 - 24	2	3,225
26 - 25	3	2,374
26 - 26	0	0,390
27 - 18	0	0,148
27 - 19	0	0,481
27 - 20	1	1,220
27 - 21	0	1,208
27 - 22	3	1,504
27 - 23	0	1,035
27 - 24	3	1,122
27 - 25	1	0,826
27 - 26	0	0,284

27 - 27	0	0,043
28 - 18	0	0,018
28 - 19	0	0,060
28 - 20	0	0,153
28 - 21	0	0,151
28 - 22	1	0,188
28 - 23	0	0,129
28 - 24	0	0,140
28 - 25	0	0,103
28 - 26	0	0,035
28 - 27	0	0,012
28 - 28	0	0,000

Tabela 4.8.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* FGA:

Alelo	n	Frequência
18	12	0,01846
19	39	0,06000
20	99	0,15231
21	98	0,15077
22	122	0,18769
22.2	3	0,00462
23	84	0,12923
23.2	3	0,00462
24	91	0,14000
25	67	0,10308
26	23	0,03538
27	8	0,01231
28	1	0,00154

Tabela 4.8.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* FGA:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
272	282,0555

Tabela 4.8.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* FGA:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,7563 \pm 0,0242$

Tabela 4.8.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* FGA:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,8679	PD = 0,9674	Pex = 0,7299	PIC =0,8518

4.9. Locus D5S818Tabela 4.9.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* D5S818:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
8 - 8	0	0,0000
9 - 8	0	0,0230
9 - 9	0	0,1620
10 - 8	0	0,0490
10 - 9	1	0,7400
10 - 10	0	0,7640
11 - 8	0	0,3420
11 - 9	7	5,1310
11 - 10	11	10,9460
11 - 11	37	37,7980
12 - 8	1	0,3700
12 - 9	5	5,5470
12 - 10	9	11,8340
12 - 11	82	82,0960
12 - 12	50	44,1910
13 - 8	0	0,2050
13 - 9	2	3,0740
13 - 10	11	6,5580
13 - 11	44	45,4950
13 - 12	42	49,1830
13 - 13	16	13,5250
14 - 8	0	0,0110
14 - 9	0	0,1620
14 - 1	0	0,3450
14 - 11	4	2,3940
14 - 12	1	2,5890
14 - 13	2	1,4350
14 - 14	0	0,0320

Tabela 4.9.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* D5S818:

Alelo	n	Frequência
8	1	0,00154
9	15	0,02308
10	32	0,04923
11	222	0,34154
12	240	0,36923
13	133	0,20462
14	7	0,01077

Tabela 4.9.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* D5S818:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
222	228,527

Tabela 4.9.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* D5S818:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,7443 \pm 0,0178$

Tabela 4.9.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* D5S818:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,7032	PD = 0,8499	Pex = 0,4462	PIC = 0,6473

4.10. Locus D13S317Tabela 4.10.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* D13S317:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
8 - 8	5	5,764
9 - 8	3	5,362
9 - 9	1	1,202
10 - 8	3	3,217
10 - 9	3	1,479
10 - 10	0	0,425
11 - 8	33	30,430
11 - 9	14	13,991
11 - 10	9	8,394
11 - 11	34	39,524
12 - 8	26	22,253
12 - 9	10	10,231
12 - 10	7	6,139
12 - 11	66	58,062
12 - 12	17	21,102
13 - 8	9	9,920
13 - 9	3	4,561
13 - 10	2	2,737
13 - 11	28	25,883
13 - 12	16	18,928
13 - 13	5	4,162
14 - 8	3	4,156
14 - 9	5	1,911
14 - 10	0	1,146
14 - 11	9	10,843
14 - 12	7	7,929
14 - 13	6	3,535
14 - 14	0	0,716
15 - 8	0	0,134
15 - 9	0	0,062
15 - 10	0	0,037
15 - 11	0	0,350

15 - 12	0	0,256
15 - 13	0	0,114
15 - 14	1	0,048
15 - 15	0	0,000

Tabela 4.10.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* D13S317:

Alelo	n	Frequência
8	87	0,13385
9	40	0,06154
10	24	0,03692
11	227	0,34923
12	166	0,25538
13	74	0,11385
14	31	0,04769
15	1	0,00154

Tabela 4.10.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* D13S317:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
263	252,1048

Tabela 4.10.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* D13S317:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,5707 \pm 0,0194$

Tabela 4.10.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o locus D13S317:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,7757	PD = 0,9107	Pex = 0,5741	PIC =0,7433

4.11. Locus D7S820Tabela 4.11.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* D7S820:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
7 - 7	1	0,102
8 - 7	3	1,738
8 - 8	8	6,735
9 - 7	2	1,405
9 - 8	15	11,008
9 - 9	3	4,391
10 - 7	3	3,680
10 - 8	30	28,823
10 - 9	26	23,304
10 - 10	33	30,356
11 - 7	1	2,459
11 - 8	17	19,263
11 - 9	9	15,575
11 - 10	30	40,781
11 - 11	23	13,525
12 - 7	1	2,108
12 - 8	11	16,512
12 - 9	16	13,350
12 - 10	40	34,955
12 - 11	26	23,362
12 - 12	6	9,924
13 - 7	0	0,388
13 - 8	2	3,042
13 - 9	2	2,459
13 - 10	3	6,439
13 - 11	4	4,304
13 - 12	8	3,689
13 - 13	1	0,324
14 - 7	0	0,018
14 - 8	0	0,145
14 - 9	0	0,117
14 - 10	1	0,307

14 - 11	0	0,205
14 - 12	0	0,176
14 - 13	0	0,032
14 - 14	0	0,000

Tabela 4.11.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* D7S820:

Alelo	n	Frequência
7	12	0,01846
8	94	0,14462
9	76	0,11692
10	199	0,30615
11	133	0,20462
12	114	0,17538
13	21	0,03231
14	1	0,00154

Tabela 4.11.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* D7S820:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
250	259,6425

Tabela 4.11.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* D7S820:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,0194 \pm 0,0054$

Tabela 4.11.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* D7S820:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,7989	PD = 0,9273	Pex = 0,6038	PIC = 0,7688

4.12. Locus TPOXTabela 4.12.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* TPOX:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
6 - 6	0	0,000
7 - 6	0	0,003
7 - 7	0	0,002
8 - 6	0	0,521
8 - 7	1	1,042
8 - 8	84	87,755
9 - 6	0	0,122
9 - 7	0	0,243
9 - 8	46	41,143
9 - 9	3	4,747
10 - 6	1	0,080
10 - 7	0	0,160
10 - 8	29	27,082
10 - 9	3	6,330
10 - 10	2	2,043
11 - 6	0	0,256
11 - 7	1	0,512
11 - 8	84	86,453
11 - 9	24	20,206
11 - 10	15	13,300
11 - 11	20	21,102
12 - 6	0	0,017
12 - 7	0	0,034
12 - 8	9	5,729
12 - 9	0	1,339
12 - 10	0	0,881
12 - 11	2	2,814
12 - 12	0	0,085
13 - 6	0	0,002
13 - 7	0	0,003
13 - 8	1	0,521
13 - 9	0	0,122

13 - 10	0	0,080
13 - 11	0	0,256
13 - 12	0	0,017
13 - 13	0	0,000

Tabela 4.12.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* TPOX:

Alelo	n	Frequência
6	1	0,00154
7	2	0,00308
8	338	0,52000
9	79	0,12154
10	52	0,08000
11	166	0,25538
12	11	0,01692
13	1	0,00154

Tabela 4.12.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* TPOX:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
216	209,2666

Tabela 4.12.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* TPOX:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,6294 \pm 0,0228$

Tabela 4.12.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* TPOX:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,6439	PD = 0,7915	Pex = 0,3992	PIC =0,5930

4.13. Locus CSF1POTabela 4.13.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* CSF1PO:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
8 - 8	0	0,002
9 - 8	0	0,043
9 - 9	0	0,140
10 - 8	0	0,512
10 - 9	1	3,581
10 - 10	15	21,102
11 - 8	0	0,610
11 - 9	5	4,271
11 - 10	63	50,644
11 - 11	29	30,051
12 - 8	1	0,669
12 - 9	5	4,681
12 - 10	61	55,504
12 - 11	58	66,203
12 - 12	38	36,111
13 - 8	1	0,145
13 - 9	3	1,014
13 - 10	10	12,022
13 - 11	11	14,339
13 - 12	15	15,715
13 - 13	3	1,666
14 - 8	0	0,018
14 - 9	0	0,129
14 - 10	1	1,535
14 - 11	3	1,831
14 - 12	1	2,006
14 - 13	1	0,435
14 - 14	0	0,023

Tabela 4.13.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* CSF1PO:

Alelo	n	Frequência
8	2	0,00308
9	14	0,02154
10	166	0,25538
11	198	0,30462
12	217	0,33385
13	47	0,07231
14	6	0,00923

Tabela 4.13.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* CSF1PO:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
240	235,906

Tabela 4.13.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* CSF1PO:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,1388 \pm 0,0144$

Tabela 4.13.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* CSF1PO:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,7759	PD = 0,8703	Pex = 0,4757	PIC = 0,6743

4.14. Locus Penta DTabela 4.14.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* Penta D:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
2.2 - 7	0	0,006
2.2 - 8	1	0,068
2.2 - 9	0	0,672
2.2 - 10	0	0,450
2.2 - 11	1	0,789
2.2 - 12	0	0,672
2.2 - 13	1	0,851
2.2 - 14	1	0,370
2.2 - 15	0	0,074
2.2 - 16	0	0,018
2.2 - 17	0	0,012
2.2 - 2.2	0	0,009
7 - 7	0	0,000
8 - 7	0	0,017
8 - 8	0	0,085
9 - 7	1	0,168
9 - 8	0	1,847
9 - 9	13	9,069
10 - 7	0	0,112
10 - 8	2	1,237
10 - 9	20	12,260
10 - 10	2	4,049
11 - 7	0	0,197
11 - 8	1	2,169
11 - 9	19	21,498
11 - 10	14	14,398
11 - 11	12	12,524
12 - 7	0	0,168
12 - 8	3	1,847
12 - 9	10	18,307
12 - 10	9	12,260
12 - 11	23	21,498

12 - 12	15	9,069
13 - 7	0	0,213
13 - 8	4	2,339
13 - 9	20	23,177
13 - 10	14	15,522
13 - 11	34	27,217
13 - 12	22	23,177
13 - 13	14	14,565
14 - 7	0	0,092
14 - 8	0	1,017
14 - 9	9	10,077
14 - 10	8	6,749
14 - 11	11	11,834
14 - 12	6	10,077
14 - 13	14	12,758
14 - 14	4	2,727
15 - 7	0	0,018
15 - 8	0	0,203
15 - 9	4	2,015
15 - 10	2	1,350
15 - 11	1	2,367
15 - 12	3	2,015
15 - 13	1	2,552
15 - 14	1	1,109
15 - 15	0	0,102
16 - 7	0	0,005
16 - 8	0	0,051
16 - 9	0	0,504
16 - 10	0	0,337
16 - 11	0	0,592
16 - 12	2	0,504
16 - 13	0	0,638
16 - 14	1	0,277
16 - 15	0	0,055
16 - 16	0	0,005
17 - 7	0	0,003
17 - 8	0	0,034
17 - 9	0	0,336
17 - 10	0	0,225
17 - 11	0	0,394
17 - 12	1	0,336
17 - 13	0	0,425
17 - 14	1	0,185
17 - 15	0	0,037
17 - 16	0	0,009
17 - 17	0	0,002

Tabela 4.14.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* Penta D:

Alelo	n	Frequência
2.2	4	0,00615
7	1	0,00154
8	11	0,01692
9	109	0,16769
10	73	0,11231
11	128	0,19692
12	109	0,16769
13	138	0,21231
14	60	0,09231
15	12	0,01846
16	3	0,00462
17	2	0,00308

Tabela 4.14.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* Penta D:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
265	272,7935

Tabela 4.14.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* Penta D:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,0784 \pm 0,0176$

Tabela 4.14.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o *locus* Penta D:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,8394	PD = 0,9525	Pex = 0,6742	PIC = 0,8172

4.15. Locus Penta ETabela 4.15.1 - Número de genótipos observados e esperados no *locus* Penta E:

Genótipos	Número de genótipos:	
	Observados	Esperados
5 - 5	0	1,391
6 - 5	0	0,133
6 - 6	0	0,002
7 - 5	7	6,427
7 - 6	0	0,299
7 - 7	12	7,174
8 - 5	0	0,530
8 - 6	0	0,025
8 - 7	2	1,196
8 - 8	0	0,043
9 - 5	1	0,530
9 - 6	0	0,025
9 - 7	0	1,196
9 - 8	0	0,099
9 - 9	0	0,043
10 - 5	8	3,578
10 - 6	0	0,166
10 - 7	7	8,071
10 - 8	0	0,666
10 - 9	1	0,666
10 - 10	1	2,205
11 - 5	4	5,897
11 - 6	0	0,274
11 - 7	15	13,302
11 - 8	1	1,097
11 - 9	1	1,097
11 - 10	5	7,405
11 - 11	5	6,034
12 - 5	5	8,216
12 - 6	0	0,382
12 - 7	18	18,533

12 - 8	1	1,529
12 - 9	1	1,529
12 - 10	7	10,317
12 - 11	20	17,005
12 - 12	15	11,750
13 - 5	8	4,638
13 - 6	0	0,216
13 - 7	5	10,462
13 - 8	2	0,863
13 - 9	1	0,863
13 - 10	4	5,824
13 - 11	7	9,599
13 - 12	13	13,374
13 - 13	9	3,721
14 - 5	3	2,518
14 - 6	0	0,117
14 - 7	3	5,680
14 - 8	0	0,468
14 - 9	0	0,468
14 - 10	3	3,162
14 - 11	9	5,211
14 - 12	8	7,260
14 - 13	3	4,099
14 - 14	3	1,083
15 - 5	1	1,921
15 - 6	2	0,089
15 - 7	4	4,334
15 - 8	1	0,357
15 - 9	1	0,357
15 - 10	3	2,413
15 - 11	5	3,977
15 - 12	4	5,541
15 - 13	3	3,128
15 - 14	0	1,698
15 - 15	1	0,626
16 - 5	0	1,524
16 - 6	0	0,071
16 - 7	5	3,438
16 - 8	0	0,284
16 - 9	0	0,284
16 - 10	4	1,914
16 - 11	3	3,154
16 - 12	3	4,394
16 - 13	4	2,481
16 - 14	1	1,347
16 - 15	0	1,028

16 - 16	1	0,390
17 - 5	2	1,988
17 - 6	0	0,092
17 - 7	2	4,484
17 - 8	1	0,370
17 - 9	1	0,370
17 - 10	5	2,496
17 - 11	3	4,114
17 - 12	4	5,732
17 - 13	1	3,236
17 - 14	0	1,757
17 - 15	3	1,341
17 - 16	0	1,063
17 - 17	4	0,670
18 - 5	1	0,464
18 - 6	0	0,022
18 - 7	1	1,046
18 - 8	0	0,086
18 - 9	0	0,086
18 - 10	1	0,582
18 - 11	1	0,960
18 - 12	3	1,337
18 - 13	0	0,755
18 - 14	0	0,410
18 - 15	0	0,313
18 - 16	0	0,248
18 - 17	0	0,324
18 - 18	0	0,032
19 - 5	1	0,994
19 - 6	0	0,046
19 - 7	1	2,242
19 - 8	0	0,185
19 - 9	0	0,185
19 - 10	4	1,248
19 - 11	2	2,057
19 - 12	5	2,866
19 - 13	1	1,618
19 - 14	0	0,878
19 - 15	0	0,670
19 - 16	1	0,532
19 - 17	0	0,693
19 - 18	0	0,162
19 - 19	0	0,162
20 - 5	0	0,265
20 - 6	0	0,012
20 - 7	2	0,598

20 - 8	0	0,049
20 - 9	0	0,049
20 - 10	0	0,333
20 - 11	2	0,549
20 - 12	0	0,764
20 - 13	0	0,431
20 - 14	0	0,234
20 - 15	0	0,179
20 - 16	0	0,142
20 - 17	0	0,185
20 - 18	0	0,043
20 - 19	0	0,092
20 - 20	0	0,009
21 - 5	1	0,398
21 - 6	0	0,018
21 - 7	0	0,897
21 - 8	0	0,074
21 - 9	1	0,074
21 - 10	0	0,499
21 - 11	1	0,823
21 - 12	1	1,146
21 - 13	0	0,647
21 - 14	2	0,351
21 - 15	0	0,268
21 - 16	0	0,213
21 - 17	0	0,277
21 - 18	0	0,065
21 - 19	0	0,139
21 - 20	0	0,037
21 - 21	0	0,023
22 - 5	1	0,199
22 - 6	0	0,009
22 - 7	1	0,448
22 - 8	0	0,037
22 - 9	0	0,037
22 - 10	0	0,250
22 - 11	0	0,411
22 - 12	1	0,573
22 - 13	0	0,324
22 - 14	0	0,176
22 - 15	0	0,134
22 - 16	0	0,106
22 - 17	0	0,139
22 - 18	0	0,032
22 - 19	0	0,069
22 - 20	0	0,018

22 - 21	0	0,028
22 - 22	0	0,005

Tabela 4.15.2 - Frequências alélicas observadas no *locus* Penta E:

Alelo	n	Frequência
5	43	0,06615
6	2	0,00308
7	97	0,14923
8	8	0,01231
9	8	0,01231
10	54	0,08308
11	89	0,13692
12	124	0,19077
13	70	0,10769
14	38	0,05846
15	29	0,04462
16	23	0,03538
17	30	0,04615
18	7	0,01077
19	15	0,02308
20	4	0,00615
21	6	0,00923
22	3	0,00462

Tabela 4.15.3 - Número de heterozigotos observados e esperados no *locus* Penta E:

Número de heterozigotos	
Observados	Esperados
274	289,6363

Tabela 4.15.4 - Teste exacto (P) do equilíbrio Hardy-Weinberg no *locus* Penta E:

Equilíbrio Hardy-Weinberg
$P = 0,1124 \pm 0,0184$

Tabela 4.15.5 - Parâmetros estatísticos de eficácia *a priori* obtidos para o locus Penta E:

Parâmetros Estatísticos de eficácia <i>a priori</i>			
H = 0,8912	PD = 0,9776	Pex = 0,7794	PIC =0,8801

4.16. Teste da Independência Alélica**Tabela 4.16.1** - Teste da Independência alélica entre as várias combinações de pares de *loci* na população do Norte de Portugal

Locus 1 - Locus 2	P $\pm$ desvio padrão
D3S1358 - VWA	0,68554 $\pm$ 0,03650
D3S1358 - D16S539	0,01661 $\pm$ 0,00760
VWA - D16S539	0,99390 $\pm$ 0,00423
D3S1358 - D8S1179	0,17196 $\pm$ 0,03162
VWA - D8S1179	0,76605 $\pm$ 0,03751
D16S539 - D8S1179	0,58075 $\pm$ 0,04415
D3S1358 - D21S11	0,15613 $\pm$ 0,03101
VWA - D21S11	0,41245 $\pm$ 0,04615
D16S539 - D21S11	0,93828 $\pm$ 0,01941
D8S1179 - D21S11	0,37659 $\pm$ 0,04245
D3S1358 - D18S51	0,65141 $\pm$ 0,04270
VWA - D18S51	0,82429 $\pm$ 0,03334
D16S539 - D18S51	0,32498 $\pm$ 0,04273
D8S1179 - D18S51	0,37316 $\pm$ 0,04585
D21S11 - D18S51	0,85286 $\pm$ 0,03104
D3S1358 - TH01	0,40150 $\pm$ 0,03920
VWA - TH01	0,24622 $\pm$ 0,03484
D16S539 - TH01	0,59219 $\pm$ 0,04046
D8S1179 - TH01	0,52969 $\pm$ 0,04141
D21S11 - TH01	0,25722 $\pm$ 0,03664
D18S51 - TH01	0,91044 $\pm$ 0,02526
D3S1358 - FGA	0,07509 $\pm$ 0,02128
VWA - FGA	0,70117 $\pm$ 0,04270
D16S539 - FGA	0,81026 $\pm$ 0,03572
D8S1179 - FGA	0,22394 $\pm$ 0,03750
D21S11 - FGA	0,83401 $\pm$ 0,03303
D18S51 - FGA	0,47029 $\pm$ 0,04697
TH01 - FGA	0,96785 $\pm$ 0,01209
D3S1358 - D5S818	0,64309 $\pm$ 0,03568
VWA - D5S818	0,71723 $\pm$ 0,03518
D16S539 - D5S818	0,28477 $\pm$ 0,03680
D8S1179 - D5S818	0,38593 $\pm$ 0,04268
D21S11 - D5S818	0,34206 $\pm$ 0,04026
D18S51 - D5S818	0,26787 $\pm$ 0,03948

TH01 - D5S818	0,21127 ± 0,03333
FGA - D5S818	0,41862 ± 0,04542
D3S1358 - D13S317	0,28190 ± 0,03705
VWA - D13S317	0,93742 ± 0,01567
D16S539 - D13S317	0,35643 ± 0,04145
D8S1179 - D13S317	0,16053 ± 0,03247
D21S11 - D13S317	0,31217 ± 0,04441
D18S51 - D13S317	0,54556 ± 0,04478
TH01 - D13S317	0,37434 ± 0,03855
FGA - D13S317	0,15044 ± 0,03210
D5S818 - D13S317	0,25132 ± 0,03527
D3S1358 - D7S820	0,28207 ± 0,03532
VWA - D7S820	0,61118 ± 0,04006
D16S539 - D7S820	0,77543 ± 0,03709
D8S1179 - D7S820	0,49177 ± 0,04584
D21S11 - D7S820	0,80069 ± 0,03658
D18S51 - D7S820	0,96293 ± 0,01704
TH01 - D7S820	0,29267 ± 0,03610
FGA - D7S820	0,96449 ± 0,01530
D5S818 - D7S820	0,97501 ± 0,01040
D13S317 - D7S820	0,63389 ± 0,04120
D3S1358 - TPOX	0,30805 ± 0,03607
VWA - TPOX	0,05392 ± 0,01629
D16S539 - TPOX	0,63765 ± 0,03934
D8S1179 - TPOX	0,66954 ± 0,04187
D21S11 - TPOX	0,10907 ± 0,02828
D18S51 - TPOX	0,78716 ± 0,03641
TH01 - TPOX	0,23215 ± 0,03173
FGA - TPOX	0,10923 ± 0,02714
D5S818 - TPOX	0,63654 ± 0,03668
D13S317 - TPOX	0,71912 ± 0,03522
D7S820 - TPOX	0,11543 ± 0,02326
D3S1358 - CSF1PO	0,69887 ± 0,03564
VWA - CSF1PO	0,72186 ± 0,03555
D16S539 - CSF1PO	0,59545 ± 0,04113
D8S1179 - CSF1PO	0,80060 ± 0,03152
D21S11 - CSF1PO	0,50650 ± 0,04582
D18S51 - CSF1PO	0,39816 ± 0,04270
TH01 - CSF1PO	0,73048 ± 0,03424
FGA - CSF1PO	0,14636 ± 0,03081
D5S818 - CSF1PO	0,54682 ± 0,03903
D13S317 - CSF1PO	0,30273 ± 0,04019
D7S820 - CSF1PO	0,71399 ± 0,03621
TPOX - CSF1PO	0,10906 ± 0,02147
D3S1358 - PentaD	0,78204 ± 0,03327
VWA - Penta D	0,96806 ± 0,01343

D16S539 - Penta D	$0,90685 \pm 0,02556$
D8S1179 - Penta D	$0,02569 \pm 0,01379$
D21S11 - Penta D	$0,24383 \pm 0,04005$
D18S51 - Penta D	$0,51077 \pm 0,04540$
TH01 - Penta D	$0,51161 \pm 0,04397$
FGA - Penta D	$0,15879 \pm 0,03462$
D5S818 - Penta D	$0,27934 \pm 0,03759$
D13S317 - Penta D	$0,28554 \pm 0,03766$
D7S820 - Penta D	$0,79855 \pm 0,03542$
TPOX - Penta D	$0,31177 \pm 0,03856$
CSF1PO - Penta D	$0,25066 \pm 0,03804$
D3S1358 - Penta E	$0,98100 \pm 0,01038$
VWA - Penta E	$0,57139 \pm 0,04725$
D16S539 - Penta E	$0,04579 \pm 0,01782$
D8S1179 - Penta E	$0,79395 \pm 0,03949$
D21S11 - Penta E	$0,92827 \pm 0,02406$
D18S51 - Penta E	$0,52447 \pm 0,04827$
TH01 - Penta E	$0,38999 \pm 0,04660$
FGA - Penta E	$0,72714 \pm 0,04331$
D5S818 - Penta E	$0,25277 \pm 0,04038$
D13S317 - Penta E	$0,83921 \pm 0,03302$
D7S820 - Penta E	$0,45378 \pm 0,04691$
TPOX - Penta E	$0,71814 \pm 0,04191$
CSF1PO - Penta E	$0,61394 \pm 0,04458$
PentaD - Penta E	$0,19075 \pm 0,03856$

4.17. Comparações Genético-Populacionais**Tabela 4.17.1.** - Distâncias de Nei, obtidas a partir das frequências alélicas das populações consideradas

	PtN	Aç	GB	HK	Índ	Esp	Par	PtC	Alb
PtN	0,0000								
Aç	0,0111	0,0000							
GB	0,1379	0,1455	0,0000						
HK	0,1197	0,1278	0,2338	0,0000					
Índ	0,0981	0,0934	0,1806	0,1143	0,0000				
Esp	0,0108	0,0203	0,1465	0,1338	0,0983	0,0000			
Par	0,0415	0,0379	0,1508	0,1201	0,0948	0,0471	0,0000		
PtC	0,0064	0,0119	0,1428	0,1161	0,0861	0,0073	0,0355	0,0000	
Alb	0,0211	0,0326	0,1608	0,1189	0,0896	0,0244	0,0502	0,0210	0,0000

(PtN: Portugal-Norte, Aç: Açores, GB: Guiné-Bissau, HK: Hong-Kong, Índ: Índia - Uttar-Pradesh,
Esp: Espanha-Nordeste, Par: Paraguai, PtC: Portugal Centro, Alb: Albânia)

```

      +Espanha-Nordeste
    +--5
    !  +Portugal-Centro
    !
  --7+Albânia
    !
    !  +Portugal-Norte
    !  !
  +--6  +Açores
    !  !
    +--4      +-----Guiné-Bissau
      !  +--2
      !  !  +---Hong-Kong
    +--3  +--1
      !      +---Índia
      !
    +-Paraguai

```

Figura 4.17.1 - Árvore filogenética obtida com base nas distâncias genéticas de Nei, a partir do método *Neighbor-Joining*, visualizada em *Microsoft® Notepad*, sem *bootstrapping*

```

                                +----Índia
                                +856.0
                        +483.0  +----Hong-Kong
                        !      !
                +710.0  +-----Guiné-Bissau
                !      !
        +426.0  +-----Paraguai
        !      !
    +373.0  +-----Albânia
    !      !
    !      !      +----Espanha-Nordeste
+873.0  +-----556.0
!      !      +----Portugal-Centro
!      !
!      +-----Portugal-Norte
!
+-----Açores

```

Figura 4.17.2 - Árvore filogenética obtida com base nas distâncias genéticas de Nei, a partir do método *Neighbor-Joining*, visualizada em *Microsoft® Notepad*, após *bootstrapping* (1000 iterações)

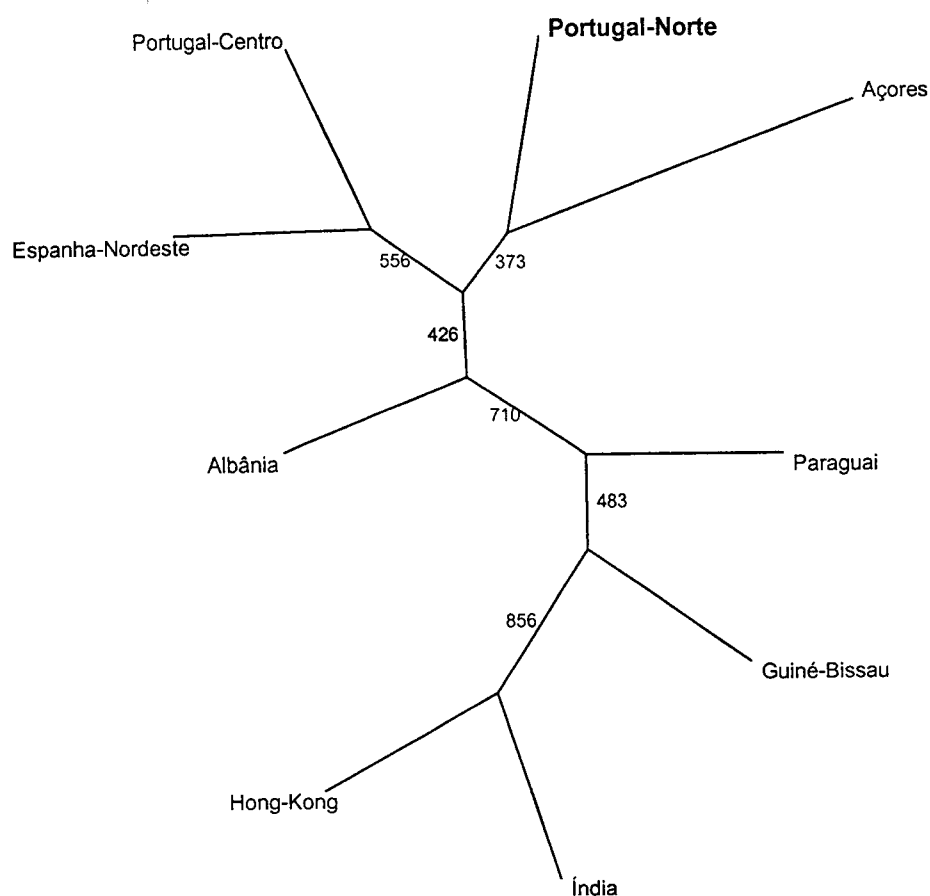


Figura 4.17.3 - Árvore filogenética obtida com base nas distâncias genéticas de Nei, a partir do método *Neighbor-Joining*, visualizada no programa *Tree View*, após *bootstrapping* (1000 iterações)

4.18. Aplicação do estudo do PowerPlex® 16 na conclusão de perícias médico-legais

Descrevem-se três casos, dois de identificação genética individual e um de suposta agressão sexual, para a conclusão dos quais foram usados os STRs autossómicos incluídos no PowerPlex® 16.

A escolha destes casos residiu no facto de os ter acompanhado de uma forma mais directa, porquanto os exames médico-legais efectuados antes da intervenção laboratorial, designadamente a colheita de amostras biológicas, teve uma intervenção pessoal, no âmbito das atribuições de um perito médico do INML.

Caso 1

Foram encontrados, na valeta de uma estrada, encobertos por alguns arbustos, restos cadavéricos, quase esqueletizados (partes moles preservadas nas regiões nadegueiras).

As características antropológicas permitiram deduzir tratar-se de um indivíduo do sexo masculino, com aproximadamente sessenta anos, com uma estatura cerca de cento e sessenta e dois centímetros, com sinais de fractura nos ossos da perna esquerda, não recente, pois havia formação de calo ósseo.

Pelas características tafonómicas, os restos encontravam-se inumados há menos de um ano.

Posteriormente, apresentaram-se no Serviço de Tanatologia Forense dois indivíduos (irmão e irmã), referindo que os citados restos cadavéricos poderiam pertencer ao seu pai, desaparecido há cerca de um ano.

As amostras biológicas disponíveis para se proceder à identificação dos restos cadavéricos foram músculo do cadáver e sangue dos pretensos filhos.

Em relação à amostra cadavérica, procedeu-se à diluição do DNA nas proporções 1:10 e 1:20, em água estéril.

A amplificação foi efectuada com o *kit* PowerPlex® 16, de acordo com as condições de amplificação e tipagem descritas no manual do *kit*, usando o DNA concentrado e as diluições atrás referidas.

O DNA do músculo, foi obtido utilizando a extracção com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Smith e col., 1990), seguida da purificação e concentração com Centricon® 100.

Quanto aos sangues, o DNA foi extraído com Chelex®, de acordo com a técnica atrás descrita.

A tipagem dos produtos de amplificação foi feita no sequenciador ABI 310, encontrando-se os respectivos electroforetogramas representados na Figura 4.18.1 (página 97).

Foram omitidos os electroforetogramas relativos ao DNA concentrado e à diluição 1:10, respeitantes ao músculo do cadáver, por apresentarem inúmeros picos, possivelmente resultantes da existência de produtos inespecíficos que interferiram na reacção de PCR. A maioria destes picos foram eliminados ou, pelo menos, a sua quantidade diminuiu consideravelmente após se ter efectuado uma maior diluição do DNA (1:20).

Quanto aos sangues, os electroforetogramas obtidos, demonstram permitir uma caracterização inequívoca dos alelos, de cada um dos *loci* analisados.

Os genótipos obtidos para cada uma destas amostras, encontram-se referenciados na Tabela 4.18.1 (página 98). A sua análise permite concluir que o pretenso pai não foi excluído e, quando comparado com um indivíduo tirado ao acaso da mesma população, apresenta uma probabilidade de paternidade de 99,9999896%. Ou seja, os resultados obtidos, através do estudo das amostras mencionadas, permitiram a identificação positiva do cadáver, graças ao uso da análise do DNA (PowerPlex® 16), não obstante o tempo que mediu entre a data provável da morte e a colheita de amostras biológicas ter sido relativamente longo (12 meses).

Acresce, ainda, que esta identificação positiva, através do estudo do DNA, corroborou a obtida usando os métodos tradicionais.

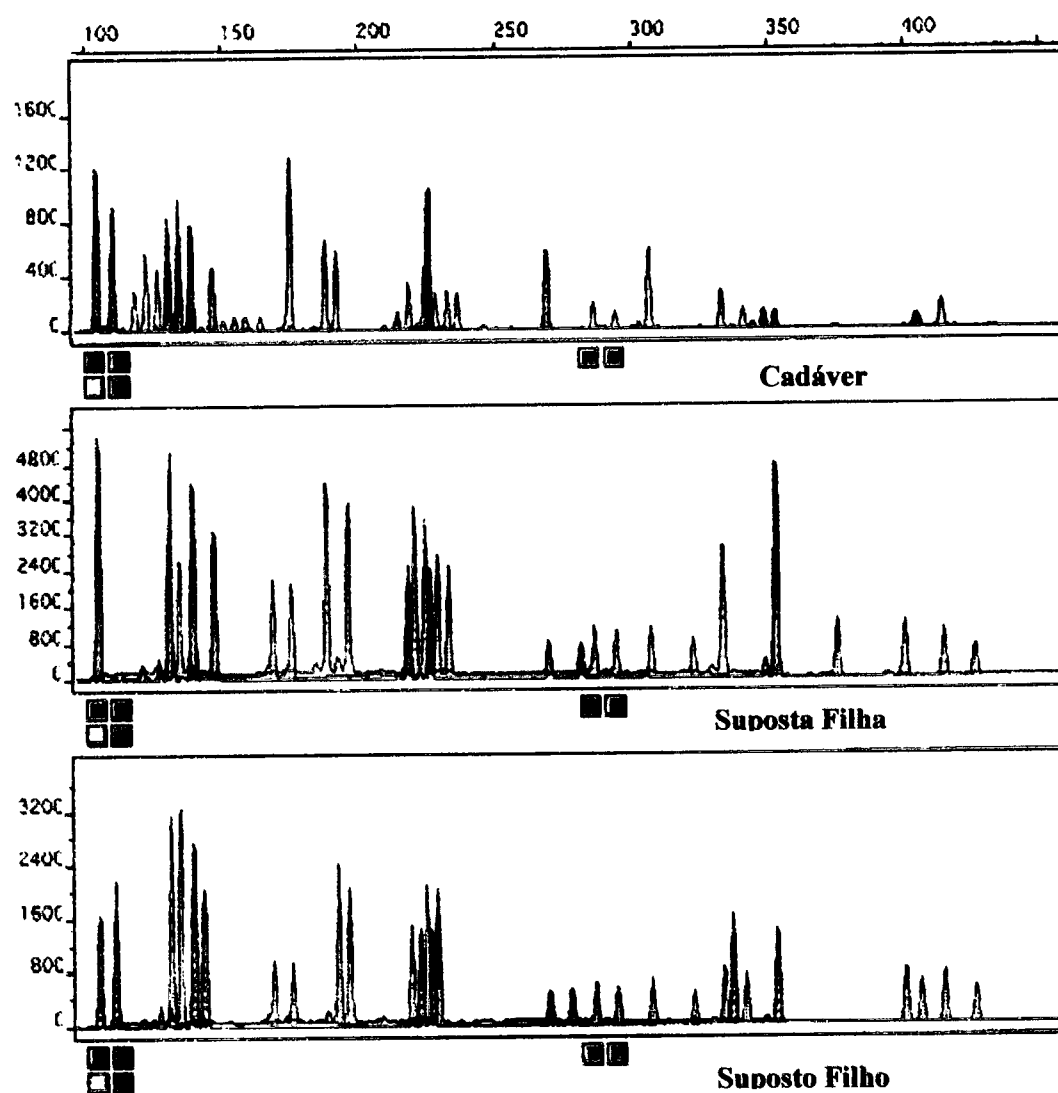


Figura 4.18.1 – Electroforetogramas, respeitantes ao caso 1, de identificação de restos cadavéricos

Tabela 4.18.1 – Genótipos dos restos cadavéricos e dos pretensos filhos

Sistemas estudados	Cadáver	Pretensa Filha	Pretenso Filho
D3S1358	17 - 18	17	17
vWA	14 - 16	14 - 16	14 - 15
D16S539	11 - 13	11 - 13	11 - 13
D8S1179	13	11 - 13	12 - 13
D21S11	29 - 32.2	31.2 - 32.2	29 - 31.2
D18S51	14	14 - 18	14 - 18
TH01	9.3	8 - 9.3	8 - 9.3
FGA	23 - 24	24	20 - 24
D5S818	11 - 12	11 - 12	12
D13S317	11 - 12	11 - 13	12 - 13
D7S820	9 - 12	8 - 9	9 - 10
TPOX	8	8 - 11	8 - 10
CSF1PO	10 - 12	10	10 - 12
Penta D	10 - 12	9 - 12	9 - 12
Penta E	5 - 11	5 - 15	11 - 15
Amelogenina	XY	X	XY

Caso 2

Numa fábrica de produtos químicos, deu-se uma explosão, seguida de incêndio, tendo falecido dois indivíduos.

Uma vez que se encontravam em estado de carbonização muito acentuada, não foi possível efectuar a identificação através do uso dos métodos tradicionais.

Graças à existência de uma ficha dentária, relativamente recente, foi possível identificar, provisoriamente, um dos cadáveres; porquanto, a identificação definitiva foi efectuada usando o estudo do DNA.

As amostras biológicas presentes ao Serviço de Genética e Biologia Forense para identificação do referido cadáver, foram os sangues colhidos a este e aos pretensos pais.

A extracção do DNA foi feita com Chelex[®], de acordo com o protocolo atrás descrito. A amplificação e a tipagem dos produtos de amplificação, foram realizados conforme o referido no caso anterior.

Os electroforetogramas obtidos para cada uma das amostras, encontram-se representados na Figura 4.18.2 e os respectivos genótipos na Tabela 4.18.2. A conclusão resultante da sua análise é que os pretensos pais não foram excluídos e, quando comparados com indivíduos tirados ao acaso da mesma população, apresentam uma probabilidade de maternidade e paternidade de 99,9999999%.

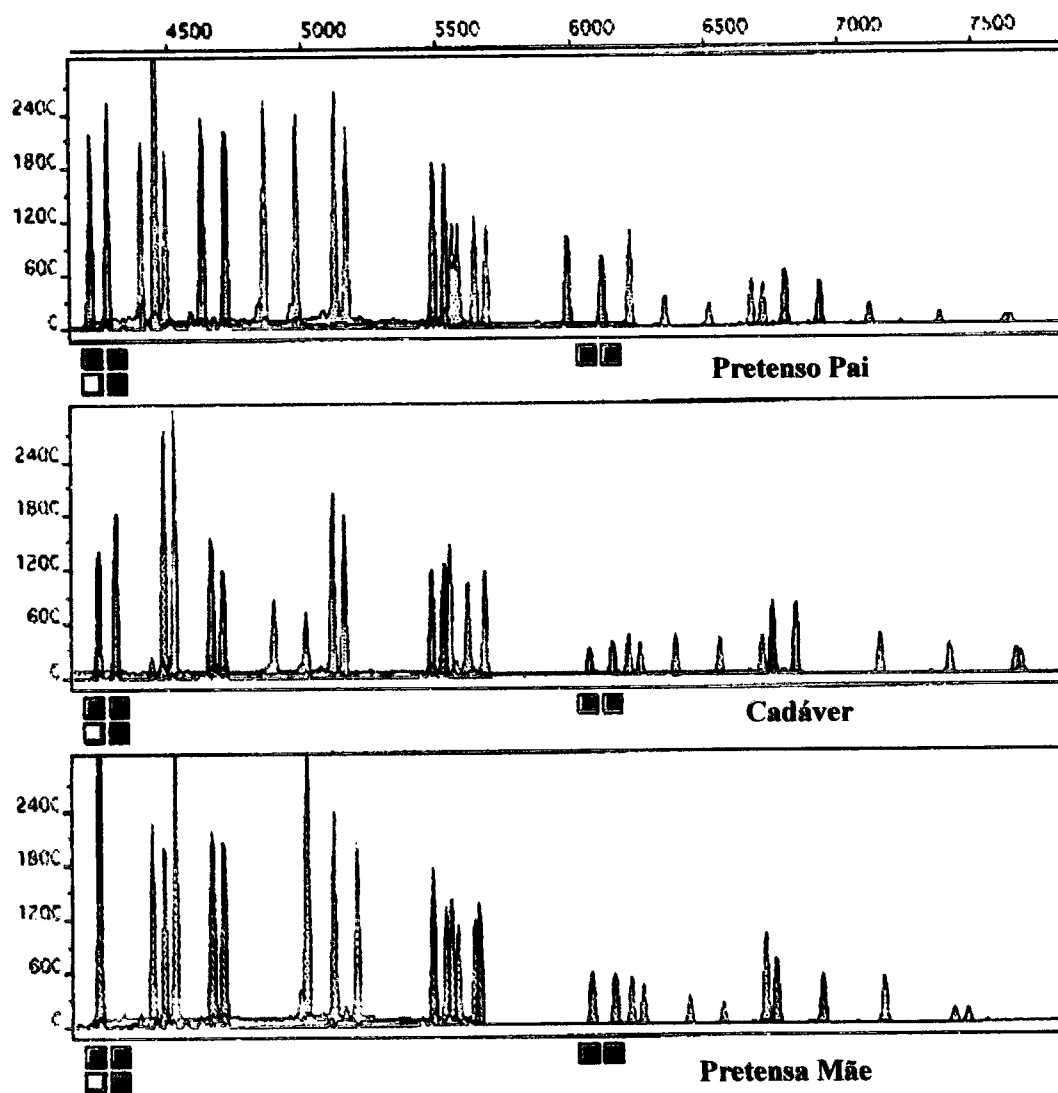


Figura 4.18.2 – Electroforetogramas, respeitantes ao caso 2, de identificação de restos cadavéricos

Tabela 4.18.2 – Genótipos dos restos cadavéricos e dos pretensos pais

Sistemas estudados	Pretenso Pai	Pretensa Mãe	Cadáver
D3S1358	16	15 - 16	16
vWA	15 - 17	15 - 16	15 - 16
D16S539	12	11 - 12	11 - 12
D8S1179	12 - 13	11 - 15	11 - 12
D21S11	31.2 - 32	30 - 31	30 - 32
D18S51	13 - 17	14 - 17	13 - 17
TH01	7 - 9.3	9.3	7 - 9.3
FGA	22 - 25	20 - 24	20 - 22
D5S818	9 - 11	11	11
D13S317	11 - 12	10 - 12	10 - 11
D7S820	12 - 13	9 - 11	9 - 12
TPOX	8 - 11	9 - 11	9 - 11
CSF1PO	10 - 11	10	10 - 11
Penta D	9 - 14	9 - 10	9 - 14
Penta E	5 - 15	5	5 - 15
Amelogenina	XY	X	XY

Caso 3

Menor de 16 anos, supostamente agredida sexualmente por indivíduo de identidade desconhecida. A queixosa apresentava marcas de traumatismo numa das hemifaces e escoriações num dos membros inferiores, compatíveis com a sua descrição da ocorrência.

Foi enviado material diverso, para o Serviço de Genética e Biologia Forense, proveniente da alegada vítima, designadamente, exsudado vaginal (zaragatoas do intróito e fundo de saco vaginais), peças de vestuário da mesma e um conjunto de pêlos púbicos cortados, aglutinados por substância de cor esbranquiçada, da qual se efectuou mancha em zaragatoa, tendo-se a partir da mesma extraído DNA.

Em relação às provas de orientação (reacção da fosfatase ácida) efectuadas nas manchas existentes nas peças de vestuário, exsudado vaginal e substância esbranquiçada atrás referida, a reacção foi positiva, apenas, relativamente à última amostra.

Quanto às provas de certeza (pesquisa de espermatozóides no exsudado vaginal e a Amelogenina, caracterizada neste exsudado e na aludida substância esbranquiçada), não foram observados espermatozóides e só relativamente à substância esbranquiçada se detectaram as bandas específicas dos cromossomas X e Y.

Posteriormente foi enviada uma zaragatoa bucal colhida no suspeito.

Os electroforetogramas relativos a estas amostras, ou seja, zaragatoas do intróito e fundo de saco vaginais colhidas à queixosa, fase vaginal e espermática, da substância esbranquiçada e zaragatoa bucal colhida ao suspeito, encontram-se na Figura 4.18.3.

Os genótipos correspondentes a cada uma destas amostras estão referidos na Tabela 4.18.3, a partir dos quais se pode concluir que as características genéticas do DNA extraído da fase vaginal da substância esbranquiçada, existente nos pêlos púbicos, são idênticas às características genéticas do DNA extraído das zaragatoas colhidas na vagina da queixosa. E, ainda, que as características genéticas do DNA extraído da fase

espermática da substância esbranquiçada, podem corresponder a uma mistura de células da alegada vítima e do suspeito.

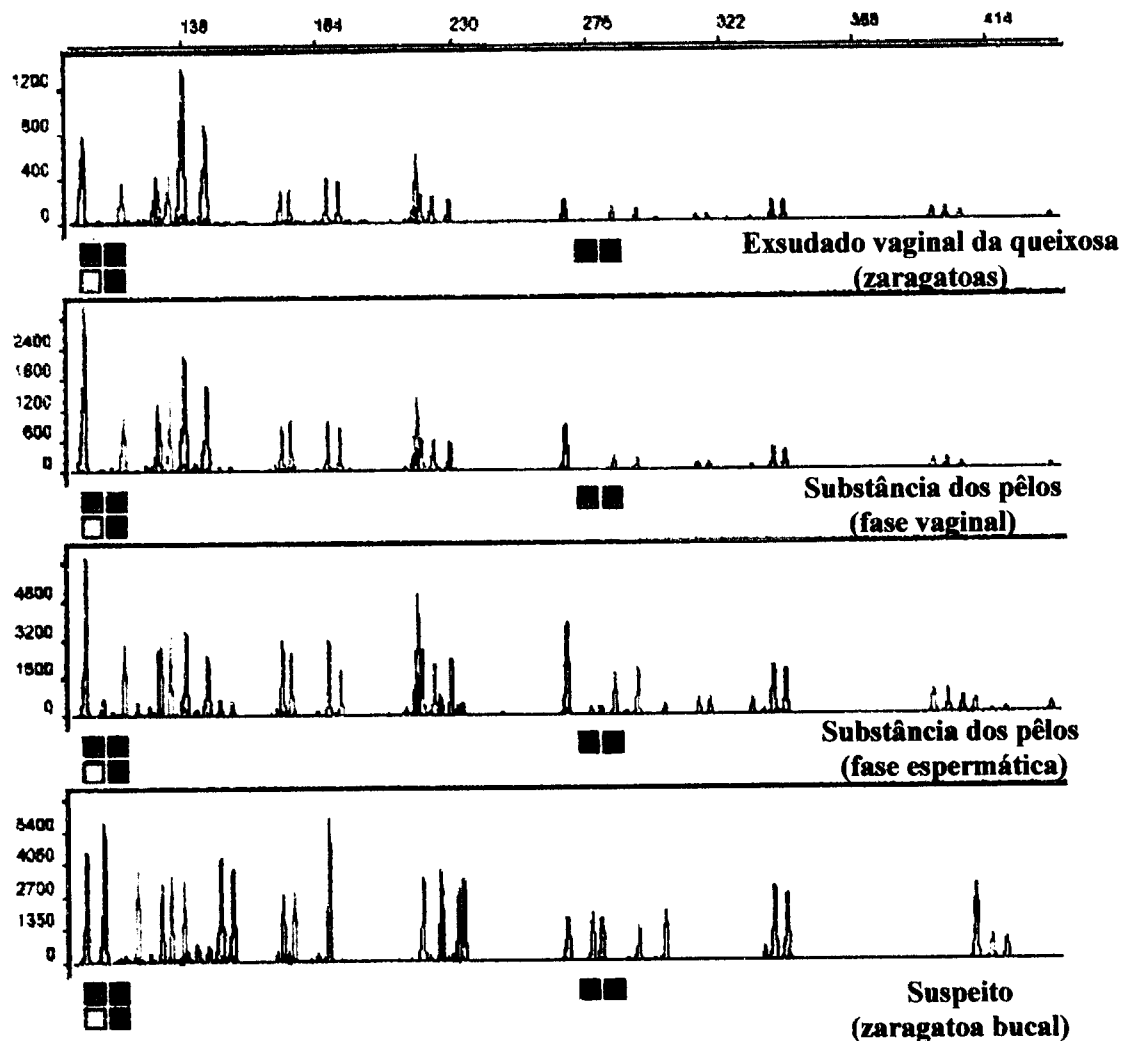


Figura 4.18.3 – Electroforetogramas, respeitantes ao caso 3, de agressão sexual

Tabela 4.18.3 – Genótipos, da zaragatoa vaginal da queixosa, da substância dos pêlos (fases vaginal e espermática) e do suspeito

Sistemas estudados	Zaragatoa Vaginal (Queixosa)	Zaragatoa da Substância dos pêlos (Fase Vaginal)	Zaragatoa da Substância dos pêlos (Fase Espermática)	Zaragatoa Bucal (Suspeito)
D3S1358	14,17	14,17	14,15,17	15,17
vWA	14,16	14,16	14,16,17,18	17,18
D16S539	11,13	11,13	9,11,13	9,13
D8S1179	11,14	11,14	11,13,14,15	13,15
D21S11	29	29	29,31,32.2	31,32.2
D18S51	16,17	16,17	13,16,17	13
TH01	9,9.3	9,9.3	9,9.3,10	9,10
FGA	21,22	21,22	21,22	21,22
D5S818	11,12	11,12	11,12,13	12,13
D13S317	11,12	11,12	11,12	11
D7S820	8,9	8,9	8,9,11	8,11
TPOX	8	8	8,11	8,11
CSF1PO	10,12	10,12	10,11,12,13	11,13
Penta D	8,9	8,9	8,9,11	11
Penta E	11,17	11,17	11,13,14,17	13,14
Amelogenina	X	X	XY	XY

5. DISCUSSÃO

Antes de se efectuar uma perícia médico-legal do âmbito da Genética e Biologia Forense tem de se proceder à escolha adequada dos marcadores genéticos a utilizar, devendo ser privilegiados aqueles que possuam adequado tamanho dos alelos para permitir a amplificação de vários *loci* em simultâneo (Urquhart e col., 1994); proporcionem elevados valores de probabilidade de exclusão *a priori* (casos de filiação) e poder de discriminação (casos de criminalística biológica); ajuste às condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg; ausência de ligamento entre eles;

A verificação destes 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 (condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg). Para além de se determinar se é possível o cálculo dos valores da Probabilidade de Paternidade e do Likelihood Ratio, mediante o uso combinado desses sistemas e a respectiva regra do produto (inexistência de associação alélica entre os *loci*).

O principal objectivo deste estudo consistiu na análise de vários *loci* microssatélite, para aplicação à resolução de casos forenses, usando o *kit* PowerPlex® 16. Este possui, entre outras vantagens, condições experimentais estandardizadas, porquanto os parâmetros de amplificação e de tipagem dos produtos amplificados, encontram-se descritos no manual do referido *kit* e todos os reagentes necessários à PCR, bem como o controlo positivo e os ladders alélicos, estão nele incluídos. Para além destas vantagens, estes *kits* antes de serem comercializados são validados para a análise de amostras forenses, o que representa uma indiscutível segurança e fiabilidade dos resultados obtidos.

Por outro lado, o número de amostras usado neste estudo populacional (n=325) foi suficientemente elevado, por forma a garantir que se tivessem detectado a maioria das variantes alélicas de cada um dos polimorfismos do DNA analisados.

Procedeu-se, ainda, à comparação das características da população do Norte de Portugal com as de outras populações europeias, bem como de outros grupos étnicos.

Descreveram-se ainda três casos da casuística registada no Serviço de Genética e Biologia Forense, nos quais houve acompanhamento pessoal, na qualidade de Perito Médico.

5.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Independência Alélica

Para se efectuar a valorização estatística de microssatélites autossómicos com aplicação médico-legal, é preciso verificar a existência de duas condições: Equilíbrio de Hardy-Weinberg e de Independência Alélica entre os *loci*.

Em relação à primeira, neste estudo, a aplicação do **teste exacto** de Guo e Thompson, nos quinze microssatélites, não mostrou valores de *P* inferiores a 0,05 (nível de significância escolhido), com a excepção do *locus* D7S820 (Tabela 5.1).

Este facto permite concluir que a população do Norte de Portugal se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os *loci*, excepto o D7S820.

Nestas circunstâncias, torna-se possível o uso das frequências alélicas obtidas no cálculo da Probabilidade de Paternidade (investigação biológica da paternidade) e Likelihood Ratio (criminalística biológica).

Tabela 5.1 - Valor de *P*, no teste exacto de Hardy-Weinberg, nos 15 *loci* estudados

D3S1358	vWA	D16S539	D8S1179	D21S11	D18S51	TH01	FGA
0,3707	0,5822	0,1057	0,1016	0,5395	0,5505	0,5824	0,7563
D5S818	D13S317	D7S820	TPOX	CSF1PO	Penta D	Penta E	
0,7443	0,5707	0,0194	0,6294	0,1388	0,0784	0,1124	

A aplicação do **Teste de Independência Alélica** (Equilíbrio de Ligamento), na população estudada, não revelou, para os diferentes pares de *loci*, valores inferiores a 0,05 (Tabela 4.16.1), com a exceção dos três seguintes:

- D3S1358 – D16S539 ($p=0,01661$) [cromossomas 3 e 16];
- D8S1179 – Penta D ($p=0,02569$) [cromossomas 8 e 21];
- D16S539 - Penta E ($p=0,04579$) [cromossomas 16 e 15].

Os baixos valores observados nos pares indicados poderão, eventualmente, ser devidos à existência de algum grau remanescente de diferenciação sub-populacional, uma vez que os marcadores se encontram localizados em pares cromossômicos distintos.

Não obstante estes resultados, parece que o uso da regra do produto, para combinar frequências genótípicas dos *loci* analisados, pode ser levada a efeito.

Consideramos, assim, que a população do Norte de Portugal cumpre, no geral, as duas condições acima descritas; estando, deste modo, satisfeitos dois dos pressupostos necessários para a utilização dos dados deste estudo na conclusão dos casos.

5.2. Parâmetros de interesse Médico-Legal

Em relação à **Probabilidade de Exclusão *a priori***, o valor médio obtido foi de 0,6069.

A **Probabilidade de Exclusão *a priori* Acumulada** foi de 0,999999533. Este valor, está acima do mínimo proposto na 5ª reunião do Grupo Espanhol e Português da ISFG, que é de 99,9%.

O outro parâmetro calculado foi o **Poder de Discriminação**, para o qual o valor médio é de 0,9195, sendo para cada um dos polimorfismos estudados superior a 0,8 com a excepção do *locus* TPOX, cujo valor é precisamente igual a este (Tabela 4.12.5).

Este, é o mínimo proposto por Urquhart e col. (1996), na selecção de loci para utilização médico-legal.

Quanto ao **Poder de Discriminação Acumulado**, o valor foi de 0,999999999.

O valor da **Heterozigosidade** média obtida foi de 0,7960.

Este, encontra-se acima de 0,7, valor proposto por Gill e col. (1996), na escolha de *loci* para aplicação em perícias médico-legais.

Todos os *loci*, com excepção do TPOX, têm valores acima daquele (Tabelas 4.12.5).

O valor médio obtido para o **Conteúdo em Informação Polimórfica**, foi de 0,7652.

Através dos valores obtidos, podemos afirmar que o conjunto dos quinze *loci*, do presente estudo, têm grande utilidade na resolução de perícias médico-legais.

Os valores mais elevados, obtidos para os parâmetros calculados, verificaram-se nos sistemas Penta E, D18S51 e FGA, que são os que apresentam um maior número de alelos diferentes (Tabela 5.2). Por isso, pode-se afirmar que estes *loci* possuem maior capacidade informativa que os restantes.

Quanto aos valores mais baixos, foram observados para os sistemas D5S818 e TPOX, (Tabela 5.2), com 7 e 8 alelos, respectivamente. Por outro lado, estes marcadores apresentam valores desequilibrados das respectivas frequências alélicas o que, também, condiciona os valores dos parâmetros atrás referidos.

Tabela 5.2 – Parâmetros estatísticos de interesse Médico-Legal e número de alelos diferentes, para cada *loci*, obtidos na população do Norte de Portugal

Sistema	Pex	PD	PIC	H	Nº Alelos
D3S1358	0,5833	0,9215	0,7566	0,7906	8
VWA	0,6198	0,9340	0,7803	0,8089	9
D16S539	0,5536	0,9034	0,7297	0,7661	7
D8S1179	0,6502	0,9425	0,7987	0,8224	10
D21S11	0,6846	0,9532	0,8208	0,8406	13
D18S51	0,7529	0,9728	0,8658	0,8797	13
TH01	0,5762	0,9177	0,7509	0,7853	6
FGA	0,7299	0,9674	0,8518	0,8679	13
D5S818	<i>0,4462</i>	<i>0,8499</i>	<i>0,6473</i>	<i>0,7032</i>	7
D13S317	0,5741	0,9107	0,7433	0,7757	8
D7S820	0,6038	0,9273	0,7688	0,7989	8
TPOX	<i>0,3992</i>	<i>0,7915</i>	<i>0,5930</i>	<i>0,6439</i>	8
CSF1PO	0,4757	0,8703	0,6743	0,7259	7
PENTA D	0,6742	0,9525	0,8172	0,8394	12
PENTA E	0,7794	0,9776	0,8801	0,8912	18

5.3. Comparações Genético-Populacionais

Foi efectuada uma **análise comparativa** relativamente à distribuição dos alelos, em cada *locus*, na população do Norte de Portugal e nas oito populações já referidas.

Assim, verifica-se que:

- O *locus* **D3S1358** apresenta uma distribuição maioritariamente unimodal em todas as populações comparadas. Os alelos 15 e 16 são os mais frequentes, pelo que, na opinião de alguns autores, (e.g. Nei e Chakraborty, 1976), serão, também, evolutivamente, os mais antigos. A população dos Açores apresenta os alelos 10 e 11, ausentes nas outras populações.

- O *locus* **vWA** mostra uma distribuição alélica unimodal (com a moda nos alelos 16 ou 17), com excepção da população de Hong-Kong, onde é bimodal (alelos 14 e 17). A amostra populacional da Índia é a única onde se pode observar o alelo 10. Não aparece o alelo 13 na população dos Açores, e o 12 e 13 na do Paraguai.

- O *locus* **D16S539** exhibe uma distribuição bimodal generalizada. Sendo as modas para os alelos 9 e 11, relativamente às populações europeias, da Guiné-Bissau e Hong-Kong.

- O *locus* **D8S1179** tem uma distribuição alélica, na maioria das populações unimodal (alelo 13), com excepção da população de Hong-Kong em que é multimodal (alelos 11, 13 e 15), sendo que apenas duas populações partilham o alelo 18 (Hong-Kong e Centro de Portugal).

- O *locus* **D21S11** apresenta uma distribuição alélica com unidades de repetição parciais. Foram descritos os alelos específicos 25.2, na amostra populacional do Centro de Portugal, 28.2 na de Hong-Kong e 34 e 36 na população da Guiné-Bissau.

- No *locus* **D18S51** a distribuição alélica é pouco uniforme, podendo ser unimodal, bimodal e multimodal. Foram observados os alelos específicos 9, na amostra populacional da Guiné-Bissau e 25, na da Índia.

- O *locus* **TH01** apresenta uma distribuição tendencialmente bimodal, sendo que as modas se encontram nos alelos 6 e 9.3 nas populações europeias, à excepção da Albânia e do Paraguai. Na população da Índia estas recaem sobre os alelos 6 e 9 e na de Hong-Kong nos alelos 7 e 9. Na amostra populacional da Guiné-Bissau, pode-se observar o alelo específico 5.

- O *locus* **FGA** tem uma distribuição alélica irregular, dada a presença de vários alelos com unidades de repetição parciais. Foram identificados os alelos específicos 16, na amostra populacional da Índia, 20.2 e 27.2 na da Espanha, 18.2 na população da Guiné-Bissau e 25.2 e 26.2 na de Hong-Kong.

- O *locus* **D5S818** apresenta uma distribuição unimodal em todas as amostras populacionais europeias. A frequência mais elevada encontra-se nos alelos 11 e 12. Em relação às outras populações, a distribuição é bimodal.

- O *locus* **D13S317** mostra uma distribuição tendencialmente bimodal. Na amostra populacional do Nordeste da Espanha, pode-se observar o alelo específico 16.

- O *locus* **D7S820** manifesta uma distribuição bimodal, para a maioria das populações, encontrando-se as modas para os alelos 8 e 10 relativamente às populações europeias e da Guiné-Bissau, sendo para as restantes os alelos 8 e 11. Foram descritos os alelos específicos 6 na amostra populacional da Índia e 15 na do Nordeste da Espanha.

- O *locus* **TPOX** apresenta uma distribuição bimodal encontrando-se as mais altas frequências para os alelos 8 e 11. Foram detectados os alelos específicos 13 na amostra populacional do Norte de Portugal e 15 na do Centro de Portugal.

- O *locus* **CSF1PO** tem uma distribuição maioritariamente unimodal, sendo os alelos 10, 11 e 12 os mais frequentes.

- O *locus* **Penta D** apresenta uma distribuição irregular das frequências alélicas nas várias populações estudadas, predominando o alelo 13 nas populações europeias. Na amostra populacional da Guiné-Bissau, pode-se observar o alelo específico 3.2.

- O *locus* **Penta E** apresenta, também, uma distribuição irregular das frequências alélicas nas várias populações estudadas, predominando o alelo 12 nas populações europeias. Na amostra populacional de Hong-Kong, pode-se observar o alelo específico 25.

Para efectuar as comparações genético-populacionais entre a população do Norte de Portugal e as oito populações estudadas, foram calculadas as distâncias genéticas de Nei (capítulo 4.17).

Os valores mais baixos de distância foram observados entre as amostras populacionais do Centro de Portugal (0,0064), Nordeste de Espanha (0,0108), Açores (0,0111) e a população do Norte de Portugal.

Os valores máximos foram encontrados relativamente às amostras populacionais de Guiné-Bissau (0,1379), Hong-Kong (0,1197) e Índia (0,0981).

Estes valores foram representados na árvore filogenética, obtida com base nas distâncias atrás referidas.

Ou seja, a árvore filogenética evidencia que as populações mais próximas da população do Norte de Portugal são aquelas que, geograficamente, lhe estão mais próximas (Centro de Portugal e Nordeste de Espanha), ou aquelas em que se verifica uma decisiva influência da nossa população na sua formação populacional, que é o caso dos Açores.

5.4. Aplicação do estudo do PowerPlex® 16 na conclusão de perícias médico-legais

Conforme ficou patente nas conclusões das três perícias descritas, o uso de STRs autossômicos altamente polimórficos é muito útil na resolução de casos médico-legais do âmbito da Genética e Biologia Forense, particularmente quando se usam *kits* comerciais com as características do PowerPlex® 16. Pois, para além das vantagens já mencionadas em relação a este *kit*, os resultados proporcionados são altamente informativos e perfeitamente reprodutíveis, como ficou particularmente demonstrado no último caso (caso 3), porquanto, para os diferentes *loci* estudados nas diversas amostras que foram presentes, os genótipos obtidos em relação ao mesmo indivíduo foram coincidentes.

Quanto aos casos de identificação, também ficou realçada a importância dos polimorfismos do DNA incluídos neste *kit*, pois em relação ao primeiro caso foi possível a identificação de restos cadavéricos, através dos seus pretensos filhos e no segundo caso, a identificação foi levada a cabo com base na caracterização daqueles polimorfismos nos seus pretensos pais.

Nas duas situações, as probabilidades obtidas foram elevadas (99,9999896% e 99,9999999%).

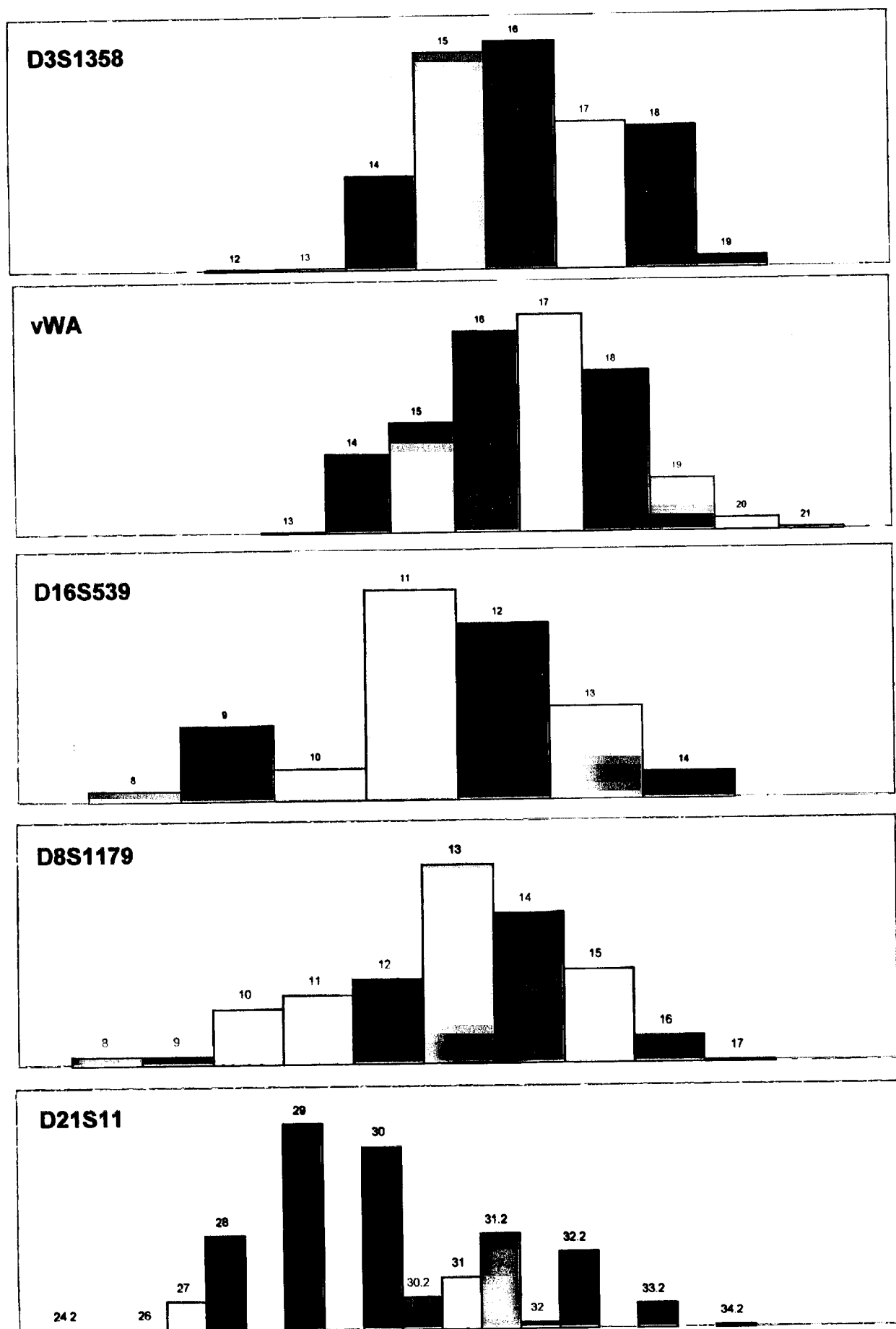


Figura 5.3.1 – Distribuição dos alelos, dos loci D3S1358, vWA, D16S539, D8S1179 e D21S11, observada na população do Norte de Portugal

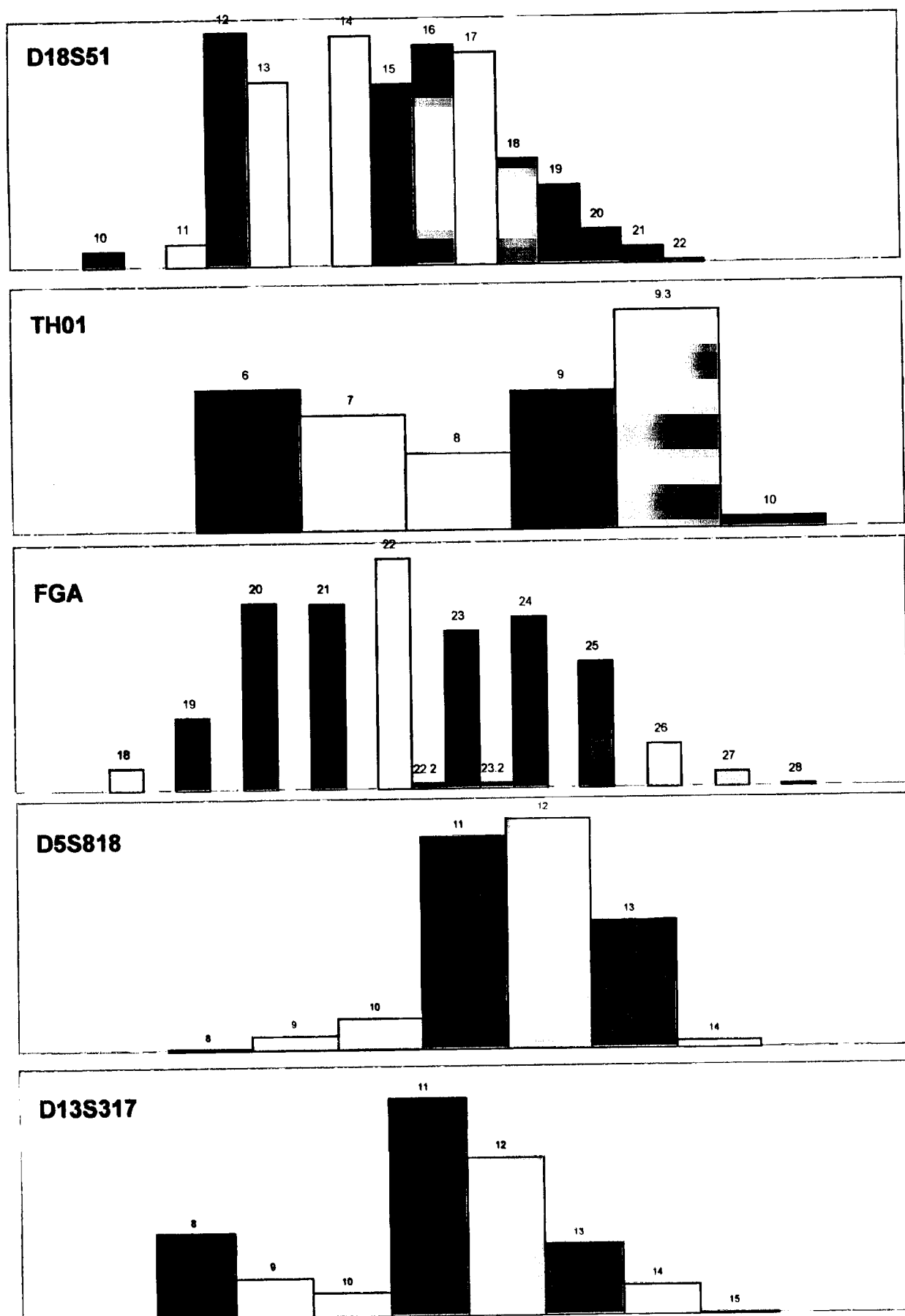


Figura 5.3.2 – Distribuição dos alelos, dos *loci* D18S51, TH01, FGA, D5S818 e D13S317, observada na população do Norte de Portugal

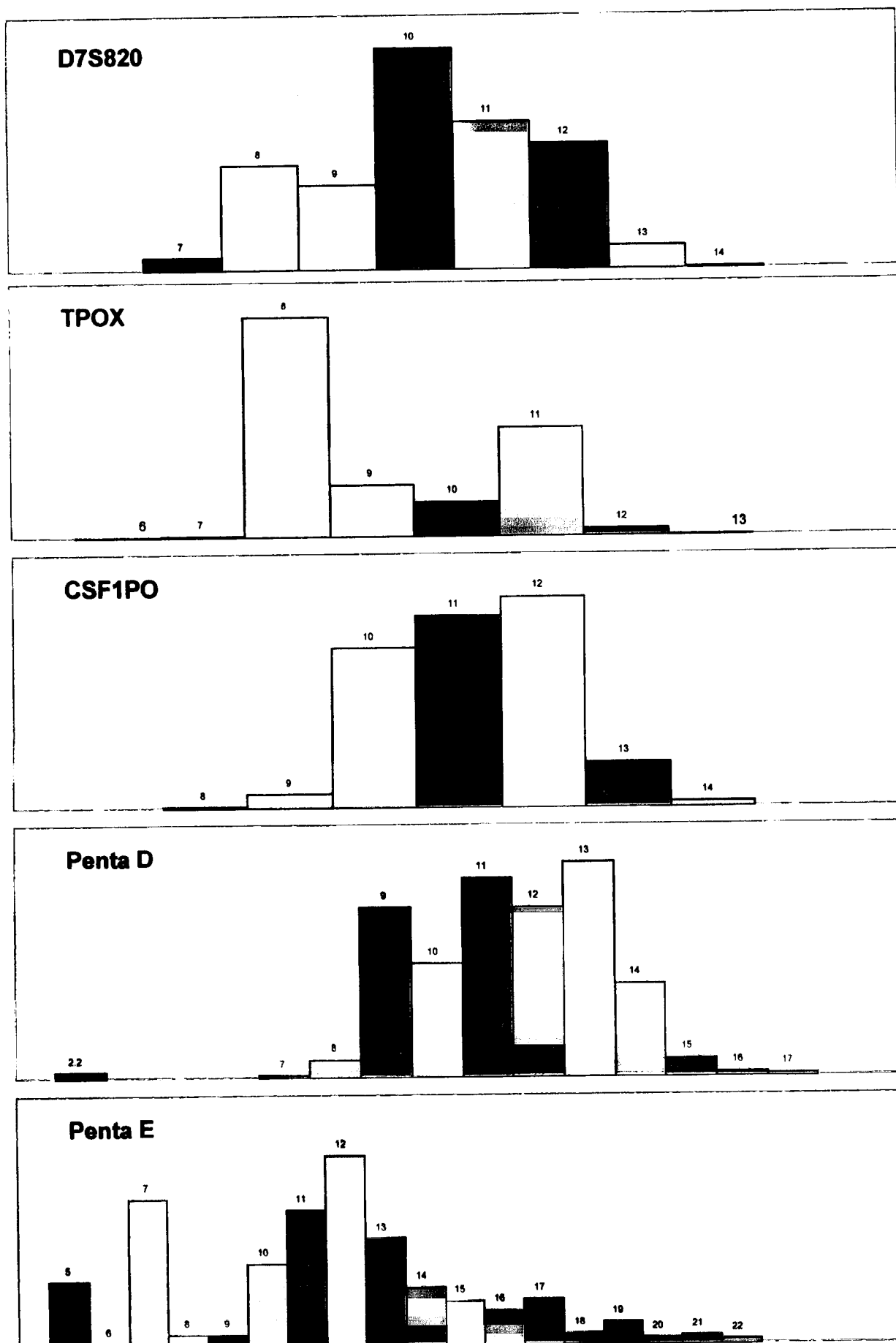


Figura 5.3.3 – Distribuição dos alelos, dos *loci* D7S820, TPOX, CSF1PO, Penta D e Penta E, observada na população do Norte de Portugal

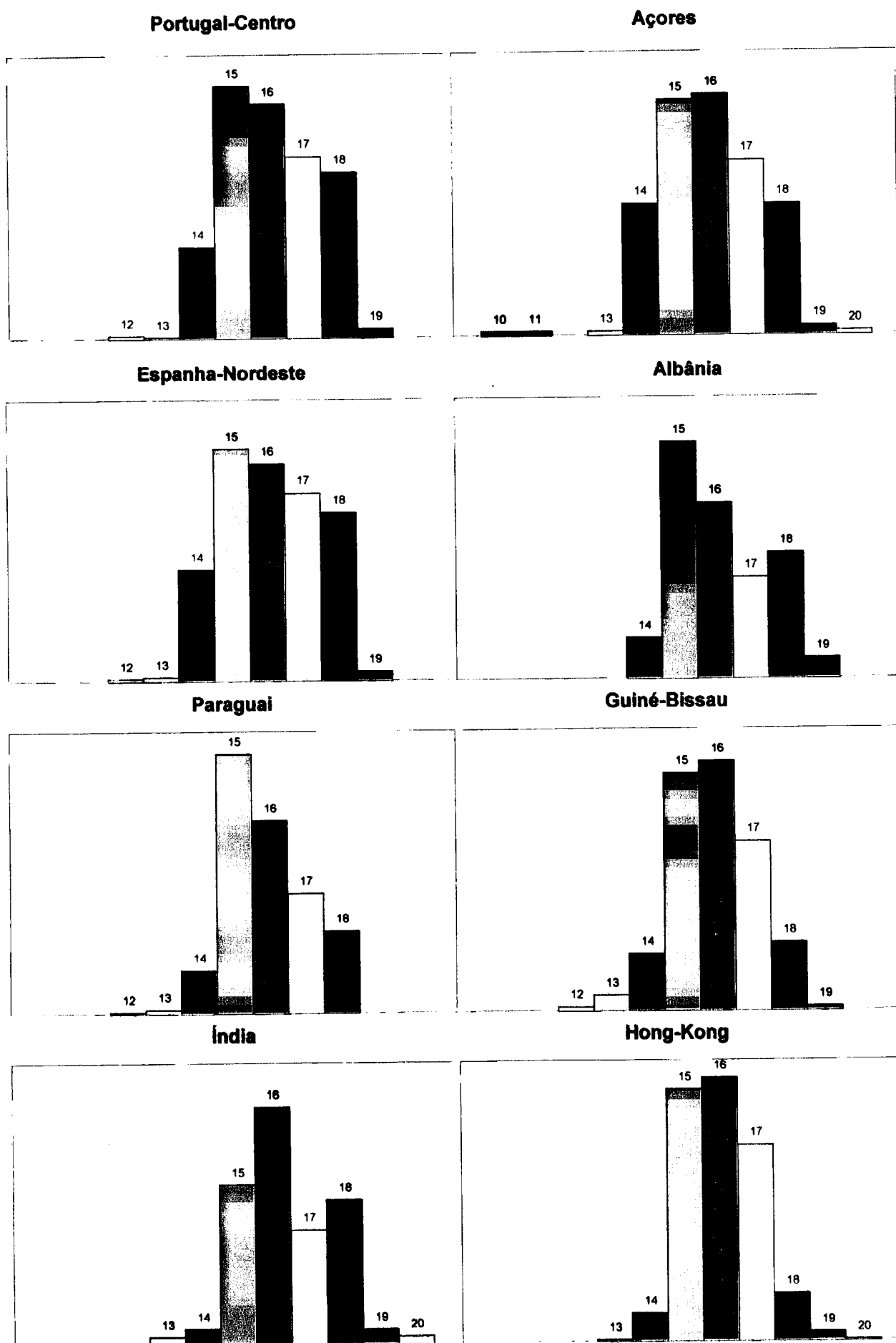


Figura 5.3.4 – Distribuição dos alelos do *locus* D3S1358, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

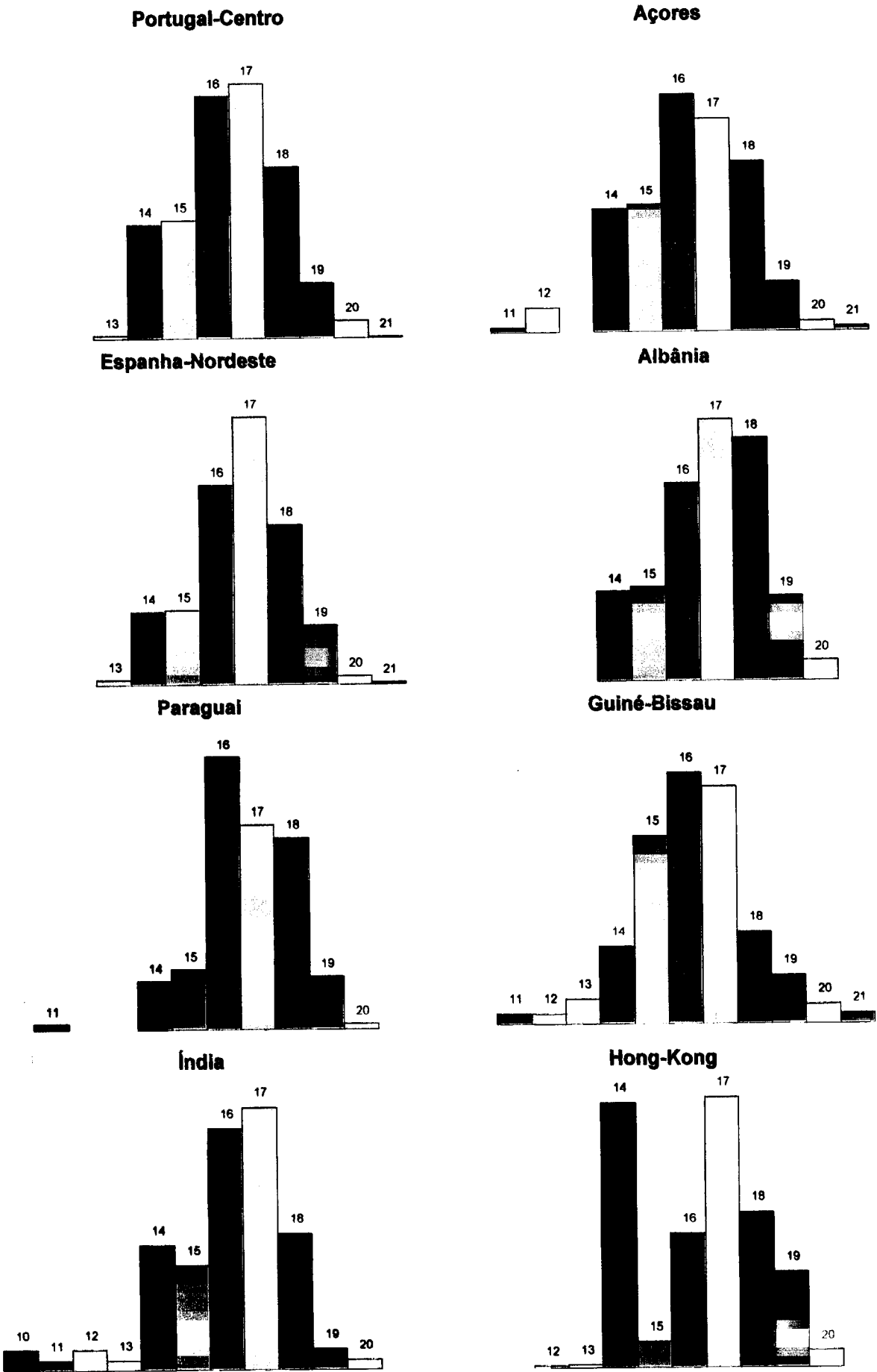


Figura 5.3.5 – Distribuição dos alelos do locus vWA, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

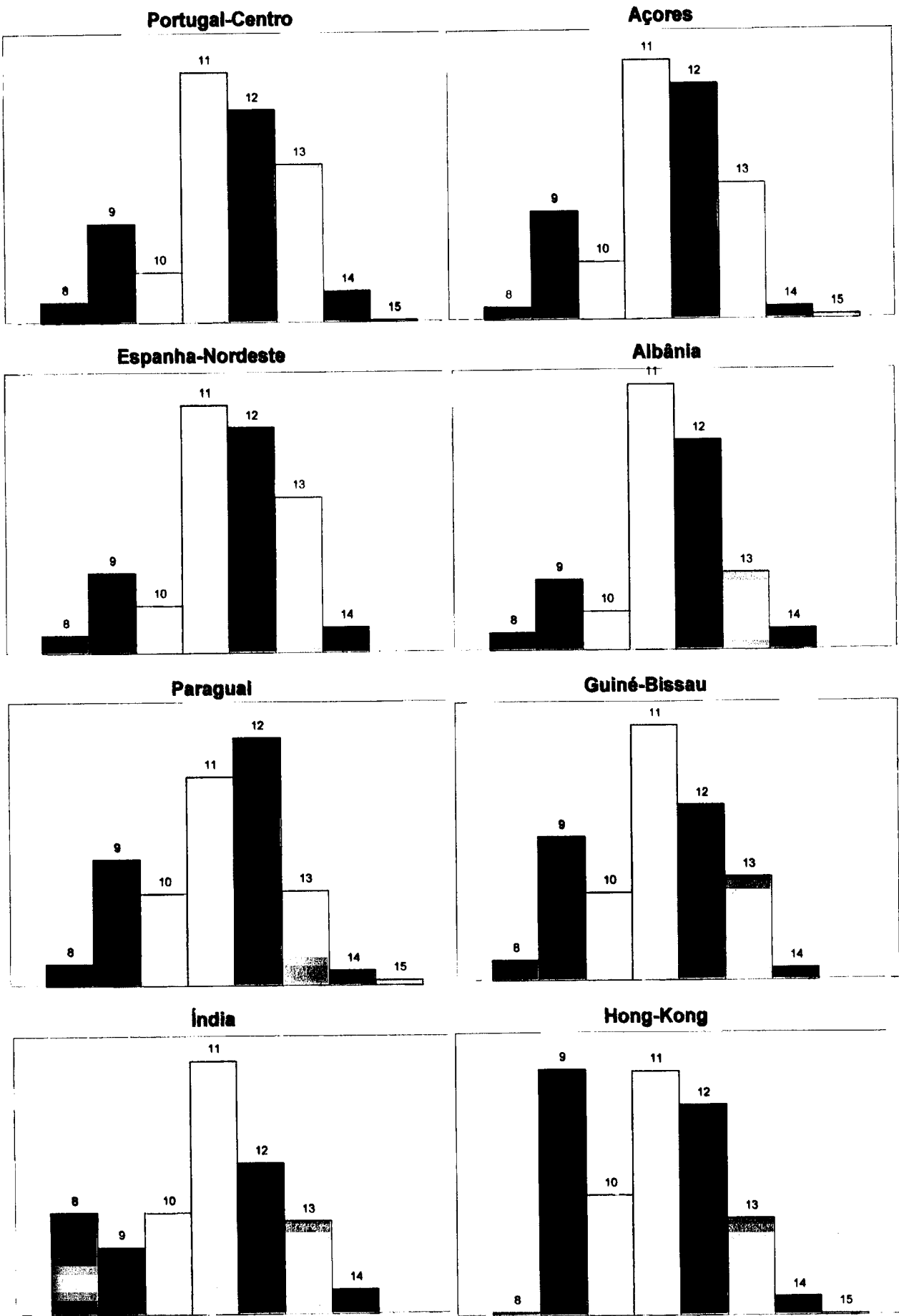


Figura 5.3.6 – Distribuição dos alelos do locus D16S539, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

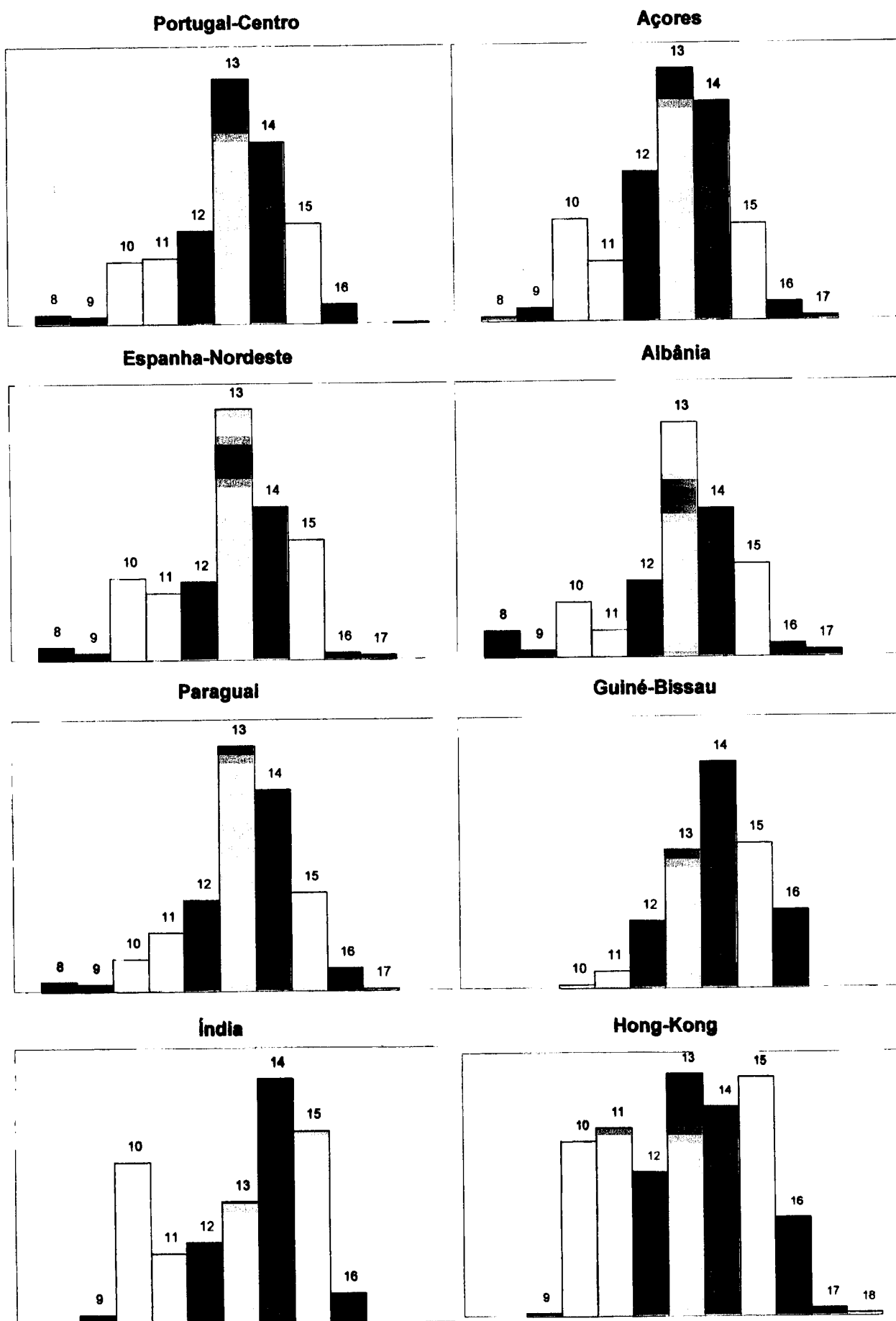


Figura 5.3.7 – Distribuição dos alelos do *locus* D8S1179, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

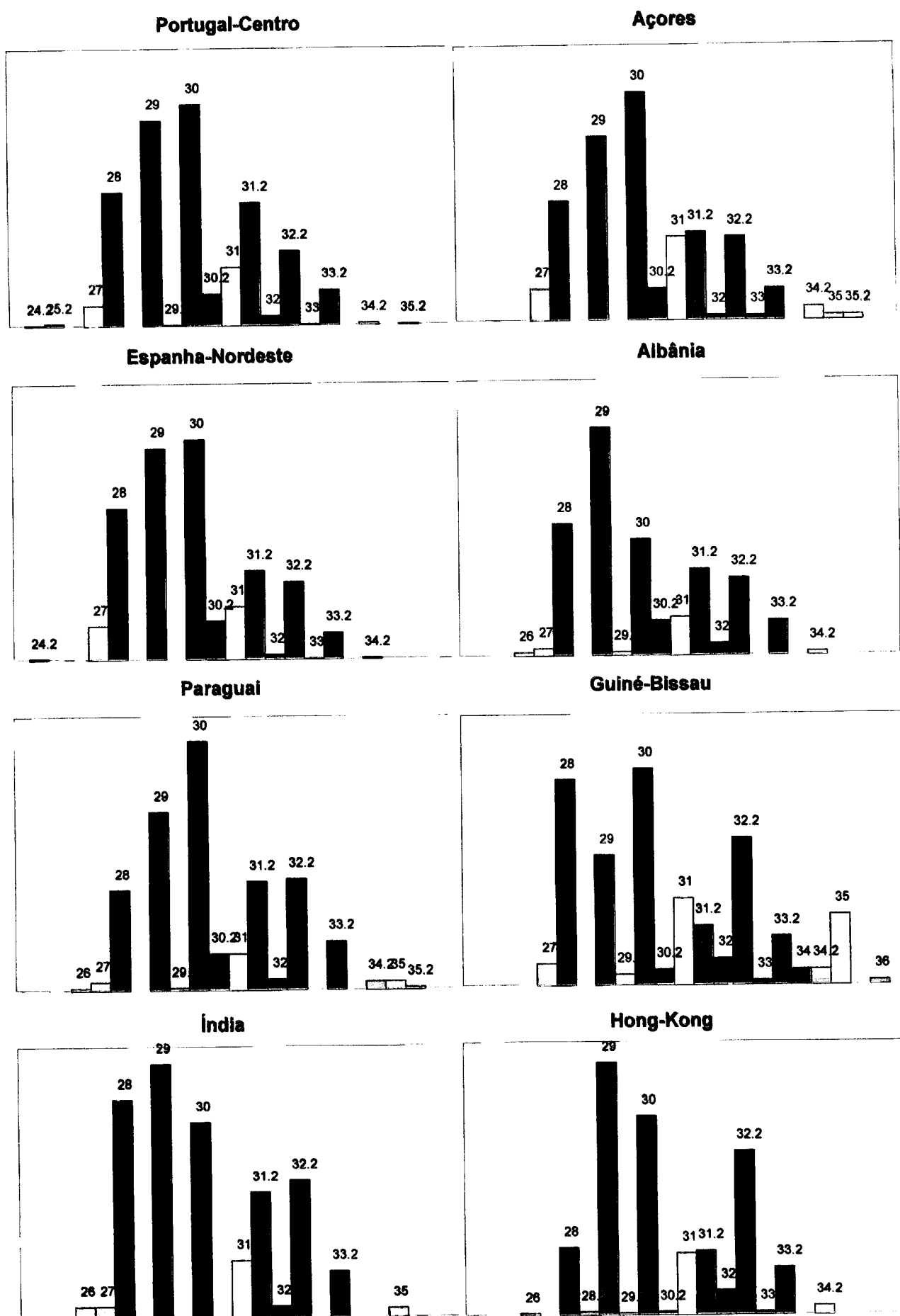


Figura 5.3.8 – Distribuição dos alelos do *locus* D21S11, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

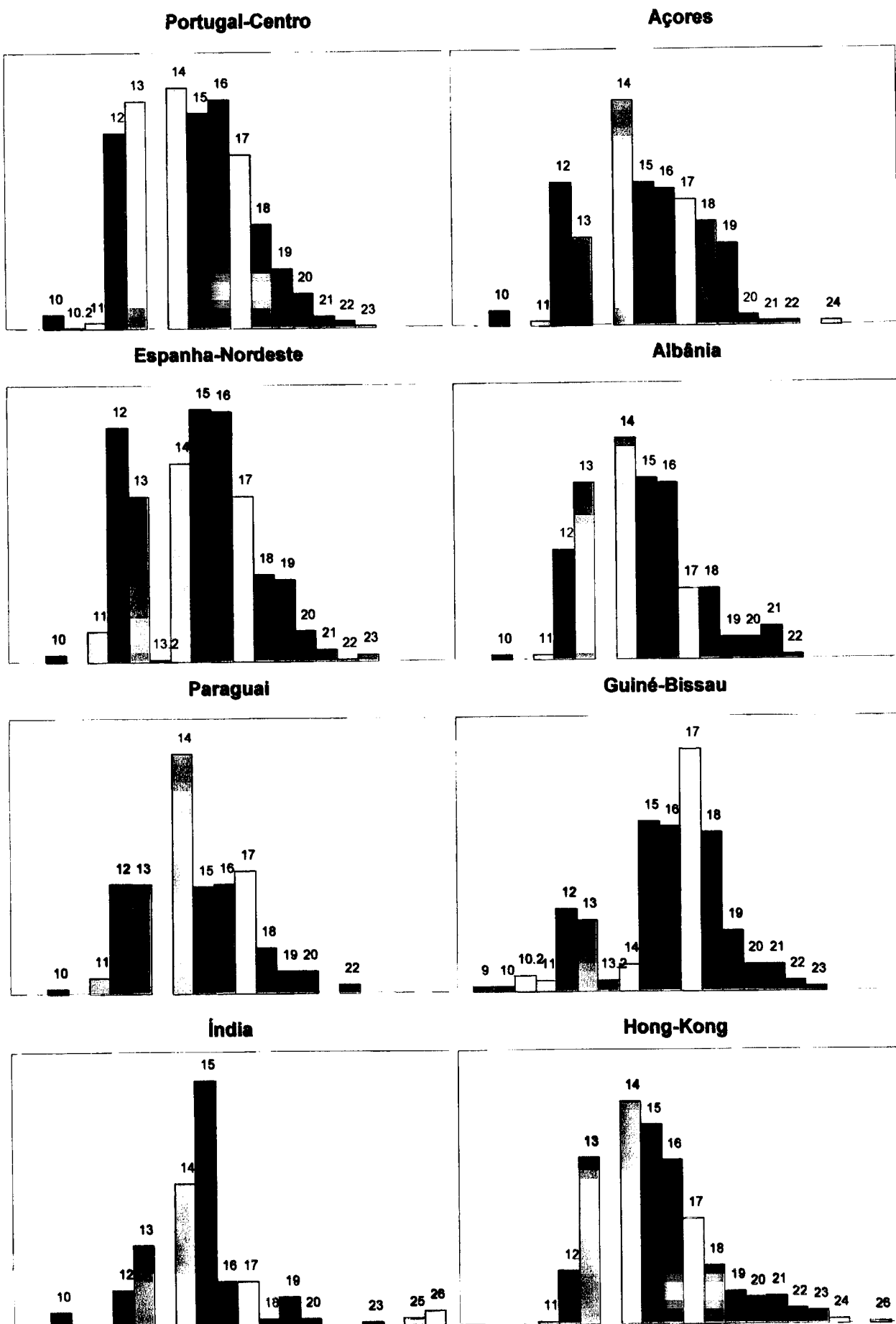


Figura 5.3.9 – Distribuição dos alelos do *locus* D18S51, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

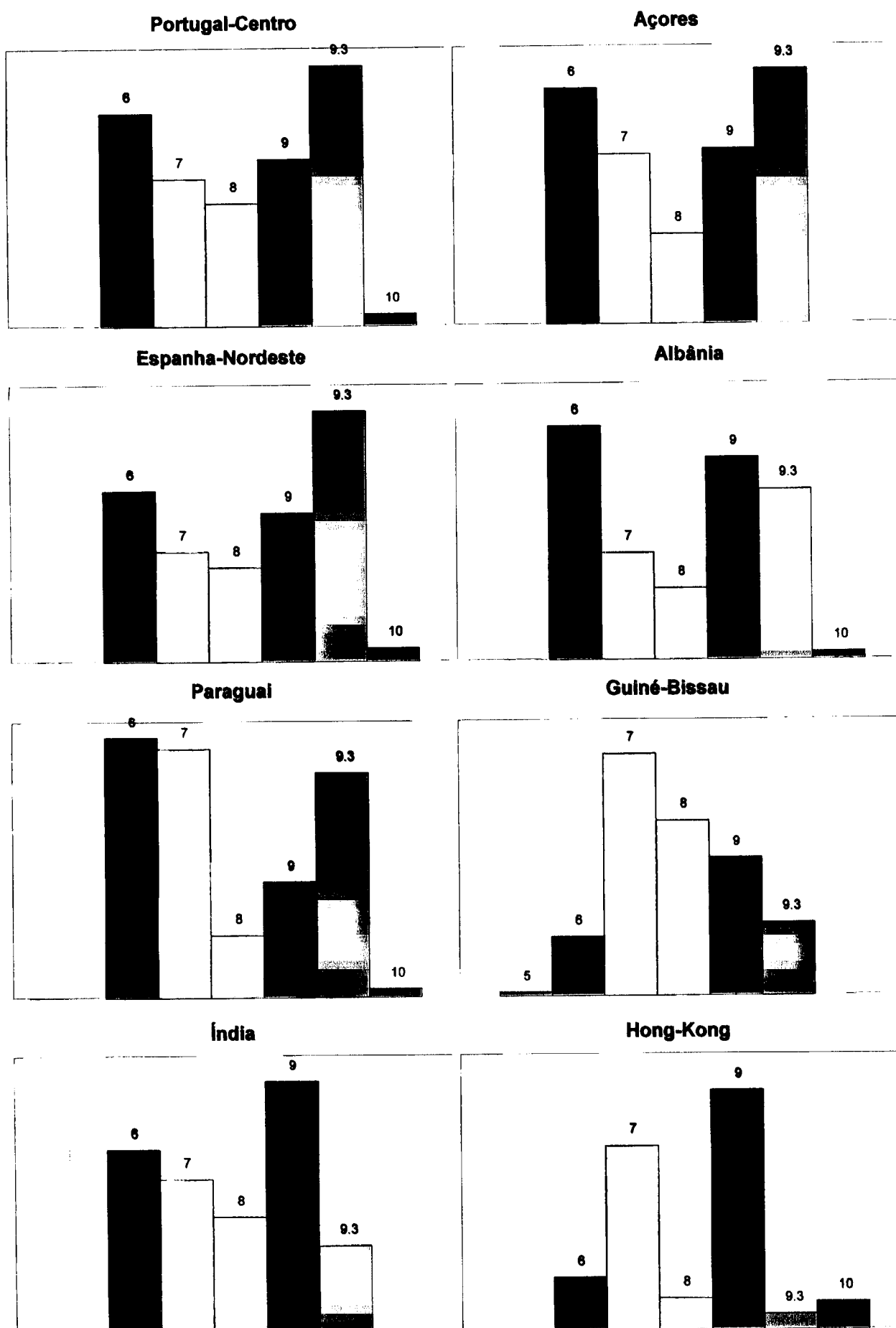


Figura 5.3.10 – Distribuição dos alelos do *locus* TH01, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

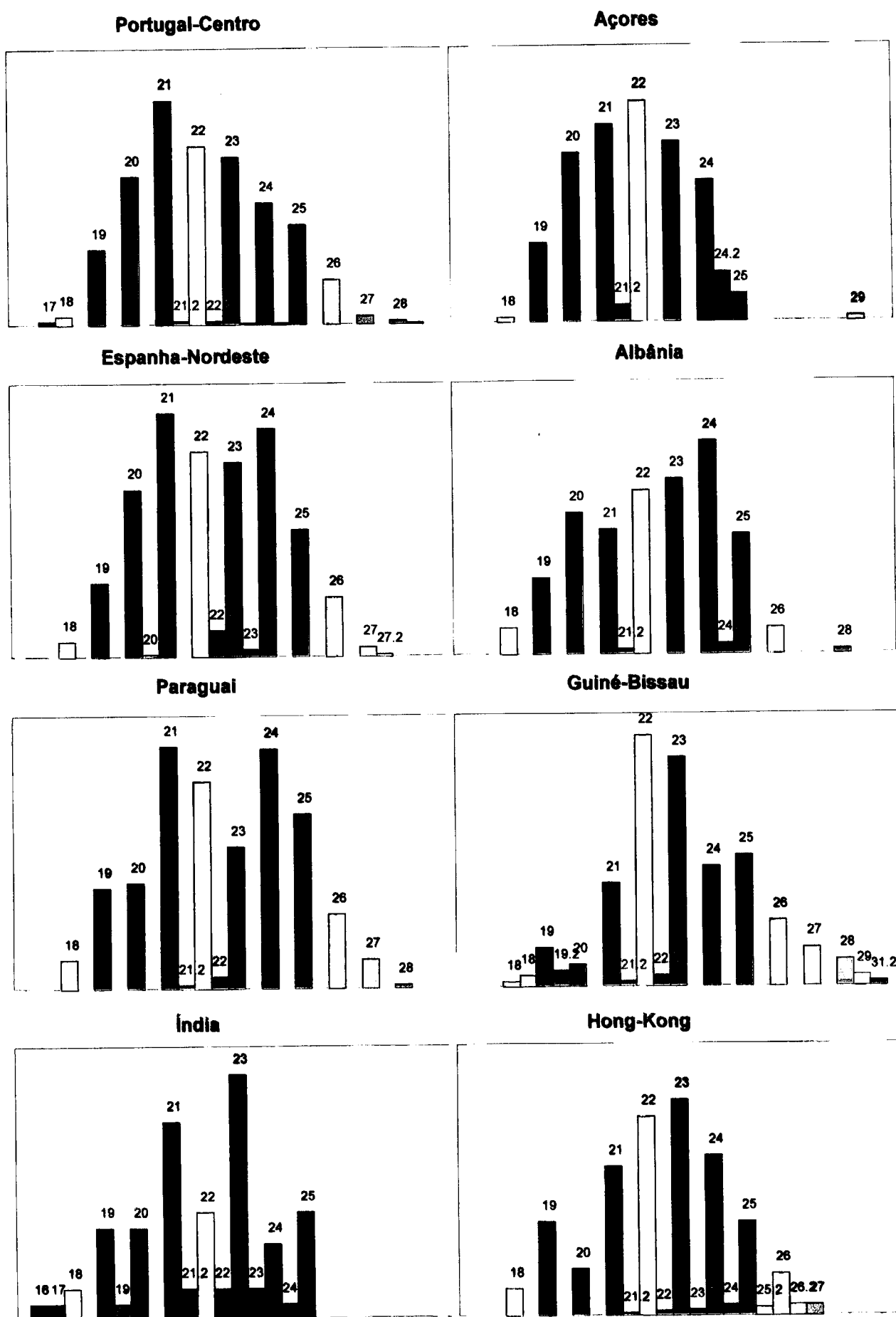


Figura 5.3.11 – Distribuição dos alelos do *locus* FGA, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

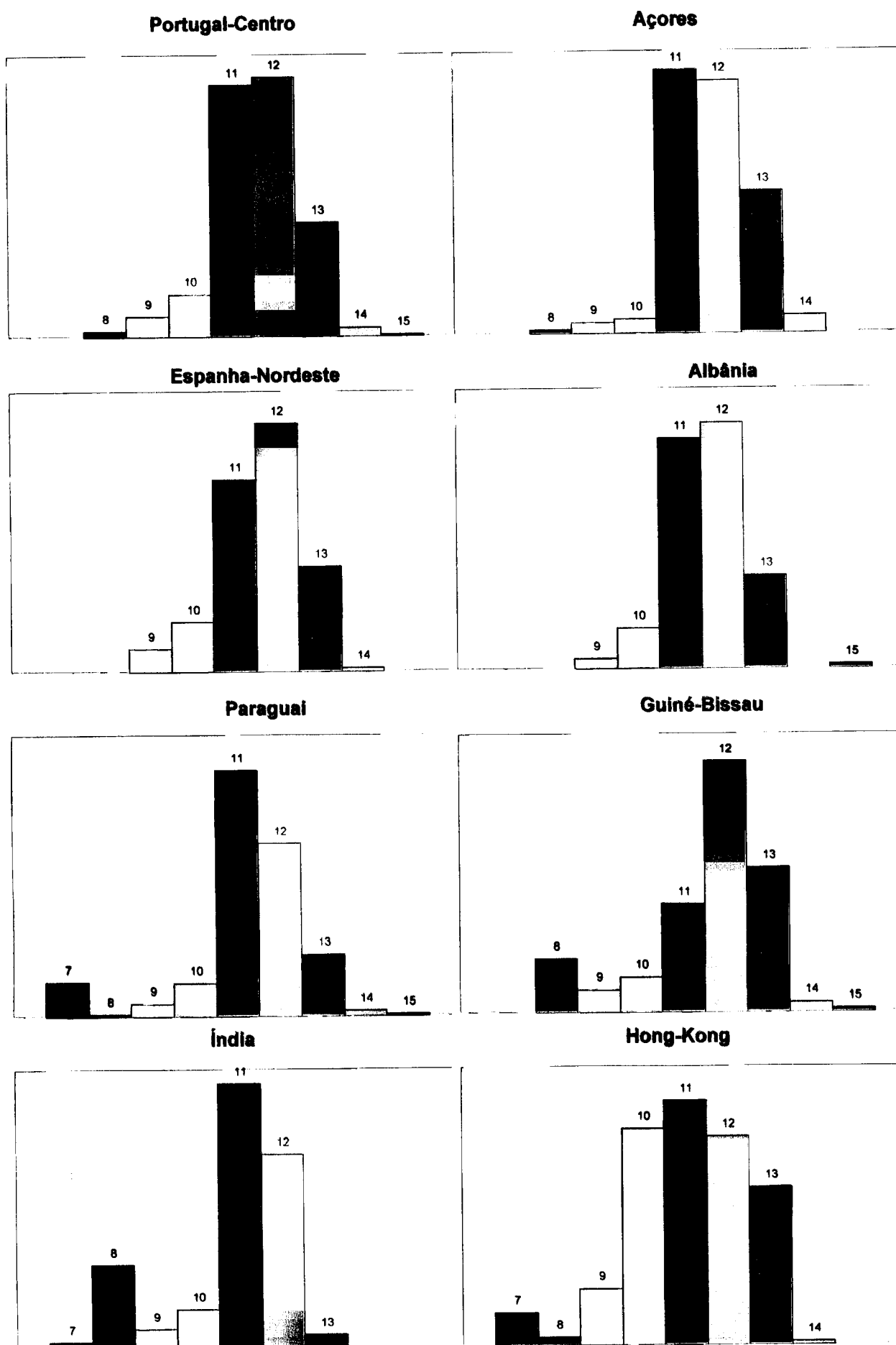


Figura 5.3.12 – Distribuição dos alelos do *locus* D5S818, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

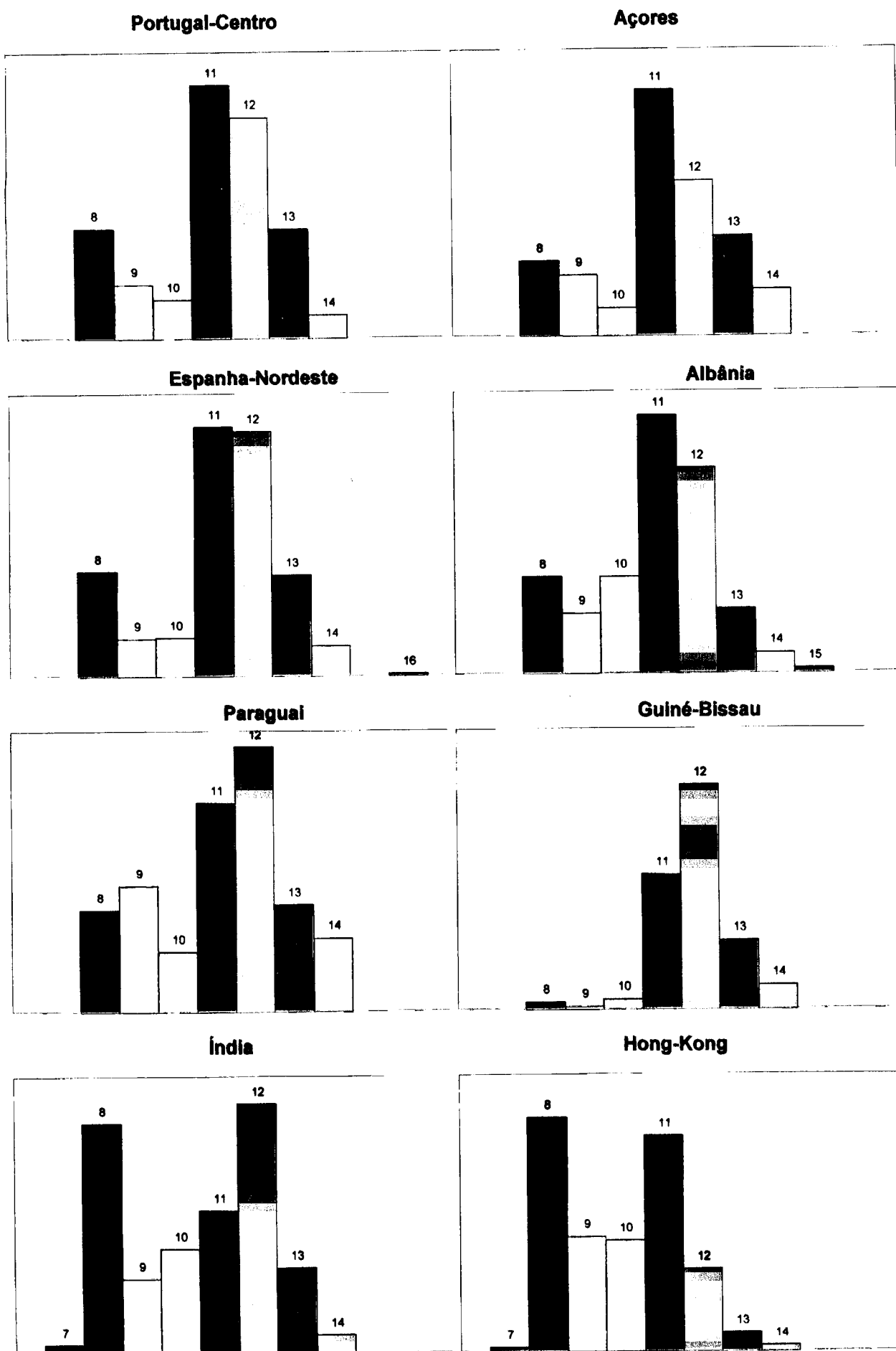


Figura 5.3.13 – Distribuição dos alelos do *locus* D13S317, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

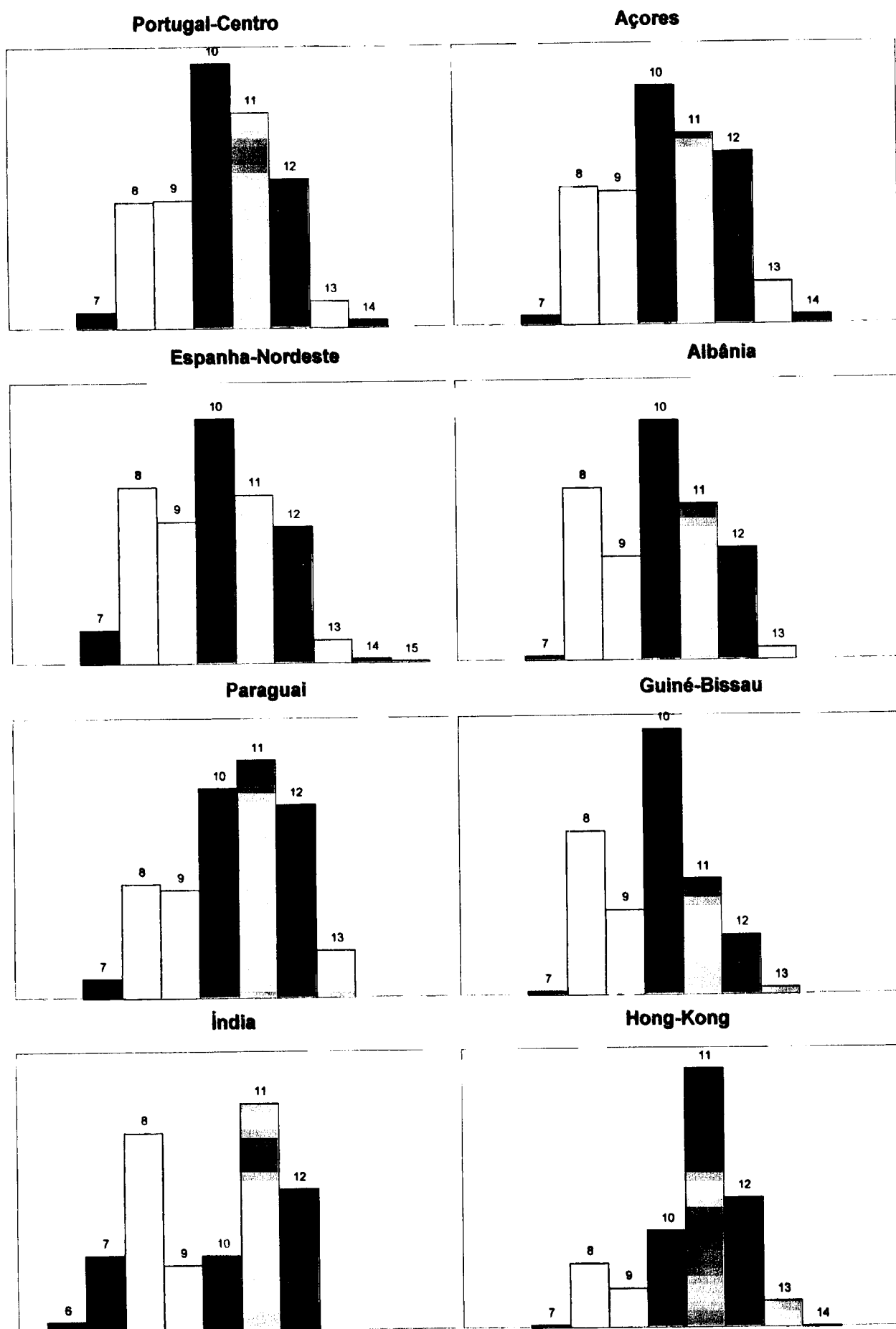


Figura 5.3.14 – Distribuição dos alelos do locus D7S820, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

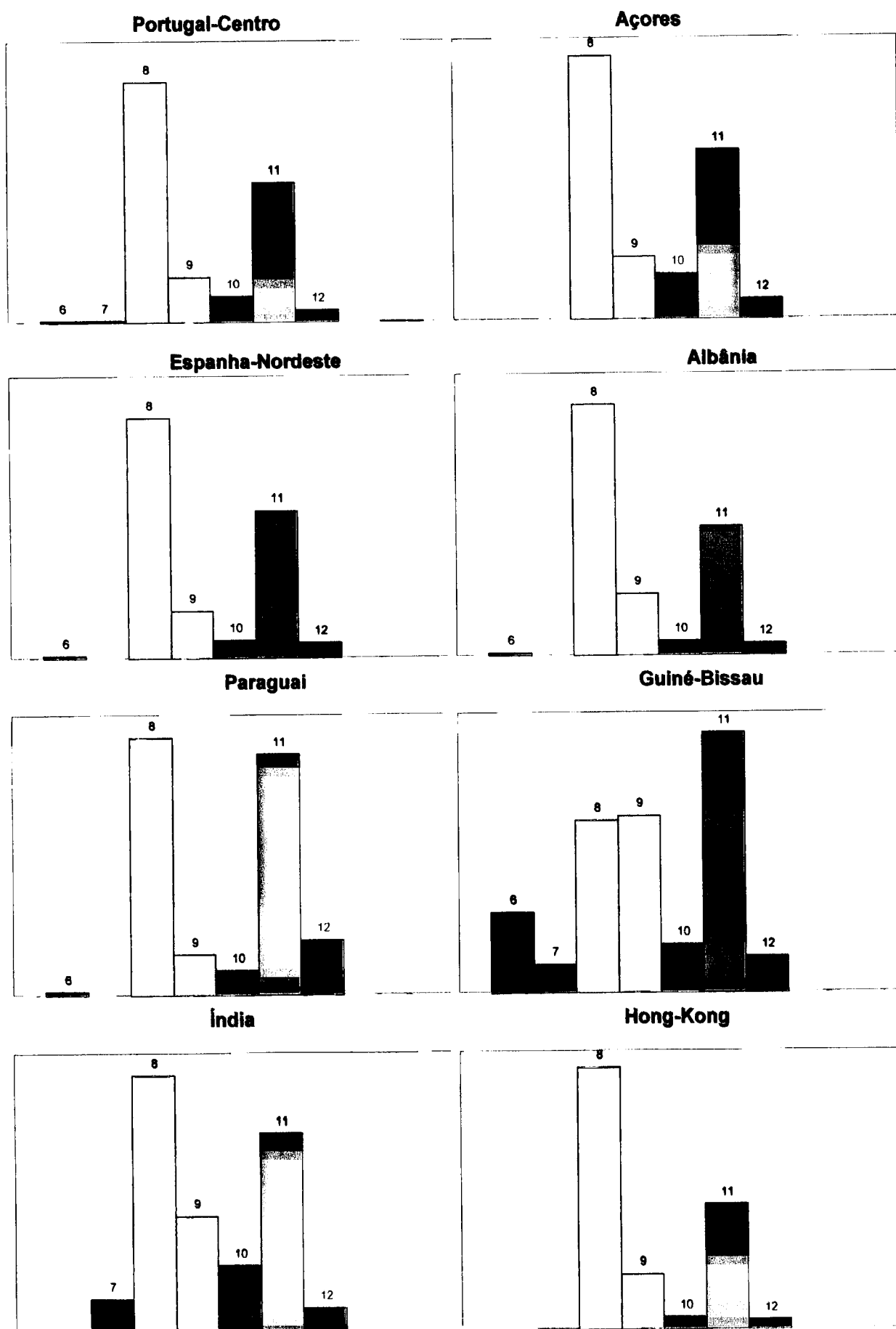


Figura 5.3.15 – Distribuição dos alelos do *locus* TPOX, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

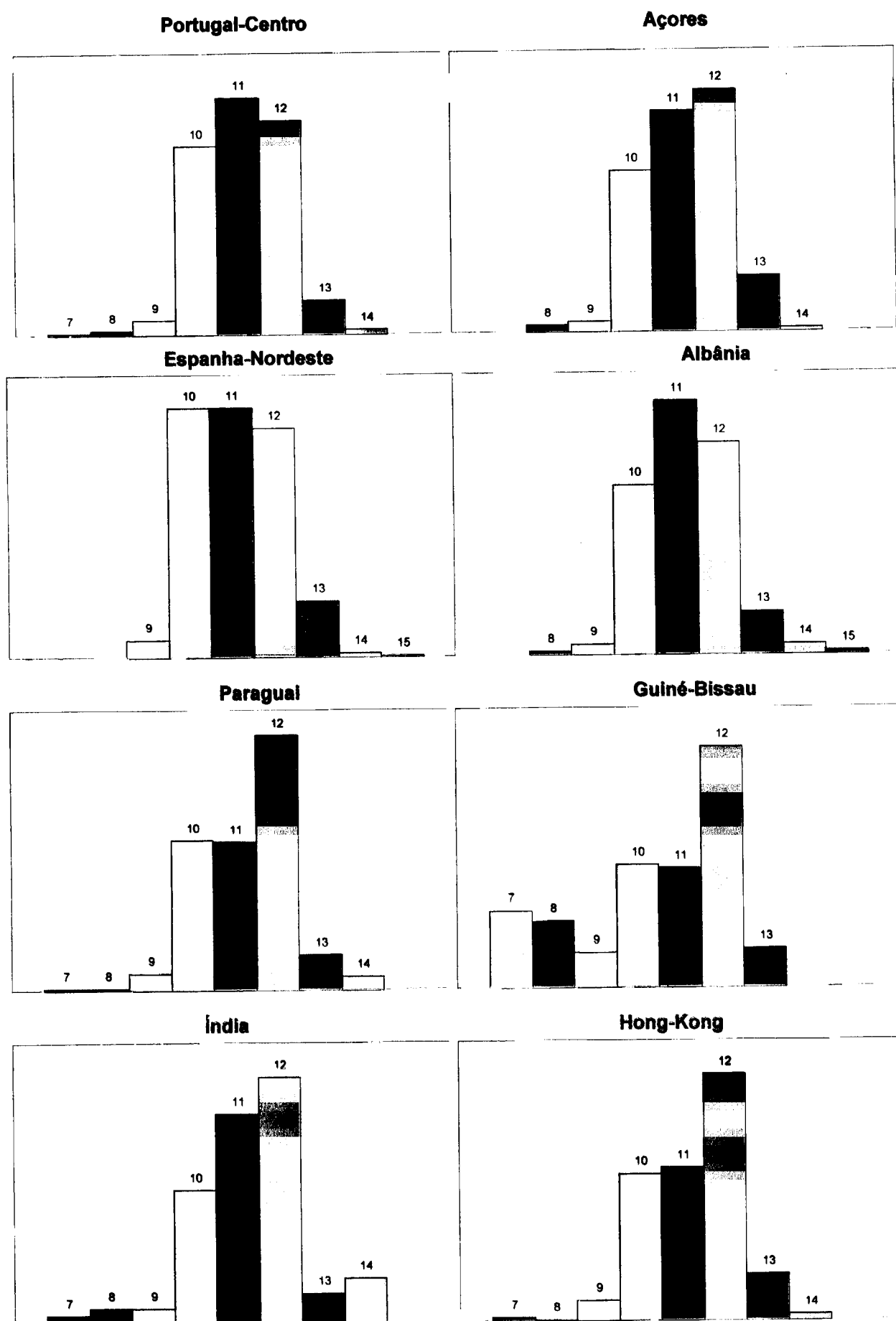


Figura 5.3.16 – Distribuição dos alelos do *locus* CSF1PO, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

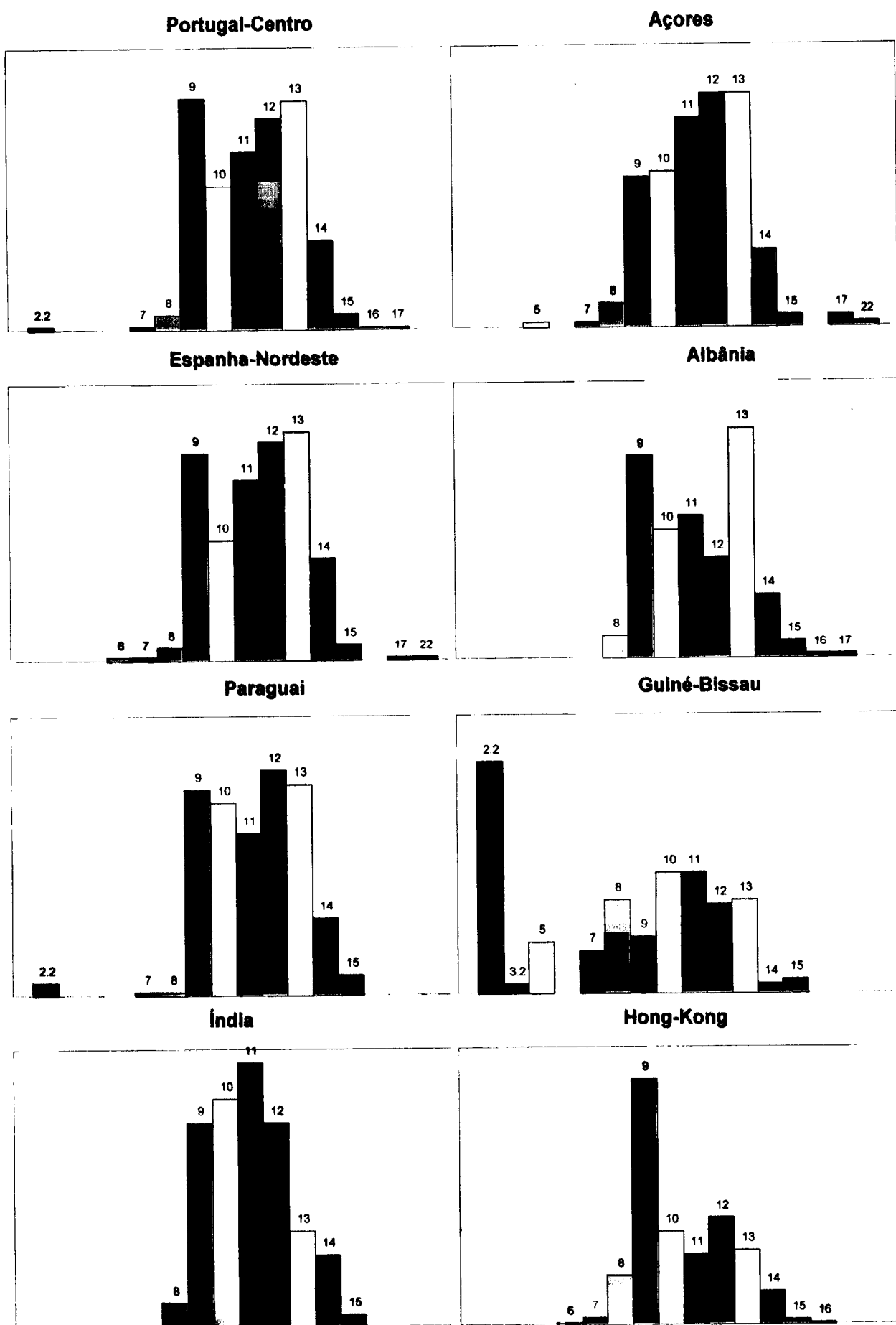


Figura 5.3.17 – Distribuição dos alelos do *locus* Penta D, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

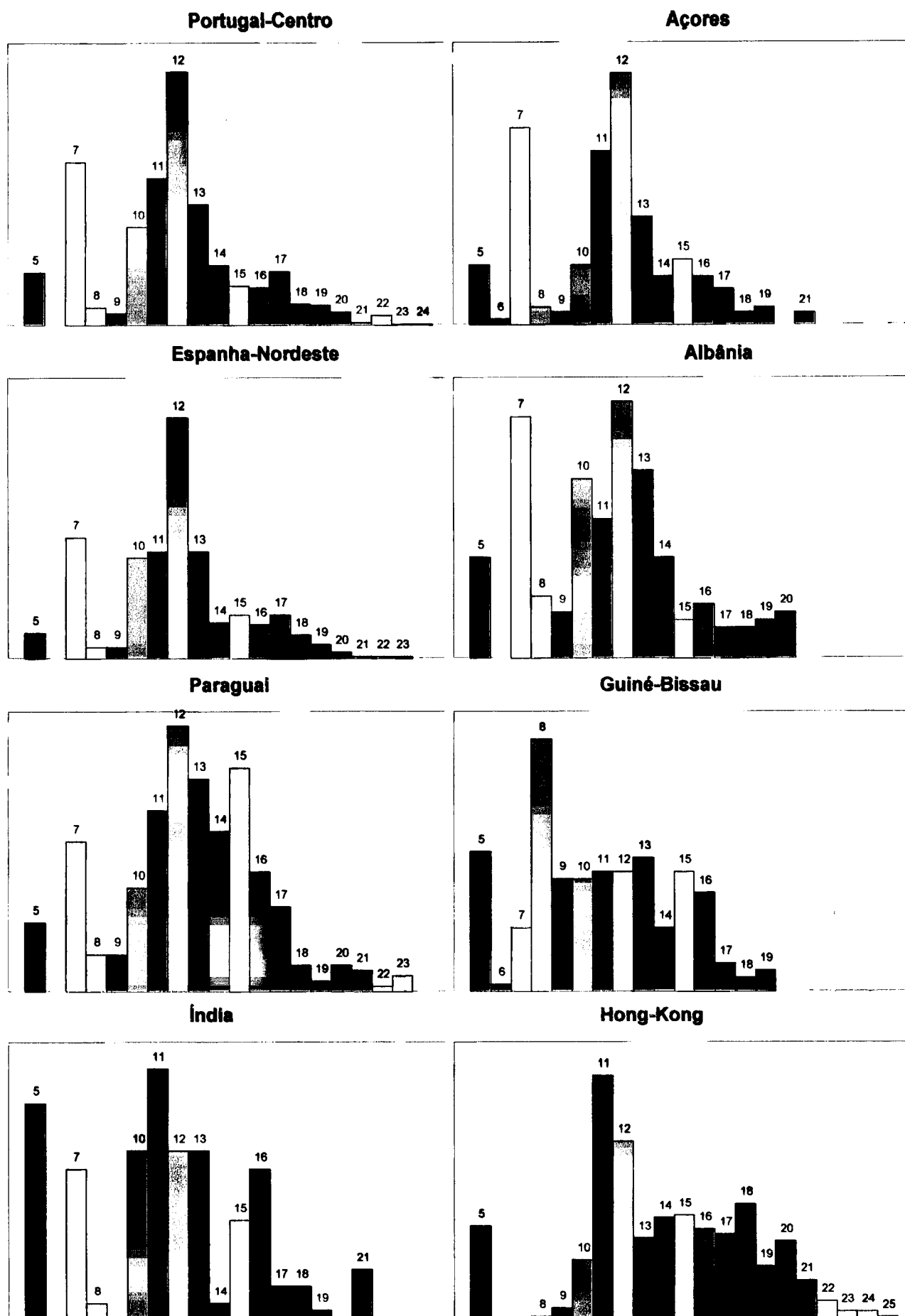


Figura 5.3.18 – Distribuição dos alelos do *locus* Penta E, observada nas populações comparadas com a do Norte de Portugal

6. CONCLUSÕES

1º - Foram detectadas, na população do Norte de Portugal, a maioria das variantes alélicas descritas para cada um dos polimorfismos do DNA estudados, pelo facto de se ter caracterizado um número elevado de amostras (n=325). A metodologia empregue, por ter envolvido o uso de um *kit* comercial (PowerPlex® 16) validado, permitiu assegurar a classificação inequívoca dos alelos.

2º - Obtiveram-se as frequências alélicas da população do Norte de Portugal, referentes aos STRs autossómicos D3S1358, vWA, D16S539, D8S1179, D21S11, D18S51, TH01, FGA, D5S818, D13S317, D7S820, TPOX, CSF1PO, Penta D e Penta E, tendo-se podido, deste modo, estabelecer uma base de dados de referência.

3º - A população deste estudo encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, existindo, também, Independência Alélica entre a maioria dos *loci*. Por isso, será possível a utilização da regra do produto das frequências genotípicas para a valorização da prova pericial, no âmbito da Genética e Biologia Forense.

4º - Os quinze *loci* estudados apresentam valores elevados em relação aos parâmetros de eficácia médico-legal, demonstrando que o sistema *multiplex* PowerPlex® 16 possui um interesse relevante na resolução de perícias médico-legais desta área.

5º - Os *loci* Penta E, D18S51 e FGA mostram o mais elevado grau de polimorfismo, associado a uma distribuição equilibrada dos alelos. Por isso, têm uma maior capacidade informativa.

6º - A análise das distâncias genéticas de Nei, da população do Norte de Portugal relativamente às populações europeias, mostrou as mínimas distâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVANCED DNA TECHNOLOGIES WORKSHOP, Automation and Application, *American Academy of Forensic Sciences 49th Annual Meeting*, New York, USA, 1997.

ALFORD R. L. et al., Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, **55** (1994), pgns. 190-461.

ANKER R. et al., Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase locus. *Hum. Mol. Genet.*, **1** (1992), pgn. 137.

BAIRD e col., 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** (1986), pgns. 489-501.

BÄR W. e al., DNA recommendations. Further report of DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.*, **110** (1997), pgns. 175-176.

BIRREN e col., http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/ref_500.htm, 2000

BOTSTEIN D. et al., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Gen.*, **32** (1980), pgns. 314-331.

BOYD W. C., Tables and monogram for calculating chances of excluding paternity. *Am. J. Hum. Genet.*, **6** (1954), pgns. 426-433.

BRINKMAN D., The STR approach. *Adv. Forensic Haemogenetics*, **6** (1996), pgns. 41-51.

BROOK J. D. e col., 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** (1992), pgns. 799-808.

BUDOWLE B. e col., 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** (1991), pgns. 841-855.

BUDOWLE B. et al., CODIS STR data from 41 sample populations. *J. Forensic Sci.*, **46(3)** (2001), pgns. 453-489.

BUDOWLE B. e SPRECHER C. J., Concordance study on population database sample using the PowerPlex 16 kit and AmpF ℓ STR Profiler Plus kit and AmpF ℓ STR COfiler kit. *J. Forensic Sci.*, **46(3)** (2001), pgns. 637-641.

BUTLER J. M., Forensic DNA typing. *Academic Press* (2001).

CARRACEDO A. et al., Forensic DNA analysis in Europe: current situation and standardization efforts. *Forensic Sci. Int.*, **86** (1997), pgns. 87-102.

CAVALLI-SFORZA L. L., The DNA revolution in population genetics. *Trends Genet.*, **14** (1998), pgns. 60-65.

CHAKRABORTY R., Statistical interpretation of DNA typing data. *Am. J. Hum. Genet.*, **49** (1991), pgns. 895-897.

COOPERATIVE HUMAN LINKAGE CENTER – www.chlc.org

CORTE-REAL F., Estudo genético-populacional de microssatélites para aplicação forense nos países lusófonos – Análise filogenética e valorização estatística como prova pericial. *Dissertação de Doutorado* (1999)

DEKA R. e col., A population genetic study of six VNTR *loci* in three ethnically defined populations. *Genomics.*, **11** (1991), pgns. 83-92.

DNA COMMISSION OF THE ISFH. Second DNA recommendations, 1991 report concerning recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of DNA polymorphisms. *Int. J. Legal Med.*, **104** (1992), pgs. 361-364.

DNA COMMISSION OF THE ISFH. DNA recommendations. 1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeats) systems. *Forensic Sci. Int.*, **69** (1994), pgs. 103-104.

DNA COMMISSION OF THE ISFH. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.*, **110** (1997), pgs. 175-176.

EDWARDS A. et al., DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Gen.*, **49** (1991), pgs. 746-756.

EDWARDS A. et al., Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, **12** (1992), pgs. 241-253.

EFRON B., The jackknife, the Bootstrap, and other resampling plans. *Society for Industrial and Applied Mathematics. Philadelphia.* (1982).

FELSENSTEIN J., Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39** (1985), pgs. 783-791.

FELSENSTEIN J., PHYLIP – Phylogeny inference package (version 3.5c). *Cladistics*, **5** (1986), pgs. 164-166.

GENÉ M. e col., Polimorfismo del DNA en la investigación biológica de la paternidad. Estado actual. *Med. Clin. (Barc.)*, **97** (1991), pgs. 110-114.

GILL P. et al., A new method of inferential logic-development of a criminal intelligence database. *Int. J. Legal Med.*, **109** (1996), pgns. 14-22.

GÓMEZ J. e CARRACEDO A., The 1998-1999 collaborative exercises and proficiency testing program on DNA typing of the Spanish and Portuguese Working Group of the International Society for Forensic Genetics (GEP-ISFG). *Forensic Sci. Int.*, **114** (2000), pgns. 21-30.

GREEN E. D. et al., Systematic generation of sequence-tagged sites for physical mapping of human chromosomes: application to the mapping of human chromosome 7 using yeast artificial chromosomes. *Genomics*, **11** (1991), pgns. 548-564.

GRIFFITHS R. A. et al., New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. *Int. J. Legal Med.*, **111** (1998), pgns. 267-272.

GONÇALVES R. e col., Genetic profile of a multi-ethnic population from Guiné-Bissau (west African coast) using the new PowerPlex® 16 System kit. *Forensic Sci. Int.*, **129** (2002), pgns 78-80.

GUO S. W. e THOMPSON E. A., Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples alleles. *Biometrics*, **48** (1992), pgns. 361-372.

HAMMOND H. A. et al., Evaluation of thirteen STR loci for use in personal identification applications. *Am. J. Hum. Genet.*, **55** (1994), pgns. 175-189.

HARDY G.H., Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, **28** (1908), pgns. 49-50.

HATTORI e col., http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/ref_500.htm, 2000

HAUGE X.Y. e LITT M., A study of the origin of shadow bands seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Hum. Mol. Genet.*, **2** (1993), pgns. 411-415.

HAZAN J. e col., A genetic linkage map of human chromosome 20 composed entirely of microsatellite markers. *Genomics*, **12** (1992), pgns. 183-189.

HIGUCHI e col., DNA typing from single hairs. *Nature*, **332** (1988), pgns. 543-546.

HUDSON T. J. e al., An STS-based map of the human genome. *Science*, **270** (1995), pgns. 1945-1954.

IMPRAIM C. C. e col., Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142** (1987), pgns. 710-716.

JARRETA M. et al., *La prueba del ADN en medicina forense*. Masson, Barcelona (1999).

JEFFREYS A. J. et al., Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*, **316** (1985), pgns. 76-79.

JEFFREYS A. J. e col., Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable *loci* in human DNA. *Nature*, **332** (1988), pgns. 278-281.

JONES D. A., Blood samples: probability of discrimination. *J. Forensic Sci.*, **12** (1972), pgns. 355-359.

KIMPTON C. P. et al., A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWA gene. *Hum. Mol. Genet.*, **1** (1992), pgn. 287.

LAREU e col., Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method, 1996, www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/ref_500.htm

LAW M. Y. e col., STR data for the PowerPlex™ 16 loci for the Chinese population in Hong Kong. *Forensic Sci. Int.*, **129** (2002), pgns 64-67.

LAWYER F. C. e col., Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.*, **264** (1989), pgns. 6427-6437.

LI H. e col., Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature*, **335** (1988), pgns. 414-417.

LITT M. e LUTY J. A., A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Gen.*, **44** (1989), pgns. 397-401.

LOPES V. e col., Frequências alélicas dos sistemas *multiplex* Identifiler e PowerPlex 16 na população centro de Portugal – *II Congresso Nacional de Medicina Legal*, poster 45.

MARTINEZ-ESPIN E. e col., Paraguayan population data on the fifteen STR loci included in the PowerPlex™ 16 kit. *J. Forensic Sci.*, **48** (2003), pgns 253-256.

MILLS K. A. et al., Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Hum. Mol. Genet.*, **1** (1992), pgn. 779.

NEI M., Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, **106** (1972), pgns. 283-292.

NEI M. e ROYCHOUDHURY A. C., Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, **76** (1974), pgns. 379-390.

NEI M. e CHAKRABORTY R., Electrophoretically silent alleles in a finite population. *J. Mol. Evol.*, **8** (1976), pgns. 381-385.

NEI M., Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89** (1978), pgns. 583-590.

NEI M. e SAITOU N., The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4** (1987), pgns. 406-425.

ODELBERG e col., Characterization of eight VNTR *loci* agarose gel electrophoresis. *Genomics*, **5** (1989), pgns. 915-924.

OHNO Y. et al., A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles. *Forensic Sci. Int.*, **19** (1982), pgns. 93-98.

OLDROYD N. J. et al., A highly discriminating octoplex short tandem repeat PCR system suitable for human individual identification. *Electrophoresis*, **16** (1995), pgns. 334-337.

PAÄBO S., Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86** (1989), pgns. 1939-1943.

PAGE R. D. M., TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Application in the Biosciences*, **12** (1996), pgns. 357-358.

PAREDES M., STR frequencies for the PowerPlex® 16 System *Kit* in a population from Northeast Spain. *Forensic Sci. Int.*, **135** (2003), pgns 75-78.

PER HOFF-OLSEN e col., Extraction of DNA from decomposed human tissue – An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic Sci. Int.*, **105** (1999), pgns. 171-183.

PINHEIRO M. F., Contribuição da PCR na investigação médico-legal. *Dissertação de Doutorado* (1997).

PROMEGA, PowerPlex® 16 System. *Technical Manual*.

RAYMOND M. e ROUSSET F., GENEPOP (version 3.3): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, **86** (1995), pgns. 248-249.

RAYMOND M. e ROUSSET F., An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49** (1995), pgns. 1280-1283.

RICHARDS R. L. e Sutherland G. R., Fragile X syndrome: the molecular picture comes into focus. *Trends Genet.*, **8** (1992), pgns. 249-255.

RIGGINS e col., Human genes containing polymorphic trinucleotide repeats. *Nat. Genet.*, **2** (1992), pgns. 186-191.

ROBINO C. e col., Allele frequencies for the PowerPlex™ 16 STR loci in an Albanian population sample from Northern Italy. *J. For. Sci.* **46:4** (2001), pgns 998-999.

SAIKI R. K. e col., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239** (1988), pgns. 487-491.

SMITH J. C. e col., Highly polymorphic minisatellite DNA probes. Further evaluation for individual identification and paternity testing. *J. Forensic Sci.*, **30** (1990), pgns. 3-18.

SULLIVAN K. M. et al., A rapid and quantitative sex test : fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques*, **15** (1993), pgns. 636-641.

TANDON M. e col., Genomic diversity at 15 fluorescent labeled short tandem repeat *loci* in few important populations of State of Uttar Pradesh, India. *Forensic Sci. Int.*, **128** (2002), pgns. 190-195.

URQUHART A. et al., Variation in short tandem repeat sequences – a survey of twelve microsatellite *loci* for use as forensic identification markers. *Int. J. Legal Med.*, **107** (1994), pgns. 13-20.

URQUHART A. et al., Selection of STR *loci* for forensic identification systems. *Advances in Forensic Haemogenetics*, **6** (1996), pgns. 115-117.

VELOSA R. G. e col., Genetic profile of the Açores Archipelago population using the new PowerPlex[®]16 System *kit*. *Forensic Sci. Int.*, **129** (2002), pgns. 68-71.

WALSH P. S. et al., CHELEX[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, **10 (4)** (1991), pgns. 506-513.

WONG Z. e col., Cloning a selected fragment from a human DNA fingerprint: isolation of an extremely polymorphic minisatellite. *Nucleic Acids Research*, **14** (1986), pgns. 4605-4616.

WONG Z. e col., Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann. Hum. Genet.*, **51** (1987), pgns. 269-288.