



**ANDRÉA LOUISE MOUTINHO GÄRTNER**

**CONTRIBUTO DE MARCADORES DO MHC NOS ESTUDOS DE  
PATERNIDADE**

Porto

2004

Dissertação de candidatura ao grau de  
Mestre apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas Abel Salazar da  
Universidade do Porto.

## Resumo

A investigação do vínculo genético começou no início do século XX com as descobertas de Landesteiner sobre o sistema ABO. Até aos anos 50 as formas de produção de prova eram apenas os sistemas ABO, Rh e MN, do grupo de identificação eritrocitário. Estes Marcadores apenas permitiam uma exclusão de paternidade em cerca de 50%.

Em 1952 Dausset descreveu um novo sistema de identificação ligado aos leucócitos humanos – o HLA ("Human Leucocyte Antigen").

Em 1985 Jeffreys descobre uma técnica para estudar regiões específicas do DNA. Com a implementação da investigação ao nível do DNA, os estudos de paternidade têm vindo a evoluir.

Actualmente, a técnica que mais impera nos laboratórios responsáveis por estes estudos é a tipagem genética de STRs ("Short Tandem Repeats").

Com este trabalho pretendeu-se averiguar qual a relevância dos marcadores HLA na investigação da paternidade.

O estudo descrito no Capítulo III demonstra como o HLA é altamente informativo, e como a utilização apenas de STRs pode, em casos que implicam mais de 2 gerações, induzir em erro.

O estudo descrito no capítulo IV evidencia a capacidade que o HLA, por si só, tem de excluir paternidades sem ser necessário recorrer à tipagem de STRs. Evidência ainda, a vulnerabilidade dos STRs, em induzirem falsos negativos, podendo levar a falsas exclusões de paternidade.

Assim, a conjugação dos resultados de ambos os estudos, permite concluir que a genotipagem dos alelos HLA torna-se vantajosa, sempre que estejam em causa mais do que 2 gerações, e tendo em conta os custos de cada técnica, sugere-se começar os estudos pela genotipagem dos alelos HLA passando ao estudo de STRs apenas quando a primeira técnica não permite a resolução do caso.

## Résumé

L'investigation de la hérédité génétique a commencé au début du siècle XX avec les découvertes de Landesteiner sur le système ABO. Jusqu'à les années 50 les formes de production de la preuve étaient seulement les systèmes ABO, Rh, et MN, identifient des groupes érythrocytaires. Ces marqueurs permettaient seulement l'exclusion de paternité environ le 50%.

En 1952, Dausset a décrit un nouveau système d'identification liée aux leucocytes humains - le HLA (Human Leucocyte Antigen).

En 1985 Jeffreys découvre une technique pour étudier des régions spécifiques du ADN. Avec le développement des investigations au niveau de l'ADN, les études de paternité ont subi une grande évolution.

Actuellement la technique plus utilisée dans les laboratoires responsables pour ces études c'est le typage génétique de STRs (Short Tandem Repeats). La prétention de ce travail c'est vérifier quel est la relevance des marqueurs HLA dans l'investigation de paternité.

L'étude décrite dans le chapitre III démontre que le HLA est grandement informatif et comme l'utilisation seulement de STRs peut en cas de plus que 2 générations, induire en erreur.

L'étude décrite dans le chapitre IV évalue la capacité que le HLA tout seul a d'exclure paternités sans nécessiter de ajouter le typage de STRs. Plus évalue la vulnérabilité des STRs, avec des faux négatifs, avec le risque des faux exclusions de paternité.

Donc la conjugaison des résultats des deux études permet conclure que le génotypage des allèles HLA c'est avantageuse s'il y a plus que 2 générations pour étudier. Considérant les coûts de chaque technique, on peut se faire la suggestion de commencer pour le génotypage des allèles HLA faisant les études des STRs seulement quand la première technique ne permet pas la résolution du cas.

## Summary

The paternity analysis started at the beginning of the XX<sup>th</sup> Century with Landesteiner who described the ABO blood system. Until the 50s only ABO, Rh and MN were used as paternity markers, all of them red cell antigens. These only permitted a paternity exclusion on about 50%.

In 1952 Dausset described a system that begins to be important in paternity analysis, the HLA system – “Human Leukocyte Antigens”.

In 1985 Jeffreys discovers a technique for the study of DNA specific regions. With investigation at DNA level, paternity studies tend to evolve.

The paternity tests are currently carried out by analysis of STR sets.

In this work we pretended to analyse the relevance of HLA markers for paternity investigation.

The Study described in Chapter III shows how HLA haplotypes are informative for biologic exclusions and how the exclusive employment parentage STR Sets can be compromised by an increased risk of erroneous conclusions.

Chapter IV shows that HLA in many cases is enough to exclude a paternity. This case also demonstrates how inconsistent results can occasionally be encountered.

With the results of this 2 studies we can conclude that HLA genotyping is valious in cases were there are more than 2 generations in one family. Considering the costs of both techniques we consider that it would be preferable to start the study with HLA genotyping and use the STR panels only in cases were HLA does not resolve the paternity case.

## **Agradecimentos**

Ao Professor José Eduardo Pinto da Costa, Coordenador do Curso de Mestrado em Medicina Legal, agradeço a oportunidade que me concedeu de realizar este Mestrado. Quero ainda agradecer a forma entusiástica e cativante com que partilhou o interesse pelo “Mundo” da Medicina Legal.

À Professora Graça Porto, orientadora deste trabalho conducente a esta dissertação, quero expressar o meu reconhecimento pela orientação teórica e pelo apoio oportuno que revelou no decorrer do trabalho.

À Dra Helena Alves, co-orientadora e Directora do Centro de Histocompatibilidade do Norte, local de realização deste trabalho, agradeço as facilidades e disponibilidade concedidas para a sua realização e ainda os conhecimentos que transmitiu no domínio da Biologia Molecular.

À Professora Maria José Carneiro de Sousa deixo a minha palavra de apreço pela experiência partilhada e pela boa disposição sempre presente.

Ao Laboratório de Genética Molecular do Centro de Histocompatibilidade do Norte, pela colaboração no decorrer do trabalho.

À Doutora Luisa Azevedo do IPATIMUP pela incondicional ajuda dada na resolução de problemas.

Aos meus Pais agradeço os ensinamentos transmitidos, que sem eles eu nunca teria chegado aqui. À Hanna e ao Miguel obrigado pela paciência.

À Alfagene na pessoa da Eng<sup>a</sup> Elsa Master pelo apoio financeiro concedido.

## **Nota Prévia**

Esta tese está estruturada em capítulos de forma a simplificar a apresentação e discussão dos resultados, uma vez que se dividem em dois estudos independentes que, no entanto se complementam.

O segundo e terceiro Capítulos correspondem a dois estudos, e estão escritos em inglês uma vez que correspondem a trabalhos que vão ser submetidos para publicação. É de referir que o primeiro estudo, "Exclusion of paternity of deceased man with the contribution of MHC", só será submetido para publicação após conclusão do processo judicial.

*“Os filhos das minhas filhas meus netos são;  
Os filhos dos meus filhos serão ou não?”*

**Ditado Popular**

# ÍNDICE

## Capítulo I

### Introdução

Nota Histórica	11
O Sistema HLA	12
Análise de Microsatélites (STRs)	13
O exame de paternidade em Portugal	14
Objectivos do trabalho	14

## Capítulo II

### Material e Métodos

Amostragem	16
Extracção de DNA	16
PCR para amplificação do Painel de STRs	17
PCR para amplificação dos genes HLA-A, B e Cw	18
Hibridização com sondas para os genes HLA-A, B e Cw	19
Interpretação dos resultados	20

## Capítulo III

Paternity exclusion of deceased man with the contribution of MHC	23
--	----

## Capítulo IV

Paternity excusion based on HLA typing	29
--	----

## Capítulo V

Discussão e Conclusão	34
-----------------------	----

<b>Bibliografia</b>	<b>56</b>
---------------------	-----------

## **Abreviaturas**

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (Desoxiribonucleic Acid)

dNTP – Desoxinucleótídeos Trifosfatos

EDTA - Ácido Etilenodiaminatetracético

HLA – Antígenos Leucocitários Humanos (Human Leukocyte Antigens)

MHC – Sistema Maior de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)

PCR – Reacção de Polimerização em Cadeia (Polymerase Chain Reaction)

RCLB – Solução de Lise de Glóbulos Vermelhos (Red Cell Lysis Buffer)

SDS – Sódium Dodecil Sulfato

STR – “Short Tandem Repeats”

WCLB – Solução de Lise de Glóbulos Brancos (White Cell Lysis Buffer)

## **CAPÍTULO I**

### **Introdução**

## Introdução

### Nota Histórica

A necessidade de estabelecer relações de parentesco aparece-nos geralmente em contextos legais, sociais e de saúde. A incerteza de paternidade é tão antiga como a humanidade e tem suscitado muita controvérsia ao longo dos tempos. Embora a mulher tenha quase sempre certeza que a criança por si gerada é biologicamente sua, o homem tem muitas vezes de lidar com a incerteza da paternidade. A investigação do vínculo genético mereceu sempre a especial atenção da Justiça. Em 1977 foi feita a reforma do Código Civil Português, e desde aí a investigação de paternidade no nosso país tem sido cada vez mais solicitada. Isto, porque o artigo 1864º, obriga à averiguação oficiosa da paternidade nos casos de crianças registadas apenas com nome da mãe. *“Sempre que seja lavrado registo de nascimento de menor apenas com a maternidade estabelecida, deve o funcionário remeter ao tribunal certidão integral do registo, a fim de se averiguar officiosamente a identidade do pai” (Artigo 1864º do Código Civil Português).*

O DNA é responsável pela transmissão genética das características hereditárias dos pais para os seus descendentes, estabelecendo-se assim um vínculo genético. Todas as características humanas são herdadas de acordo com as leis mendelianas que regem a transmissão dos caracteres hereditários. É neste vínculo genético que se baseiam os estudos de paternidade. A utilização de marcadores genéticos para definir a paternidade baseia-se em aspectos fundamentais, como o facto de que um marcador genético não pode aparecer num indivíduo se não estiver presente em pelo menos um dos seus progenitores (Hawkins BR, 1997). Em casos de disputa de paternidade o objectivo principal é excluir o falso pretenso pai ou afiliar o alegado pai (Keresztury L *et. al*, 2002). O valor científico da análise de paternidade é direccionada para a exclusão, uma vez que não se pode garantir a não existência de outro indivíduo no mundo que apresente as mesmas características. No entanto o estabelecimento da paternidade é umas das verdadeiras certezas na vida, se para tal forem analisados suficiente número de alelos (Tracey M, 2001).

Pode-se dizer que a investigação de paternidade como produção de prova começou no início do Século XX com Landesteiner (1901) que descreveu o sistema ABO (antígenos eritrocitários). O reconhecimento de que a transmissão dos grupos

sanguíneos ABO à descendência seguia as leis de Mendel tornou-se o ponto de partida para tudo que veio a seguir. Até aos anos 50 os únicos marcadores utilizados em estudos de paternidade eram o ABO, Rh (factor Rhesus) e MN, todos eles marcadores eritrocitários. Em conjunto, estes marcadores apenas permitiam exclusão de paternidade em cerca de 50% (Dyer P and Middleton D, 1993). Em meados do século XX com Dausset (1952) surgiu outro marco importante, a descoberta do sistema HLA “Human Leukocyte Antigen” (HLA). Já no fim do século (1985) Jeffreys descobre uma técnica para estudar regiões específicas do DNA (Jeffreys AJ *et. al*, 1985), sendo esta última a que mais impera actualmente. Nos últimos 10 a 15 anos, com a implementação de investigação ao nível do DNA, em quase todo o mundo o estudo de paternidades tem vindo a evoluir positivamente (Morling N, *et. al*, 2002).

Nos estudos de paternidade envolvendo mãe, filho e pretense pai é feita uma colheita de amostra (geralmente sangue) a todos os intervenientes no processo. Nos casos em que a investigação envolve um pretense pai falecido, estudam-se todos os descendentes e em alguns casos os ascendentes de maneira a construir um perfil genético para o falecido. As técnicas mais correntes nestes casos são, actualmente a Genotipagem do HLA e de STRs (Short Tandem Repeats).

### **O Sistema HLA**

O MHC (Major Histocompatibility Complex), descoberto há 50 anos atrás (Beck S e Towsdale J, 2000), está presente em todos os vertebrados estudados até ao momento. Os antigénios do MHC nos humanos têm a designação de HLA para “Human Leukocyte Antigens” e está localizado no braço curto do cromossoma 6 (6p21.31) cobrindo uma região com cerca de 3,6 Mbp. O Sistema HLA encontra-se dividido em 3 regiões: class I, II e III, como foi proposto por Jan Klein em 1977 (Dorak MT, 2002).

Uma das características do MHC é sua expressão co-dominante, uma vez que ambos os alelos contribuem para o fenótipo. Outra característica é a herança em bloco do haplótipo, uma vez que a recombinação é um evento raro (Dorak MT, 2002).

O elevado polimorfismo deste grupo de genes torna-se uma característica essencial em termos genéticos. Pode mesmo afirmar-se que o MHC apresenta o maior grau de polimorfismo em todo o genoma humano, tanto que teoricamente é possível que cada indivíduo apresente um conjunto diferente de alelos MHC.

A Genotipagem do HLA continua a ser um procedimento de elevada relevância na investigação do vínculo genético, sendo em alguns casos insubstituível. É de execução fácil, e não acarreta grandes custos, e presta serviços relevantes à justiça.

A extrema variabilidade dos genes HLA é a razão pela qual é tão difícil encontrar um dador compatível para transplantes, uma vez que quase todos os indivíduos são diferentes no que respeita ao genótipo HLA. Este elevado grau de polimorfismo que se torna um grave problema na área da transplantação, é de extrema utilidade na área da genética forense. Existem pelo menos 6 genes neste sistema, tendo em conta que cada indivíduo apresenta 2 alelos de cada gene, poderíamos obter teoricamente uma população de combinações na ordem dos 240.000.000.000 (Easteal S, 1992).

### **Análise de Microsatélites (STRs)**

Microsatélites são fragmentos de DNA constituídos por sequências de repetições que podem ter entre 1-6 bases (Goldstein e Schlötterer, 1999). Este tipo de fragmentos de DNA são muito comuns nos organismos eucariotas, estando distribuídas de uma forma aleatória por todo o genoma. Os microsatélites são encontrados tanto nas regiões codificantes como não codificantes (Hamad *et al.*, 1982; Tautz 1989). Os microsatélites são estruturas bastante comuns ao longo do genoma e a maior parte deles são polimórficos, características estas que fazem com que estes marcadores sejam muito utilizados em estudos evolutivos, genética populacional e genética forense. A análise de árvores genealógicas demonstra que os microsatélites são codominantes, apresentando hereditariedade mendeliana (Edwards *et al.*, 1992; Fornage *et al.*, 1992). Devido às suas dimensões reduzidas, geralmente inferior a 300 pares de bases, os microsatélites podem ser amplificados por PCR, o que permite que a análise seja efectuada a partir de amostras escassas ou mesmo de DNA que se encontre parcialmente degradado (Jarne e Lagoa, 1996).

Embora os microsatélites apresentem muitas vantagens e por isso sejam marcadores de eleição em diferentes tipos de estudos, verifica-se que apresentam alguns problemas. Estas estruturas são geralmente muito polimórficas devido à ocorrência das tais repetições. Estes polimorfismos devem-se ao ganho ou perda de unidades de repetição. Estas zonas do genoma apresentam taxas de mutação elevadas, podendo oscilar entre  $10^{-2}$  e  $10^{-6}$  mutações por geração (Dallas, 1992; Weber e Wong, 1993; Harr e Schlötterer, 2000). O mecanismo que leva à ocorrência de mutações num microsatélite

ainda não é bem conhecido, no entanto pensa-se que a origem destas mutações esteja em erros de emparelhamento, durante o processo da replicação (Levinson e Guttman, 1987). Os “tandems” compostos por sequências de dinucleotídeos apresentam taxas mais elevadas do que as compostas por trinucleotídeos, também as sequências com bases AT apresentam maior taxa de mutação do que as sequências ricas em GC (Schlötterer e Tautz, 1992). Por exemplo, nos microsátélites podem ocorrer alelos escondidos ou nulos, isto é, alelos que não são amplificados pela reacção de PCR.

Um estudo efectuado com 23 famílias demonstrou que 7 destas famílias apresentavam alelos nulos, que foram reconhecidos pelo facto de, aparentemente, os filhos não herdarem os alelos dos pais. Estes autores demonstram que um dos alelos não era amplificado devido a uma deleção de 8 pares de bases não permitindo o emparelhamento do oligonucleotídeo durante a reacção de PCR (Callen *et al*, 1993). Assim, na presença de alelos nulos, um indivíduo heterozigótico pode ser erradamente considerado como homozigótico (Bruford e Wayne, 1993).

### **O exame de paternidade em Portugal**

Neste momento, não há legislação nenhuma que estabeleça o procedimento a seguir num estudo de paternidade. O que há é uma recomendação da Sociedade Internacional de Genética Forense (ISGF), para investigações genéticas em casos de paternidade, publicada em 2002 (Morling *et al*, 2002). Actualmente, são utilizados preferencialmente os STRs em detrimento dos marcadores de HLA.

### **Objectivos do trabalho**

Em face do exposto é objectivo deste trabalho averiguar qual a relevância dos marcadores de HLA na investigação de paternidade.

Na primeira parte do trabalho (Capítulo III) foi objectivo determinar a importância dos marcadores de HLA em casos de paternidade duvidosa determinada com base em painéis de STRS. E na segunda parte do trabalho (Capítulo IV) pretendeu-se definir a sensibilidade e especificidade dos STRs num caso de paternidade inequivocamente excluída pelo HLA

**CAPÍTULO II**  
**Material e Métodos**

## **Material e métodos**

### **Amostragem**

Para o primeiro objectivo foram estudados 4 elementos de uma família (pretensos avós paternos, mãe e filha) os quais foram enviados ao Centro de Histocompatibilidade do Norte para estudo de paternidade duvidosa (Capítulo III).

Para o segundo objectivo foram analisados 4 amostras de 1 família enviada ao Centro de Genética Preditiva e Preventiva para estudo do HLA associado a hemocromatose. O estudo dos haplótipos HLA na hemocromatose é realizada sistematicamente no contexto da investigação de factores modificadores da expressão da doença (Projecto POCTI 32986/99).

### **Extracção DNA**

O DNA genómico pode ser obtido a partir de vários produtos biológicos como, sangue, linfócitos circulantes, soro, saliva, etc.

No trabalho em questão o DNA foi obtido através de sangue periférico. As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa para tubos de colheita, já preparados com um anti-coagulante (EDTA). A extracção foi feita pelo método clássico de “Salting Out”.

Os tubos com EDTA e sangue foram centrifugados a 4000 r.p.m. durante 10 min a 4°C numa centrifuga (Sigma-302)K, após retirado o “buffy coat”. Foi produzida a lise dos glóbulos vermelhos com uma solução hipotónica, RCLB – Red Cell Lysis Buffer (10mM Tris-HCL, pH 7,6; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM NaCL), centrifugou-se a 1500 r.p.m. durante 10 minutos para recuperar as células nucleadas (Glóbulos Brancos) do sangue, rejeitando o sobrenadante por aspiração com uma pipeta de transferência e homogeneizando o “pellet”. Esta fase de lavagem foi repetida até que o sobrenadante estivesse límpido. De seguida adicionou-se ao “pellet” um tampão de lise, WCLB – White Cell Lysis Buffer (10mM Tris-HCl, pH 6,7; 10mM EDTA, pH 8,0; 50mM NaCl); um detergente, SDS 10% - Sodium Dodecyl Sulfato; e proteinase K 20 mg/ml, homogeneizou-se suavemente com uma pipeta de transferência e deixou-se a incubar numa turbula durante 2 horas. Nesta fase o DNA nuclear é extraído para o meio e as proteínas associadas são digeridas. De seguida procedeu-se à eliminação das proteínas celulares por desidratação e precipitação das mesmas com uma solução

saturada de NaCl 6 M, após adição do NaCl agitou-se vigorosamente com o vortex. Voltou-se a centrifugar a 3500 r.p.m. durante 20 minutos. Com esta centrifugação as proteínas sedimentaram e o DNA ficou livre no sobrenadante, que foi retirado para um tubo de 10 ml, adicionou-se a este tubo um volume duplo de Etanol absoluto a  $-20^{\circ}$  C. O Etanol tem a função de fazer precipitar o DNA livre em solução. Agitou-se suavemente o tubo e transferiu-se a nuvem de DNA para um tubo de 2 ml. Para terminar fizeram-se 3 lavagens com Etanol 70% e deixou-se secar o tubo, após evaporação de todo o Etanol juntou-se ddH<sub>2</sub>O para diluir o DNA.

O DNA é conservado a  $-20^{\circ}$  C para períodos longos e  $4^{\circ}$  C para períodos curtos.

### PCR (Polymerase Chain Reaction) para amplificação do painel de STRs (AmpF/STR® Identifiler™).

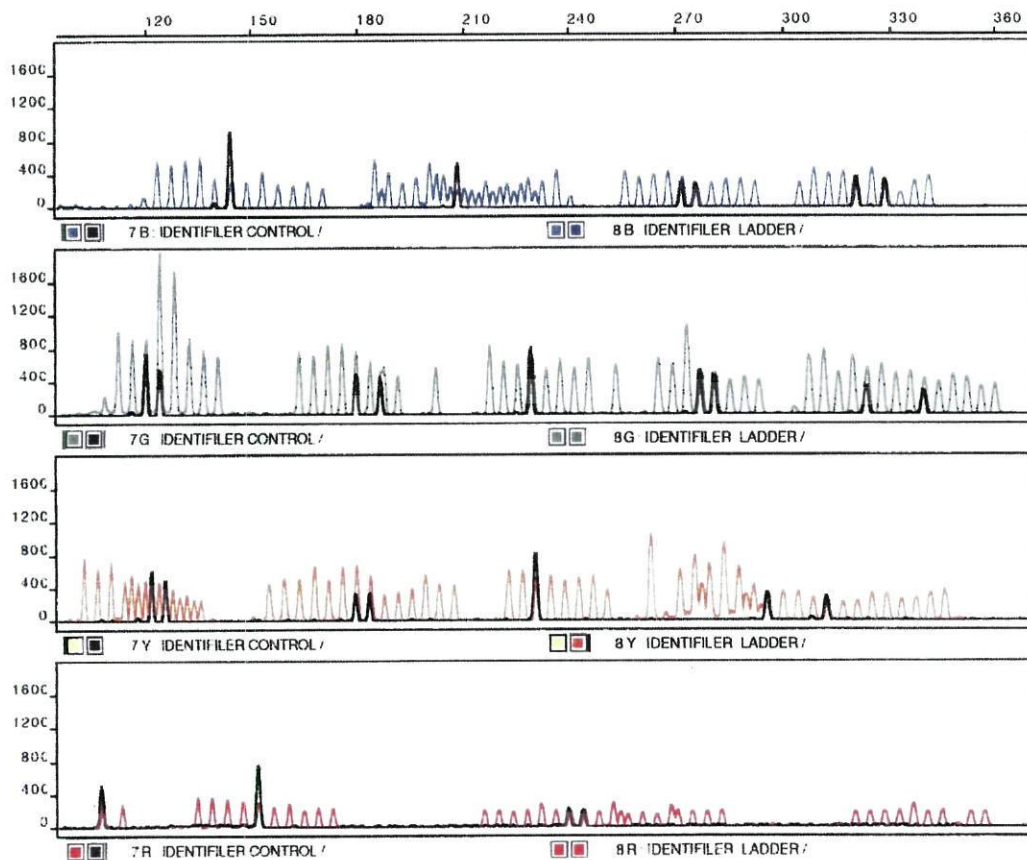


Figura 1 – Amostra controlo (picos pretos) do painel de STRs (AmpF/STR® Identifiler™) os picos de cor representam o marcador dos alelos.

A reacção de PCR teve como fim a amplificação do DNA, para tal foi utilizado entre 20-50 ng de DNA genómico, num total de reacção de 10 µl. As reacções continham a seguinte mistura: 3.8 µl de “Reaction Mix” (contendo MgCl<sub>2</sub>, dATP,

dGTP, dCTP, dTTP, Albumina e tampão com 0.05% sódio); 2 µl de “Primer Set” (oligonucleotídeos *locus* específicos, marcados com fluorocromos, 6-FAM™, VIC™, NED™ e PET™); 0.2 µl de Taq Gold® (enzima polimerase) e 3 µl de ddH<sub>2</sub>O. As reacções de PCR foram realizadas num termociclador Perkin Elmer 9600, tendo-se iniciado com um ciclo de desnaturação a 95°C, durante 11 minutos, seguido de 28 ciclos nas seguintes condições: desnaturação (94°C, 1 minuto); “annealing” (59°C, 1 minuto); extensão (72°C, 1 minuto). A extensão final após os 28 ciclos foi prolongado por 60 minutos, a 60°C, com o objectivo de terminar as cadeias.

Misturou-se 1.0 µl de produto de PCR com 1.0 µl de “Size Standard” (GeneScan™-500LIZ™) e 15 µl de Formamida HI-Di™. A mistura foi desnaturada a 96°C durante 2 minutos e colocada logo em seguida no aparelho “3100-Avant Genetic Analyzer”.

### PCR (Polymerase Chain Reaction) para amplificação dos genes HLA-A, B e Cw

A amplificação do genes HLA-A, B e Cw é feita com o “DYNAL Reli™ SSO HLA Typing Kit”.

Para esta reacção de PCR utilizou-se entre 10-15 ng de DNA genómico, num total de reacção de 15 µl. As reacções continham a seguinte mistura: 7,2 µl de “Master-mix” (Solução de Tris-HCL, contendo 10% glicerol, 100 mM KCl, 0,001% dNTPs, primers biotinilados, 0,001% AmpliTaq® [Taq polymerase], 0,05% azidina de sodio), 3,8 µl de MgCl<sub>2</sub> e 0,3 µl de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) (Foi necessário adicionar esta Taq extra ao Kit uma vez que a Taq contida no Kit não era suficiente para que houvesse amplificação).

Tabela 1- Descrição do número de pares de *primers*, exões e respectivos pesos moleculares para cada gene de HLA em questão.

	Pares <i>Primers</i>	Exões do gene Amplificados	Peso molecular
HLA-A	2	Exão 2	480pb
		Exão 3	314pb
HLA-B	2	Exão 2	376pb
		Exão 3	355pb
HLA-Cw	2	Exão 2	410pb
		Exão 3	519pb

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador Perkin Elmer 9600, começando com 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação (95°C, 15 segundos); “annealing” (60°C, 45 segundos); extensão (72°C, 15 segundos). A extensão final após os 35 ciclos foi prolongada por 5 minutos com o objectivo de terminar as cadeias. Esta reacção de PCR aplicou-se aos 3 genes HLA-A, B e Cw, que apenas diferem entre si no conteúdo da Master-mix.

De seguida fez-se o controlo da reacção de PCR, correndo uma electroforese, durante 15-20 minutos a 150 volts em gel de agarose a 2% (w/v) com 2 µl de “Loading Buffer” e 5 µl de produto de PCR a par com um indicador de pesos moleculares, para verificar se os pesos do produto de PCR correspondiam ao esperado para cada locus. Após verificação de amplificação positiva procedeu-se à reacção de hibridização.

#### **Hibridização com sondas para os genes HLA-A, B e Cw**

A hibridização é feita com o “DynaReli™ SSO HLA Typing Kit”.

Aqueceu-se o Tampão de hibridização (213 ml de água desionizada, 55ml de concentrado SSPE [Solução de fosfato de sódio com NaCl, EDTA e 1,0% ProClin®150] e 7ml de SDS [Solução de dodecil sulfato de sódio com 1,0% de ProClin®150]) e o tampão de lavagem (1228,5 ml de água desionizada, 65 ml de concentrado de SSPE e 6,5 ml de concentrado de SDS) a 50°C em banho-maria, de forma a que todos os precipitados sólidos fiquem em solução. Entretanto adicionou-se a cada produto de PCR (previamente amplificado) 10 µl de solução de desnaturação (solução contendo 3% EDTA, 1,6% hidróxido de sódio e Azul de Timol) e deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Colocou-se as tiras no suporte, com parte da linha de marcação virada para cima. Na parte superior de cada poço, contendo uma tira, colocou-se 20 µl de produto de PCR desnaturado, 1,25 ml de tampão de hibridização pré-aquecido e incubou-se durante 30 minutos a 50°C, com agitação. De seguida aspirou-se o líquido e adicionou-se a cada poço 1,25 ml de tampão de lavagem à temperatura ambiente, agitou-se durante alguns segundos e voltou-se a aspirar a solução, dispensou-se em cada poço 1,25 ml de tampão de lavagem pré-aquecido e incubou-se a 50°C durante 15 minutos. Durante estes 15 minutos preparou-se a solução de conjugado. Aspirou-se o conteúdo de cada poço e adicionou-se a cada tira 1,25 ml de solução de conjugado (para 1 tira: 1,3 ml de tampão de lavagem e 4 µl de Estreptavidina-HPR

[“*streptavidin-horseradish peroxidase*” numa solução de ACES com NaCl e 1,0% ProClin®150]) e agitou-se durante 15 minutos, voltou-se a aspirar e adicionou-se 1,25 ml de tampão de lavagem à temperatura ambiente e incubou-se de novo durante 5 minutos, repetiu-se os últimos 2 passos e no fim, aspirou-se o conteúdo e adicionou-se 1,25 ml de tampão citrato (570 ml de água desionizada e 30 ml de concentrado de citrato [solução de Citrato de sódio]) e incubou-se durante 5 minutos.

Entretanto preparou-se a solução de substrato (Para 1 tira: 1,1 ml de substrato A [Solução de citrato contendo 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,1% ProClin®150] e 275 µl de substrato B [Contém 0,1% 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina em 40% dimetilformamida]) e no fim dos 5 minutos aspirou-se a solução e adicionou-se 1,25 ml de solução substrato e incubou-se durante 10 minutos. Para terminar aspirou-se a solução, adicionou-se 1,25 ml de água desionizada a cada poço e deixou-se secar as tiras para poder fazer a leitura.

Este procedimento foi executado automaticamente numa aparelho AutoLipa.

### Interpretação dos resultados

As tabelas de interpretação podem ser consultadas no site: [www.tissue-typing.com](http://www.tissue-typing.com).

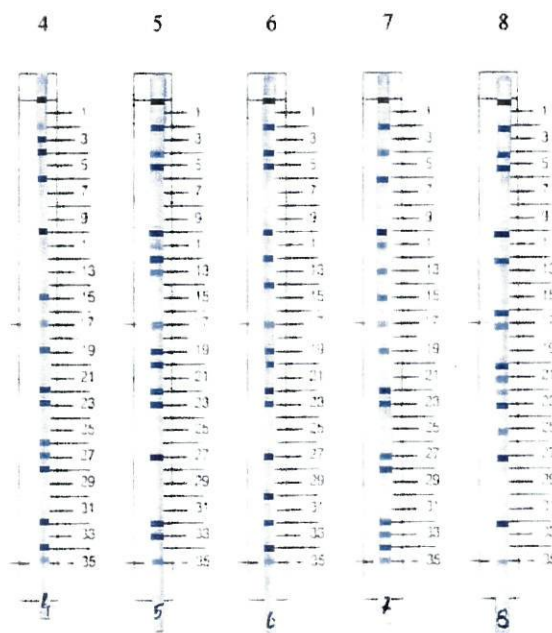


Figura 2 – Tiras de tipagem HLA, em que as bandas azuis indicam sinal positivo.

O tipo de HLA-A, B ou Cw foi atribuído lendo os sinais positivos (bandas azuis, ver figura 2) na tira de tipagem, determinando quais os alelos presentes nas amostras de DNA. Os resultados podem ser interpretados manualmente usando tabelas de

interpretação fornecida pelo kit, no entanto dada a complexidade da análise a interpretação foi feita usando o programa "DYNAL RELI™ SSO Pattern Matching".

As sondas de controlo tinham duas funções fundamentais:

➤ Indicar a amplificação adequada e a hibridização da amostra. As bandas controlo eram menos intensas que as outras. Sempre que havia ausência das bandas controlo não se podia fazer uma determinação correcta da tipagem, nestes casos todo o ensaio era invalidado, tendo que se repetir a amplificação e a hibridização.

➤ Definir a intensidade base para o sinal verdadeiro. Apenas se considerou os sinais com intensidade igual ou superior ao controlo.

Efectuou-se sempre um controlo positivo de DNA (DNA do Kit [DNA de um linfócito B em Solução Tris-HCL, EDTA contendo 0,05% azida sódica]) e um controlo negativo para cada ensaio.

O controlo positivo tinha sinal positivo para as bandas: 2;4;6;10;14;15;17;19;22;25;27;30;32;34 e 35 e a interpretação foi A\*0101 e A\*2301. O controlo negativo não teve sinais positivos. Sempre que o controlo positivo deu outro resultado ou o controlo negativo teve sinais positivos o ensaio foi repetido.

As tiras de tipagem HLA-B continham dois controlos internos, um para o exão 2 (sonda 27) e outro para o exão 3 (sonda 56).

As sondas de controlo tinham as mesmas duas funções fundamentais explicadas para o HLA-A.

O controlo positivo tinha sinal positivo para as bandas: 3; 5; 7; 8; 13; 14; 16; 26; 27; 29; 30; 38; 41; 46; 47; 50; 53; 54 e 56 e a interpretação foi B\*0801 e B\*1801 ou B\*0801 e B\*1803. O controlo negativo não teve sinais positivos. Sempre que o controlo positivo deu outro resultado ou o controlo negativo teve sinais positivos o ensaio foi repetido.

As tiras de tipagem HLA-Cw continham dois controlos internos, um para o exão 2 (probe 17) e outro para o exão 3 (probe 36).

As sondas de controlo tinham as mesmas duas funções fundamentais explicadas para o HLA-A.

O controlo positivo tinha sinal positivo para as bandas: 3; 6; 8; 12; 13; 17; 24; 30; 34 e 36 e a interpretação foi Cw\*07011. O controlo negativo não teve sinais positivos. Sempre que o controlo positivo deu outro resultado ou o controlo negativo teve sinais positivos o ensaio foi repetido.

### **CAPÍTULO III**

**Exclusion of paternity of a deceased man with the contribution of MHC genes**

# Exclusion of paternity of a deceased man with the contribution of MHC genes.

Gärtner AL<sup>1,2,\*</sup>, Vide MC<sup>3</sup>, Mendes F<sup>2</sup>, Pires A<sup>2</sup>, Tafulo S<sup>2</sup>, Porto G<sup>1,4</sup>, Alves H<sup>2\*</sup>

1. Instituto de Biologia Molecular e Celular, Porto, Portugal
2. Laboratório de Genética, Centro de Histocompatibilidade do Norte, Porto, Portugal
3. Laboratório de Biologia Forense, Instituto de Medicina Legal de Coimbra, Coimbra, Portugal
4. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal

\*Corresponding authors

Tel: 351-22-5573470, Fax:351-22-5501101

E-mail: [andreagartner@yahoo.com](mailto:andreagartner@yahoo.com)

Address: Centro de Histocompatibilidade do Norte

Rua Dr. Roberto Frias, Pavilhão Maria Fernanda

4200-467 Porto

Portugal

## Abstract

Four DNA samples corresponding to a child, her mother and the alleged grandparents (parents of the alleged father who deceased) were studied for Short Tandem Repeats (STRs) markers and HLA genes. The results of the STR markers couldn't exclude the deceased man as the father of the child. The MHC genes could exclude the deceased man. We report the use of HLA genes in addition to Short Tandem Repeats markers, for paternity testing, once the exclusive use of STRs increases the risk of erroneous conclusions.

*Keywords: Parentage testing; Short Tandem repeats; HLA genes; paternity exclusion.*

## Introduction

At the end of 70's Human Leukocyte Antigens (HLA) were the most studied leukocyte membrane markers. HLA genes are the most polymorphic yet discovered, with hundreds of alleles described so far [1].

The use of inherited markers for elucidation of disputed or unclear parentage relies on fundamental principles such as, a genetic marker cannot appear in a child unless it is present in one or both biological parent's [2].

In cases of disputed paternity the main goal is to obtain either exclusion or affiliation of the alleged father.

Presently, DNA profiles from Short Tandem Repeats (STR) loci are commonly used for paternity testing. STRs are the called microsatellites, which consist in tandem repeats of

short units of DNA that occur with high frequency throughout the genome. Microsatellite loci have a high degree of variability that is caused by high rates of mutations that alter microsatellite length [3].

In this work we analyse a paternity case where genetic information of the deceased alleged father was given by the genetic information of the child's alleged grandparents (the parents of the deceased father).

## Material and Methods

DNA was extracted from blood samples of 4 individuals: Mother, daughter, alleged grandmother and grandfather.

### STR typing

22 STRs were studied in the 4 samples.

The microsatellite typing was done by PCR, STRs studied were: HUMTH01, HUMVWA31/A, HUMF13A1, HUMFES/FPS and HUMACTBP2; D3S1358, HUMFIBRA/FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, TPOX and CSF1PO; SE33; D12S391; D1S1656; D19S433, D2S1338, Penta E and Penta D .

### MHC typing

MHC Genes, HLA-A, B, C, DRB1 and DQB1, typing were done by PCR-SSO (HLA-A,B and Cw, Dynal Rely<sup>TM</sup> SSO and HLA-DRB1 and DQB1, Murex & Innogenetics SSO – INNO LIPA<sup>TM</sup>)

## Results

Twenty-two STR markers were studied. The results are shown on table 1.

Table 1 - Results of the STR typing

STRs	Grandfather	Grandmother	Mother	Daughter
<b>HUMTH01</b>	6 – 6	7 – 9.3	6 – 9.3	6 – 9.3
<b>HUMFES/FPS</b>	10 – 10	10 – 12	10 – 10	10 – 10
<b>HUMVWA31/A</b>	14 – 17	16 – 16	15 – 18	17 – 18
<b>HUMF13/A1</b>	6 – 7	6 – 7	7 – 7	7 – 7
<b>D3S1358</b>	15 – 16	14 – 16	15 – 16	15 – 16
<b>HUMFIBRA/FGA</b>	20 – 23	23 – 24	18 – 20	20 – 24

<b>D8S1179</b>	11 - 15	14 - 15	14 - 15	14 - 14
<b>D21S11</b>	30 - 30.2	30 - 31.2	29 - 32.2	29 - 30
<b>D18S51</b>	15 - 19	17 - 17	13 - 15	15 - 15
<b>D5S818</b>	11 - 13	12 - 13	11 - 12	11 - 12
<b>D13S317</b>	9 - 12	9 - 11	11 - 12	12 - 13
<b>D7S820</b>	10 - 11	11 - 12	8 - 10	10 - 10
<b>D16S539</b>	11 - 13	8 - 11	12 - 12	12 - 13
<b>TPOX</b>	8 - 12	8 - 8	8 - 8	8 - 11
<b>CSFIPO</b>	8 - 11	11 - 11	11 - 12	11 - 12
<b>SE33</b>	19 - 27.2	18 - 29.2	18 - 26.2	18 - 19
<b>D12S391</b>	17 - 23	17.3 - 23	19 - 24	19 - 23
<b>D1S1656</b>	16 - 17.3	17 - 17.3	13 - 17.3	13 - 15.3
<b>D19S433</b>	13 - 14.2	13 - 15	13 - 14	14 - 15
<b>D2S1338</b>	23 - 26	17 - 23	17 - 17	17 - 17
<b>Penta E</b>	12 - 13	7 - 7	15 - 15	7 - 15
<b>Penta D</b>	9 - 14	12 - 13	11 - 13	9 - 11

As shown in the table there are only three loci exclusion.

Four HLA (A, B DR and DQ) loci were studied. The results are shown on table 2.

Table 2 - Results of HLA gene typing

	Haplotype
Mother	HLA-A*03,*68, B*27,*57, Cw*02,*06, DRB1*03,*07, DQB1*02,*02
Daughter	HLA-A*02,*68, B*27,*51, Cw*02,*16, DRB1*03,*11, DQB1*02,*03
Grandmother	HLA-A*03,*26, B*07,*49, Cw*04,*07, DRB1*11,*16, DQB1*03,*05
Grandfather	HLA-A*24,*33, B*14,*51, Cw*08,*15, DRB1*01,*15, DQB1*05,*06

The involved Haplotypes deduced by segregation transmission analysis were as follows:

Mother

a: HLA-A\*68, B\*27, Cw\*02, DRB1\*03, DQB1\*02

b: HLA-A\*03, B\*57, Cw\*06, DRB1\*07, DQB1\*02

Daughter

a: HLA-A\*68, B\*27, Cw\*02, DRB1\*03, DQB1\*02 (inherited from mother)

b: HLA-A\*02, B\*51, Cw\*16, DRB1\*11, DQB1\*03 (inherited from father)

The possible haplotypes involved in the alleged grandparents calculated by known linkage disequilibrium were as follows:

#### Grandfather

e: HLA-A\*24, B\*51, Cw\*15, DRB1\*15, DQB1\*06

f: HLA-A\*33, B\*14, Cw\*08, DRB1\*01, DQB1\*05

#### Grandmother

g: HLA-A\*03, B\*07, Cw\*07, DRB1\*16, DQB1\*05

h: HLA-A\*26, B\*49, Cw\*04, DRB1\*11, DQB1\*03

### **Discussion**

The results of the STR markers couldn't exclude the deceased man as the father of the child. There were only 3 locus that excluded the biological relationship, that were TPOX, D13S317 and D1S1656. Three exclusions don't imply non-paternity [4]. It would be required at least four exclusions. This exclusions could be due to mutations, once microsatellite loci have a high rates of mutation [3].

The MHC genes could exclude the deceased man, who didn't share either of the two HLA-A or Cw with the Child, once the alleged grandfathers don't show any of those alleles. Considering the shared alleles between child and mother, the inherited haplotype from the mother is HLA-A\*68, B\*27, Cw\*02, DRB1\*03, DQB1\*02 and the inherited haplotype from the biological father is HLA-A\*02, B\*51, Cw\*16, DRB1\*11, DQB1\*03. This haplotye couldn't be transmitted from the alleged grandparents to the alleged father, since it doesn't exist in the alleged grandparents. So the paternity is excluded.

#### **Conclusions:**

This case shows how informative are HLA haplotypes for biologic exclusions.

Using methods for HLA polymorphism's helps significantly to increase the chance of validation of ambiguous results in paternity testing.

This demonstrates that the exclusive employment of a parentage testing kit is compromised by an increased risk of erroneous conclusions.

## References

- [1]. Gruen JR and Weissman SM. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood*. 1997; 90:4252-4265.
- [2]. Hawkins BR. Fourteen-year experience of human leukocyte antigen typing in cases of disputed parentage in Hong Kong. *HKMJ*. 1997; 3: 369-372.
- [3]. Kruglyak S, Durrett RT, Schug MD, Aquadro CF. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:10774-10778.
- [4]. Gunn PR, Trueman K, Stapleton P, Klarkowski DB. DNA analysis in disputed parentage: the occurrence of two apparently false exclusions of paternity, both at short tandem repeat loci, in one child. *Electrophoresis*. 1997; 18: 1650-1652.

**CAPÍTULO IV**  
**Paternity Exclusion based on HLA Typing**

## Paternity Exclusion based on HLA Typing

Gärtner AL<sup>1,2,\*</sup>, Tafalo S<sup>2</sup>, Alves H<sup>2</sup>, Porto G<sup>1,3</sup>

1. Instituto de Biologia Molecular e Celular, Porto, Portugal
2. Laboratório de Genética, Centro de Histocompatibilidade do Norte, Porto, Portugal
3. Instituto de Ciências Biomédicas Abel; Salazar, Universidade do Porto, Portugal

\*Corresponding authors

Tel: 351-22-5573470, Fax:351-22-5501101

E-mail: [andreagartner@yahoo.com](mailto:andreagartner@yahoo.com)

Address: Centro de Histocompatibilidade do Norte

Rua Dr. Roberto Frias, Pavilhão Maria Fernanda

4200-467 Porto

Portugal

### Abstract

Four DNA samples corresponding to two children, the mother and the alleged father were studied for HLA genes and STRs (AmpF/STR® Identifiler™). The results of HLA and STRs excluded one of the child as daughter of the alleged father.

In this case we report that it wasn't necessary to use STRs for the exclusion, the HLA already excluded the father.

We also report a mutation for one of the STR markers, which shows a mismatch between the mother and one of the daughters.

*Keywords: Parentage testing; Short Tandem Repeats; HLA genes; paternity exclusion.*

### Introduction

The MHC in humans is called Human Leukocyte Antigens (HLA). It is located on chromosome 6p21.31 and covers a region of about 3.6 Mpb depending on the haplotype [1]. MHC is inherited *en bloc* as a haplotype with the exception of the rare recombinational events.

One of the main characteristics of the MHC is its extreme polymorphism. Among the expressed loci, the MHC has the greatest degree of polymorphism in the human genome. This is at such a level that it is theoretically possible for each human being to have a different MHC genotype.

The development of methods for molecular analysis of Short Tandem Repeats (STRs) revolutionised parentage testing, increasing the discriminatory power associated with their high degree of polymorphism [2].

However, the occurrence of germline mutations at microsatellite loci introduces problems in ascertaining non-fatherhood status in paternity testing [3].

### Material and Methods

DNA was extracted from blood samples of 4 individuals: Mother, two daughters and alleged father.

#### MHC typing

MHC Genes, HLA-A, B, C done by PCR-SSO (Dynal Rely™)

#### STR typing

Sixteen STRs were studied using the AmpF/STR® Identifiler™ Kit, from Applied Biosystems, for ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyser.

The STRs studied were: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenina, D5S818 e FGA

### Results

Three HLA (A, B and Cw) loci were studied. The results are shown on table 1.

Table 1 - Results of HLA gene typing

	Haplotype
Father	HLA-A*03,*32, B*35,*40, Cw*02,*04
Mother	HLA-A*03,*33, B*14,*35, Cw*04,*08
Daughter (1)	HLA-A*03,*03, B*35,*35, Cw*04,*04
Daughter (2)	HLA-A*03,*24, B*35,*55, Cw*04,*03

The involved Haplotypes deduced by segregation transmission analysis were as follows:

#### Mother

a: HLA-A\*03, B\*35, Cw\*04

b: HLA-A\*32, B\*40, Cw\*02

#### Father

c: HLA-A\*03, B\*35, Cw\*04

d: HLA-A\*32, B\*40, Cw\*02

### Daughter (1)

a: HLA-A\*03, B\*35, Cw\*04 (inherited from mother)

b: HLA-A\*03, B\*35, Cw\*04 (inherited from father)

### Daughter (2)

a: HLA-A\*03, B\*35, Cw\*04 (inherited from mother)

b: HLA-A\*24, B\*55, Cw\*03 (inherited from father)

Sixteen STR markers were studied. The results are shown on table 1.

Table 2 - Results of the STR typing

STRs	Father	Mother	Daughter 1	Daughter 2
D8S1179	10 - 15	11 - 12	10 - 11	11 - 14
D21S11	31 - 31.2	28 - 31	31 - 31	30 - 31
D7S820	10 - 12	9 - 11	11 - 12	9 - 10
CSP1PO	9 - 12	11 - 12	9 - 11	11 - 12
D3S1358	16 - 19	16 - 17	17 - 19	17 - 18
TH01	5 - 5	4 - 7	5 - 7	4 - 7
D16S539	11 - 13	8 - 11	8 - 13	11 - 11
D2S1338	17 - 23	17 - 25	23 - 25	16 - 24
D19S433	14 - 16	14 - 15	14 - 16	14 - 16
vWA	17 - 18	15 - 18	17 - 18	15 - 15
TPOX	8 - 11	8 - 8	8 - 11	8 - 11
D18S51	12 - 17	12 - 14	12 - 12	12 - 20
D5S818	12 - 12	11 - 13	11 - 12	13 - 13
FGA	21 - 25	22 - 23	23 - 25	22 - 23
Amelogene	X - Y	X - X	X - X	X - X

As show in table 2 there are 11 exclusions for the father and 1 (D2S1338) for the mother for daughter 2.

### Discussion

The HLA excluded the alleged father as father of daughter 2. This man didn't share either of the two HLA-A, B and Cw with daughter 2. Considering the shared alleles between daughter and mother, the inherited haplotype from the mother is HLA-A\*03, B\*35 and Cw\*04 and the inherited haplotype from the biological father is HLA-A\*24,

B\*55, Cw\*03. This haplotype couldn't be transmitted from the alleged father. So for daughter 2 the paternity is excluded.

The results of the STR markers exclude the father once there are 11 locus excluded in 16 makers, there is no doubt on the exclusion.

The results of the STR markers also shows one inconsistent result between daughter 2 and mother, since there is a mismatch for D2S1338, confirming the possibility of false negative results due to mutations as previously described for STRs D21S11 [4] and D5S818 [5].

### **Conclusions:**

This case shows how HLA genes are highly informative, and that in many case, it is enough to exclude a paternity. On the other hand, this case shows how inconsistent results can occasionally be encountered for known or alleged parents who otherwise shows to be the parents.

### **References**

- [1]. The MHC Sequencing consortium. Complete sequence and gene map of human major histocompatibility complex. *Nature*. 1999; 401: 921-923.
- [2]. Edwards M and Allen RW. Characteristics of mutations at the D5S818 locus studied with a tightly linked marker. *Immunohematology*. 2004; 44: 83-90.
- [3]. Dawid AP, Mortera J and Pascali VL. Non-fatherhood or mutation? A probabilistic approach to parental exclusion in paternity testing. *Forensic Sci Int*. 2001; 124: 55-61.
- [4]. Thangaraj K, Reddy AG, Singh L. Mutation in the STR locus D21S1 1 of father causing allele mismatch in the child. *J Forensic Sci*. 2004; 49:99-103.
- [5]. Edwards M and Allen RW. Characteristics of mutations at the D5S818 locus studied with a tightly linked marker. *Transfusion*. 2004; 44: 83-90.

**CAPÍTULO V**  
Discussão e Conclusão

## Discussão

Não há evidências suficientes para aceitar que o exame de HLA deva ser substituído pelos STRs em casos de disputa de paternidade. Para a investigação do vínculo genético na população em geral é ainda um recurso importante e insubstituível, por razões técnicas e de custos. Não se questiona que os STRs foram um avanço importante, no entanto tem sido questionado o seu uso devido talvez a desconhecimento de verdades científicas básicas. Ainda hoje, na área da transplantação, a procura de dador compatível faz-se através do exame de HLA. A vasta complexidade do sistema HLA faz com que este seja extremamente útil no estudo do vínculo genético.

Michael Edwards e Robert Allen (2004) demonstram num artigo publicado recentemente que os STRs têm uma elevada probabilidade de inconsistências, devido à elevada taxa de mutação deste tipo de marcadores. Neste estudo demonstram, utilizando um dos marcadores do painel de STRs do “kit AmpF/STR® Identifiler™” (D5S818), que devido a inserções ou deleções nas sequências ocorrem várias vezes falsos negativos (Edwards and Allen, 2004).

Thangaraj K *et al.* (2004) descrevem um caso de exclusão, falsa negativa, devido a uma mutação no marcador D21S11. Neste caso foi necessário estudar mais 6 marcadores do cromossoma Y e sequenciar todos os alelos do locus D21S11 no pai, na mãe e no filho para concluir que se tratava de uma mutação e não de uma exclusão. Tal como descrito no capítulo IV em que há uma falsa exclusão no STR D2S1338. Por outro lado, Henke *et al.* (1999) demonstram que a utilização exclusivamente de um sistema de estudo de paternidade é um erro, principalmente em caso de dúvida deve sempre ser utilizado mais do que um sistema de marcadores (Henke L *et al.*, 1999). Em casos como este é sem dúvida mais económico recorrer à tipagem dos alelos HLA.

No caso do pretense pai ter falecido, é sempre difícil provar ou excluir a paternidade. No entanto, estudando o HLA de familiares, por exemplo pai e mãe do falecido, é sempre possível estimar o haplótipo do pretense pai, com base na transmissão em bloco do haplótipo HLA. Sempre que há mais do que duas gerações envolvidas é vantajoso recorrer à genotipagem dos alelos HLA, como foi demonstrado no capítulo III.

Lonardo *et al.* (2000) descrevem um caso em que a exclusão de paternidade do pretense pai apenas foi possível recorrendo à genotipagem do HLA, uma vez que em vinte e dois STRs apenas um apresentava exclusão.

Segundo a tabela do Código de Custas Judiciais (DR, II Serie, 15-07-1997), para o triénio de 2004-2006, o custo do estudo de paternidade por STRs é de 1468,5 Euros por trio (pretense pai, mãe e filho) por cada indivíduo adicional são 489,5 Euros. Nos casos estudados, uma vez que intervieram quatro indivíduos o custo foi de 1958,0 Euros.

Segundo a tabela de preços das instituições e serviços integrados no Sistema Nacional de Saúde (DR, I serie-B, 05-02-2003) para o estudo molecular HLA-ABC, o custo é de 146,80 Euros por indivíduo e o estudo molecular HLA-DQ/DR é de 130,80 Euros. Para o 1º estudo (Capítulo III) o custo foi de 1210,80 Euros, para o 2º estudo (Capítulo IV), uma vez que a tipagem genética do HLA-ABC seria suficiente para resolver o caso, o custo foi de 587,6 Euros.

Em qualquer um dos casos o custo da tipagem HLA ficou bastante mais económica, e em ambos os casos a exclusão de paternidade foi resolvida apenas com a determinação dos alelos HLA.

Tabela 2 – Lista completa dos alelos HLA Classe I, actualizada até Abril 2004.

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-E	HLA-F	HLA-G
A*010101	B*070201	Cw*010201	E*0101	F*010101	G*010101
A*010102	B*070202	Cw*010202	E*0102	F*010102	G*010102
A*0102	B*070203	Cw*0103	E*010301	-----	G*010103
A*0103	B*070204	Cw*0104	E*010302	-----	G*010104
A*0104N	B*0703	Cw*0105	E*010303	-----	G*010105
A*0106	B*0704	Cw*0106	E*0104	-----	G*010106
A*0107	B*0705	Cw*0107	-----	-----	G*010107
A*0108	B*0706	Cw*0108	-----	-----	G*010108
A*0109	B*0707	Cw*0109	-----	-----	G*0102
A*0110	B*0708	Cw*0110	-----	-----	G*0103
A*02010101	B*0709	Cw*020201	-----	-----	G*010401
A*02010102L	B*0710	Cw*020202	-----	-----	G*010402
A*020102	B*0711	Cw*020203	-----	-----	G*010403
A*020103	B*0712	Cw*020204	-----	-----	G*0105N
A*020104	B*0713	Cw*020205	-----	-----	G*0106DRA*0101
A*020105	B*0714	Cw*0203	-----	-----	-----
A*020106	B*0715	Cw*0204	-----	-----	-----
A*020107	B*0716	Cw*0205	-----	-----	-----
A*020108	B*0717	Cw*0206	-----	-----	-----
A*020109	B*0718	Cw*0207	-----	-----	-----
A*0202	B*0719	Cw*0208	-----	-----	-----
A*0203	B*0720	Cw*0209	-----	-----	-----
A*0204	B*0721	Cw*030201	-----	-----	-----
A*0205	B*0722	Cw*030202	-----	-----	-----
A*0206	B*0723	Cw*030301	-----	-----	-----
A*0207	B*0724	Cw*030302	-----	-----	-----
A*0208	B*0725	Cw*030303	-----	-----	-----

A*0209	B*0726	Cw*030304	-----	-----	-----
A*0210	B*0727	Cw*030401	-----	-----	-----
A*0211	B*0728	Cw*030402	-----	-----	-----
A*0212	B*0729	Cw*030403	-----	-----	-----
A*0213	B*0730	Cw*0305	-----	-----	-----
A*0214	B*0731	Cw*0306	-----	-----	-----
A*0215N	B*0732	Cw*0307	-----	-----	-----
A*0216	B*0733	Cw*0308	-----	-----	-----
A*021701	B*0734	Cw*0309	-----	-----	-----
A*021702	B*0735	Cw*0310	-----	-----	-----
A*0218	B*0736	Cw*0311	-----	-----	-----
A*0219	B*0737	Cw*0312	-----	-----	-----
A*022001	B*0738	Cw*0313	-----	-----	-----
A*022002	B*0801	Cw*0314	-----	-----	-----
A*0221	B*0802	Cw*0315	-----	-----	-----
A*0222	B*0803	Cw*0316	-----	-----	-----
A*0224	B*0804	Cw*04010101	-----	-----	-----
A*0225	B*0805	Cw*04010102	-----	-----	-----
A*0226	B*0806	Cw*040102	-----	-----	-----
A*0227	B*0807	Cw*0403	-----	-----	-----
A*0228	B*0808N	Cw*040401	-----	-----	-----
A*0229	B*0809	Cw*040402	-----	-----	-----
A*0230	B*0810	Cw*0405	-----	-----	-----
A*0231	B*0811	Cw*0406	-----	-----	-----
A*0232N	B*0812	Cw*0407	-----	-----	-----
A*0233	B*0813	Cw*0408	-----	-----	-----
A*0234	B*0814	Cw*0409N	-----	-----	-----
A*0235	B*0815	Cw*0410	-----	-----	-----
A*0236	B*0816	Cw*0411	-----	-----	-----
A*0237	B*0817	Cw*0412	-----	-----	-----
A*0238	B*0818	Cw*0413	-----	-----	-----
A*0239	B*0819N	Cw*0414	-----	-----	-----
A*0240	B*0820	Cw*0415	-----	-----	-----
A*0241	B*0821	Cw*0501	-----	-----	-----
A*0242	B*1301	Cw*0502	-----	-----	-----
A*0243N	B*1302	Cw*0503	-----	-----	-----
A*0244	B*1303	Cw*0504	-----	-----	-----
A*0245	B*1304	Cw*0505	-----	-----	-----
A*0246	B*1306	Cw*0506	-----	-----	-----
A*0247	B*1307N	Cw*0507N	-----	-----	-----
A*0248	B*1308	Cw*0508	-----	-----	-----
A*0249	B*1309	Cw*0509	-----	-----	-----
A*0250	B*1310	Cw*0602	-----	-----	-----
A*0251	B*1311	Cw*0603	-----	-----	-----
A*0252	B*1312	Cw*0604	-----	-----	-----
A*0253N	B*1313	Cw*0605	-----	-----	-----
A*0254	B*1401	Cw*0606	-----	-----	-----
A*0255	B*1402	Cw*0607	-----	-----	-----
A*0256	B*1403	Cw*0608	-----	-----	-----
A*0257	B*1404	Cw*0609	-----	-----	-----
A*0258	B*1405	Cw*0610	-----	-----	-----
A*0259	B*140601	Cw*0611	-----	-----	-----
A*0260	B*140602	Cw*070101	-----	-----	-----
A*0261	B*15010101	Cw*070102	-----	-----	-----
A*0262	B*15010102N	Cw*070103	-----	-----	-----
A*0263	B*150102	Cw*07020101	-----	-----	-----
A*0264	B*150103	Cw*07020102	-----	-----	-----
A*0265	B*150104	Cw*0703	-----	-----	-----
A*0266	B*1502	Cw*070401	-----	-----	-----
A*0267	B*1503	Cw*070402	-----	-----	-----

A*0268	B*1504	Cw*0705	-----	-----	-----
A*03010101	B*1505	Cw*0706	-----	-----	-----
A*03010102N	B*1506	Cw*0707	-----	-----	-----
A*030102	B*1507	Cw*0708	-----	-----	-----
A*030103	B*1508	Cw*0709	-----	-----	-----
A*0302	B*1509	Cw*0710	-----	-----	-----
A*0303N	B*1510	Cw*0711	-----	-----	-----
A*0304	B*151101	Cw*0712	-----	-----	-----
A*0305	B*151102	Cw*0713	-----	-----	-----
A*0306	B*1512	Cw*0714	-----	-----	-----
A*0307	B*1513	Cw*0715	-----	-----	-----
A*0308	B*1514	Cw*0716	-----	-----	-----
A*0309	B*1515	Cw*0717	-----	-----	-----
A*0310	B*1516	Cw*0718	-----	-----	-----
A*0311N	B*15170101	Cw*0719	-----	-----	-----
A*0312	B*15170102	Cw*0720	-----	-----	-----
A*0313	B*1518	Cw*0721	-----	-----	-----
A*0314	B*1519	Cw*0722	-----	-----	-----
A*110101	B*1520	Cw*0723	-----	-----	-----
A*110102	B*1521	Cw*0724	-----	-----	-----
A*1102	B*1523	Cw*0725	-----	-----	-----
A*1103	B*1524	Cw*0726	-----	-----	-----
A*1104	B*1525	Cw*080101	-----	-----	-----
A*1105	B*1526N	Cw*080102	-----	-----	-----
A*1106	B*1527	Cw*0802	-----	-----	-----
A*1107	B*1528	Cw*0803	-----	-----	-----
A*1108	B*1529	Cw*0804	-----	-----	-----
A*1109	B*1530	Cw*0805	-----	-----	-----
A*1110	B*1531	Cw*0806	-----	-----	-----
A*1111	B*1532	Cw*0807	-----	-----	-----
A*1112	B*1533	Cw*0808	-----	-----	-----
A*1113	B*1534	Cw*0809	-----	-----	-----
A*1114	B*1535	Cw*0810	-----	-----	-----
A*1115	B*1536	Cw*0811	-----	-----	-----
A*1116	B*1537	Cw*0812	-----	-----	-----
A*1117	B*1538	Cw*120201	-----	-----	-----
A*2301	B*1539	Cw*120202	-----	-----	-----
A*2302	B*1540	Cw*120203	-----	-----	-----
A*2303	B*1542	Cw*120301	-----	-----	-----
A*2304	B*1543	Cw*120302	-----	-----	-----
A*2305	B*1544	Cw*120303	-----	-----	-----
A*2306	B*1545	Cw*120401	-----	-----	-----
A*2307N	B*1546	Cw*120402	-----	-----	-----
A*2308N	B*1547	Cw*1205	-----	-----	-----
A*2309	B*1548	Cw*1206	-----	-----	-----
A*2310	B*1549	Cw*1207	-----	-----	-----
A*2311N	B*1550	Cw*1208	-----	-----	-----
A*2312	B*1551	Cw*1209	-----	-----	-----
A*24020101	B*1552	Cw*1210	-----	-----	-----
A*24020102L	B*1553	Cw*1211	-----	-----	-----
A*240202	B*1554	Cw*1212	-----	-----	-----
A*240203	B*1555	Cw*140201	-----	-----	-----
A*240204	B*1556	Cw*140202	-----	-----	-----
A*240205	B*1557	Cw*140203	-----	-----	-----
A*240301	B*1558	Cw*1403	-----	-----	-----
A*240302	B*1560	Cw*1404	-----	-----	-----
A*2404	B*1561	Cw*1405	-----	-----	-----
A*2405	B*1562	Cw*150201	-----	-----	-----
A*2406	B*1563	Cw*150202	-----	-----	-----
A*2407	B*1564	Cw*1503	-----	-----	-----

A*2408	B*1565	Cw*1504	-----	-----	-----
A*2409N	B*1566	Cw*150501	-----	-----	-----
A*2410	B*1567	Cw*150502	-----	-----	-----
A*2411N	B*1568	Cw*150503	-----	-----	-----
A*2413	B*1569	Cw*1506	-----	-----	-----
A*2414	B*1570	Cw*1507	-----	-----	-----
A*2415	B*1571	Cw*1508	-----	-----	-----
A*2417	B*1572	Cw*1509	-----	-----	-----
A*2418	B*1573	Cw*1510	-----	-----	-----
A*2419	B*1574	Cw*1511	-----	-----	-----
A*2420	B*1575	Cw*1512	-----	-----	-----
A*2421	B*1576	Cw*1601	-----	-----	-----
A*2422	B*1577	Cw*1602	-----	-----	-----
A*2423	B*1578	Cw*160401	-----	-----	-----
A*2424	B*1579N	Cw*1606	-----	-----	-----
A*2425	B*1580	Cw*1701	-----	-----	-----
A*2426	B*1581	Cw*1702	-----	-----	-----
A*2427	B*1582	Cw*1703	-----	-----	-----
A*2428	B*1583	Cw*1801	-----	-----	-----
A*2429	B*180101	Cw*1802	-----	-----	-----
A*2430	B*180102	-----	-----	-----	-----
A*2431	B*1802	-----	-----	-----	-----
A*2432	B*1803	-----	-----	-----	-----
A*2433	B*1804	-----	-----	-----	-----
A*2434	B*1805	-----	-----	-----	-----
A*2435	B*1806	-----	-----	-----	-----
A*2436N	B*1807	-----	-----	-----	-----
A*2437	B*1808	-----	-----	-----	-----
A*2438	B*1809	-----	-----	-----	-----
A*2439	B*1810	-----	-----	-----	-----
A*2440N	B*1811	-----	-----	-----	-----
A*2441	B*1812	-----	-----	-----	-----
A*2442	B*1813	-----	-----	-----	-----
A*250101	B*1814	-----	-----	-----	-----
A*250102	B*1815	-----	-----	-----	-----
A*2502	B*1817N	-----	-----	-----	-----
A*2503	B*1818	-----	-----	-----	-----
A*2504	B*1819	-----	-----	-----	-----
A*2601	B*2701	-----	-----	-----	-----
A*2602	B*2702	-----	-----	-----	-----
A*2603	B*2703	-----	-----	-----	-----
A*2604	B*2704	-----	-----	-----	-----
A*2605	B*270502	-----	-----	-----	-----
A*2606	B*270503	-----	-----	-----	-----
A*260701	B*270504	-----	-----	-----	-----
A*260702	B*270505	-----	-----	-----	-----
A*2608	B*270506	-----	-----	-----	-----
A*2609	B*2706	-----	-----	-----	-----
A*2610	B*2707	-----	-----	-----	-----
A*2611N	B*2708	-----	-----	-----	-----
A*2612	B*2709	-----	-----	-----	-----
A*2613	B*2710	-----	-----	-----	-----
A*2614	B*2711	-----	-----	-----	-----
A*2615	B*2712	-----	-----	-----	-----
A*2616	B*2713	-----	-----	-----	-----
A*2617	B*2714	-----	-----	-----	-----
A*2618	B*2715	-----	-----	-----	-----
A*2619	B*2716	-----	-----	-----	-----
A*2620	B*2717	-----	-----	-----	-----
A*29010101	B*2718	-----	-----	-----	-----

A*29010102N	B*2719	-----	-----	-----	-----
A*290201	B*2720	-----	-----	-----	-----
A*290202	B*2721	-----	-----	-----	-----
A*290203	B*2723	-----	-----	-----	-----
A*2903	B*2724	-----	-----	-----	-----
A*2904	B*2725	-----	-----	-----	-----
A*2905	B*350101	-----	-----	-----	-----
A*2906	B*350102	-----	-----	-----	-----
A*2907	B*3502	-----	-----	-----	-----
A*2908N	B*3503	-----	-----	-----	-----
A*2909	B*3504	-----	-----	-----	-----
A*2910	B*3505	-----	-----	-----	-----
A*2911	B*3506	-----	-----	-----	-----
A*3001	B*3507	-----	-----	-----	-----
A*3002	B*3508	-----	-----	-----	-----
A*3003	B*350901	-----	-----	-----	-----
A*3004	B*350902	-----	-----	-----	-----
A*3006	B*3510	-----	-----	-----	-----
A*3007	B*3511	-----	-----	-----	-----
A*3008	B*3512	-----	-----	-----	-----
A*3009	B*3513	-----	-----	-----	-----
A*3010	B*351401	-----	-----	-----	-----
A*3011	B*351402	-----	-----	-----	-----
A*3012	B*3515	-----	-----	-----	-----
A*310102	B*3516	-----	-----	-----	-----
A*3102	B*3517	-----	-----	-----	-----
A*3103	B*3518	-----	-----	-----	-----
A*3104	B*3519	-----	-----	-----	-----
A*3105	B*3520	-----	-----	-----	-----
A*3106	B*3521	-----	-----	-----	-----
A*3107	B*3522	-----	-----	-----	-----
A*3108	B*3523	-----	-----	-----	-----
A*3109	B*3524	-----	-----	-----	-----
A*3201	B*3525	-----	-----	-----	-----
A*3202	B*3526	-----	-----	-----	-----
A*3203	B*3527	-----	-----	-----	-----
A*3204	B*3528	-----	-----	-----	-----
A*3205	B*3529	-----	-----	-----	-----
A*3206	B*3530	-----	-----	-----	-----
A*3207	B*3531	-----	-----	-----	-----
A*3208	B*3532	-----	-----	-----	-----
A*3301	B*3533	-----	-----	-----	-----
A*330301	B*3534	-----	-----	-----	-----
A*330302	B*3535	-----	-----	-----	-----
A*3304	B*3536	-----	-----	-----	-----
A*3305	B*3537	-----	-----	-----	-----
A*3306	B*3538	-----	-----	-----	-----
A*3307	B*3539	-----	-----	-----	-----
A*3401	B*3540N	-----	-----	-----	-----
A*3402	B*3541	-----	-----	-----	-----
A*3403	B*3542	-----	-----	-----	-----
A*3404	B*3543	-----	-----	-----	-----
A*3405	B*3544	-----	-----	-----	-----
A*3601	B*3545	-----	-----	-----	-----
A*3602	B*3546	-----	-----	-----	-----
A*3603	B*3547	-----	-----	-----	-----
A*3604	B*3548	-----	-----	-----	-----
A*4301	B*3549	-----	-----	-----	-----
A*6601	B*3701	-----	-----	-----	-----
A*6602	B*3702	-----	-----	-----	-----

A*6603	B*3703N	-----	-----	-----	-----
A*6604	B*3704	-----	-----	-----	-----
A*680101	B*3705	-----	-----	-----	-----
A*680102	B*3801	-----	-----	-----	-----
A*680103	B*380201	-----	-----	-----	-----
A*6802	B*380202	-----	-----	-----	-----
A*680301	B*3803	-----	-----	-----	-----
A*680302	B*3804	-----	-----	-----	-----
A*6804	B*3805	-----	-----	-----	-----
A*6805	B*3806	-----	-----	-----	-----
A*6806	B*3807	-----	-----	-----	-----
A*6807	B*3808	-----	-----	-----	-----
A*6808	B*3809	-----	-----	-----	-----
A*6809	B*390101	-----	-----	-----	-----
A*6810	B*390103	-----	-----	-----	-----
A*6811N	B*390104	-----	-----	-----	-----
A*6812	B*390201	-----	-----	-----	-----
A*6813	B*390202	-----	-----	-----	-----
A*6814	B*3903	-----	-----	-----	-----
A*6815	B*3904	-----	-----	-----	-----
A*6816	B*3905	-----	-----	-----	-----
A*6817	B*390601	-----	-----	-----	-----
A*6818N	B*390602	-----	-----	-----	-----
A*6819	B*3907	-----	-----	-----	-----
A*6820	B*3908	-----	-----	-----	-----
A*6821	B*3909	-----	-----	-----	-----
A*6822	B*3910	-----	-----	-----	-----
A*6823	B*3911	-----	-----	-----	-----
A*6824	B*3912	-----	-----	-----	-----
A*6825	B*3913	-----	-----	-----	-----
A*6901	B*3914	-----	-----	-----	-----
A*7401	B*3915	-----	-----	-----	-----
A*7402	B*3916	-----	-----	-----	-----
A*7403	B*3917	-----	-----	-----	-----
A*7404	B*3918	-----	-----	-----	-----
A*7405	B*3919	-----	-----	-----	-----
A*7406	B*3920	-----	-----	-----	-----
A*7407	B*3922	-----	-----	-----	-----
A*7408	B*3923	-----	-----	-----	-----
A*7409	B*3924	-----	-----	-----	-----
A*7410	B*3925N	-----	-----	-----	-----
A*8001	B*3926	-----	-----	-----	-----
-----	B*3927	-----	-----	-----	-----
-----	B*3928	-----	-----	-----	-----
-----	B*400101	-----	-----	-----	-----
-----	B*400102	-----	-----	-----	-----
-----	B*400103	-----	-----	-----	-----
-----	B*400104	-----	-----	-----	-----
-----	B*4002	-----	-----	-----	-----
-----	B*4003	-----	-----	-----	-----
-----	B*4004	-----	-----	-----	-----
-----	B*4005	-----	-----	-----	-----
-----	B*40060101	-----	-----	-----	-----
-----	B*40060102	-----	-----	-----	-----
-----	B*4007	-----	-----	-----	-----
-----	B*4008	-----	-----	-----	-----
-----	B*4009	-----	-----	-----	-----
-----	B*4010	-----	-----	-----	-----
-----	B*4011	-----	-----	-----	-----
-----	B*4012	-----	-----	-----	-----





B\*510201  
B\*510202  
B\*5103  
B\*5104  
B\*5105  
B\*5106  
B\*5107  
B\*5108  
B\*5109  
B\*5110  
B\*5111N  
B\*5112  
B\*511301  
B\*511302  
B\*5114  
B\*5115  
B\*5116  
B\*5117  
B\*5118  
B\*5119  
B\*5120  
B\*5121  
B\*5122  
B\*5123  
B\*5124  
B\*5126  
B\*5127N  
B\*5128  
B\*5129  
B\*5130  
B\*5131  
B\*5132  
B\*5133  
B\*5134  
B\*520101  
B\*520102  
B\*520103  
B\*520104  
B\*5202  
B\*5203  
B\*5204  
B\*5205  
B\*5301  
B\*5302  
B\*5303  
B\*5304  
B\*5305  
B\*5306  
B\*5307  
B\*5308  
B\*5309  
B\*5401  
B\*5402  
B\*5501  
B\*5502  
B\*5503  
B\*5504  
B\*5505  
B\*5507  
B\*5508

-----	B*5509	-----	-----	-----	-----
-----	B*5510	-----	-----	-----	-----
-----	B*5511	-----	-----	-----	-----
-----	B*5512	-----	-----	-----	-----
-----	B*5513	-----	-----	-----	-----
-----	B*5514	-----	-----	-----	-----
-----	B*5515	-----	-----	-----	-----
-----	B*5516	-----	-----	-----	-----
-----	B*5601	-----	-----	-----	-----
-----	B*5602	-----	-----	-----	-----
-----	B*5603	-----	-----	-----	-----
-----	B*5604	-----	-----	-----	-----
-----	B*560501	-----	-----	-----	-----
-----	B*560502	-----	-----	-----	-----
-----	B*5606	-----	-----	-----	-----
-----	B*5607	-----	-----	-----	-----
-----	B*5608	-----	-----	-----	-----
-----	B*5609	-----	-----	-----	-----
-----	B*5610	-----	-----	-----	-----
-----	B*5611	-----	-----	-----	-----
-----	B*5612	-----	-----	-----	-----
-----	B*570101	-----	-----	-----	-----
-----	B*570102	-----	-----	-----	-----
-----	B*5702	-----	-----	-----	-----
-----	B*570301	-----	-----	-----	-----
-----	B*570302	-----	-----	-----	-----
-----	B*5704	-----	-----	-----	-----
-----	B*5705	-----	-----	-----	-----
-----	B*5706	-----	-----	-----	-----
-----	B*5707	-----	-----	-----	-----
-----	B*5708	-----	-----	-----	-----
-----	B*5709	-----	-----	-----	-----
-----	B*5801	-----	-----	-----	-----
-----	B*5802	-----	-----	-----	-----
-----	B*5804	-----	-----	-----	-----
-----	B*5805	-----	-----	-----	-----
-----	B*5806	-----	-----	-----	-----
-----	B*5807	-----	-----	-----	-----
-----	B*5808	-----	-----	-----	-----
-----	B*5809	-----	-----	-----	-----
-----	B*5901	-----	-----	-----	-----
-----	B*670101	-----	-----	-----	-----
-----	B*670102	-----	-----	-----	-----
-----	B*6702	-----	-----	-----	-----
-----	B*7301	-----	-----	-----	-----
-----	B*7801	-----	-----	-----	-----
-----	B*780201	-----	-----	-----	-----
-----	B*780202	-----	-----	-----	-----
-----	B*7803	-----	-----	-----	-----
-----	B*7804	-----	-----	-----	-----
-----	B*7805	-----	-----	-----	-----
-----	B*8101	-----	-----	-----	-----
-----	B*8102	-----	-----	-----	-----
-----	B*8201	-----	-----	-----	-----
-----	B*8202	-----	-----	-----	-----
-----	B*8301	-----	-----	-----	-----

Fonte: Anthony Nolan Research Institute

Tabela 3 – Lista completa dos alelos HLA Classe II, atualizada até Abril 2004.

HLA-DRA	HLA-DRB1	HLA-DRB2-9	HLA-DQA1	HLA-DQBI	HLA-DPA1	HLA-DPBI	HLA-DMA	HLA-DMB	HLA-DOA	HLA-DOB
DRA*010201	DRB1*010101	DRB2*0101	DQA1*010101	DQB1*0201	DPA1*010301	DPB1*010101	DMA*0101	DMB*0101	DOA*010101	DOB*01010101
DRA*010202	DRB1*010102	DRB3*010101	DQA1*010102	DQB1*0202	DPA1*010302	DPB1*010102	DMA*0102	DMB*0102	DOA*01010201	DOB*01010102
-----	DRB1*010103	DRB3*01010201	DQA1*010201	DQB1*0203	DPA1*0104	DPB1*0102	DMA*0103	DMB*0103	DOA*01010202	DOB*010102
-----	DRB1*010201	DRB3*01010202	DQA1*010202	DQB1*030101	DPA1*0105	DPB1*020102	DMA*0104	DMB*0104	DOA*01010203	DOB*010201
-----	DRB1*010202	DRB3*010103	DQA1*0103	DQB1*030102	DPA1*0106	DPB1*020103	-----	DMB*0105	DOA*010103	DOB*010202
-----	DRB1*010203	DRB3*010104	DQA1*010401	DQB1*030201	DPA1*0107	DPB1*020104	-----	DMB*0106	DOA*01010401	DOB*0103
-----	DRB1*0103	DRB3*0102	DQA1*010402	DQB1*030202	DPA1*0108	DPB1*020105	-----	-----	DOA*01010402	DOB*01040101
-----	DRB1*0104	DRB3*0103	DQA1*0105	DQB1*030302	DPA1*020101	DPB1*020106	-----	-----	DOA*010105	DOB*01040102
-----	DRB1*0105	DRB3*0104	DQA1*0106	DQB1*030303	DPA1*020102	DPB1*0202	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0106	DRB3*0105	DQA1*0201	DQB1*0304	DPA1*020103	DPB1*030101	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0107	DRB3*0106	DQA1*030101	DQB1*030501	DPA1*020104	DPB1*030102	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0108	DRB3*0107	DQA1*0302	DQB1*030502	DPA1*020105	DPB1*040101	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0109	DRB3*0108	DQA1*0303	DQB1*030503	DPA1*020106	DPB1*040102	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0110	DRB3*0109	DQA1*040101	DQB1*0306	DPA1*020201	DPB1*0402	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0111	DRB3*0110	DQA1*040102	DQB1*0307	DPA1*020202	DPB1*0501	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*030101	DRB3*0111	DQA1*0402	DQB1*0308	DPA1*020203	DPB1*0601	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*030102	DRB3*0201	DQA1*0403N	DQB1*0309	DPA1*0203	DPB1*0801	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*030201	DRB3*020201	DQA1*0404	DQB1*0310	DPA1*0301	DPB1*0901	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*030202	DRB3*020202	DQA1*050101	DQB1*0311	DPA1*0302	DPB1*1001	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*030203	DRB3*020203	DQA1*050102	DQB1*0312	DPA1*0401	DPB1*110101	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0304	DRB3*020204	DQA1*0502	DQB1*0313	-----	DPB1*110102	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*030501	DRB3*0203	DQA1*0503	DQB1*0401	-----	DPB1*1301	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*030502	DRB3*0204	DQA1*0504	DQB1*0402	-----	DPB1*1401	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0306	DRB3*0205	DQA1*0505	DQB1*050101	-----	DPB1*1501	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0307	DRB3*0206	DQA1*060101	DQB1*050102	-----	DPB1*1601	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0308	DRB3*0207	DQA1*060102	DQB1*050201	-----	DPB1*1701	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0309	DRB3*0208	DQA1*0602	DQB1*050202	-----	DPB1*1801	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0310	DRB3*0209	-----	DQB1*050301	-----	DPB1*1901	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0311	DRB3*0210	-----	DQB1*050302	-----	DPB1*200101	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0312	DRB3*0211	-----	DQB1*0504	-----	DPB1*200102	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0313	DRB3*0212	-----	DQB1*060101	-----	DPB1*2101	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0314	DRB3*0213	-----	DQB1*060102	-----	DPB1*2201	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0315	DRB3*0214	-----	DQB1*060103	-----	DPB1*2301	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0316	DRB3*0215	-----	DQB1*0602	-----	DPB1*2401	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0317	DRB3*0216	-----	DQB1*0603	-----	DPB1*2501	-----	-----	-----	-----
-----	DRB1*0318	DRB3*0217	-----	DQB1*060401	-----	DPB1*260101	-----	-----	-----	-----

DRB1*0319	DRB3*0218	DQB1*060402	DPB1*260102
DRB1*0320	DRB3*0219	DQB1*060501	DPB1*2701
DRB1*0321	DRB3*030101	DQB1*060502	DPB1*2801
DRB1*0322	DRB3*030102	DQB1*0606	DPB1*2901
DRB1*0323	DRB3*0302	DQB1*0607	DPB1*3001
DRB1*0324	DRB3*0303	DQB1*0608	DPB1*3101
DRB1*0325	DRB4*01010101	DQB1*0609	DPB1*3201
DRB1*0326	DRB4*0102	DQB1*0610	DPB1*3301
DRB1*040101	DRB4*01030101	DQB1*061101	DPB1*3401
DRB1*040102	DRB4*01030102N	DQB1*061102	DPB1*3501
DRB1*0402	DRB4*010302	DQB1*0612	DPB1*3601
DRB1*040301	DRB4*010303	DQB1*0613	DPB1*3701
DRB1*040302	DRB4*010304	DQB1*0614	DPB1*3801
DRB1*0404	DRB4*0104	DQB1*0615	DPB1*3901
DRB1*040501	DRB4*0105	DQB1*0616	DPB1*4001
DRB1*040502	DRB4*0106	DQB1*0617	DPB1*4101
DRB1*040503	DRB4*0201N	DQB1*0618	DPB1*4401
DRB1*040504	DRB4*0301N	DQB1*0619	DPB1*4501
DRB1*0406	DRB5*010101	DQB1*0620	DPB1*4601
DRB1*040701	DRB5*010102	DQB1*0621	DPB1*4701
DRB1*040702	DRB5*0102		DPB1*4801
DRB1*040703	DRB5*0103		DPB1*4901
DRB1*0408	DRB5*0104		DPB1*5001
DRB1*0409	DRB5*0105		DPB1*5101
DRB1*0410	DRB5*0106		DPB1*5201
DRB1*0411	DRB5*0107		DPB1*5301
DRB1*0412	DRB5*0108N		DPB1*5401
DRB1*0413	DRB5*0109		DPB1*5501
DRB1*0414	DRB5*0110N		DPB1*5601
DRB1*0415	DRB5*0111		DPB1*5701
DRB1*0416	DRB5*0112		DPB1*5801
DRB1*0417	DRB5*0113		DPB1*5901
DRB1*0418	DRB5*0202		DPB1*6001
DRB1*0419	DRB5*0203		DPB1*6101N
DRB1*0420	DRB5*0204		DPB1*6201
DRB1*0421	DRB5*0205		DPB1*6301
DRB1*0422	DRB6*0101		DPB1*6401N
DRB1*0423	DRB6*0201		DPB1*6501
DRB1*0424	DRB6*0202		DPB1*6601
DRB1*0425	DRB7*010101		DPB1*6701

DRB1*0426	DRB7*010102	DPB1*6801
DRB1*0427	DRB8*0101	DPB1*6901
DRB1*0428	DRB9*0101	DPB1*7001
DRB1*0429		DPB1*7101
DRB1*0430		DPB1*7201
DRB1*0431		DPB1*7301
DRB1*0432		DPB1*7401
DRB1*0433		DPB1*7501
DRB1*0434		DPB1*7601
DRB1*0435		DPB1*7701
DRB1*0436		DPB1*7801
DRB1*0437		DPB1*7901
DRB1*0438		DPB1*8001
DRB1*0439		DPB1*8101
DRB1*0440		DPB1*8201
DRB1*0441		DPB1*8301
DRB1*0442		DPB1*8401
DRB1*0443		DPB1*8501
DRB1*0444		DPB1*8601
DRB1*0445		DPB1*8701
DRB1*0446		DPB1*8801
DRB1*0447		DPB1*8901
DRB1*0448		DPB1*9001
DRB1*0449		DPB1*9101
DRB1*0450		DPB1*9201
DRB1*070101		DPB1*9301
DRB1*070102		DPB1*9401
DRB1*0703		DPB1*9501
DRB1*0704		DPB1*9601
DRB1*0705		DPB1*9701
DRB1*0706		DPB1*9801
DRB1*0707		DPB1*9901
DRB1*0708		
DRB1*080101		
DRB1*080102		
DRB1*080201		
DRB1*080202		
DRB1*080203		
DRB1*080302		
DRB1*080401		

DRB1\*080402  
DRB1\*080403  
DRB1\*080404  
DRB1\*0805  
DRB1\*0806  
DRB1\*0807  
DRB1\*0808  
DRB1\*0809  
DRB1\*0810  
DRB1\*0811  
DRB1\*0812  
DRB1\*0813  
DRB1\*0814  
DRB1\*0815  
DRB1\*0816  
DRB1\*0817  
DRB1\*0818  
DRB1\*0819  
DRB1\*0820  
DRB1\*0821  
DRB1\*0822  
DRB1\*0823  
DRB1\*0824  
DRB1\*0825  
DRB1\*0826  
DRB1\*0827  
DRB1\*0828  
DRB1\*090102  
DRB1\*0902  
DRB1\*0903  
DRB1\*100101  
DRB1\*100102  
DRB1\*110101  
DRB1\*110102  
DRB1\*110103  
DRB1\*110104  
DRB1\*110105  
DRB1\*1102  
DRB1\*1103  
DRB1\*110401

DRB1\*110402  
DRB1\*1105  
DRB1\*110601  
DRB1\*110602  
DRB1\*1107  
DRB1\*110801  
DRB1\*110802  
DRB1\*1109  
DRB1\*1110  
DRB1\*1111  
DRB1\*111201  
DRB1\*111202  
DRB1\*1113  
DRB1\*1114  
DRB1\*1115  
DRB1\*1116  
DRB1\*1117  
DRB1\*1118  
DRB1\*1119  
DRB1\*1120  
DRB1\*1121  
DRB1\*1122  
DRB1\*1123  
DRB1\*1124  
DRB1\*1125  
DRB1\*1126  
DRB1\*112701  
DRB1\*112702  
DRB1\*1128  
DRB1\*1129  
DRB1\*1130  
DRB1\*1131  
DRB1\*1132  
DRB1\*1133  
DRB1\*1134  
DRB1\*1135  
DRB1\*1136  
DRB1\*1137  
DRB1\*1138  
DRB1\*1139

DRB1\*1140  
DRB1\*1141  
DRB1\*1142  
DRB1\*1143  
DRB1\*1144  
DRB1\*1145  
DRB1\*1146  
DRB1\*1147  
DRB1\*1148  
DRB1\*1149  
DRB1\*1150  
DRB1\*120101  
DRB1\*120102  
DRB1\*120201  
DRB1\*120202  
DRB1\*120302  
DRB1\*1204  
DRB1\*1205  
DRB1\*1206  
DRB1\*1207  
DRB1\*1208  
DRB1\*1209  
DRB1\*130101  
DRB1\*130102  
DRB1\*130103  
DRB1\*130201  
DRB1\*130202  
DRB1\*130301  
DRB1\*130302  
DRB1\*1304  
DRB1\*1305  
DRB1\*1306  
DRB1\*130701  
DRB1\*130702  
DRB1\*1308  
DRB1\*1309  
DRB1\*1310  
DRB1\*1311  
DRB1\*1312  
DRB1\*1313

DRB1\*131401  
DRB1\*131402  
DRB1\*1315  
DRB1\*1316  
DRB1\*1317  
DRB1\*1318  
DRB1\*1319  
DRB1\*1320  
DRB1\*1321  
DRB1\*1322  
DRB1\*1323  
DRB1\*1324  
DRB1\*1325  
DRB1\*1326  
DRB1\*1327  
DRB1\*1328  
DRB1\*1329  
DRB1\*1330  
DRB1\*1331  
DRB1\*1332  
DRB1\*1333  
DRB1\*1334  
DRB1\*1335  
DRB1\*1336  
DRB1\*1337  
DRB1\*1338  
DRB1\*1339  
DRB1\*1340  
DRB1\*1341  
DRB1\*1342  
DRB1\*1343  
DRB1\*1344  
DRB1\*1345  
DRB1\*1346  
DRB1\*1347  
DRB1\*1348  
DRB1\*1349  
DRB1\*1350  
DRB1\*1351  
DRB1\*1352

DRBI\*1353  
DRBI\*1354  
DRBI\*1355  
DRBI\*1356  
DRBI\*1357  
DRBI\*1358  
DRBI\*1359  
DRBI\*1360  
DRBI\*1361  
DRBI\*1362  
DRBI\*1363  
DRBI\*140101  
DRBI\*140102  
DRBI\*1402  
DRBI\*140301  
DRBI\*140302  
DRBI\*1404  
DRBI\*140501  
DRBI\*140502  
DRBI\*1406  
DRBI\*140701  
DRBI\*140702  
DRBI\*1408  
DRBI\*1409  
DRBI\*1410  
DRBI\*1411  
DRBI\*1412  
DRBI\*1413  
DRBI\*1414  
DRBI\*1415  
DRBI\*1416  
DRBI\*1417  
DRBI\*1418  
DRBI\*1419  
DRBI\*1420  
DRBI\*1421  
DRBI\*1422  
DRBI\*1423  
DRBI\*1424  
DRBI\*1425

DRB1\*1426  
DRB1\*1427  
DRB1\*1428  
DRB1\*1429  
DRB1\*1430  
DRB1\*1431  
DRB1\*1432  
DRB1\*1433  
DRB1\*1434  
DRB1\*1435  
DRB1\*1436  
DRB1\*1437  
DRB1\*1438  
DRB1\*1439  
DRB1\*1440  
DRB1\*1441  
DRB1\*1442  
DRB1\*1443  
DRB1\*1444  
DRB1\*1445  
DRB1\*1446  
DRB1\*1447  
DRB1\*1448  
DRB1\*150101  
DRB1\*150102  
DRB1\*150103  
DRB1\*150104  
DRB1\*150105  
DRB1\*150201  
DRB1\*150202  
DRB1\*150203  
DRB1\*1503  
DRB1\*1504  
DRB1\*1505  
DRB1\*1506  
DRB1\*1507  
DRB1\*1508  
DRB1\*1509  
DRB1\*1510  
DRB1\*1511



Tabela 4 - Painel de STR's com respectivos alelos

D8S1179	D21S11	D7S820	CSP1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Amelog.
8	24	6	6	12	1	8	5	15	9	6	7	7	7	17	X
9	24.2	7	7	14	2	9	8	16	10	11	8	9	8	18	Y
10	25	8	8	15	3	10	9	17	11	12	9	10	9	19	
11	26	9	9	16	4	11	10	18	12	13	10	10.2	10	20	
12	27	10	10	17	5	12	11	19	12.2	14	11	11	11	21	
13	28	11	11	6	7	13	12	20	13	15	12	12	12	22	
14	28.2	12	12	18	8	14	13	21	13.2	16	13	13	13	23	
15	29	14	14	19	9	15	14	22	14	17		13.2	14	24	
16	29.2	15	15		10		15	23	14.2	18		14	15	25	
17	30.2				11			24	15	19		14.2	16	26	
18	31				13.3			25	15.2	20		15		26.2	
	31.2							26	16	21		16		27	
	32							27	16.2	22		17		28	
	32.2							28	17	23		18		29	
	33								17.2	24		19		30	
	33.2											20		30.2	
	34											21		31.2	
	34.2											22		32.2	
	35											23		33.2	
	35.2											24		42.2	
	36													43.2	
	37											25		44.2	
	38											26		45.2	
												27		46.2	
														47.2	
														48.2	
														50.2	
														51.2	

Como se pode verificar pela tabela o marcador que tem maior número de alelos é o FGA com 28 alelos o que será sempre pouco polimórfico em relação ao número de alelos que cada gene HLA tem.

### Conclusão:

Pode-se concluir que a utilização da genotipagem dos alelos HLA torna-se vantajosa em relação aos painéis de STRs sempre que a investigação em curso implique a participação de mais do que 2 gerações.

Tendo em conta os custos menores da genotipagem sugere-se a utilização deste método para uma primeira abordagem eliminatória, passando-se aos painéis de STRs apenas em casos de dúvida.

## **Bibliografia**

Beck S and Trowsdale J. The Human Major Histocompatibility Complex: Lesson from the DNA Sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2000; 1: 117-137.

Bruford MW and Wayne RK. Microsatellites and their application to populations genetics studies. *Curr opin Genet Develp.* 1993; 3: 939-943.

Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Philips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *Am J Hum Genet.* 1993; 52: 922-927.

Dallas JF. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mamm Genome.* 1992; 3: 452-456.

Dorak MT (2002). Major Histocompatibility Complex.  
<http://www.openlink.org/dorak>.

Dyer P and Middleton. Histocompatibility Testing – A Pratical Approach. 1993. *Oxford University Press*, New York.

Eastel S. DNA Fingerprinting by PCR Amplification of HLA Genes. *Proceedings of a Conference held 30-31 October 1989, Australian Institute of Criminology.* 1992; 2.

Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at fice trimeric and terameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics.* 1992; 12: 241-253.

Edwards M and Allen RW. Characteristics of mutations at the D5S818 locus studied with a tightly linked marker. *Transfusion.* 2004; 44: 83-90.

Fornage M, Chan L, Siest G, Boerwinkle E. Allele frequency distribution of the (TG)<sub>n</sub>(AG)<sub>m</sub> microsatellite in the apolipoprotein C-II gene. *Genomics.* 1992; 12: 63-68.

Goldstein D and Schlötterer C. Microsatellite: Evolution and Applications. 1999. *Oxford University Press*, Oxford.

Hamada H, Petrino MG, Kakunaga J. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely form in evolutionarily diverse eukariotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982; 79: 6465-6469.

Harr B and Schlötterer C. Long Microsatellite Alleles in *Drosophila melanogaster* Have a Downward Mutation Bias and Short Persistence Times, Which Cause their Genome-Wide Underrepresentation. *Genetics*. 2000; 155: 1213-1220.

Hawkins BR. Fourteen-year experience of human leucocyte antigen typing in cases of disputed parentage in Hong Kong. *Hong Kong Medical J*. 1997; 3: 369-372.

Henke L, Fimmers R, Josephi E, Cleef S, Dülmer M, Henke J. Usefulness of conventional blood groups, DNA-minisatellites, and short tandem repeat polymorphisms in paternity testing: a comparison. *Forensic Science International*. 1999; 103: 133-142.

Jarne P and Lagoa PJJ. Microsatellites, from molecules to population and back. *Trends ecol Evol*. 1996; 11: 424-429

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*. 1985; 316: 76-79.

Keresztury L, Rajczy K, Lászik A, Gyódi É, Falus A, Petrányi GG. Combination of DNA-based and conventional methods detecting HLA polymorphism and its utilization for paternity testing. *Am. J. Forensic Med Pathol*. 2002; 23: 57-62.

Levinson G and Gutman GA. Slipped-Strand Mismatching: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. *Mol Biol Evol*. 1987; 4: 203-221.

Lonardo AM, Cardozo MB, Valente SF, Szöcs A, Echenique CG, Santapá OA. Genotype Reconstruction and Paternity Testing of dead Father. "XI<sup>th</sup> International Symposium on Human Identification". 2000.

Morling N, Allen RW, Carracedo A, Geada H, Guidet F, Hallenberg C, Martin W, Mayr WR, Olaisen B, Pascali VL, Schneider PM. Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases. *Forensic Science International*. 2002; 129: 148-157.

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

Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res.* 1989; 17: 6463-6471.

Thangaraj K, Reddy AG, Singh L. Mutation in the STR locus D21S1 1 of father causing allele mismatch in the child. *J Forensic Sci.* 2004; 49: 99-103.

Tracey M. Short Tandem Repeat-based Identification of Individuals and Parents. *Croatian Medical Journal.* 2001; 42: 233-238.

Weber JL and Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet.* 1993; 2: 1123-1128.