

TICIANE HENRIQUES SANTA RITA

**NOVAS APLICAÇÕES DO DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL NÃO INVASIVO
PELA ANÁLISE DO PLASMA MATERNO**

BRASÍLIA, 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TICIANE HENRIQUES SANTA RITA

**NOVAS APLICAÇÕES DO DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL NÃO INVASIVO
PELA ANÁLISE DO PLASMA MATERNO**

Tese apresentada para a obtenção
do título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Barcelos Barra

Brasília
2018

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Eloiza e Idelmo, exemplos de honestidade e caráter, pelo investimento em toda minha vida para que seja repleto de conhecimentos e por sonhar meus sonhos.

Ao meu esposo Gabriel, pelo amor, incentivo, compreensão e acima de tudo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão Igor “espírito de luz” mesmo não podendo te ver, sinto-me tocar nas vitórias e nos obstáculos. Obrigada por ser meu anjo protetor. Ao meu irmão companheiro Felipe Henriques, obrigada por acreditar em mim. Aos meus pais pelo amor incondicional, zelo e suporte emocional. Nossa caminhada juntos fez a realização do meu grandioso sonho ser mais leve.

Ao meu esposo Gabriel muito obrigada pelo apoio, pela confiança, pela compreensão, pela valorização, pelo amor e pela solidariedade. Sempre tão entusiasmado pelo meu trabalho, dando coragem e incentivo até mesmo nas inquietações. O agradecimento por toda torcida e força estendo a sua família que agora também é minha.

À família de Brasília, em especial Ademilton e família Félix. Obrigada pelo seio familiar que me proporcionaram, isto sem dúvidas, foi essencial.

Ao meu orientador, professor e amigo Gustavo Barra, por enxergar o que há de melhor em mim e para mim. Obrigada por ter acreditado no meu potencial, pelos momentos imensuráveis de aprendizado e principalmente por todas as oportunidades. São já 07 anos de convivência e só tenho a agradecer por me permitir conhecer e fazer parte do tão sonhado "mundo da pesquisa". E como não vivemos apenas de trabalho, agradeço também pelos momentos alegres, repletos de companheirismo e confiança. Que venha mais e mais descobertas em nossa caminhada...

Ao Laboratório Sabin, especialmente às Dras Janete Vaz, Sandra Costa e Lídia Abdalla e ao Dr Rafael Jácomo por acreditar, investir na ciência, e acima de tudo incentivar o crescimento profissional. Obrigada pela oportunidade ímpar e também pelo arsenal tecnológico que nos oferece para desenvolver as pesquisas. Gratidão eterna.

Ao nosso setor de Pesquisa e Desenvolvimento, especialmente ao Pedro pela parceria no trabalho e pela disposição de ajudar sempre. Aos todos os amigos do setor de BioMol pela convivência harmoniosa e pelo acolhimento.

As amigos do clube científico pela parceria de estudo e pelas trocas de experiências. Especialmente a Camila Nobre e Daniela Paniago por toda amizade que se perdura ao longo dessa caminhada e por toda a vida.

Aos amigos que fiz nessa trajetória, amigos sabianos e de Brasília, vocês são a minha diversão e o meu descanso.

À Universidade de Brasília (UnB), pela oportunidade de estudar em uma instituição de renome e aos todos professores que contribuíram para meu crescimento intelectual.

As minhas amigas da época de faculdade e da vida (Renata Rego, Maysa Araújo e Nathalie Garcia) por todo incentivo em qualquer decisão e por ajudar a superar toda a saudade com essa distância.

A todos, que em algum momento contribuíram mesmo que de forma indireta para a realização desta etapa na minha formação acadêmica.

RESUMO

A descoberta do DNA fetal livre de células na circulação materna viabilizou o desenvolvimento de tecnologias para o diagnóstico pré-natal não invasivo. Neste trabalho foram desenvolvidos três estudos independentes relacionados a este tema. O objetivo do primeiro estudo foi determinar o haplótipo Y-STR do feto no plasma materno durante a gravidez e estimar, de forma não invasiva, se o suposto pai e feto pertencem à mesma linhagem masculina. O estudo incluiu casais com gravidez única e paternidade supostamente conhecida. O sangue periférico foi coletado em tubos EDTA (mãe) e em papel FTA (pai). O DNA do plasma materno foi extraído usando NucliSens EasyMAG (Biomerieux). O sexo fetal foi determinado por qPCR pesquisando o alvo DYS-14 no plasma materno e também foi confirmado após o parto. Dos voluntários incluídos, 20 mães com fetos masculinos e 10 mães com fetos femininos foram selecionadas para a análise de Y-STR. A moda da idade gestacional foi de 12 semanas. Todas as amostras de DNA foram submetidas a amplificação por PCR com kits PowerPlex Y23, ampFLSTR Yfiler e dois multiplexes próprios, que em conjunto representam 27 diferentes Y-STR. Os produtos de PCR foram detectados no analisador genético 3500 e foram analisados usando o software GeneMapper-IDX (Life Technologies). Os haplótipos fetais (formato Yfiler) foram comparados com outros 5328 haplótipos brasileiros disponíveis no banco de dados de referência de haplótipos cromossômicos Y (YHRD). Como resultado, entre 22 e 27 loci foram amplificados com sucesso a partir do plasma materno em todos os 20 casos de fetos masculinos. Nenhuma das mulheres com fetos femininos apresentou um haplótipo Y-STR falsamente amplificado. O haplótipo detectado no plasma materno correspondeu ao haplótipo do pai alegado em 16 dos 20 casos. Quatro casos apresentaram inconsistências simples e que não configuravam exclusões; 1 caso mostrou uma mutação no locus DYS458 devido à contração de uma unidade repetição e 3 casos apresentaram “dropout” em um dos locus DYS385 I/II. Todas as inconsistências foram

confirmadas após o nascimento do bebê. Dezesesseis haplótipos fetais não foram encontrados em YHRD e um deles apresentou mutação, o que corresponde à probabilidade de paternidade de 99,9812% e 95,7028%, respectivamente. Três haplótipos fetais ocorreram duas vezes no YHRD, o que corresponde à probabilidade de paternidade de 99,9437%. Em conclusão, um haplótipo Y-STR fetal discriminatório pode ser obtido da análise do plasma materno durante a gravidez a partir da décima segunda semanas de gestação. Todos os fetos masculinos puderam ser atribuídos à linhagem masculina do pai alegado no início da gravidez. A alta probabilidade de paternidade associada a cada caso sugere que a relação não é aleatória e essa estratégia pode ser usada como alternativa para análise de parentesco fetal masculino. Posteriormente foi questionado se o DNA fetal estaria presente na microcirculação materna e se a determinação não invasiva do sexo fetal utilizando o sangue capilar coletado por punção digital é comparável aos resultados obtidos do plasma isolado do sangue venoso. Desta forma, o segundo estudo envolveu 101 voluntárias grávidas. A mediana da idade gestacional (min–max) foi 11 (8–20) semanas. Inicialmente o desenho experimental do estudo foi prospectivo. No entanto, após iniciar os experimentos resultados falsos positivos para o DNA masculino foram identificados nas amostras de sangue capilar usando um protocolo de assepsia com álcool isopropílico. Suspeitou-se da contaminação da pele dos dedos maternos com DNA exógeno masculino. Subsequentemente novos protocolos de assepsia do local de coleta do sangue capilar (ponta dos dedos) foram implementados (hipoclorito de sódio 0,5% tamponado aplicado duas vezes e hipoclorito de sódio 1% tamponado aplicado uma vez). Os resultados obtidos do plasma isolado do sangue venoso e capilar foram comparados com o sexo do recém-nascido ao nascimento. As análises revelaram que a sensibilidade e especificidade da determinação do sexo fetal no sangue venoso comparado ao sexo no nascimento foi 100% (95%IC 93-100%) e 100% (95%IC 93-100%). No sangue capilar, os resultados foram 100% (95%IC 78-100%) e 58% (95%IC 27-84%) para o grupo do álcool isopropílico, 100% (95%IC 83-100%) e 100% (95%IC 82-100%) para o grupo do hipoclorito de sódio tamponado à 0,5%, e 100% (95%IC 80-100%) e 100% (95%IC 81-100%) para o grupo do hipoclorito de sódio tamponado à 1%,

respectivamente. Em conclusão, o DNA fetal está presente no sangue capilar materno permitindo a determinação não invasiva do sexo fetal. O DNA masculino exógeno pode estar presente nas pontas dos dedos das mulheres grávidas e ser detectável gerando resultados falsos positivos. Por isto, a eliminação do DNA masculino exógeno é crítica para uma confiável determinação do sexo fetal usando o sangue capilar materno. As soluções de hipoclorito de sódio diluído e tamponado, entre 0,5% e 1% pode ser usado para eliminar o DNA masculino exógeno das pontas dos dedos das mulheres grávidas. Por fim, o uso do cromossomo Y no diagnóstico pré-natal não invasivo limita sua aplicação aos fetos masculinos. Portanto, seria importante o desenvolvimento de tecnologias para análise do DNA fetal independentemente do sexo fetal e que contemple os cromossomos autossômicos. Assim, hipotetizou-se usar os polimorfismos de inserção e deleção (Indels) presentes no pai e ausentes na mãe como “pequenas ilhas” de diferenças genéticas entre mãe e feto para o estudo pré-natal não invasivo das características genéticas do feto. Entretanto, antes de desenvolver esta metodologia seria necessário conhecer as frequências alélicas e os parâmetros forenses destes Indels usando um conjunto de marcadores que tenha sido previamente validado e de preferência na população local. O tema de pesquisa do terceiro estudo foi avaliar as frequências alélicas de 38 indels na população do Distrito Federal. Os resultados indicam que este conjunto é um sistema genético altamente informativo, pois a probabilidade de discriminar dois indivíduos selecionados ao acaso é de 99,9999999999993% e a probabilidade de excluir um indivíduo falsamente acusado em um caso de paternidade é 99,81%. Com base nas frequências alélicas foram calculadas as distâncias genéticas da população estudada (Distrito Federal) em relação as populações descritas em outros estudos (Portugal, África, Ásia, tribo Terena e do estado do Rio de Janeiro). A análise das distâncias genéticas entre as diferentes populações revelou que o Distrito Federal é mais semelhante ao Rio de Janeiro, assumindo uma posição intermediária em relação à Europa e Rio de Janeiro - Afrodescendente e foi distante dos nativos americanos, africanos e do leste asiático. Esta conclusão está de acordo com a composição da população relatada no Censo 2010, em que a maioria dos imigrantes era do Nordeste e do Sudeste. Estes três estudos

foram aprovados por comitês de ética locais e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido.

Palavras-chave: Y-STR, plasma materno, teste pré-natal não invasivo de DNA fetal livre de células, análise de parentesco pré-natal fetal, determinação não invasiva do sexo fetal, sangue capilar, DNA masculino exógeno, polimorfismos de inserção e deleção, Brasília, Distrito Federal (Brasil), Indel, Genética forense

ABSTRACT

The discovery of cell-free fetal DNA in the maternal circulation enabled the development of technologies for noninvasive prenatal diagnosis. In this work, three independent studies related to this topic were developed. The aim of the first study is to determine the fetus Y-STR haplotype in maternal plasma during pregnancy and estimate, non-invasively, if the alleged father and fetus belong to the same male lineage. The study enrolled couples with singleton pregnancies and supposedly known paternity. Peripheral blood was collected in EDTA tubes (mother) and in FTA paper (father). Maternal plasma DNA was extracted by using NucliSens EasyMAG. Fetal gender was determined by qPCR targeting DYS-14 in maternal plasma and it was also confirmed after the delivery. From all included volunteers, 20 mothers bearing male fetuses and 10 mothers bearing female fetuses were selected for the Y-STR analysis. The mode gestational age was 12 weeks. All DNA samples were subjected to PCR amplification by PowerPlex Y23, ampFLSTR Yfiler, and two in-house multiplexes, which together accounts for 27 different Y-STR. The PCR products were detected with 3500 Genetic Analyzer and they were analyzed using GeneMapper-IDX. Fetuses' haplotypes (Yfiler format) were compared to other 5328 Brazilian haplotypes available on Y-chromosome haplotypes reference database (YHRD). As a result, between 22 and 27 loci were successfully amplified from maternal plasma in all 20 cases of male fetuses. None of the women bearing female fetuses had a falsely amplified Y-STR haplotype. The haplotype detected in maternal plasma completely matched the alleged father haplotype in 16 out of the 20 cases. Four cases showed single mismatches and they did not configure exclusions; 1 case showed a mutation in the DYS458 locus due to the loss of one repeat unit and 3 cases showed one DYS385I/II locus dropout. All mismatches were confirmed after the delivery. Seventeen fetuses' haplotypes were not found in YHRD and one of them had a mutation, which corresponded to the paternity probability of 99.9812% and 95.7028%, respectively. Three fetuses' haplotypes occurred twice in YHRD, which corresponded to paternity probability of 99.9437%. In conclusion, high discriminatory fetal Y-STR haplotype could be determined

from maternal plasma during pregnancy starting at 12 weeks of gestation. All male fetuses could be attributed to the alleged father male lineage early in pregnancy. The high probability of paternity associated with each case suggests that the relationship is not random and this strategy can be used as an alternative for male fetal kinship analysis. Posteriorly, we questioned whether the presence of fetal DNA on maternal microcirculation and investigated whether the fetal sex determination performed on plasma isolated from capillary blood is comparable to results obtained using plasma isolated from venous blood. Thus, the second study involved 101 pregnant volunteers. The median (min–max) gestational age was 11 (8–20) weeks. The initial study design was prospective. However, after commencement of the study the appearance of false positive results for male DNA among the capillary samples led us to suspect maternal skin contamination with exogenous male DNA. We subsequently instituted new skin-cleansing protocols for the capillary samples (isopropyl alcohol, 0.5% buffered sodium hypochlorite applied twice and 1% buffered sodium hypochlorite applied once), and compared with these results with our plasma samples. The analysis revealed that, compared to the clinical examination at birth, sensitivity and specificity of the fetal sex determination in venous blood was 100% (95%CI 93-100%) and 100% (95%CI 93-100%). In capillary blood, results were 100% (95%CI 78-100%) and 58% (95%CI 27-84%) for the isopropyl alcohol group, 100% (95%CI 83-100%) and 100% (95%CI 82-100%) for the 0.5% buffered sodium hypochlorite group and 100% (95%CI 80-100%) and 100% (95%CI 81-100%) for 1% buffered sodium hypochlorite group, respectively. In conclusion, fetal DNA is present in maternal capillary blood allowing for non-invasive fetal sex determination. Exogenous male DNA may be present, and detectable, on the fingertips of pregnant women. So, the elimination of the exogenous male DNA is critical for a reliable fetal sex determination using maternal capillary blood. A diluted buffered sodium hypochlorite (0.5% - 1%) can be used to eliminate exogenous male DNA from the fingertips of pregnant women. Exploration of the Y chromosome in non-invasive prenatal diagnosis limits its application to male fetuses. Thus, it is important to develop technologies for fetal DNA analysis regardless of the fetal sex and that contemplate the autosomal Chromosomes. Thus, it was hypothesized to use insertion and deletion

polymorphisms (Indels) present in the father and absent in the mother as "small islands" of genetic differences between mother and fetus for the non-invasive prenatal study of genetic characteristics of the fetus. However, before developing this methodology it is necessary to know the allelic frequencies and the forensic parameters of these Indels using a set of markers that has been previously validated and preferably in the local population. Thus, the third study was to evaluate the allelic frequencies of 38 indels in the population of the Federal District. The results indicate that this set is a highly informative genetic system. Therefore, the probability of discriminating two individuals selected at random is 99.9999999999993% and the probability of excluding a falsely accused individuals in a paternity case is 99.81%. Based on the allelic frequencies, the genetic distances of the study population (Federal District) were calculated in relation to the populations described by different studies (Portugal, Africa, Asia, Terena and Rio de Janeiro). Furthermore, analysis of genetic distances between diferents populations revealed that Federal District was plotted closer of Rio de Janeiro. Moreover, it assumed an intermediate position relative to Europe and RJ-AFD and was quite distant from Native Americans, Africans and East Asians. This conclusion agrees with the population composition reported in the 2010 National Survey Inquiries, in which most of the immigrants were from the northeast and the southeast. The studies developed were approved by a local ethics committee and all participants signed the informed consent form.

Keywords: Y-STR, maternal plasma, noninvasive prenatal testing cell-free fetal DNA, fetal prenatal kinship analysis, non-invasive fetal sex determination, capillary blood, exogenous male DNA, insertion and deletion polymorphisms, Brasília, Distrito Federal (Brazil), Indel, Forensic genetics

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Perfis representativos de Y-STR obtidos do plasma de uma mãe que carregava um feto masculino (caso 7) usando o PowerPlex Y23 e Yfiler

Figura 2.2 - Perfis representativos de Y-STR obtidos do plasma de mãe que carregava um feto feminino (caso 25) usando o PowerPlex Y23 e Yfiler

Figura 2.3 - Perfis representativos de Y-STR obtidos do plasma de mulheres que carregavam um feto masculino (caso 7) usando os sistemas Mini-1/-2

Figura 2.4 - Perfis representativos de Y-STR obtidos do plasma de mulheres que carregavam um feto feminino (caso 25) usando os sistemas Mini-1/-2

Figura 2.5 - Análise de concordância de haplótipos Y-STR representativos do suposto pai e do plasma materno usando alguns loci do PowerPlex Y23

Figura 2.6 - Mutação no *locus* DYS458 do caso 1 detectado no plasma materno e no recém-nascido

Figura 2.7 - Alelo *dropout* no *locus* DYS385 no plasma materno nos casos 17 e 18

Figura 3.1 - Gráfico de dispersão mostrando os ciclos quantitativos (Cq) das reações de qPCR para o DYS-14 (A, B e C) e RNase P (D, E e F) com os diferentes protocolos de assepsia antes da coleta do sangue capilar

Figura 4.1 - Análise de coordenadas principais das distâncias genéticas de Nei (DA) entre as populações estudadas. Dados da matriz de distância genética (tabela 4.4)

Figura 4.2 - Dendrograma gerado pelo software Dispan (método *neighbor-joining*) a partir da matriz de distâncias genéticas de Nei (DA) das populações estudadas

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Sequências de *primers* utilizados para a determinação do sexo fetal

Tabela 2.2 - Resultados qualitativos para detecção de Y-STR *loci* fetal no plasma de mães que carregavam fetos masculinos (n=20) e fetos femininos (n=10) e sua concordância com os *loci* do pai alegado

Tabela 2.3 - Faixa do tamanho do produto e taxa de detecção para cada *locus* Y-STR incluído nos sistemas multiplex utilizados no estudo

Tabela 2.4 - Os principais contribuintes do sistema multiplex para a detecção com sucesso de cada Y-STR no plasma materno

Tabela 2.5 - Resultados quantitativos de haplótipos Y-STR correspondentes do plasma materno e suposto pai, considerando-se a frequência dos haplótipos fetais em formato Yfiler no banco de dados do Brasil (n = 5.328) no YHRD

Tabela 3.1 – Comparação da determinação não invasiva do sexo fetal executada no sangue venoso e no sangue capilar com diferentes protocolos de assepsia da pele *versus* a examinação clínica do sexo do recém-nascido ao nascimento

Tabela 4.1 - Frequências alélicas e parâmetros estatísticos dos 38 Indel-plex em uma amostra populacional do Distrito Federal (n = 200)

Tabela 4.2 - Parâmetros forenses dos 37 Indel-plex em uma amostra populacional do Distrito Federal (n = 200)

Tabela 4.3 – Parâmetro de paternidade dos 37 Indel-plex em uma amostra populacional do Distrito Federal (n = 200)

Tabela 4.4 - Matriz da distância genética de Nei (DA) calculada pelo software DISPAN a partir das frequências alélicas entre diferentes populações

LISTA DE SIGLAS

cfDNA	DNA fetal livre de células
CIP	Contéudo de informação polimórfica
Cq	Ciclo quantitativo
IC	Intervalo de confiança
PCoA	Análise de coordenadas principais
PD	Poder de discriminação
PE	Poder de exclusão
PM	Probabilidade de coincidência (“ <i>matching</i> ”)
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
STR	<i>Short tandem repeats</i> ou microssatélites
Y-STR	<i>Short tandem repeats</i> do cromossomo Y
YHRD	Y-Chromosome Haplotypes Reference Database

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	20
2	INVESTIGAÇÃO DE VÍNVULO GENÉTICO FETAL PELA ANÁLISE DO PLASMA MATERNO	22
2.1	INTRODUÇÃO	22
2.2	OBJETIVOS	25
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.3.1	Sujeitos.....	26
2.3.2	Amostras De Referência Do Suposto Pai E Da Criança	26
2.3.3	Coleta, Processamento E Transporte Do Sangue Materno	27
2.3.4	Extração De DNA Do Plasma Materno.....	27
2.3.5	Determinação Do Sexo Fetal (Ensaio DYS-14)	27
2.3.6	Amplificação De Y-STR No Plasma Materno.....	29
2.3.6.1	Powerplex Y23.....	29
2.3.6.2	Yfiler	29
2.3.6.3	Sistemas multiplex Mini-1 e Mini-2 Y-STR (Mini-1/-2)	29
2.3.7	Amplificação De Y-STR Das Amostras De Referência Do Suposto Pai E Da Criança	30
2.3.8	Análise De Parentesco Com NGM™	30
2.3.9	Eletroforese Capilar.....	30
2.3.10	Análises Estatísticas	31
2.3.11	Aspectos Éticos.....	32
2.4	RESULTADOS	33
2.4.1	Determinação Do Sexo Fetal No Início Da Gravidez	33
2.4.2	Amplificação De Y-STR No Plasma Materno.....	33
2.4.3	Análise Da Linhagem Masculina Fetal – Resultados Qualitativos	40
2.4.4	Análise Da Linhagem Masculina Fetal – Resultados Quantitativos	43
2.5	DISCUSSÃO	46
2.6	CONCLUSÃO.....	50
3	DETERMINAÇÃO NÃO INVASIVA DO SEXO FETAL PELA ANÁLISE DO DNA FETAL LIVRE DE CÉLULAS NO SANGUE CAPILAR MATERNO OBTIDO POR PUNÇÃO DIGITAL	51
3.1	INTRODUÇÃO	51
3.2	OBJETIVOS	53
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.3.1	Sujeitos.....	54
3.3.2	Delineamento Experimental.....	54
3.3.3	Assepsia com Álcool Isopropílico para Punção Capilar	55
3.3.4	Assepsia com Hipoclorito de Sódio à 0,5% Tamponado Aplicado Duas Vezes para Punção Capilar	55

3.3.5	Assepsia Com Hipoclorito De Sódio À 1% Tamponado Aplicado Uma Vez Para Punção Capilar.....	55
3.3.6	Assepsia Para Punção Venosa	56
3.3.7	Processamento Para Obtenção Do Plasma Materno	56
3.3.8	Extração De DNA Do Plasma Materno.....	56
3.3.9	Determinação Do Sexo Fetal (Ensaio DYS-14)	57
3.3.10	Análises Estatísticas	57
3.3.11	Aspectos Éticos.....	57
3.4	RESULTADOS	58
3.5	DISCUSSÃO	60
3.6	CONCLUSÃO.....	63
4	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE 38 POLIMORFISMOS DE INSERÇÃO E DELEÇÃO EM UMA AMOSTRA POPULACIONAL DO DISTRITO FEDERAL DO BRASIL – UM TERRITÓRIO QUE SURTIU DO NADA	64
4.1	INTRODUÇÃO	64
4.1.1	Polimorfismos De Inserção E Deleção	65
4.1.2	Conjunto 38 Indel-Plex.....	66
4.1.3	Brasília E Distrito Federal	66
4.1.4	Descrições De Frequências Alélicas Envolvendo O Conjunto 38 Indel-Plex No Brasil	67
4.2	OBJETIVOS	69
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
4.3.1	População.....	70
4.3.2	Coleta De Sangue	70
4.3.3	Extração De DNA	70
4.3.4	Genotipagem Dos Marcadores Indels	70
4.3.5	Análise Estatística Dos Dados	71
4.3.5.1	Frequências Alélicas.....	71
4.3.5.2	Heterozigosidade	71
4.3.5.3	Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	72
4.3.5.4	Desequilíbrio de ligação.....	73
4.3.5.5	Conteúdo de informação polimórfica (CIP).....	73
4.3.5.6	Probabilidade de coincidência (“<i>matching</i>”) (PM).....	74
4.3.5.7	Poder de discriminação (PD).....	74
4.3.5.8	Poder de exclusão (PE).....	75
4.3.5.9	Distância genética.....	75
4.3.6	Aspectos Éticos.....	76
4.4	RESULTADOS	77
4.4.1	Frequências Alélicas	77
4.4.2	Heterozigose	77
4.4.3	Equilíbrio De Hardy-Weinberg.....	77
4.4.4	Desequilíbrio De Ligação.....	77
4.4.5	Parâmetros Forenses	79

4.4.6	Parâmetro De Paternidade.....	81
4.4.7	Distância Genética.....	82
4.5	DISCUSSÃO.....	84
4.5.1	Frequências alélicas.....	84
4.5.2	Parâmetros Forenses.....	85
4.5.3	Parâmetro De Paternidade.....	87
4.5.4	Distância Genética.....	88
4.6	CONCLUSÃO.....	90
5	REFERÊNCIAS.....	91
6	ANEXOS.....	100
6.1	ANEXO I – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	100
6.2	ANEXO II – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	101
6.3	ANEXO III – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	105

1 INTRODUÇÃO GERAL

Esta tese de doutorado é composta por três estudos independentes relacionados ao estudo pré-natal não invasivo das características genéticas do feto, área de pesquisa viabilizada pela descoberta do DNA fetal livre de células (cfDNA) na circulação materna. Inicialmente, esta descoberta permitiu a detecção das características genéticas herdadas do pai e que não estão presentes no genoma de origem materna (1). Atualmente, com o avanço das tecnologias de sequenciamento, o DNA de origem fetal na circulação materna pode ser distinguido dos pais com maior facilidade (2).

Em relação ao primeiro estudo, sabe-se que em algumas situações existe a necessidade de se identificar o pai biológico antes do nascimento da criança (1). Na maioria das vezes, a investigação do vínculo genético pré-natal ainda depende de métodos invasivos como amniocentese ou biópsia da vilosidade coriônica. Ambos procedimentos são estressantes e conferem risco pequeno, mas existente, tanto para a mãe quanto para o feto (3).

O desenvolvimento de um teste de paternidade fetal confiável executado pela análise do sangue periférico materno é desafiador, pois não é simples a diferenciação entre o DNA fetal livre de células e o DNA materno usando tecnologias moleculares tradicionais (como eletroforese capilar), já que as sequências maternas vão estar em concentrações superiores as do feto (4). Logo, nestas condições, a principal estratégia usada para aplicação do DNA fetal livre de células na prática é explorar as diferenças genéticas entre mãe e feto como, por exemplo, o cromossomo Y.

Aproveitando-se da principal diferença genética entre mãe e feto masculino, análise dos marcadores do tipo “*short tandem repeats*” (STRs) do cromossomo Y poderia permitir a identificação do haplótipo Y-STR do feto presente no sangue da mãe. A posterior comparação com o haplótipo Y-STR do pai poderia permitir a conclusão ou estimativa de que ambos pertencem a mesma linhagem patrilinear ou não.

Em relação ao segundo estudo, sabe-se que o método padrão-ouro para coleta do sangue materno na análise não invasiva das características genéticas do feto é a punção venosa na fossa antecubital (5).

Desta forma, foi questionado se o DNA fetal estaria presente na microcirculação materna e se a determinação do sexo fetal, pela detecção ou não do cromossomo Y no sangue materno, ainda durante a gravidez poderia ser feita no sangue capilar. Esta dúvida subsidiou o desenvolvimento do segundo estudo (determinação não invasiva do sexo fetal no sangue capilar materno coletado por punção digital).

O uso do sangue capilar coletado por uma punção digital poderia trazer mais conforto para a mãe, pois trata-se de uma coleta menos invasiva e principalmente possibilitaria a coleta de material em áreas onde não há flebotomista.

Em relação ao terceiro estudo, sabe-se que o uso do cromossomo Y no diagnóstico pré-natal não invasivo limita sua aplicação aos fetos masculinos. Consequentemente, seria importante o desenvolvimento de tecnologias para análise do DNA fetal independentemente do sexo fetal e que contemple os cromossomos autossômicos. Portanto, hipotetizou-se usar os polimorfismos de inserção e deleção (Indels) presentes no pai e ausentes na mãe como “pequenas ilhas” de diferenças genéticas entre mãe e feto para o estudo pré-natal não invasivo das características genéticas do feto.

No entanto, antes de desenvolver esta metodologia é necessário conhecer as frequências alélicas e os parâmetros forenses destes Indels usando um conjunto de marcadores que tenha sido previamente validado e de preferência na população local. Assim, o tema de pesquisa do terceiro estudo foi avaliar as frequências alélicas de 38 indels na população do Distrito Federal. A aplicação dos indels no diagnóstico pré-natal não invasivo ainda encontra-se em desenvolvimento.

Por fim, os estudos 1 e 3 foram publicados na revista “*Forensic Science International: Genetics*” e o estudo 2 na revista “*Prenatal Diagnosis*”, ambas indexadas no Medline e com fator de impacto “*Journal Citation Reports*” de 3.911 e de 2.523, respectivamente.

2 INVESTIGAÇÃO DE VÍNVULO GENÉTICO FETAL PELA ANÁLISE DO PLASMA MATERNO

2.1 INTRODUÇÃO

A identificação do DNA fetal livre de células na circulação materna tem possibilitado o teste pré-natal não invasivo (6). Desde a sua descoberta, o cfDNA chamou muita atenção porque sua análise fornece informações genéticas sobre o feto com risco reduzido associado à obtenção do material fetal. A amniocentese e a amostragem das vilosidades coriônicas representam um pequeno, mas claro, risco de aborto (3). Atualmente, várias aplicações envolvendo a análise genética fetal não-invasiva estão disponíveis nos serviços clínicos e incluem detecção do sexo fetal (5), tipagem sanguínea Rhesus (7), aneuploidias (8, 9), mutações de origem paterna (10), síndromes de microdeleção e duplicação (11), e, também, paternidade (1, 4).

O cfDNA é originário das células da placenta e a apoptose parece ser o principal mecanismo que controla sua liberação para a circulação da mãe (12-14). Na décima semana de gestação, a mediana da fração de cfDNA no plasma materno é de 10,2% e seus níveis aumentam ao longo da gravidez, com um aumento inicial de 0,1% por semana de 10 a 20 semanas de gestação, seguido de um aumento acentuado de 1% por semana após 21 semanas até o termo (15).

As sequências de DNA fetal no plasma materno estão presentes em uma maior proporção considerando o tamanho de até 150 pares de base, e são raramente maiores que 250 pares de base (16-18). A sua depuração na circulação materna ocorre depois de um a dois dias pós-parto, o que significa que sua rápida remoção não interfere em posterior gravidez (19, 20).

O principal desafio para os ensaios envolvendo cfDNA é distinguir as sequências fetais em um alto "background" de DNA materno homólogo. Muitos pesquisadores basearam-se na estratégia de detecção das diferenças genéticas entre mãe e feto. A diferença genética mais amplamente utilizada

nos estudos de cfDNA é o cromossomo Y (21, 22). De fato, o plasma de uma mulher grávida de um feto masculino é uma mistura de DNA masculino e feminino.

Na ciência forense, a análise de misturas de DNA masculino/feminino é bastante comum, como por exemplo, casos de agressão sexual. A haplotipagem de “short tandem repeats” do cromossomo Y (Y-STR) é um método de escolha para detectar e diferenciar de forma não ambígua o componente masculino em misturas com maior quantidade de DNA feminino (23). Na verdade, Mayntz-Press *et al.* relatou que os perfis Y-STR completos são obtidos a partir de amostras com misturas de DNA masculino:feminino na proporção de 1:1000 (24). Além disso, a tecnologia Y-STR provou ser útil na identificação do vínculo paterno (25) e existem muitos kits comerciais disponíveis para haplotipagem Y-STR.

Algumas características peculiares do cromossomo Y como estar presente somente no genoma de indivíduos do sexo masculino e ausência de recombinação, possibilita que todas as sequências localizadas na região não recombinante Y sejam transmitidas às gerações posteriores em blocos (haplótipo), sem alterações genéticas ao menos que ocorra mutação o que torna-o um marcador de linhagem (26).

A descoberta de eventos mutacionais fornece diferentes tipos de polimorfismos com distintas taxas de mutação facilitando significativamente o aumento do número de marcadores. Desta forma, a diferenciação entre indivíduos da mesma linhagem patrilinear poderá ser realizada por causa do acúmulo de mutações dos Y-STR de geração para geração (27, 28).

A primeira descrição na literatura sobre o estudo de vínculo genético pré-natal não invasivo envolveu a análise de STRs a partir da coleta de sangue periférico materno de vinte mulheres grávidas. A amplificação dos alelos fetais no plasma foi realizada pelos kits ampFLSTR Identifiler™ e ampFLSTR Yfiler™. Não houve nenhuma amplificação eficaz dos *loci* autossômicos fetais, exceto a amelogenina (região utilizada para determinação do sexo) usando o primeiro kit comercial. Esta amplificação aleatória pode ser resultante da supressão causada pelo excesso de DNA materno sobre a quantidade de DNA fetal no plasma (1).

Para sancionar essa questão utilizou-se o kit Yfiler que é específico para STRs do cromossomo Y. Observou-se que entre seis e dezesseis *loci* fetais foram amplificados com sucesso a partir do plasma das mães que carregavam fetos do sexo masculino (n=13). Outro resultado relevante neste estudo é que houve concordância entre os alelos fetais do cromossomo Y encontrados no plasma com os alelos do pai alegado. Tais achados sugerem que é possível determinar a linhagem patrilinear do feto durante a gestação através da análise dos Y-STR no sangue materno (1).

Rong e colaboradores também analisaram o plasma materno para detectar sequências fetais, entretanto, o objetivo do estudo foi determinar o sexo fetal. Da mesma forma do estudo anterior, os autores aproveitaram-se da principal diferença genética entre a mãe e o feto masculino, o cromossomo Y, mas também genotiparam STRs autossômicos. Os kits utilizados foram ampFLSTR Identifiler, Agcu Mini-STR e ampFLSTR Yfiler™. Os *loci* autossômicos amplificaram esporadicamente e o único *locus* amplificado com sucesso foi a amelogenina. Com relação aos *loci* Y-STR, das 25 amostras de plasma materno de fetos masculinos tiveram entre 5 e 12 *loci* Y-STRs amplificados, enquanto que nenhuma amplificação foi observada em 15 amostras de plasma materno de mães de fetos femininos. Os dados obtidos foram confirmados confrontando com os dados da análise do líquido amniótico e com o perfil Y-STR dos pais alegados (29).

Resumidamente, as duas descrições supracitadas mostraram que a amplificação com sucesso de STRs autossômicos fetais através do plasma materno ainda não é possível. Por outro lado, a genotipagem de Y-STR apresentou resultados superiores, mas é preciso que a técnica seja aperfeiçoada para que a determinação da linhagem patrilinear fetal no sangue materno torne-se uma realidade (1, 29).

Hoje, em nossa complexa sociedade, há muitas situações em que seria desejável conhecer a linhagem patrilinear do feto masculino ainda durante a gravidez. Assim, os objetivos deste estudo são determinar o haplótipo Y-STR de fetos masculinos no plasma materno durante a gravidez e estimar, de forma não invasiva, se o feto e o suposto pai pertencem à mesma linhagem paterna.

2.2 OBJETIVOS

- Determinar o haplótipo Y-STR de fetos masculinos no plasma materno durante a gravidez;
- Estimar de forma não invasiva se o feto e o suposto pai pertencem à mesma linhagem patrilinear.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Sujeitos

Este estudo experimental envolveu 30 casais com gestações únicas e com paternidade supostamente conhecida. Os voluntários que aceitaram participar foram recrutados em um laboratório clínico do Distrito Federal e as primeiras vinte mães consecutivas que carregavam feto do sexo masculino (casos) e as primeiras dez mães consecutivas que carregavam feto do sexo feminino (controles) foram selecionados para análise de Y-STR. Os aspectos éticos deste trabalho estão descritos no item 2.3.11.

2.3.2 Amostras De Referência Do Suposto Pai E Da Criança

A amostra de referência do suposto pai foi obtida durante a sua primeira visita e a amostra de referência da criança foi coletada depois do nascimento durante a ocasião da coleta do teste do pezinho. As amostras de sangue foram obtidas a partir da punção do dedo anelar (suposto pai) e do calcanhar (criança) em um cartão de papel Whatman® FTA™.

O DNA foi extraído a partir das manchas de sangue presente neste cartão. Perfurou-se um disco de 1,2 mm com o auxílio de um “Harris Micro Punch”. Em seguida, o disco foi colocado em tubo de amplificação de PCR e lavado com 200 µl de FTA Purification Reagent (Life Technologies). Após 10 minutos de agitação horizontal (700 rpm), à temperatura ambiente, o reagente FTA é removido, e repete-se esse passo de purificação por três vezes. Logo, faz-se a lavagem do disco com 200 µl de água livre de DNase/RNase por 05 minutos sob agitação horizontal (700 rpm) e após a retirada de todo o líquido, a reação de PCR é executada no próprio tubo utilizado na extração.

2.3.3 Coleta, Processamento E Transporte Do Sangue Materno

O sangue materno foi coletado por punção venosa em três tubos de 4 mL Vacuette K2 EDTA Sep (Greiner Bio-one). Em seguida, os tubos foram centrifugados à 3100 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente para obtenção do plasma materno. Depois disto, eles foram transportados para o centro de processamento às $22 \pm 4^\circ\text{C}$ e armazenados à -20°C até seu uso.

2.3.4 Extração De DNA Do Plasma Materno

Após o descongelamento dos tubos, 1100 μL de plasma materno foram transferidos para tubos de polipropileno e centrifugados à 14.000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O DNA foi extraído a partir de 1 mL de cada amostra utilizando o protocolo genérico 2.0.1 do sistema de Nuclisens EasyMag (bioMérieux), com 50 μL de partículas de sílica magnética e eluição em 25 μL .

2.3.5 Determinação Do Sexo Fetal (Ensaio DYS-14)

Os alvos da reação multiplex de qPCR para a determinação do sexo fetal foram a sequência específica do cromossomo Y (DYS-14) (30) e RNase P (controle interno). As sequências de *primers* e sondas com as respectivas fluorescências para os marcadores supracitados estão descritos na tabela 2.1. Ambos foram adquiridos como ensaios PrimeTime qPCR da Integrated DNA Technologies.

Tabela 2.1 – Sequências de *primers* utilizados para a determinação do sexo fetal

Conjunto PrimeTime	Sequência (5' - 3')
DYS-14 forward	CCATGACCCCAGAGTCTGC
DYS-14 reverso	CTTCCTGGCTTGGGCATTAAC
DYS-14 sonda	6-FAM-CTCCAGCTC/ZEN/CACCTGAACGGCC-IABFQ
RNAse P forward	AGATTTGGACCTGCGAGCG
RNAse P reverso	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT
RNAse P sonda	HEX-TTCTGACCT/ZEN/GAAGGCTCTGCGCG-IABFQ

Brevemente, o ensaio de qPCR consistiu de 2 µl de 10X DYS-14 PrimeTime, 1 µl de 10X RNAse P PrimeTime, 12,5 µl do master mix Maxima Probe qPCR (Fermentas) e 9 µl do DNA extraído em 25 µl de volume ajustado com água livre de DNase/RNase (Fermentas). Este ensaio foi realizado no ABI StepOne qPCR System (Life Technologies). As condições de ciclagem da PCR foram: pré-incubação por 10 minutos à 95°C, 60 ciclos de 95°C à 15 segundos e 60°C à 60 segundos. Todas as amostras foram feitas em quadruplicata e em cada ensaio foram incluídas três amostras controle: uma feminina, uma masculina e uma negativa (ausência de DNA).

O critério de interpretação para o ensaio de sexagem fetal foi: 4 resultados positivos para DYS-14 com o ciclo quantitativo (Cq) menor que 34 indica um feto masculino; 0 ou 1 resultado positivo com Cq maior que 40 para o DYS-14 indica um feto feminino; todos outros resultados foram considerados indeterminados e a reação foi repetida. A RNAse P tem que obrigatoriamente amplificar em todas as ocasiões, exceto no controle negativo (água), caso contrário, o resultado será inválido. O sexo fetal foi também confirmado por visualização da genitália externa depois do nascimento.

2.3.6 Amplificação De Y-STR No Plasma Materno

2.3.6.1 Powerplex Y23

O primeiro kit comercial para amplificação de Y-STR foi o Powerplex Y23 System (Promega). Este kit inclui os seguintes Y-STR *loci* (DYS576, DYS389I, DYS448, DYS389II, DYS19, DYS391, DYS481, DYS549, DYS533, DYS438, DYS437, DYS570, DYS635, DYS390, DYS439, DYS392, DYS643, DYS393, DYS458, DYS385I/II, DYS456, e Y-GATA-H4). Esta reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante no PCR GeneAmp 9700 (Life Technologies), exceto o uso de 60 ciclos na PCR.

2.3.6.2 Yfiler

O segundo kit comercial usado para a amplificação de Y-STR foi o AmpFISTR Yfiler PCR Amplification (Life Technologies). Este possui os seguintes Y-STR *loci* (DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385I/II, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y-GATA-H4, DYS437, DYS438, e DYS448) e todos eles estão também incluídos no Powerplex Y23. Esta reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante no termociclador GeneAmp 9700 (Life Technologies), exceto o uso de 60 ciclos na PCR.

2.3.6.3 Sistemas multiplex Mini-1 e Mini-2 Y-STR (Mini-1/-2)

A terceira (Mini-1) e quarta (Mini-2) reação multiplex utilizadas para a amplificação de Y-STR foram previamente descritas por Asamura *et al.*, e somente incluem mini Y-STR (31).

A reação multiplex Mini-1 Y-STR (4-plex) consistiu de 1,0 µl de mix primer, 12,5 µl de master mix Maxima Probe qPCR (Fermentas) e 10 µl de DNA extraído em 25 µl de volume ajustado com água DNase/RNase-free (Fermentas). A concentração dos *primers* foram as seguintes: DYS522 (6FAM) 0,5 µM, DYS508 (VIC) 0,6 µM, DYS632 (NED) 0,6 µM, DYS556

(PET) 1,4 μM . As condições da ciclagem da PCR foram: pré-incubação por 10 minutos à 95°C, 50 ciclos de 15 segundos à 95°C, 30 segundos à 60°C e uma extensão final de 20 minutos à 60°C.

A reação multiplex Mini-2 Y-STR (3-plex) foi idêntica a do Mini-1, exceto na composição de mix de *primer* DYS570 (6FAM) 0,5 μM , DYS576 (VIC) 0,5 μM , DYS540 (PET) 1,4 μM , além das condições de ciclagem da PCR (pré-incubação por 10 minutos à 95°C, 50 ciclos de 15 segundos à 95°C, 30 segundos à 55°C e uma extensão final de 20 minutos à 60°C). O termociclador TC-3000 (Techne) foi usado para realizar ambas reações e os *primers* para Mini-1 e Mini-2 *loci* foram sintetizados pela Life Technologies.

2.3.7 Amplificação De Y-STR Das Amostras De Referência Do Suposto Pai E Da Criança

Os sistemas Powerplex Y23 e Mini-1/-2 foram usados para a genotipar a amostra de referência do pai. As reações foram realizadas como descritas acima, exceto a ciclagem na PCR que foi reduzida para 30 ciclos. Além disso, um total de 0,5 – 1,0 ng de DNA (continham em um punch de 1,2 mm de FTA) foi usado por reação de PCR.

2.3.8 Análise De Parentesco Com NGM™

Quando necessário, o kit de amplificação AmpFISTR NGM™ PCR foi usado para confirmar o parentesco. As reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.9 Eletroforese Capilar

Os produtos de PCR foram separados e detectados no Analisador Genético 3500. O *threshold* de detecção do pico foi de 200 unidades relativas de fluorescência (URF) para identificar os alelos dos marcadores.

Para as reações do Yfiler, NGM™ e Mini-1/-2 foi utilizado o seguinte protocolo: 1 μl da amostra amplificada foi adicionada em 8,5 μl de Formamida

Hi-Di e 0,5 µl de GeneScan 600 LIZ. A condição da eletroforese foi 15 segundos de tempo de injeção, 1.2 kV de voltagem da injeção, 15 kV de voltagem na corrida, 60°C, 20 minutos de tempo da corrida, Dye Set G5 (6FAM, VIC, NED, PET e LIZ).

Para a reação do Powerplex Y23, 1 µl da amostra amplificada foi adicionada em 10 µl de Formamida Hi-Di e 1 µl de CC5 ILS Y23 (Promega). A condição da eletroforese foi idêntica ao Yfiler, exceto para o Dye Set G5 (FL, JOE, TMR-ET, CXR-ET e CC5 (Promega). Os dados brutos foram analisados com o Software GeneMapper® ID-X V.1.2 (todos os equipamentos e reagentes são fabricados pela Life Technologies, exceto quando indicado).

2.3.10 Análises Estatísticas

Pelo fato do cromossomo Y não segregar independentemente a “regra do produto” não pode ser aplicada, assim, as frequências haplotípicas não podem ser calculadas a partir das frequências alélicas por multiplicação como é feito em marcadores autossômicos, por isto, este marcador de linhagem é referido como ferramenta complementar. Desta forma, a análise de vários *loci* de forma combinada define o haplótipo do indivíduo e este pode ser comparado com os bancos de dados de haplótipos para que se estime a frequência deste perfil (32).

As frequências haplotípicas são estimadas utilizando o método de contagem. Tal método pesquisa um determinado haplótipo contra uma base de dados para determinar o número de vezes que o haplótipo foi observado. O resultado da frequência do haplótipo Y-STR é o número de vezes que o haplótipo foi observado dividido pelo número de haplótipos registrados no banco (33).

Neste estudo, as frequências haplotípicas foram estimadas pesquisando o haplótipo Y-STR do plasma materno no banco de dados brasileiro (n = 5.328) no Y-Chromosome Haplotype Reference Database (YHRD) (33). Os 17 *loci* incluídos no Yfiler foram considerados nesta análise (haplótipos no formato Yfiler), por causa do número pequeno de haplótipos do Powerplex

Y23 no banco de dados para a população considerada e a ausência de dados para alguns *loci* incluídos nas reações do Mini-1 (DYS522, DYS508, DYS632, DYS556) e Mini-2 (DYS540).

O índice de paternidade para cada caso foi calculado como descrito por Rolf e colaboradores. Em resumo, os casos sem mutação, o índice de paternidade é 1 dividido pela frequência do haplótipo; em casos com mutação/exclusão, o índice de paternidade é $(0,5 \times \mu)$ dividido pela frequência haplotípica, onde μ é a taxa de mutação do *locus*, mostrando uma única mutação/exclusão devido à contração/expansão de uma unidade de repetição (34).

A probabilidade de paternidade foi calculada pela seguinte fórmula: índice de paternidade x 100/(índice de paternidade + 1) (35).

2.3.11 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa intitulado como “Investigação do vínculo genético fetal pela análise do sangue materno”, foi encaminhado ao Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB), e aprovado através do protocolo 188/12 (Anexo I), de acordo com o estabelecido pela Resolução nº 196/96. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e informado.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Determinação Do Sexo Fetal No Início Da Gravidez

O ensaio DYS-14 foi utilizado para determinar o sexo fetal durante a gravidez e guiou a seleção das voluntárias para a análise de Y-STR. As primeiras vinte e dez consecutivas mães que carregavam fetos masculinos e femininos, respectivamente, foram selecionadas para a análise de Y-STR. Depois do nascimento, observou-se uma concordância completa entre o sexo fetal atribuído pelo ensaio do DYS-14 e o sexo do recém-nascido. Adicionalmente, em 24 das 30 grávidas voluntárias a moda da idade gestacional foi 12 semanas (Tabela 2.2).

2.4.2 Amplificação De Y-STR No Plasma Materno

Considerando todos os sistemas multiplex (Powerplex Y23, Yfiler e Mini-1/-2) foram amplificados com sucesso no plasma materno entre 22 e 27 *loci* (mediana de 25) em todos os casos de fetos masculinos. Em mulheres que carregavam fetos femininos nenhuma amplificação foi observada (Tabela 2.2).

Os eletroferogramas representativos obtidos do plasma materno usando o Powerplex Y23 e o Yfiler em amostras masculinas e femininas estão ilustradas na figura 2.1 e figura 2.2, respectivamente. Além destes, as figuras 2.3 e 2.4 mostram eletroferogramas representativos usando o Mini-1/-2.

Tabela 2.2 - Resultados qualitativos para detecção de Y-STR *loci* fetal no plasma de mães que carregavam fetos masculinos (n=20) e fetos femininos (n=10) e sua concordância com os *loci* do pai alegado

Número do caso	Idade gestacional (semanas)	Ensaio DYS-14 (plasma materno)	Sexo do recém-nascido	Y-STR loci (plasma materno)	Concordância com os loci do suposto pai	Concordância com os loci do recém-nascido
1	12	Masculino	Masculino	26	25 ^a	26
2	12	Masculino	Masculino	25	25	25
3	12	Masculino	Masculino	22	21 ^b	21 ^b
4	12	Masculino	Masculino	26	26	26
5	24	Masculino	Masculino	23	23	23
6	36	Masculino	Masculino	27	27	27
7	12	Masculino	Masculino	24	24	24
8	17	Masculino	Masculino	24	24	24
9	12	Masculino	Masculino	25	25	25
10	12	Masculino	Masculino	26	26	26
11	16	Masculino	Masculino	26	26	26
12	12	Masculino	Masculino	26	26	26
13	12	Masculino	Masculino	25	25	25
14	12	Masculino	Masculino	24	24	24
15	12	Masculino	Masculino	23	23	23
16	12	Masculino	Masculino	25	25	25
17	12	Masculino	Masculino	25	24 ^b	24 ^b
18	12	Masculino	Masculino	25	24 ^b	24 ^b
19	12	Masculino	Masculino	25	25	25
20	17	Masculino	Masculino	24	24	24
21	13	Feminino	Feminino	0	0	NA
22	12	Feminino	Feminino	0	0	NA
23	12	Feminino	Feminino	0	0	NA
24	12	Feminino	Feminino	0	0	NA
25	12	Feminino	Feminino	0	0	NA
26	12	Feminino	Feminino	0	0	NA
27	12	Feminino	Feminino	0	0	NA
28	12	Feminino	Feminino	0	0	NA
29	12	Feminino	Feminino	0	0	NA
30	12	Feminino	Feminino	0	0	NA

NA - não de aplica

a - Caso com mutação no locus DYS 458

b - Casos com alelo *dropout* em um do locus DYS 385I/II no plasma materno

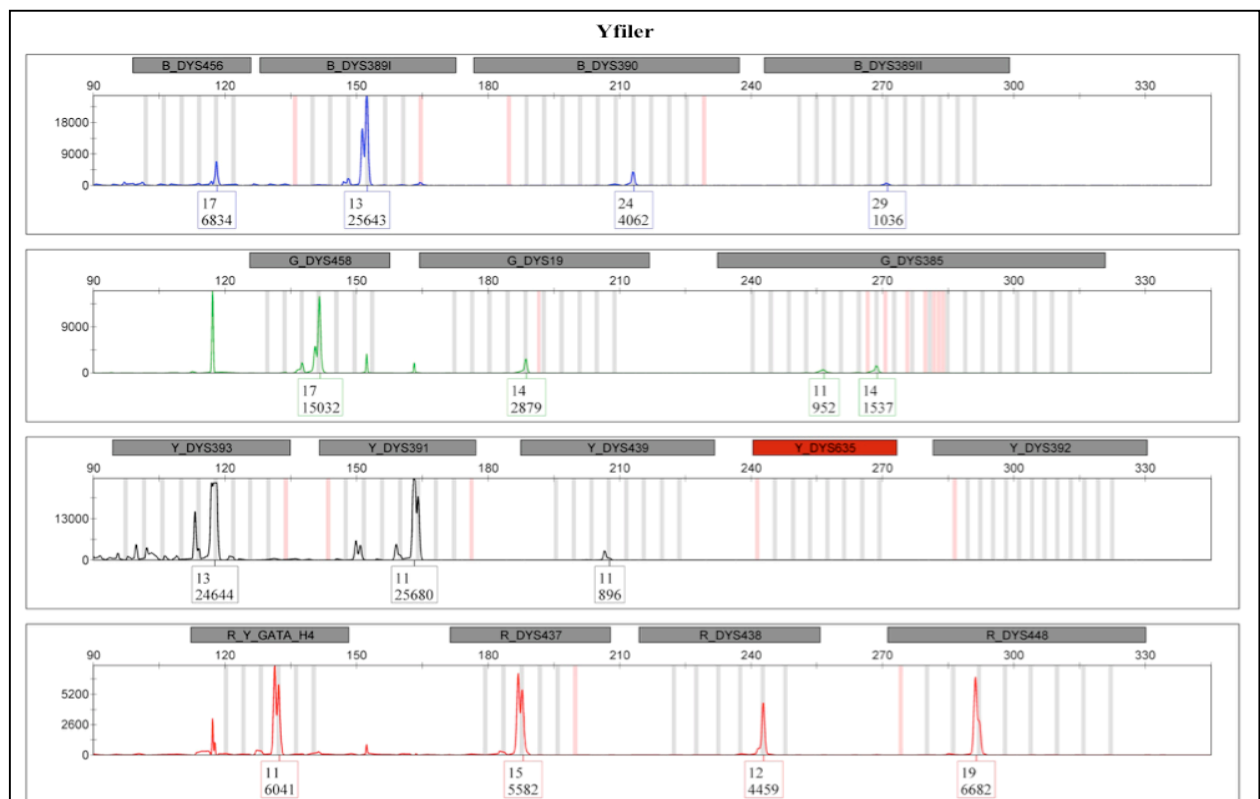
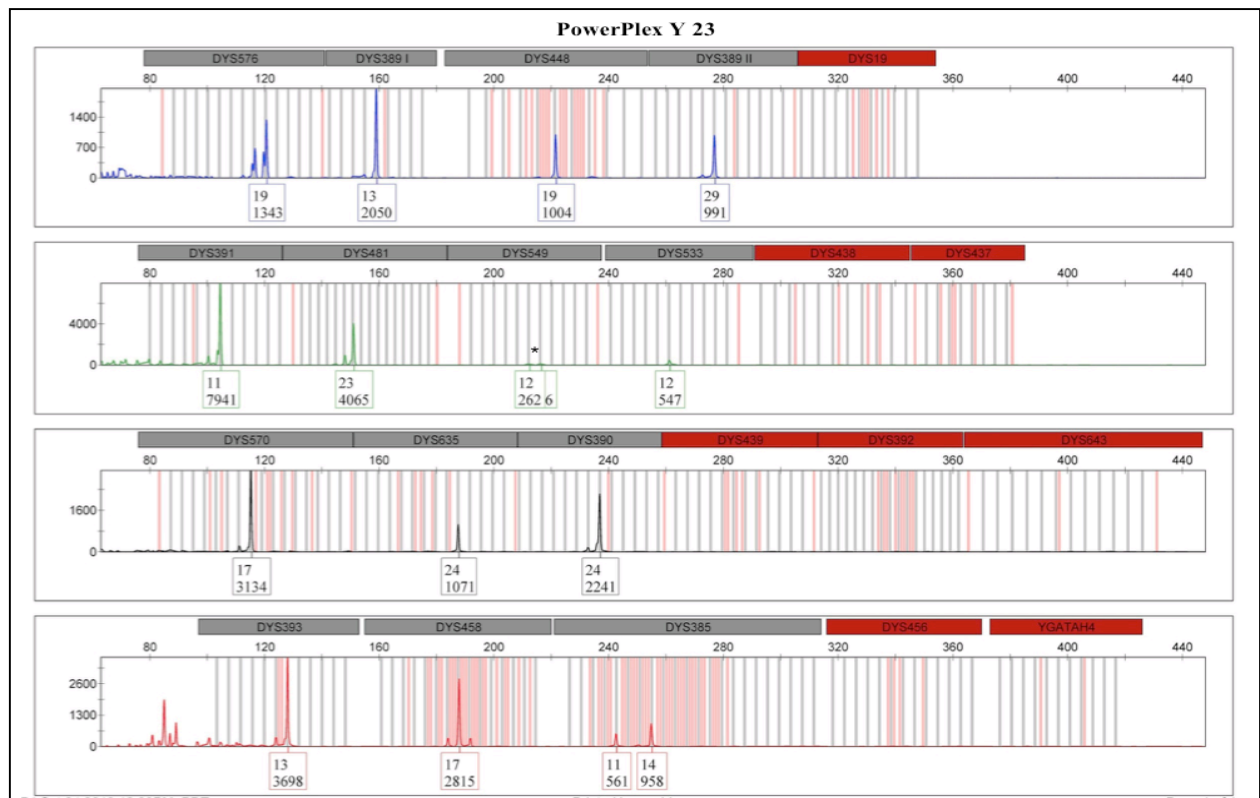


Figura 2.1 - Perfis representativos de Y-STR obtidos do plasma de uma mãe que carregava um feto masculino (caso 7) usando o PowerPlex Y23 e Yfiler
*Locus excluído da análise

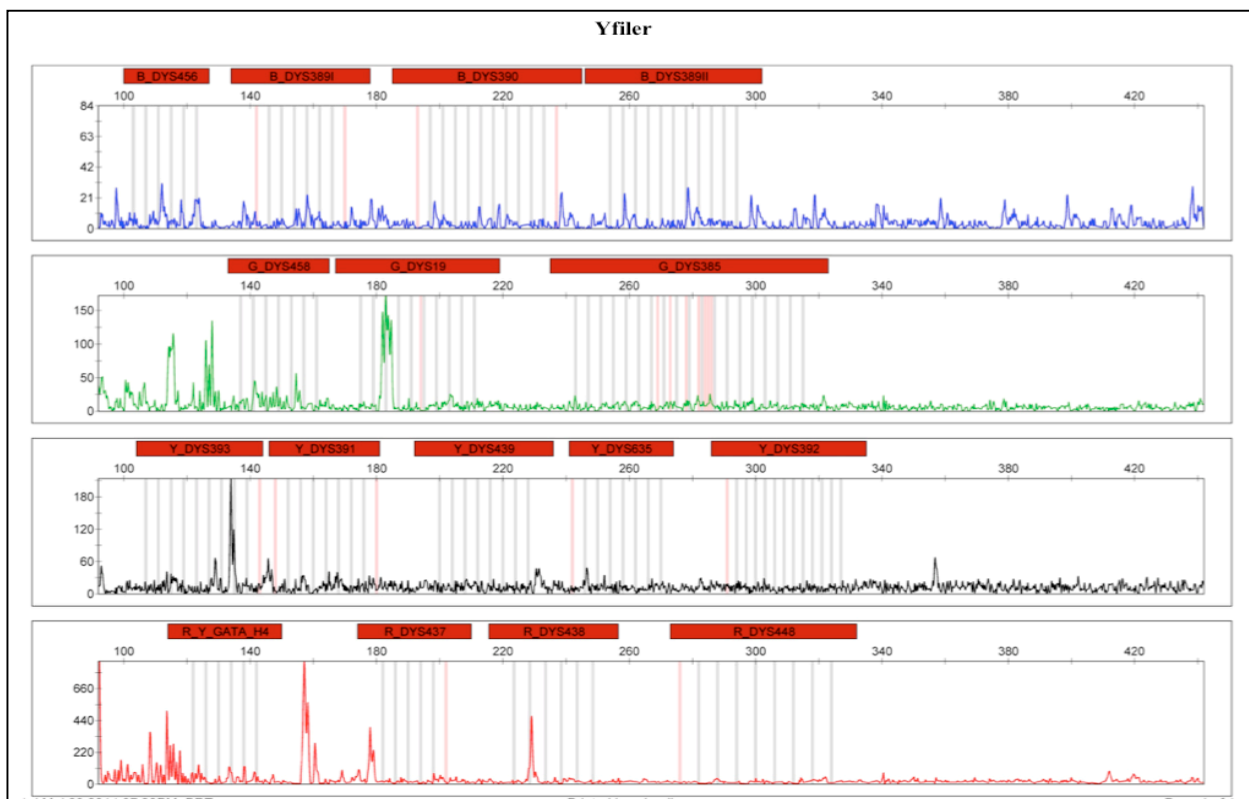
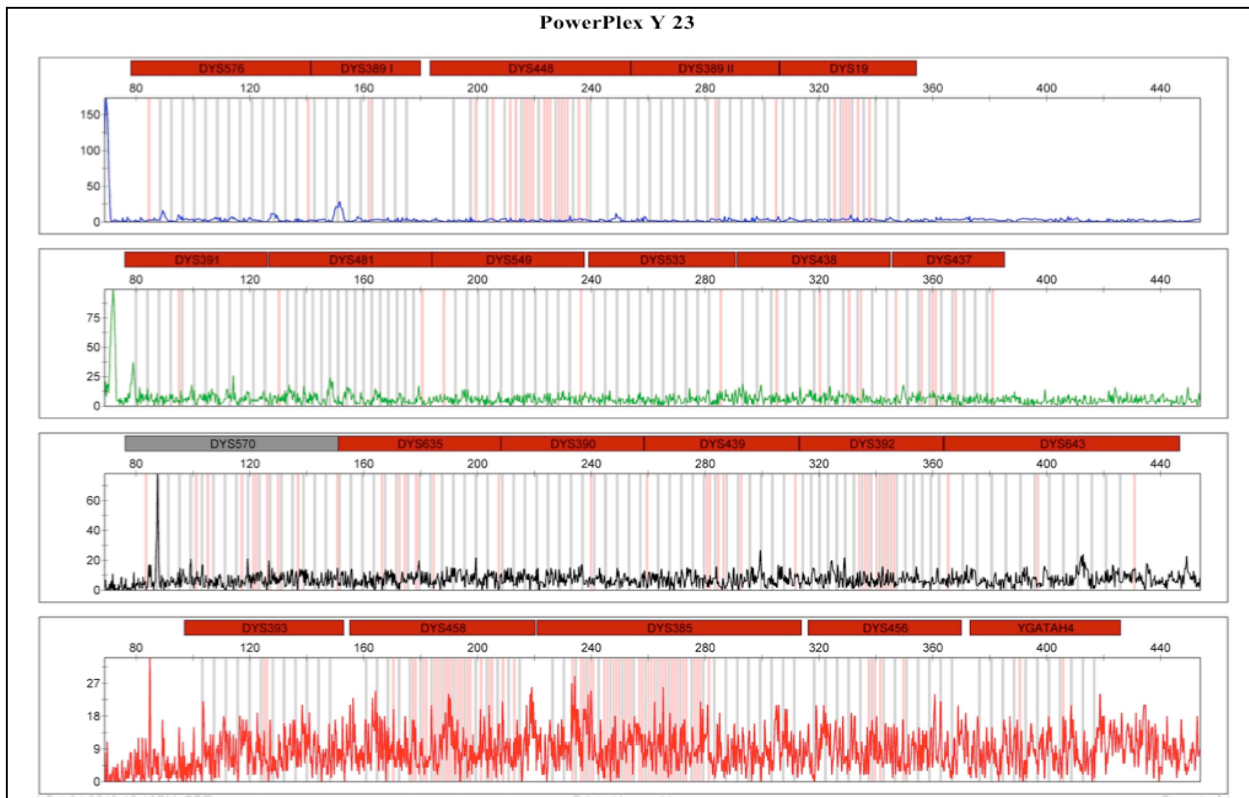


Figura 2.2 - Perfis representativos de Y-STR obtidos do plasma de uma mãe que carregava um feto feminino (caso 25) usando o PowerPlex Y23 e Yfiler

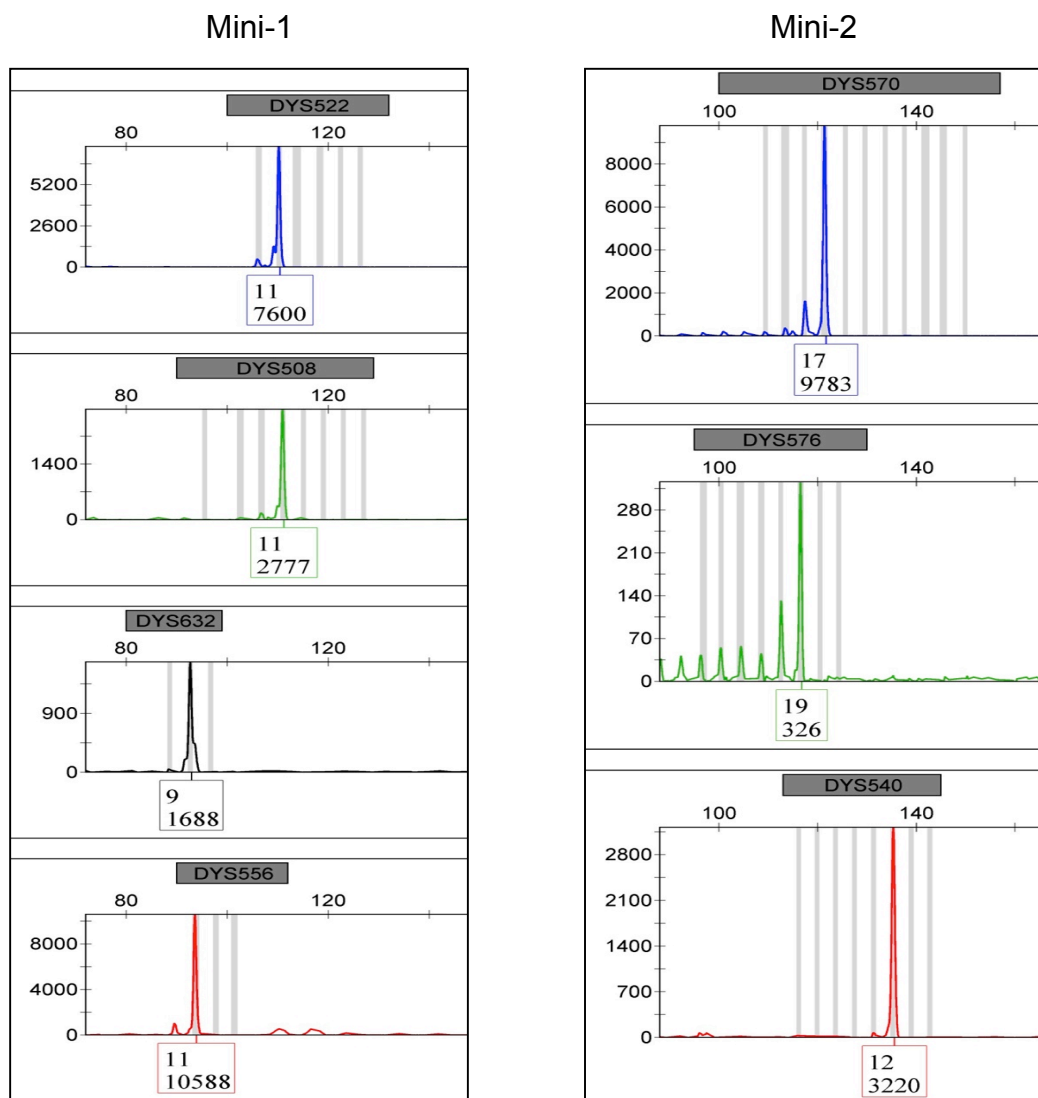


Figura 2.3 - Perfis representativos de Y-STR obtidos do plasma de mulheres que carregavam um feto masculino (caso 7) usando os sistemas Mini-1/-2

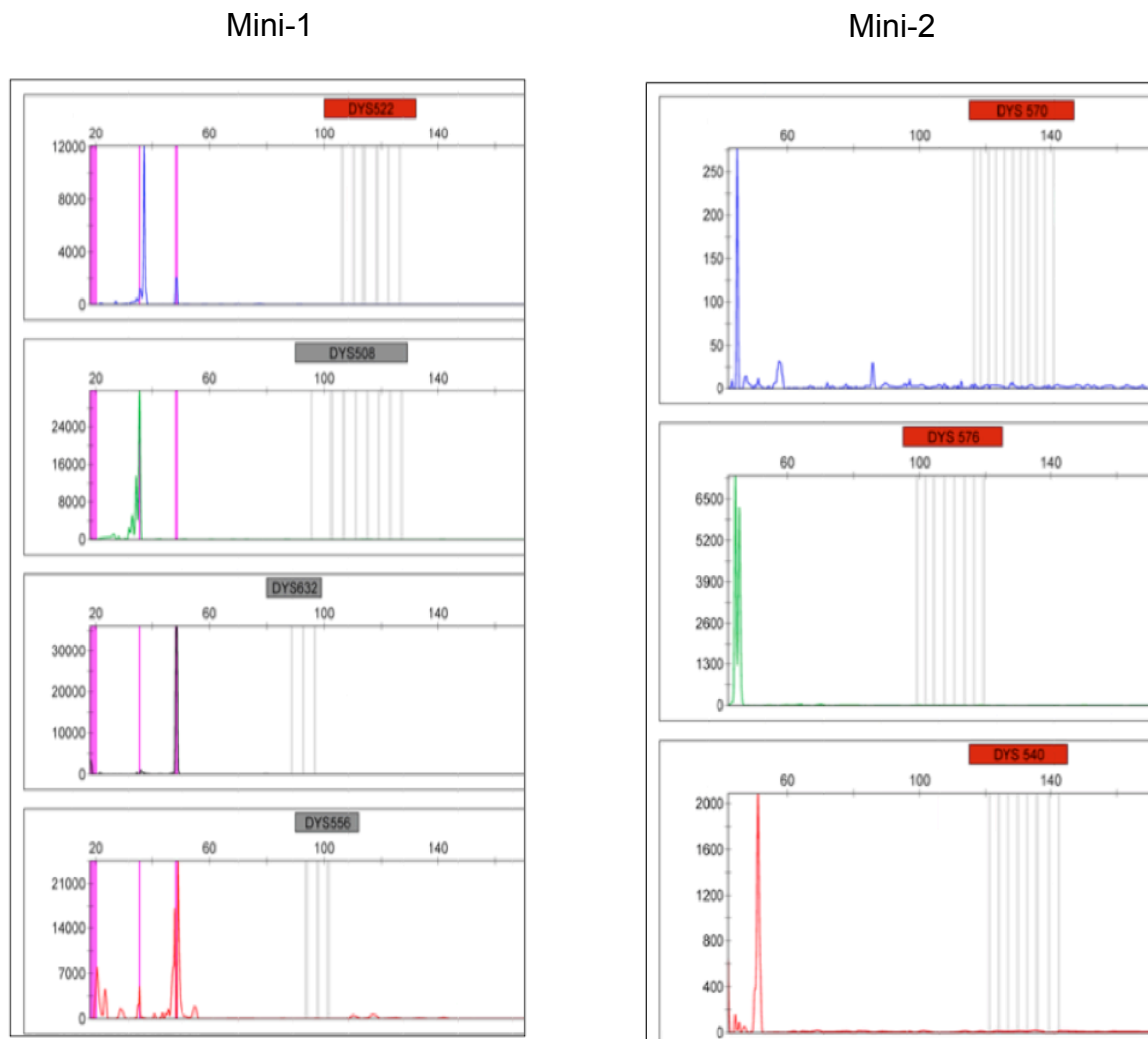


Figura 2.4 - Perfis representativos de Y-STR obtidos do plasma de mulheres que carregavam um feto feminino (caso 25) usando os sistemas Mini-1/-2

Claramente, a detecção com sucesso de Y-STR fetal foi dependente do tamanho do produto, pois os *loci* com tamanho de produtos menores mostraram altas taxas de detecção. A taxa de detecção variou entre 5% à 100% no Powerplex Y23, 50% à 100% no Yfiler e foi 100% para todos os *loci* incluídos no Mini-1/-2. Além disso, todos os Y-STR *loci* com 55% de detecção com sucesso ou inferior foram produtos com tamanho maior que 250 pb (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Tamanho do produto e taxa de detecção para cada *locus* Y-STR incluído nos sistemas multiplex utilizados no estudo

Y-STR	Powerplex Y 23 (1 Rxn)		Yfiler (2 Rxn em 8 dos 20 casos)		Mini-1/-2 (1 Rxn)	
	Tamanho do produto (pb)	Taxa de detecção (%)	Tamanho do produto (pb)	Taxa de detecção (%)	Tamanho do produto (pb)	Taxa de detecção (%)
DYS 522	N.A	N.A	N.A	N.A	112-132	100
DYS 508	N.A	N.A	N.A	N.A	105-129	100
DYS 632	N.A	N.A	N.A	N.A	95-99	100
DYS 556	N.A	N.A	N.A	N.A	96-112	100
DYS 540	N.A	N.A	N.A	N.A	113-145	100
DYS 576	97-145	100	N.A	N.A	109-141	100
DYS 389I	147-179	95	130-175	100	N.A	N.A
DYS 448	196-256	90	273-332	95	N.A	N.A
DYS 389II	259-303	70	244-301	75	N.A	N.A
DYS 19	312-352	25	167-218	100	N.A	N.A
DYS 391	86-130	100	145-179	100	N.A	N.A
DYS 481	139-184	85	N.A	N.A	N.A	N.A
DYS 549	198-238	80	N.A	N.A	N.A	N.A
DYS 533	245-285	75	N.A	N.A	N.A	N.A
DYS 438	293-343	45	215-250	95	N.A	N.A
DYS 437	344-380	30	173-209	90	N.A	N.A
DYS 570	90-150	100	N.A	N.A	115-147	100
DYS 635	150-202	85	242-274	80	N.A	N.A
DYS 390	207-255	95	179-238	100	N.A	N.A
DYS 439	263-307	55	129-232	95	N.A	N.A
DYS 392	314-362	15	283-333	50	N.A	N.A
DYS 643	367-423	5	N.A	N.A	N.A	N.A
DYS 393	101-145	95	98-136	100	N.A	N.A
DYS 458	159-215	90	127-160	100	N.A	N.A
DYS 385I/II	223-307	95	234-324	85	N.A	N.A
DYS 456	316-364	30	100-127	90	N.A	N.A
YGATA H4	374-414	10	114-150	95	N.A	N.A

NA - Não aplicável

A contribuição específica de cada multiplex para a detecção com sucesso para os Y-STR *loci* está detalhada na tabela 2.4. O Powerplex Y23 e os Mini-1/-2 contribuíram somente com 3 e 5 *loci*, respectivamente, uma vez que são exclusivos para estes sistemas (tabela 2.4, 1^a e 3^a colunas), além disso, eles se sobrepõem em 2 *loci* detectados com sucesso (tabela 2.4, 4^a coluna).

Tabela 2.4 - Os principais contribuintes do sistema multiplex para a detecção com sucesso de cada Y-STR no plasma materno

Powerplex Y23	Yfiler#	Mini-1/-2	Mini-1/-2 + Powerplex Y23	Powerplex Y23 + Yfiler#
DYS 481	DYS 19	DYS 522	DYS 576	DYS 389I
DYS 549	DYS 438	DYS 508	DYS 570	DYS 448
DYS 533	DYS 437	DYS 632		DYS 389II
	DYS 439	DYS 556		DYS 391
	DYS 392	DYS 540		DYS 635
	DYS 456			DYS 390
	YGATA H4			DYS 393
				DYS 458
				DYS 385I/II

- Duas reações do Yfiler foram realizadas em 8 dos 20 casos

Além disso, o Yfiler e o Powerplex Y23 detectaram igualmente 9 *loci* com sucesso (tabela 2.4, 5ª coluna) e, apesar da redundância entre os sistemas, o Yfiler foi o contribuinte principal para a detecção de 7 Y-STR (tabela 2.4, 2ª coluna), porque o tamanho do produto para estes *loci* eram menores quando comparados com o Powerplex Y23 (tabela 2.3), como por exemplo, o tamanho do produto do DYS19 varia de 167 pb à 281 pb no Yfiler e no Powerplex Y23 de 312 pb à 352 pb. No entanto, não podemos excluir que este resultado é secundário ao fato de que em 8 dos 20 casos foram realizadas duas reações para o Yfiler.

2.4.3 Análise Da Linhagem Masculina Fetal – Resultados Qualitativos

O haplótipo Y-STR detectado no plasma materno concordou completamente com o suposto pai em 16 dos 20 casos e 4 casos mostraram simples inconsistências (Tabela 2.2). Em síntese, os haplótipos extensos obtidos do plasma materno resultaram em uma concordância geral de 99,2% Y-STR *loci*. A figura 2.5 representa um exemplo da análise de concordância entre o haplótipo Y-STR do plasma materno e do suposto pai.

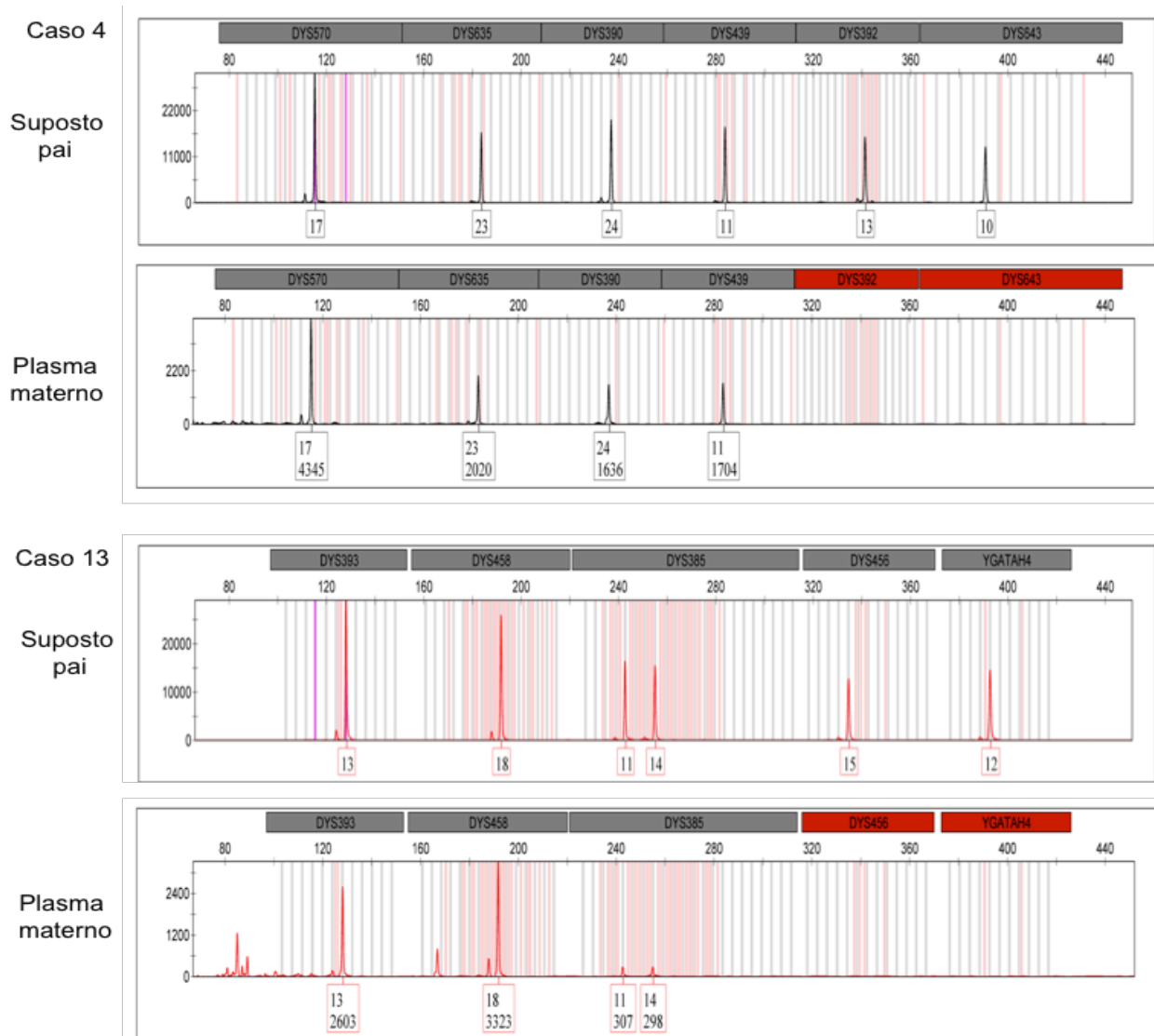


Figura 2.5 - Análise de concordância de haplótipos Y-STR representativos do suposto pai e do plasma materno usando alguns *loci* do PowerPlex Y23. Painel superior - caso 4; painel inferior - caso 13

As inconsistências encontradas nos 04 casos foram as seguintes:

a) o caso 1 apresentou uma exclusão/mutação paterna no *locus* DYS458 devido à contração de uma única unidade de repetição. A análise de parentesco do caso 1 (trio) realizada depois do nascimento baseou-se no estudo de marcadores STR autossômicos incluídos no kit AmpFLSTR NGM PCR Amplification (Life Technologies) e os dados da frequência alélica local

da população (36) confirmou a paternidade (índice de paternidade de 3.472.249.188,76 e probabilidade de paternidade de 99,99999971%). A mutação foi também confirmada depois do nascimento usando o Powerplex Y23 (Figura 2.6).

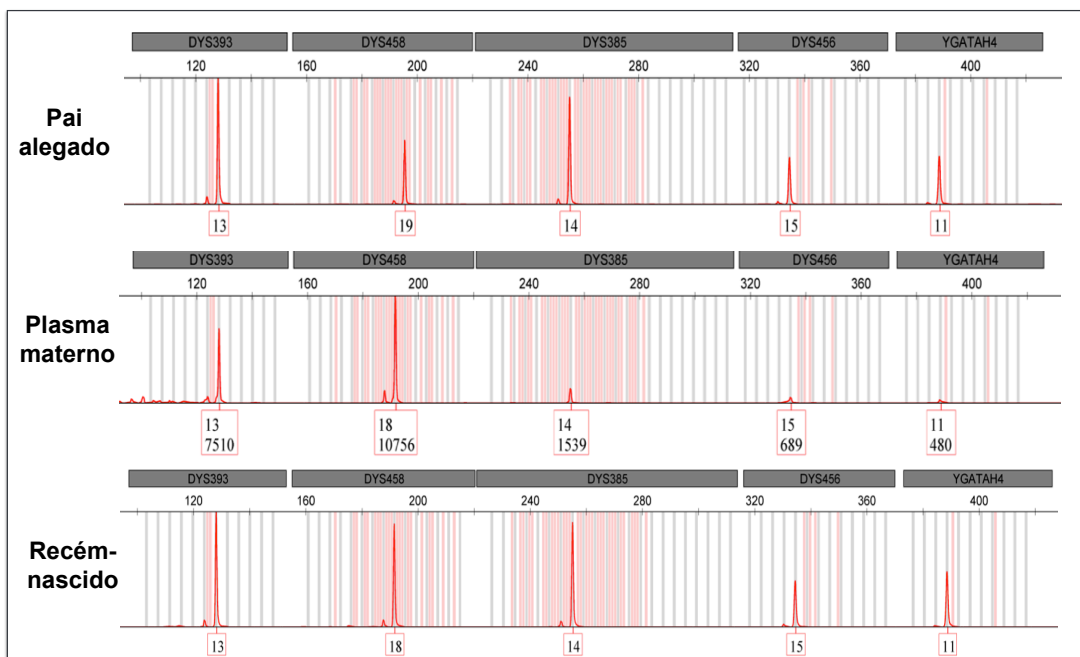


Figura 2.6 - Mutação no *locus* DYS458 do caso 1 detectado no plasma materno e na amostra de referência do recém-nascido

b) Os casos 3, 17 e 18 mostraram alelo *dropout* em um do *locus* DYS385 I/II no perfil Y-STR fetal quando comparado com o suposto pai. Isto foi confirmado utilizando o Powerplex Y23 na amostra do recém-nascido (Figura 2.7).

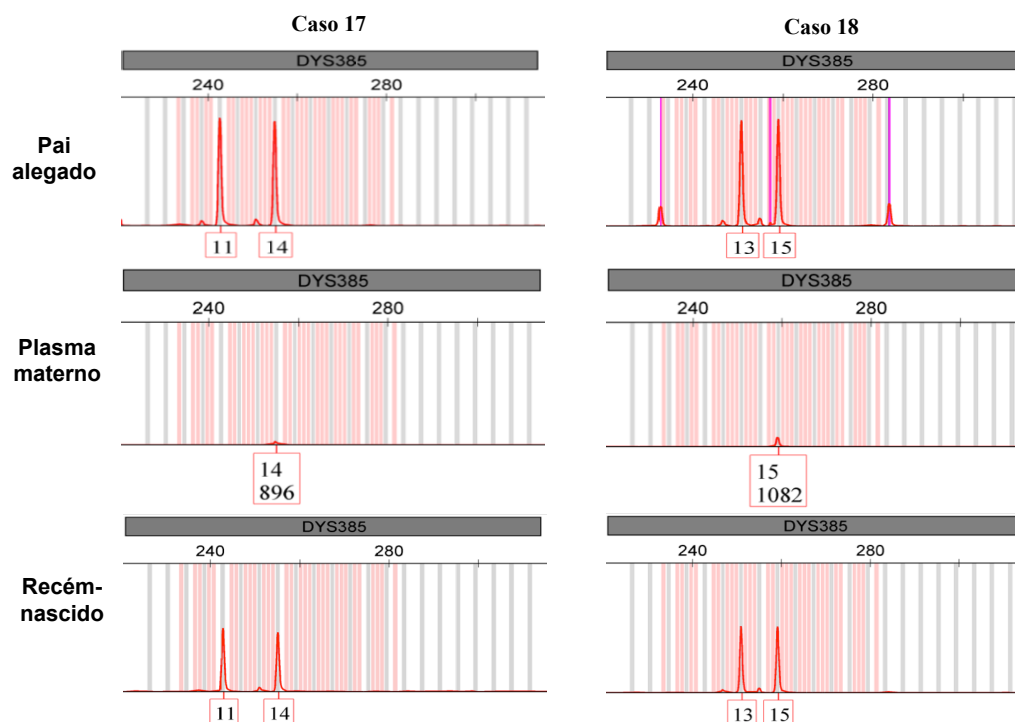


Figura 2.7 - Alelo *dropout* no *locus* DYS385 no plasma materno nos casos 17 e 18

2.4.4 Análise Da Linhagem Masculina Fetal – Resultados Quantitativos

O número de *loci* Y-STR pesquisado no YHRD em cada caso variou entre 13 à 16 e a mediana foi de 15 (Tabela 2.5). Quantitativamente, o índice de paternidade e a probabilidade de paternidade foram atribuídos para cada caso. Essas estimativas foram baseadas na frequência do haplótipo do feto através do banco de dados nacional brasileiro encontrado no YHRD.

Em 16 dos 20 casos, o haplótipo fetal não concordou com qualquer dos 5.328 haplótipos brasileiros encontrados no YHRD, o que resultou em uma frequência haplotípica de 0,0001877 ($1/5.328$), um índice de paternidade de 5.328 ($1/0,0001877$), exatamente o tamanho do banco de dados, e a probabilidade de paternidade foi 99,9812%.

Tabela 2.5 - Resultados quantitativos de haplótipos Y-STR correspondentes do plasma materno e suposto pai, considerando-se a frequência dos haplótipos fetais em formato Yfiler no banco de dados do Brasil (n = 5.328) no YHRD

Nº do caso	Y-STR fetal <i>loci</i> detectados no plasma materno	<i>Loci</i> fetal considerados	Concordância dos haplótipos no YHRD	Frequência do haplótipo	Índice de paternidade	Probabilidade de paternidade
1	26	15	0	0,0001877	22,271	95,7028
2	25	16	0	0,0001877	5327,65	99,9812
3	21	13	0	0,0001877	5327,65	99,9812
4	26	16	0	0,0001877	5327,65	99,9812
5	23	14	0	0,0001877	5327,65	99,9812
6	27	16	0	0,0001877	5327,65	99,9812
7	24	15	0	0,0001877	5327,65	99,9812
8	24	16	2	0,0005631	1776,00	99,9437
9	25	15	0	0,0001877	5327,65	99,9812
10	26	16	0	0,0001877	5327,65	99,9812
11	26	16	0	0,0001877	5327,65	99,9812
12	26	16	0	0,0001877	5327,65	99,9812
13	25	16	0	0,0001877	5327,65	99,9812
14	24	15	0	0,0001877	5327,65	99,9812
15	23	14	0	0,0001877	5327,65	99,9812
16	25	15	0	0,0001877	5327,65	99,9812
17	24	15	2	0,0005631	1776,00	99,9437
18	24	16	0	0,0001877	5327,65	99,9812
19	25	14	2	0,0005631	1776,00	99,9437
20	24	15	0	0,0001877	5327,65	99,9812

Em 1 dos 20 casos, o haplótipo fetal não concordou com qualquer dos haplótipos brasileiros encontrados no YHRD, e tem a mutação no *locus* DYS458. Neste caso, a frequência do haplótipo foi 0,0001877 (1/5.328), e o índice de paternidade foi calculado com uma fórmula específica descrita na seção de materiais e métodos $[(0,5 \times 0,00836)/0,0001877 = 22,271]$, o qual incluía uma penalização que representa a taxa de mutação do *locus* DYS458 (0,00836) (37) e este índice de paternidade resultou em uma probabilidade de paternidade de 95,7028%.

Em 3 dos 20 casos, o haplótipo fetal coincidiu com dois haplótipos brasileiros encontrados no YHRD, o que resultou em uma frequência haplotípica de 0,0005631 (3/5.328), um índice de paternidade de 1776 (1/0,0005631) e em uma probabilidade de paternidade de 99,9437%. O *locus* DYS385 foi excluído da análise quantitativa nos casos com *locus* dropout (3, 17 e 18) e não alterou o número de concordâncias no banco de dados.

Quantitativamente, os resultados podem ser divididos em três categorias: I) os casos que não concordaram com qualquer haplótipo no YHRD (n = 16); II) o caso que não concordou com qualquer haplótipo no YHRD e tem uma mutação (n = 1); III) os casos que mostraram duas concordâncias no YHRD (n = 3). A probabilidade de paternidade para cada caso foi 99,9812% (I), 95,7028% (II) e 99,9437% (III).

2.5 DISCUSSÃO

Neste estudo, determinou-se o haplótipo Y-STR de fetos masculinos no plasma materno durante a gravidez e estimou-se, de forma não invasiva, se o feto e o pai alegado pertencem a mesma linhagem patrilinear. Os resultados mostraram que (a) um haplótipo Y-STR fetal altamente discriminatório pode ser obtido do plasma de mulheres grávidas de fetos masculinos e não das grávidas de fetos femininos e (b) este haplótipo pode ser usado para estimar, qualitativamente e quantitativamente, se o feto pertence a mesma linhagem masculina do suposto pai ainda durante a gestação.

O primeiro achado foi que um haplótipo Y-STR fetal extenso pode ser formado no plasma materno é sustentado pela amplificação consistente de pelo menos 22 *loci* Y-STR diferentes de mulheres com fetos masculinos com 12 semanas de gestação. Em mães com fetos femininos, no entanto, isto não foi possível pelo fato do cromossomo Y não estar presente na sua circulação.

Qualitativamente, houve concordância completa do haplótipo Y-STR do feto e do suposto pai em 16 dos 20 casos deste estudo e 4 casos mostraram uma única inconsistência entre os *loci* Y-STR amplificados com sucesso. Em conclusão, houve uma concordância quase completa entre os *loci* Y-STR dos fetos e supostos pais (99,2%).

Estudos anteriores mostraram Y-STR amplificados com sucesso no plasma materno utilizando kits comerciais, contudo, os haplótipos obtidos foram consideravelmente menos extensos, variando de 6 à 16 Y-STRs, mediana de 12 (1) ou 5 à 12 Y-STRs, mediana de 8 (29). Como consequência, estes haplótipos supracitados teriam uma maior frequência comparado aos haplótipos encontrados no presente estudo, logo, estariam associados a um menor índice de paternidade e probabilidade de paternidade.

O segundo achado foi que o haplótipo Y-STR obtido a partir do cfDNA presente no plasma materno pode ser usado para associar o feto à linhagem masculina do pai alegado ainda durante a gravidez sendo confirmado por evidências qualitativas e quantitativas.

É de grande importância desenvolver base de dados para haplótipos Y-

STR já que a identificação de homens distintos pode ser realizada pela tipagem do cromossomo Y, além de poder ser utilizado para fazer análise comparativa entre as populações. A partir da base de dados YHRD pode-se obter estimativas confiáveis da frequência do haplótipo Y-STR fetal e assim avaliar de modo quantitativo o índice de paternidade (33).

Quantitativamente, os resultados podem ser divididos em três categorias: I) os casos que não concordaram com qualquer haplótipo no YHRD (n = 16); II) o caso que não concordou com qualquer haplótipo no YHRD e tem uma mutação (n = 1); III) os casos que mostraram duas concordâncias no YHRD (n = 3).

Dos 20 casos que carregavam fetos masculinos, 01 caso apresentou uma mutação no *locus* DYS458 devido a uma contração na unidade de repetição. Segundo Gusmão e colaboradores, a probabilidade de encontrar pelo menos uma mutação entre 2 haplótipos Y-STR na primeira geração, se 22 e 26 *loci* forem genotipados, é relativamente alta, 6 e 7%, respectivamente (28).

O *locus* DYS385I/II foi excluído da análise quantitativa nos casos com alelo "dropout" (caso 3, 17 e 18) e não alterou o número de concordâncias no banco de dados. O *locus dropout* observado pode ser secundário a peculiaridade deste locus ser Y-STR multicópia que ocorre em duas regiões no braço longo do cromossomo Y separadas por cerca de 40 quilobases. Estas regiões são amplificadas por um conjunto de *primers* que se anelam em ambas as regiões, simultaneamente, devido a presença de sequências idênticas nas duas cópias do DYS385 gerando dois alelos distintos (28). Ademais, o *dropout* também pode estar associado ao tamanho grande do produto (223 - 307 pb no PowerPlex Y23 e 234 - 324 pb no Yfiler).

A obtenção consistente de haplótipos extensos foi possível devido a diferentes razões:

a) Houve sobreposições entre os *loci* incluídos nos sistemas multiplex usados no estudo, e isso fez com que eles fornecessem contribuições específicas para formar o haplótipo Y-STR no plasma materno, uma vez que os *loci* menores que 250 pb são variáveis em cada sistema e possuem desempenho muito melhor quando comparados com os *loci* de tamanhos maiores.

b) Devido a nossa experiência na determinação do sexo fetal com 8 semanas de gestação, o número de ciclos de PCR (50 à 60 ciclos) foi aumentado em todos os sistemas de multiplex em comparação com os estudos anteriores (1, 29). Este aumento significativo viabilizou a detecção de pelo menos 22 *loci* Y-STR diferentes no plasma materno.

O número elevado de ciclos na PCR é um procedimento padrão no diagnóstico pré-natal não invasivo e inúmeros estudos neste campo de atuação descreveram esse processo (5, 16, 38, 39). No entanto, esta metodologia, juntamente com a análise de eletroforese capilar está propenso a produção de artefatos como a amplificação não específica e *pull-up* que resulta em *drop in* (figura 2.1). *Pull-up* são picos resultantes de uma sobreposição espectral dos fluoróforos utilizados na detecção dos alelos STR devido a uma calibração espectral deficiente ou pela incapacidade do software do sequenciador automaticamente filtrar determinada cor (comprimento de onda). Os *drop in* são alelos adicionais frequentemente observados no perfil de DNA devido as esporádicas contaminações (40). Portanto, deve-se ter muito cuidado na interpretação dos perfis genéticos.

Além disso, a alta ciclagem também proporciona uma contaminação na PCR e os procedimentos conhecidos para evitar carreamento de produto amplificado devem ser aplicados de forma estrita. Pelo fato das sequências fetais estarem em maior concentração considerando o tamanho de até 150 pb no plasma materno, o uso somente de mini-Y-STR, (marcadores amplamente utilizados quando se analisa amostras degradadas) permitiria diminuir o número de ciclos de amplificação eliminando este problema (16, 31).

c) O Analisador Genético 3500 tem várias mudanças significativas quando comparado a versões anteriores dos instrumentos 31xx da geração anterior, incluindo o tipo de laser e aumento da intensidade do sinal (41).

d) O grande volume do plasma materno (1 mL) usado para a extração de DNA aumentou a sensibilidade possibilitando uma maior detecção de Y-STR fetal.

Uma limitação clara da análise do cromossomo Y é o seu modo de transmissão que implica diretamente no resultado da investigação forense ou de paternidade, pois a informação encontrada remete a herança haplotípica,

ou seja, a linhagem paterna sendo assim mais esclarecedora em situações de exclusão (32).

2.6 CONCLUSÃO

Este estudo descreve que um haplótipo Y-STR poderia ser formado pela análise do plasma de grávidas de fetos do sexo masculino usando os sistemas multiplex (PowerPlex Y23, Yfiler e dois sistemas de mini-Y-STR *in-house*), e isto poderia ser usado para determinar se o feto e o pai alegado pertencem a mesma linhagem patrilinear ainda no início da gravidez.

3 DETERMINAÇÃO NÃO INVASIVA DO SEXO FETAL PELA ANÁLISE DO DNA FETAL LIVRE DE CÉLULAS NO SANGUE CAPILAR MATERNO OBTIDO POR PUNÇÃO DIGITAL

3.1 INTRODUÇÃO

A determinação não invasiva do sexo fetal é um teste capaz de indicar o sexo do feto no primeiro trimestre da gestação. O ensaio pesquisa a presença de uma sequência específica do cromossomo Y, como por exemplo, DYS-14, no plasma materno isolado do sangue venoso colhido por punção venosa. A detecção de sequências do cromossomo Y indica a gestação de um feto masculino. Por exclusão, a sua não detecção indica a gestação de um feto feminino (42).

O teste é considerado seguro se executado por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) após a oitava semana de gestação. Sensibilidade de 95,4% (95%IC 94,7%-96,1%) e especificidade de 98,6% (95%IC 98,1%-99,0%) foram reportadas (43).

No Brasil, o teste é oferecido comercialmente pelos laboratórios particulares e apesar da determinação do sexo fetal ser vista no mercado como uma forma de saciar a curiosidade dos pais em relação ao conhecimento do sexo do feto, a sua aplicação é clinicamente útil para desordens monogênicas como hiperplasia adrenal congênita, doenças ligadas ao cromossomo X como hemofilia e distrofia muscular Duchenne e genitália ambígua (43, 44).

Na China e na Índia, o teste é proibido por razões culturais e éticas quando se trata de conhecer somente o sexo (45, 46). Já em alguns países europeus, o teste é oferecido gratuitamente no sistema de saúde pública para aplicação clínica (21).

Ademais, investigar a presença do DNA fetal na microcirculação materna, desenvolver e executar a determinação não-invasiva do sexo fetal utilizando o sangue capilar coletado por punção digital contribuiria para o

avanço do conhecimento na área, além de proporcionar mais conforto para a mãe, pois trata-se de uma coleta menos invasiva e principalmente possibilitaria a coleta de material em áreas onde não há flebotomista.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar se a determinação do sexo fetal executado no plasma isolado do sangue capilar é comparável aos resultados obtidos do plasma isolado do sangue venoso. Este último é um método bem estabelecido (42).

3.2 OBJETIVOS

- Investigar a presença do DNA fetal na microcirculação materna;
- Analisar se a determinação não invasiva do sexo fetal utilizando o sangue capilar coletado por punção digital é comparável aos resultados obtidos do plasma isolado do sangue venoso.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Sujeitos

Este estudo experimental envolveu 101 voluntárias grávidas a partir da oitava semana de gestação. As voluntárias que aceitaram participar foram recrutadas em um laboratório clínico do Distrito Federal. Os aspectos éticos deste trabalho estão descritos no item 3.3.11.

3.3.2 Delineamento Experimental

Inicialmente o delineamento experimental do estudo foi prospectivo. No entanto, após começar os experimentos, resultados falsos positivos para o DNA masculino foram identificados nas amostras de sangue capilar. Suspeitou-se da contaminação da pele dos dedos maternos com DNA exógeno masculino. Subsequentemente novos protocolos de assepsia do local de coleta do sangue capilar foram implementados e seus resultados foram comparados com os resultados obtidos do plasma isolado do sangue venoso. É importante ressaltar que todas as coletas tanto capilar quanto venosa foram executadas por mulheres.

As voluntárias do estudo foram divididas em três grupos independentes de acordo com o método de assepsia do local da coleta, no caso, do sangue capilar (ponta dos dedos):

- 1) Álcool isopropílico (n = 27);
- 2) Hipoclorito de sódio à 0,5% tamponado aplicado duas vezes (n = 39);
- 3) Hipoclorito de sódio à 1% tamponado aplicado uma vez (n = 35).

Os protocolos de assepsia para punção capilar estão detalhados nos itens 3.3.3 à 3.3.5.

3.3.3 Assepsia com Álcool Isopropílico para Punção Capilar

Antes da coleta do sangue capilar, foi solicitado que as voluntárias lavassem as mãos com água e sabão, especialmente o dedo mínimo, e a assepsia da pele foi realizada antes de puncionar o dedo (procedimento executado em todos os protocolos de assepsia).

Para o grupo do álcool isopropílico, limpou-se a pele da ponta do dedo mínimo com um lenço de papel embebido em álcool isopropílico a 70% (BioSoma). O álcool isopropílico permaneceu em contato com a ponta do dedo por 2 minutos e, então, o dedo mínimo foi enxaguado com água destilada. A água destilada secou naturalmente.

3.3.4 Assepsia com Hipoclorito de Sódio à 0,5% Tamponado Aplicado Duas Vezes para Punção Capilar

Uma solução de hipoclorito de sódio com 4% de cloro disponível (Sigma-Aldrich) foi diluída para 0,5% ou 1% com água destilada e o pH foi ajustado para 7,0 usando bicarbonato de sódio (Vetek Química- Sigma-Aldrich).

Para o grupo do hipoclorito de sódio à 0,5% tamponado aplicado duas vezes, a ponta do dedo mínimo foi assepsiada com um algodão embebido com hipoclorito de sódio 0,5% tamponado. O hipoclorito de sódio permaneceu em contato com a ponta do dedo por dois minutos. O dedo mínimo foi enxaguado com água destilada. Este procedimento foi repetido duas vezes neste grupo. Em seguida, a assepsia com álcool isopropílico foi executada.

3.3.5 Assepsia Com Hipoclorito De Sódio À 1% Tamponado Aplicado Uma Vez Para Punção Capilar

Para o grupo do hipoclorito de sódio à 1% tamponado esta solução é aplicada somente uma vez na ponta do dedo mínimo. O hipoclorito de sódio permaneceu em contato com a ponta do dedo por dois minutos. Logo, o dedo

mínimo foi enxaguado com água destilada. Em seguida, a assepsia com álcool isopropílico foi executada.

A grande diferença entre esse protocolo e o anterior (item 3.3.4) é a concentração do hipoclorito que é maior, por conseguinte, é aplicado somente uma vez na ponta do dedo.

3.3.6 Assepsia Para Punção Venosa

A assepsia da pele da fossa antecubital foi realizada antes da venipuntura e foi executada com um lenço de papel embebido com álcool isopropílico à 70% (BioSoma). O álcool isopropílico secou naturalmente antes da punção venosa.

3.3.7 Processamento Para Obtenção Do Plasma Materno

Após a assepsia, o sangue venoso (método referência) e o sangue capilar (método teste) foram coletados na mesma ocasião em um tubo Vacuette K2 EDTA Sep e em um tubo MiniCollect 1mL K3 EDTA (ambos da Greiner Bio-one) por venipuntura da fossa cubital e punção no dedo mínimo, respectivamente. Em seguida, os plasmas-EDTA dos diferentes tubos foram isolados por centrifugação à 2000 g por 10 minutos à temperatura ambiente dentro de duas horas após a coleta.

3.3.8 Extração De DNA Do Plasma Materno

O plasma materno foi transferido para tubos de polipropileno após centrifugação e o DNA foi extraído de 150 µL de plasma capilar e de 1000 µL de plasma venoso utilizando o protocolo genérico 2.0.1 do sistema NucliSENS EasyMag com 50 µL de partículas de sílica magnética e eluição em 55 µL.

3.3.9 Determinação Do Sexo Fetal (Ensaio DYS-14)

A reação de qPCR multiplex para a determinação do sexo fetal envolveu dois alvos: uma sequência multicópia específica do cromossomo Y (DYS-14) e uma sequência de controle de amplificação, ou seja, controle interno (RNase P). Esta metodologia já foi descrita anteriormente (47).

Resumidamente, os critérios de interpretação do ensaio quando executado no sangue venoso são: 3 ou 4 resultados positivos para DYS-14 com ciclo quantitativo (Cq) < 34 indica feto masculino; 0 ou 1 resultado positivo com Cq > 34 para DYS-14 indica feto feminino; dois resultados positivos com Cq < 34 indica um resultado inconclusivo e, neste caso, a reação é repetida. A RNase P deve amplificar com Cq < 35, exceto na água (“*no template control*”). Caso contrário, o resultado foi considerado inválido. O mesmo critério de interpretação de resultado aplicado no sangue venoso também foi usado para o sangue capilar.

3.3.10 Análises Estatísticas

Para avaliar a capacidade diagnóstica da determinação do sexo fetal executada no sangue capilar e no sangue venoso foi calculado as medidas de sensibilidade e especificidade em relação ao exame clínico do sexo fetal ao nascimento. Ambos parâmetros foram computados usando o software Graphpad Prism v 6.0h (GraphPad).

Os valores brutos dos ciclos quantitativos (Cq) para as reações de DYS-14 e RNase P obtidos no sangue venoso e no sangue capilar de cada voluntária também foram apresentados.

3.3.11 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética do Centro Universitário de Brasília e aprovado com o registro CAAE 52869116.1.0000.0023 (Anexo II). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e informado.

3.4 RESULTADOS

Neste estudo recrutamos 101 voluntárias e a mediana da idade gestacional foi 11 semanas variando entre 8 à 36 semanas. Todas as amostras, tanto do sangue capilar quanto do sangue venoso, passaram no controle de qualidade em relação ao volume inicial e foram incluídas na análise final do estudo.

Os ciclos quantitativos das reações multiplex de qPCR para o *DYS-14* e *RNAse P* para todas as voluntárias estão representados na figura 3.1. Nos gráficos estão incluídas todas as replicatas das reações executadas para cada participante.

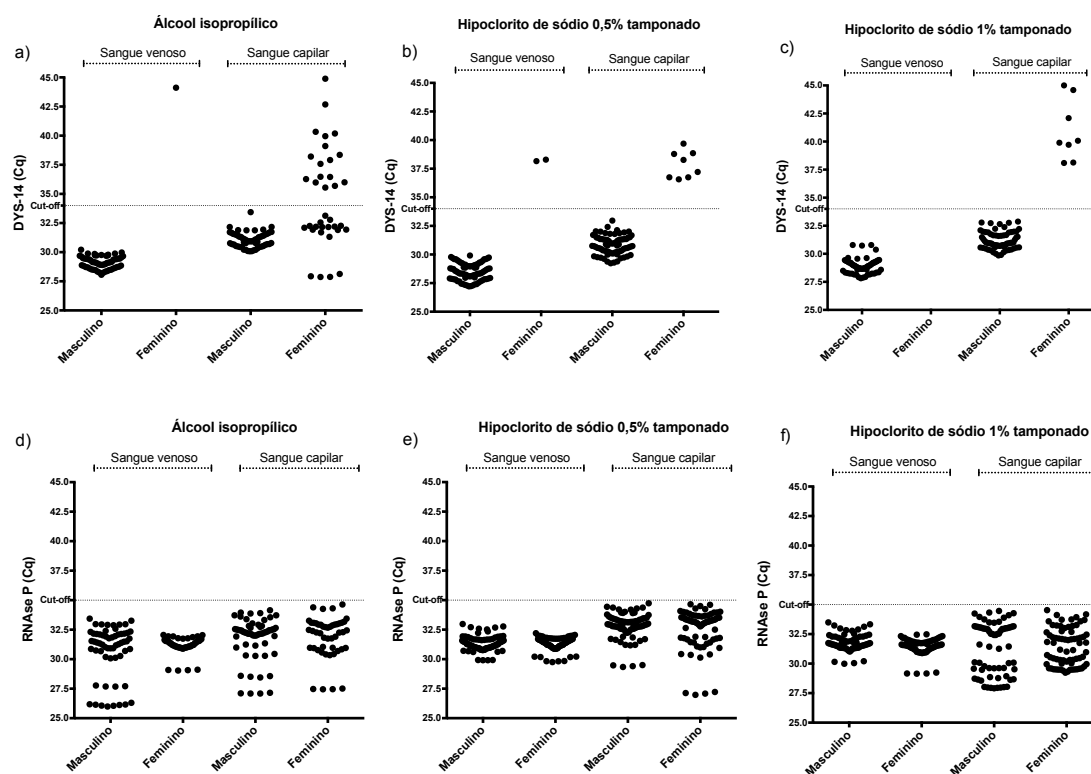


Figura 3.1 - Gráfico de dispersão mostrando os ciclos quantitativos (Cq) das reações de qPCR para o *DYS-14* (A, B e C) e *RNAse P* (D, E e F) com os diferentes protocolos de assepsia antes da coleta do sangue capilar

É notável que os valores de Cq são maiores no sangue capilar em relação ao sangue venoso. Estes resultados são esperados para esta espécie devido ao menor volume de amostra primária do sangue capilar (150 µl versus 1000 µl).

Os resultados da determinação não invasiva do sexo fetal no sangue venoso foram concordantes com o sexo do recém-nascido em todas as instâncias. No entanto, no sangue capilar cinco amostras tiveram resultados falsos positivos para o sexo masculino no grupo do álcool isopropílico, mas não foi observado nos demais protocolos de assepsia da pele (tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Comparação da determinação não invasiva do sexo fetal executada no sangue venoso e no sangue capilar com diferentes protocolos de assepsia da pele *versus* a examinação clínica do sexo do recém-nascido ao nascimento

	Exame clínico ao nascimento	
	Masculino (n)	Feminino (n)
Sangue venoso		
Álcool isopropílico (70%)		
Masculino	52	0
Feminino	0	49
Sangue capilar		
Álcool isopropílico (70%)		
Masculino	15	5
Feminino	0	7
Hipoclorito de sódio (0,5%) aplicado 2 vezes		
Masculino	20	0
Feminino	0	19
Hipoclorito de sódio (1%) aplicado 1 vez		
Masculino	17	0
Feminino	0	18

3.5 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigou-se a presença do DNA fetal na microcirculação materna e analisou se a determinação do sexo fetal realizada no plasma isolado do sangue capilar é comparável aos resultados obtidos do plasma isolado do sangue venoso.

A determinação do sexo fetal executado no sangue venoso apresentou concordância completa com o exame clínico do sexo fetal ao nascimento. Todas as amostras que apresentaram amplificação para o cromossomo Y no sangue venoso também amplificaram no sangue capilar. De forma contrária, 5 das 49 (10,2%) amostras que foram negativas para o cromossomo Y no sangue venoso, mostraram-se positivas no sangue capilar utilizando o protocolo de assepsia com álcool isopropílico (tabela 3.1).

Comparando a determinação não invasiva do sexo fetal executada no sangue venoso, um forte sinal falso positivo ocorreu no sangue capilar de mães com fetos femininos, pois um aumentado número de reações DYS-14 positivas foi observado nestas amostras femininas e, para algumas delas, o valor de Cq falso positivo associado era indistinguível aos valores de Cq verdadeiros positivos.

Estas observações sugerem que no sangue capilar, mas não no sangue venoso, havia uma contaminação com sequências do cromossomo Y. De fato, as amostras de sangue capilar estão mais susceptíveis a contaminantes da pele, porque a gota formada na superfície da pele permite que tais contaminantes entrem na amostra. Por outro lado, o sangue venoso é aspirado diretamente para dentro do tubo de coleta estéril.

A assepsia usando hipoclorito de sódio diluído e tamponado foi capaz de diminuir a contaminação exógena de cromossomo Y. O hipoclorito de sódio diluído é amplamente usado para eliminar DNA indesejáveis (48, 49). Além disso, a segurança e as propriedades não irritantes das concentrações escolhidas são bem conhecidas e aceitas (50, 51).

O protocolo com hipoclorito de sódio 1% parece funcionar melhor, pois os valores de Cq para o DYS-14 nas amostras femininas foram maiores

(Figura 3.1, item C). Adicionalmente, existe a vantagem desse protocolo de limpeza ser mais rápido do que o de hipoclorito de sódio à 0,5%.

Portanto, o protocolo recomendado para uma futura análise do DNA fetal livre de células no sangue materno obtido por punção digital é: a) passar um algodão embebido em hipoclorito de sódio 1% tamponado na ponta do dedo e esperar dois minutos; b) enxaguar o dedo com água destilada e deixar secá-lo naturalmente; c) passar um lenço de papel embebido em álcool isopropílico 70% e deixar o álcool secar naturalmente; d) proceder com a punção no dedo e coletar o sangue capilar.

Os resultados indicam que sequências exógenas de DNA do cromossomo Y estão presentes na ponta dos dedos das mulheres, e estas sequências podem ser detectadas por qPCR. O falso sinal do cromossomo Y foi significativamente diminuído após a descontaminação tópica da área de coleta com hipoclorito de sódio.

É importante destacar que a assepsia com hipoclorito de sódio não interferiu com a amplificação da RNase P, caso contrário a reação seria considerada inválida (figura 3.1). Entretanto, os valores de Cq da RNase P no sangue capilar estavam mais amplamente distribuídos do que no sangue venoso, provavelmente devido ao menor volume inicial desta amostra (se o Cq for alto) e/ou extravazamento do DNA genômico de leucócitos durante a coleta de sangue (se o Cq for baixo).

Assim, pode-se concluir que o DNA fetal está presente na microcirculação materna. Este conhecimento permitiria a execução de testes pré-natais não invasivos no sangue capilar, pelo menos para a determinação do sexo fetal. Entretanto, a eliminação do DNA masculino exógeno do sítio de coleta é essencial para um teste confiável.

A coleta do sangue capilar apresenta vantagens sobre a coleta do sangue venoso: a) é considerada menos invasiva e mais confortável para a mãe permitindo a coleta em mulheres com fobia de agulhas ou muita ansiedade em relação a venipuntura; b) requer uma menor quantidade de sangue e permite coleta no caso a mãe possua veias de difícil acesso venoso ou não possa doar um tubo completo de sangue venoso; c) pode ser executado de forma rápida e fácil permitindo que amostras possam ser

colhidas em locais onde não haja um flebotomista como, por exemplo, em áreas rurais.

Por fim, o conhecimento adquirido neste trabalho tem potencial de impactar a fase pré-analítica dos testes genéticos que envolvam o uso do sangue capilar.

3.6 CONCLUSÃO

Este estudo concluiu que o DNA fetal está presente na microcirculação materna permitindo a determinação não invasiva do sexo fetal. O DNA masculino exógeno pode estar presente nas pontas dos dedos das mulheres grávidas e ser detectável gerando resultados falsos positivos.

Portanto, a eliminação do DNA masculino exógeno é crítica para uma confiável determinação do sexo fetal usando o sangue capilar materno. A assepsia com hipoclorito de sódio diluído e tamponado, entre 0,5 e 1%, poderia ser usado para eliminar o DNA masculino exógeno das pontas dos dedos das mulheres grávidas.

4 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE 38 POLIMORFISMOS DE INSERÇÃO E DELEÇÃO EM UMA AMOSTRA POPULACIONAL DO DISTRITO FEDERAL DO BRASIL – UM TERRITÓRIO QUE SURTIU DO NADA

4.1 INTRODUÇÃO

Na identificação genética humana é importante selecionar marcadores altamente polimórficos para alcançar um poder de discriminação elevado. Por isto, os STRs são os marcadores de DNA mais utilizados e a maioria apresentam tamanhos de produtos relativamente grandes, entre 150 e 450 pares de bases, o que pode influenciar negativamente a análise de amostras de misturas ou degradadas (32).

Sabe-se que produtos pequenos de PCR são muito mais propensos a serem amplificados, por isso, a fim de superar as limitações dos STRs descritas acima, os marcadores bialélicos de evolução lenta, incluindo polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) e polimorfismos de inserção e deleção (Indels), foram recentemente introduzidos no campo de identificação forense (52-54).

As estratégias até então utilizadas para análise do DNA fetal livre de células na circulação materna exploram as diferenças genéticas entre a mãe e o feto, como o cromossomo Y (estudo 1 - específico para fetos do sexo masculino). Pois, o DNA extraído deste tipo de amostra é uma mistura de ácidos nucleicos, sendo que o DNA materno supera o fetal em quantidade (55). Além disso, ambos compartilham genomas similares tornando as genotipagens desta amostra de difícil interpretação (1), apesar da concentração do DNA fetal tender a aumentar com a progressão da gestação (15).

Neste sentido, as inserções ou deleções de DNA autossômicas de origem paterna e ausentes no genoma da mãe poderiam ser consideradas diferenças genéticas entre mãe e feto e serem exploradas no diagnóstico pré-natal não invasivo independentemente do sexo fetal.

Assim, desenvolver um ensaio de polimorfismos bialélicos baseado em qPCR alelo específico para genotipar a mãe e o suposto pai, e em seguida, analisar somente as diferenças que estão em homozigose seria de interesse para esta área de pesquisa.

Entretanto, antes de desenvolver esta metodologia é necessário conhecer as frequências alélicas e os parâmetros forenses dos Indels na população do Distrito Federal usando um conjunto de marcadores que tenha sido previamente validado.

4.1.1 Polimorfismos De Inserção E Deleção

Os polimorfismos de inserção e deleção (Indels) são polimorfismos de comprimento caracterizados pela adição ou perda de um ou mais nucleotídeos em uma determinada sequência do genoma. Os marcadores Indels bialélicos apresentam dois alelos e podem ser classificados como alelo longo (inserção) ou alelo curto (deleção), neste sentido, são possíveis apenas três genótipos (32, 56).

Os Indels são altamente abundantes no genoma humano, perdendo apenas para os polimorfismos de único nucleotídeo (SNP), e perfazem 15 a 21% dos polimorfismos humanos (57, 58). Nos últimos anos os Indels tem sido bastante explorados no campo forense devido a uma série de propriedades vantajosas que incluem: a) distribuição ampla ao longo do genoma (56, 59); b) taxa de mutação muito menor em comparação aos "*short tandem repeats*" (STR) ou microssatélites (60); c) diferenças significativas nas frequências de alelos entre grupos de população separados geograficamente, portanto, têm potencial como marcadores informativos de ascendência; d) possibilidade de amplificar fragmentos relativamente curtos (50 a 150 pares de base), o que facilita a multiplexação em larga escala e análise de DNA altamente degradado; e) a genotipagem de Indels é relativamente simples, e econômica (PCR e eletroforese capilar); e f) Indels pequenos também são adequados para automação e análise com tecnologias de alto rendimento.

Em suma, os Indels combinam características desejáveis de outros marcadores genéticos comumente usados na ciência forense (STR e SNP), assim, destacam-se na identificação humana como ferramenta complementar devido as suas peculiaridades supracitadas (52, 54, 56).

4.1.2 Conjunto 38 Indel-Plex

Atualmente dois ensaios de Indel multiplexados estão disponíveis para fins forenses: DIPplex comercial de 30 Indels (Qiagen) (61) e conjunto de 38 Indel-plex desenvolvido por Pereira e colaboradores (52).

O foco deste estudo são os trinta e oito Indels desenvolvidos em 2009. Os autores selecionaram marcadores bialélicos, não codificantes, com frequência alélica mínima maior ou igual a 0,25, heterozigosidade média de 0,40 e variação de comprimento do alelo de 2 a 5 pb. Os 38 marcadores do painel estavam distribuídos em 22 cromossomos autossômicos e eram sabidamente polimórficos para as populações da África, Ásia e Europa (52).

O conjunto de 38 marcadores foi amplificado por uma única PCR multiplex (Indel-plex) onde os fragmentos amplificados são detectados (produto menor que 160 pb) por eletroforese capilar (52). A validação da metodologia envolveu amostras de diferentes grupos populacionais, entretanto, faz-se necessário conhecer as características analíticas dos 38 Indel-plex na população do Brasil e, especificamente, do Distrito Federal antes do seu uso.

4.1.3 Brasília E Distrito Federal

O Distrito Federal do Brasil e Brasília, a atual capital federal, foram fundados em 21 de abril de 1960 com base no desejo de transferir a capital federal do Rio de Janeiro para o centro do país. O território artificial e a cidade foram construídos em apenas 4 anos na região anteriormente não habitada no Centro-Oeste do Brasil, como resultado dos esforços do presidente Juscelino Kubitschek, juntamente com o arquiteto Oscar

Niemeyer, o urbanista Lúcio Costa e mil funcionários civis, conhecidos como "candangos" (62).

De acordo com o Censo 2010, a população do Distrito Federal do Brasil era composta por 2.570.160 habitantes; 54% das pessoas nasceram localmente e os 46% restantes eram imigrantes das outras macrorregiões brasileiras: Norte (2%), Nordeste (23%), Centro-Oeste (6%), Sudeste (13%) e Sul (2%) (63). Além disso, o Brasil foi colonizado por Portugal, e a mistura de nativos americanos, africanos e europeus ocorreu em diferentes proporções entre as cinco macrorregiões (64), mas a ascendência europeia foi a mais prevalente em todas as populações urbanas (com valores até 74%) (65).

4.1.4 Descrições De Frequências Alélicas Envolvendo O Conjunto 38 Indel-Plex No Brasil

As descrições de dados populacionais sobre os 38 Indel-plex de Pereira e colaboradores para caracterizar a população brasileira são escassas, e nenhuma caracterizou o Distrito Federal especificamente.

Manta e colaboradores genotiparam o conjunto multiplex de 38 Indels para avaliar o potencial destes marcadores como uma ferramenta complementar na análise de parentesco. Dessa forma, foram estudadas três populações do Brasil, uma amostra de nativos americanos (tribo Terena) que moravam no estado de Mato Grosso do Sul, Centro-Oeste do Brasil (n = 45), além de dois grupos que moram no Rio de Janeiro: indivíduos que se auto declararam como afrodescendentes (n = 115) e indivíduos da sua população em geral (n = 137). Ao comparar as populações deste estudo com três grupos populacionais continentais (Europa, África e Ásia) (52) observou-se que as amostras do Rio de Janeiro e Rio de Janeiro Afrodescendente tinham maior similaridade com a Europa e a África, respectivamente. Os nativos americanos (Terena) posicionaram-se mais distantes dos outros três grupos. Os autores concluíram que o conjunto de 38 Indel-plex mostrou-se adequado para fins forenses gerais em populações heterogêneas, como as amostras brasileiras do Rio de Janeiro (66).

Ademais, descrições de frequências alélicas de Indels na população do Distrito Federal são essenciais para estimar a probabilidade de ocorrência do perfil encontrado de forma aleatória, auxiliando as investigações forenses, bem como estudos de vínculo genético.

Assim, neste trabalho, investigou-se os parâmetros de eficiência forense dos 38 Indel-plex em uma amostra populacional do Distrito Federal com objetivo principal de descrever as frequências alélicas e estimar os parâmetros forenses e de paternidade. Além disso, analisou-se a distância genética da população do Distrito Federal em relação as populações africanas, europeias, asiáticas e do Rio de Janeiro, com a finalidade de se produzir uma evidência genética sobre a formação da população deste território.

4.2 OBJETIVOS

- Descrever as frequências alélicas e os parâmetros forenses de 38 polimorfismos de inserção e deleção em uma amostra populacional do Distrito Federal;
- Analisar a distância genética da população do Distrito Federal em relação as populações africanas, europeias, asiáticas, estado do Rio de Janeiro e tribo Terena.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 População

Foram recrutados aleatoriamente 200 indivíduos saudáveis não relacionados (148 mulheres e 52 homens) residentes no Distrito Federal de um laboratório clínico que tivessem interesse em participar da pesquisa. Os aspectos éticos deste trabalho estão descritos no item 4.3.6.

4.3.2 Coleta De Sangue

Amostras de sangue periférico dos voluntários foram coletadas por punção venosa em um tubo de 4 mL Vacuette K2 EDTA (Greiner-bio-one). As amostras do estudo foram processadas em um laboratório clínico do Distrito Federal (Sabin).

4.3.3 Extração De DNA

O DNA genômico foi extraído de sangue total utilizando o kit *QIAamp DNA Mini* (Qiagen) conforme as instruções do fabricante (67).

4.3.4 Genotipagem Dos Marcadores Indels

Os 38 Indel-plex foram genotipados usando o protocolo de PCR multiplex originalmente descrito por Pereira e colaboradores (52) no termociclador GeneAmp PCR System 9700. Este conjunto inclui os seguintes marcadores distribuídos em 22 cromossomos autossômicos (rs34541393, rs16624, rs2307689, rs35769550, rs2307700, rs140809, rs3047269, rs33972805, rs33917182, rs16402, rs1610871, rs2067238, rs2067294, rs2307710, rs2308242, rs2307580, rs1160956, rs34511541, rs2307978, rs3051300, rs10629077, rs10688868, rs2067208, rs2307579, rs2308020, rs3080855, rs1610919, rs2307839, rs2308137, rs36040336, rs1160886,

rs2308026, rs2307526, rs34811743, rs2308189, rs5895447, rs2308171 e rs35605984) (52).

Após amplificação, 1 μ l do produto de PCR foi adicionado a 8,5 μ l de formamida Hi-Di e 0,5 μ l de 600 LIZ GeneScan. Os produtos de PCR foram detectados por eletroforese capilar no Analisador Genético 3500 e os alelos foram atribuídos usando o software GeneMapper1 ID-X, v.1.2. O conjunto de fluorescência utilizado é o G5 (6FAM, VIC, NED, PET e LIZ) (todos os equipamentos e reagentes da eletroforese capilar são fabricados pela Life Technologies, Foster City, CA, EUA).

4.3.5 Análise Estatística Dos Dados

4.3.5.1 Frequências Alélicas

As frequências alélicas dos 38 polimorfismos de inserção e deleção autossômicos nos 200 indivíduos foram obtidas por meio do programa Arlequin v.3.1 (68), pelo método de contagem direta, ou seja, número de vezes em que o alelo é observado, dividido pelo número total de alelos averiguados para o marcador.

4.3.5.2 Heterozigosidade

Significa a proporção de indivíduos com dois alelos diferentes em determinado *locus*, ou seja, corresponde a quantidade de indivíduos heterozigóticos. Quanto maior a heterozigose, maior é a variabilidade genética do *locus* na população em questão, assim, a probabilidade de que dois indivíduos tenham o mesmo perfil torna-se menor (32).

A heterozigose pode ser esperada ou observada. A heterozigose observada determina a proporção real de heterozigotos para um determinado *locus* na amostra estudada. É calculada diretamente dos genótipos encontrados na população. Trata-se do número de heterozigotos em cada *locus* dividido pelo número total de indivíduos pesquisados. A heterozigose

esperada é a fração estimada de heterozigotos para um *locus*, assumindo a condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg na população. Difere-se da observada por ser calculada a partir das frequências alélicas segundo a fórmula (69):

$$\begin{aligned} \text{Heterozigotos} + \text{Homozigotos} &= 1 \\ \text{Heterozigotos} &= 1 - \text{Homozigotos} \end{aligned}$$

$$\text{Homozigotos} = \text{Soma das frequências alélica ao quadrado (Freq. Alelo } 1^2 + \text{Freq. Alelo } 2^2 + \text{Freq. Alelo } 3^2 + \text{Freq. Alelo } 4^2 + \dots + \text{Freq. Alelo } N^2)$$

As heterozigoses esperada e observada foram obtidas pelo software Arlequin v. 3.1 (68). É importante calculá-las individualmente para constatar se existe redução na heterozigose observada o que pode ser consequência do excesso de homozigotos (devido a um problema na técnica de PCR, pois, o sistema amplifica preferencialmente um alelo em detrimento de outro) ou ocorrência de endogamia na população (32). Portanto, o ideal é que apresentem valores similares.

4.3.5.3 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A partir das frequências alélicas observadas obtem-se as frequências genotípicas esperadas considerando que as frequências alélicas não devem modificar ao longo das gerações se o *locus* é estável. Caso a frequência genotípica esperada seja semelhante à frequência genotípica observada pressupõe-se que o *locus* na população analisada está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (32). A questão básica desse pressuposto é definir se os alelos encontrados dentro do *locus* são independentes, caso contrário, a população está em desequilíbrio, o qual é calculado pelo teste chi-quadrado pelo software Arlequin v. 3.1 (68).

A população pode estar em desequilíbrio quando se analisa subpopulações ou se tem excesso de homozigose devido a amplificação preferencial um alelo em detrimento de outro (32). Os valores do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram corrigidos pelo cálculo de Bonferroni para neutralizar

a análise de comparações múltiplas, considerando resultados estatisticamente significantes se $p < 0,0013$ (valor de alfa 0,05 foi dividido pelo número de Indels investigados) (32, 70).

4.3.5.4 Desequilíbrio de ligação

Denomina-se marcadores sintênicos quando localizados no mesmo cromossomo. Na área forense caso utilize-os, o ideal é que estejam a uma distância física de pelo menos 30 megabases entre si. Esta regra é utilizada para garantir a independência entre os marcadores (52, 71).

O grupo de Pereira e colaboradores combinou no Indel-plex marcadores independentes, por isso selecionou Indels em cromossomos distintos ou com uma separação mínima de 30 megabases entre os marcadores localizados no mesmo cromossomo, exceto nos cromossomos 18, 20 e 21 (distância física entre 13,3 -18,5 megabases) (52).

No entanto, apesar da regra, podem existir desequilíbrios de ligação específicos de cada população (72). Assim, o desequilíbrio de ligação dos marcadores contidos no mesmo cromossomo foi calculado na população do Distrito Federal: cromossomo 1 (rs3047269 e rs2307579), cromossomo 5 (rs2307526, rs1160956 e rs1610871), cromossomo 6 (rs2307710, rs2307839 e rs2308137), cromossomo 8 (rs35769550 e rs5895447), cromossomo 9 (rs2067294 , rs16402 e rs2307580), cromossomo 10 (rs140809 e rs1160886), cromossomo 11 (rs10688868, rs34811743 e rs33972805), cromossomo 12 (rs1610919 e rs2067238), cromossomo 18 (rs3080855 e rs34511541), cromossomo 19 (rs36040336 e rs2307689), cromossomo 20 (rs33917182 e rs34541393) e cromossomo 21 (rs35605984 e rs10629077). Os marcadores não independentes foram excluídos dos cálculos (73). Para esta análise o software Arlequin v. 3.1 foi utilizado (68).

4.3.5.5 Conteúdo de informação polimórfica (CIP)

É utilizado para aferir o quanto um marcador genético é informativo, sendo uma medida capaz de estimar o quão polimórfico é o Indel. O grau de

polimorfismo é determinado pelo número de alelos e suas frequências. Quando o marcador tem CIP menor que 0,25 (25%) indica que é pouco informativo (74). Esse parâmetro foi mensurado pelo programa PowerStats v. 12 (75), trata-se de um cálculo complexo, e sua fórmula foi descrita por Botstein e colaboradores (74).

4.3.5.6 Probabilidade de coincidência (“*matching*”) (PM)

É a probabilidade de que dois indivíduos selecionados ao acaso tenham genótipo idêntico para um determinado *locus* (32). É calculado pela soma dos quadrados das frequências genóticas observadas. Pois, a chance de encontrar um determinado genótipo = sua frequência observada; a chance de encontrar um determinado genótipo e, em seguida, o mesmo genótipo = sua frequência observada ao quadrado. Assim, a soma das frequências observadas ao quadrado é igual a probabilidade de coincidência para o *locus* (76-78). Neste trabalho este parâmetro foi calculado pelo PowerStats v.12 (75). Os valores individuais de cada *locus* podem ser multiplicados para obtenção da probabilidade de coincidência combinada (79), que representa a probabilidade de dois indivíduos não relacionados selecionados randomicamente terem perfis genéticos idênticos para todos os Indels testados.

4.3.5.7 Poder de discriminação (PD)

É a probabilidade de encontrar dois indivíduos ao acaso na população e eles possuírem perfis genéticos diferentes. Refere-se a probabilidade contrária de se encontrar dois perfis iguais (probabilidade de coincidência). Ou seja, é calculado pela fórmula $PD = 1 - PM$ (32, 79). Nesta investigação, foi calculado através do programa PowerStats v.12 (75). Os valores individuais de cada *locus* podem ser agrupados no **poder de discriminação combinado** de acordo com as fórmulas: $1 - [(PM_1) \times (PM_2) \times (PM_3) \times \dots \times (PM_N)]$ ou $1 - (PM \text{ combinado})$, o qual foi executado no Microsoft Excel.

4.3.5.8 Poder de exclusão (PE)

Corresponde à probabilidade de se excluir qualquer indivíduo que tenha sido falsamente acusado em teste de paternidade (79). É equivalente a frequência de todos os homens, em uma determinada população, que não tem os alelos concordantes com o alelo paterno obrigatório (alelo herdado do pai biológico) da criança em um teste de paternidade (32, 79). O valor é determinado pela seguinte fórmula: $PE = h^2(1-2hH^2)$, onde h significa a frequência observada de heterozigotos e H é a frequência observada de homozigotos (79). Este parâmetro foi calculado pelo programa PowerStats v. 12 (75). Os valores individuais de cada *locus* podem ser agrupados no **poder de exclusão combinado** pelo Microsoft Excel seguindo a fórmula: $1 - [(1 - PE_1) \times (1 - PE_2) \times (1 - PE_3) \times \dots \times (1 - PE_N)]$ (32, 80).

4.3.5.9 Distância genética

Com base nas frequências alélicas foram calculadas as distâncias genéticas da população estudada (Distrito Federal) em relação as populações de Portugal, África, Ásia (52), tribo Terena e do estado do Rio de Janeiro (66). A finalidade desta análise foi investigar a semelhança genética entre as populações analisadas. Em seguida, as distâncias genéticas segundo a metodologia de Nei (1983) foram mensuradas pelo software Dispan (81), devido ao fato desse programa utilizar com frequências alélicas, diferentemente dos demais softwares para mesma finalidade que exigem genótipos. Normalmente, os genótipos não são publicados.

A matriz de distância genética gerada pelo Dispan correlaciona as diferenças entre as populações analisadas e para facilitar a sua interpretação, os dados foram representados graficamente pela análise de coordenadas principais (PCoA) do software GenAlEx v.6.5 (82). Resumidamente, este tipo de gráfico dispõe os valores das distâncias em um espaço dimensional dividido em 04 quadrantes. As populações que concentrarem-se no mesmo quadrante são mais semelhantes. A distância entre os pontos representativos de cada população também indicam proximidade genética, quanto mais próximos mais semelhantes.

Além disso, a segunda forma para se visualizar os dados da matriz de distâncias genéticas utilizada no estudo foi o dendrograma elaborado pelo software Dispan (81). Através do método chamado de *neighbor-joining* o programa faz uma reconstrução na forma de árvore filogenética com base nos valores das distâncias. O principal objetivo é encontrar pares, no caso, regiões que diminuam o comprimento do ramo que é formado a depender da similaridade construindo, assim, um gráfico de ramificações (83).

4.3.6 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB), e aprovado através do registro CAAE: 15253913.5.0000.0030) (Anexo III). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Frequências Alélicas

As frequências alélicas dos trinta e oito *loci* polimorfismos de inserção e deleção avaliados na amostra populacional estão apresentadas na tabela 4.1.

4.4.2 Heterozigose

A heterozigose observada variou entre 0,25 (rs10629077) a 0,56 (rs16624) e a heterozigose esperada variou entre 0,321 (rs10629077) a 0,501 (rs3047269, rs1610871, rs2308189 e rs35605984). Observou-se uma considerável similaridade entre os dois parâmetros em todos os *loci* (Tabela 4.1).

4.4.3 Equilíbrio De Hardy-Weinberg

As frequências genotípicas demonstraram que o conjunto de Indels estudado estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), exceto o *locus* rs10629077. No entanto, este desvio não permaneceu significativo após aplicação da correção de Bonferroni para análises múltiplas ($p < 0,0013$) (Tabela 4.1).

4.4.4 Desequilíbrio De Ligação

Foi observado evidência de desequilíbrio de ligação apenas para o cromossomo 9 entre os marcadores rs2067294 e rs16402 ($p = 0,028$), rs2067294 e rs2307580 ($p = 0,00030$), mas não entre rs16402 e rs2307580 ($p = 0,93$). Assim, o Indel rs2067294 foi excluído das análises subsequentes, pois é necessário que o marcador apresente equilíbrio de ligação, ou seja, independência estatística dos outros marcadores.

Tabela 4.1 - Frequências alélicas e parâmetros estatísticos para os 38 indel-plex em uma amostra populacional do Distrito Federal (n = 200)

Código	Referência Indel (rs)	Deleção	Inserção	Hobs	Hexp	p
B01	rs34541393	0,423	0,578	0,475	0,4892	0,772
B02	rs16624	0,555	0,445	0,56	0,495	0,089
B03	rs2307689	0,378	0,623	0,485	0,471	0,763
B04	rs35769550	0,37	0,63	0,51	0,467	0,224
B05	rs2307700	0,388	0,613	0,525	0,476	0,181
B06	rs140809	0,32	0,68	0,44	0,436	1,000
B07	rs3047269	0,495	0,505	0,49	0,501	0,778
B08	rs33972805	0,44	0,56	0,54	0,494	0,2
B09	rs33917182	0,628	0,373	0,495	0,469	0,448
B10	rs16402	0,308	0,693	0,415	0,427	0,74
G01	rs1610871	0,51	0,49	0,53	0,501	0,478
G02	rs2067238	0,558	0,443	0,435	0,495	0,113
G03	rs2067294	0,278	0,723	0,395	0,402	0,86
G04	rs2307710	0,295	0,705	0,4	0,417	0,609
G05	rs2308242	0,255	0,745	0,41	0,381	0,351
G06	rs2307580	0,443	0,558	0,475	0,495	0,667
G07	rs1160956	0,733	0,268	0,365	0,393	0,366
G08	rs34511541	0,423	0,578	0,485	0,489	1,000
G09	rs2307978	0,273	0,728	0,405	0,397	0,859
Y01	rs3051300	0,378	0,623	0,485	0,471	0,763
Y02	rs10629077	0,2	0,8	0,25	0,321	0,003
Y03	rs10688868	0,29	0,71	0,45	0,413	0,232
Y04	rs2067208	0,233	0,768	0,385	0,358	0,322
Y05	rs2307579	0,425	0,575	0,54	0,49	0,193
Y06	rs2308020	0,67	0,33	0,45	0,443	0,874
Y07	rs3080855	0,283	0,718	0,415	0,406	0,862
Y08	rs1610919	0,588	0,413	0,485	0,486	1,000
Y09	rs2307839	0,263	0,738	0,375	0,388	0,714
R01	rs2308137	0,333	0,668	0,445	0,445	1,000
R02	rs36040336	0,685	0,315	0,47	0,433	0,253
R03	rs1160886	0,37	0,63	0,49	0,467	0,542
R04	rs2308026	0,285	0,715	0,45	0,409	0,169
R05	rs2307526	0,328	0,673	0,475	0,442	0,338
R06	rs34811743	0,695	0,305	0,44	0,425	0,74
R07	rs2308189	0,485	0,515	0,49	0,501	0,778
R08	rs5895447	0,28	0,72	0,41	0,404	1,000
R09	rs2308171	0,258	0,743	0,385	0,383	1,000
R10	rs35605984	0,518	0,483	0,465	0,501	0,322

Hobs - heterozigose observada, Hexp - heterozigose esperada, p - valor de p para o equilíbrio de Hardy-Weinberg

4.4.5 Parâmetros Forenses

O **conteúdo de informação polimórfica** variou entre 0,269 e 0,375. Os quatro *loci* mais polimórficos foram rs3047269, rs1610871, rs2308189 e rs35605984. O *locus* que apresentou menor informatividade foi o rs10629077 (Tabela 4.2).

A **probabilidade de coincidência (“*matching*”) combinada** foi $7,2 \times 10^{-15}$, sendo esta a probabilidade de selecionar dois indivíduos aleatoriamente e estes apresentarem genótipos idênticos para o conjunto de 37 Indels. As probabilidades de coincidência para cada *locus* podem ser evidenciadas na tabela 4.2.

O **poder de discriminação** variou entre 0,476 (rs10629077) a 0,645 (rs2067238) e o **poder de discriminação combinado** foi 0,999999999999993 (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Parâmetros forenses para os 37 indel-plex em uma amostra populacional do Distrito Federal (n = 200)

Código	Referência Indel (rs)	CIP	PD	PM
B01	rs34541393	0,369	0,625	0,375
B02	rs16624	0,372	0,584	0,416
B03	rs2307689	0,36	0,602	0,398
B04	rs35769550	0,358	0,586	0,414
B05	rs2307700	0,362	0,586	0,414
B06	rs140809	0,341	0,585	0,415
B07	rs3047269	0,375	0,63	0,37
B08	rs33972805	0,371	0,595	0,405
B09	rs33917182	0,358	0,595	0,405
B10	rs16402	0,335	0,583	0,417
G01	rs1610871	0,375	0,608	0,392
G02	rs2067238	0,372	0,645	0,355
G04	rs2307710	0,329	0,576	0,424
G05	rs2308242	0,308	0,538	0,462
G06	rs2307580	0,372	0,63	0,37
G07	rs1160956	0,315	0,557	0,443
G08	rs34511541	0,369	0,62	0,38
G09	rs2307978	0,318	0,555	0,445
Y01	rs3051300	0,36	0,602	0,398
Y02	rs10629077	0,269	0,476	0,524
Y03	rs10688868	0,327	0,558	0,442
Y04	rs2067208	0,293	0,52	0,48
Y05	rs2307579	0,369	0,591	0,409
Y06	rs2308020	0,344	0,588	0,412
Y07	rs3080855	0,323	0,562	0,438
Y08	rs1610919	0,367	0,617	0,383
Y09	rs2307839	0,312	0,551	0,449
R01	rs2308137	0,345	0,592	0,408
R02	rs36040336	0,338	0,57	0,43
R03	rs1160886	0,358	0,596	0,404
R04	rs2308026	0,325	0,554	0,446
R05	rs2307526	0,343	0,577	0,423
R06	rs34811743	0,334	0,574	0,426
R07	rs2308189	0,375	0,629	0,371
R08	rs5895447	0,322	0,561	0,439
R09	rs2308171	0,309	0,545	0,455
R10	rs35605984	0,375	0,64	0,36

CIP - conteúdo de informação polimórfica, PD - poder de discriminação, PM - probabilidade de *matching*

4.4.6 Parâmetro De Paternidade

O marcador que apresentou maior **poder de exclusão** foi rs16624 (0,246) e menor rs10629077 (0,045) (tabela 4.3). O **poder de exclusão combinado** calculado a partir do poder de exclusão individual foi 0,9981.

Tabela 4.3 - Resultados do poder de exclusão dos 37 indel-plex em uma amostra populacional do Distrito Federal (n = 200)

Código	Referência Indel (rs)	PE
B01	rs34541393	0,167
B02	rs16624	0,246
B03	rs2307689	0,175
B04	rs35769550	0,196
B05	rs2307700	0,21
B06	rs140809	0,14
B07	rs3047269	0,179
B08	rs33972805	0,225
B09	rs33917182	0,183
B10	rs16402	0,123
G01	rs1610871	0,215
G02	rs2067238	0,137
G04	rs2307710	0,114
G05	rs2308242	0,12
G06	rs2307580	0,167
G07	rs1160956	0,094
G08	rs34511541	0,175
G09	rs2307978	0,117
Y01	rs3051300	0,175
Y02	rs10629077	0,045
Y03	rs10688868	0,147
Y04	rs2067208	0,105
Y05	rs2307579	0,225
Y06	rs2308020	0,147
Y07	rs3080855	0,123
Y08	rs1610919	0,175
Y09	rs2307839	0,099
R01	rs2308137	0,144
R02	rs36040336	0,163
R03	rs1160886	0,179
R04	rs2308026	0,147
R05	rs2307526	0,167
R06	rs34811743	0,14
R07	rs2308189	0,179
R08	rs5895447	0,12
R09	rs2308171	0,105
R10	rs35605984	0,159

PE - poder de exclusão

4.4.7 Distância Genética

A tabela 4.4 mostra as distâncias genéticas de NEI entre a população do estudo (Distrito Federal) e as populações do Rio de Janeiro (população heterogênea, Região Sudeste), RJ-AFD (população do Rio de Janeiro que se auto declarou como afrodescendentes, Região Sudeste) e Terena (nativos americanos que moram no estado de Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste) (66). Os grupos populacionais da Europa (Portugal), África (Angola e Moçambique) e do Leste Asiático (Macau e Taiwan) também foram incluídos na análise (52). Todos os marcadores Indels foram considerados, exceto rs2067294.

Tabela 4.4 - Matriz da distância genética de Nei (DA) calculada pelo software DISPAN a partir das frequências alélicas entre diferentes populações

	Distrito Federal	Rio de Janeiro	RJ-AFD	Terena	Africana	Europeia	Leste Asiático
Distrito Federal	0						
Rio de Janeiro	0,001	0					
RJ-AFD	0,0031	0,0023	0				
Terena	0,0195	0,0216	0,0253	0			
Africana	0,0182	0,0157	0,0078	0,0436	0		
Europeia	0,0029	0,004	0,0084	0,0289	0,0286	0	
Leste Asiático	0,0178	0,0192	0,0199	0,0268	0,0342	0,0244	0

RJ-AFD - população do Rio de Janeiro e auto declarada como afrodescendentes

A análise de coordenadas principais (Figura 4.1) foi construída a partir da tabela 4.4. Os dados mostraram que o Distrito Federal foi agrupado mais perto do Rio de Janeiro. Além disso, assumiu uma posição intermediária em relação à Europa (mesmo quadrante, mais semelhante) e RJ-AFD (quadrante diferente, menos similar) e era bastante distante dos nativos americanos, africanos e asiáticos.

O dendrograma gerado pelo software Dispan a partir das distâncias genéticas (Figura 4.2) apresentou resultados semelhantes, embora o Rio de Janeiro ter sido colocado em um ramo diferente do Distrito Federal e da Europa.

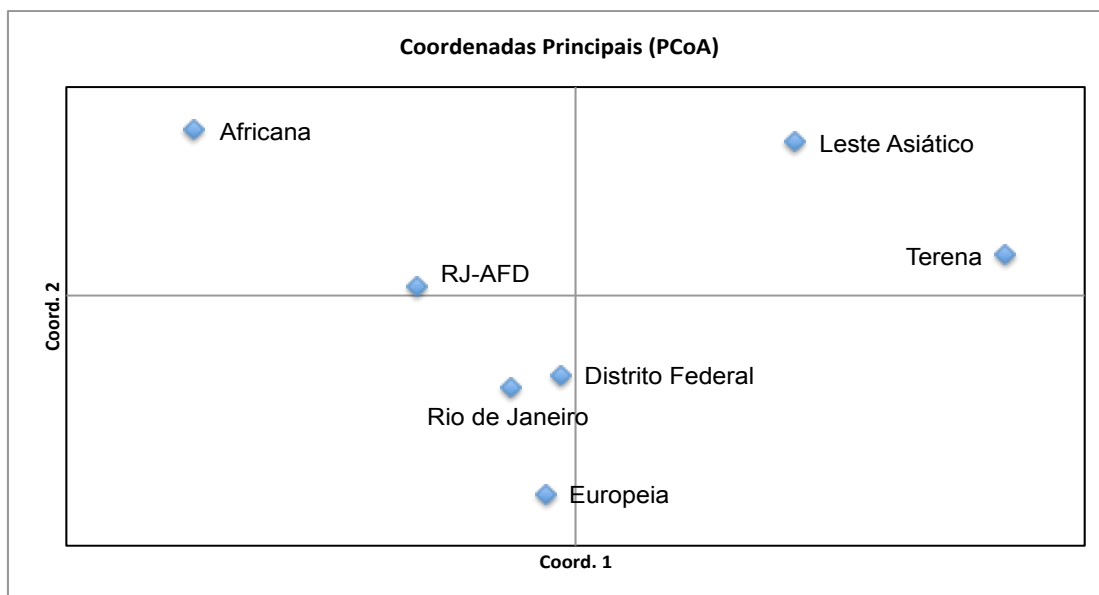


Figura 4.1 - Análise de coordenadas principais das distâncias genéticas de Nei (DA) entre as populações estudadas. Dados da matriz de distância genética (tabela 4.4).

RJ-AFD - população do Rio de Janeiro e auto declarada como afrodescendentes

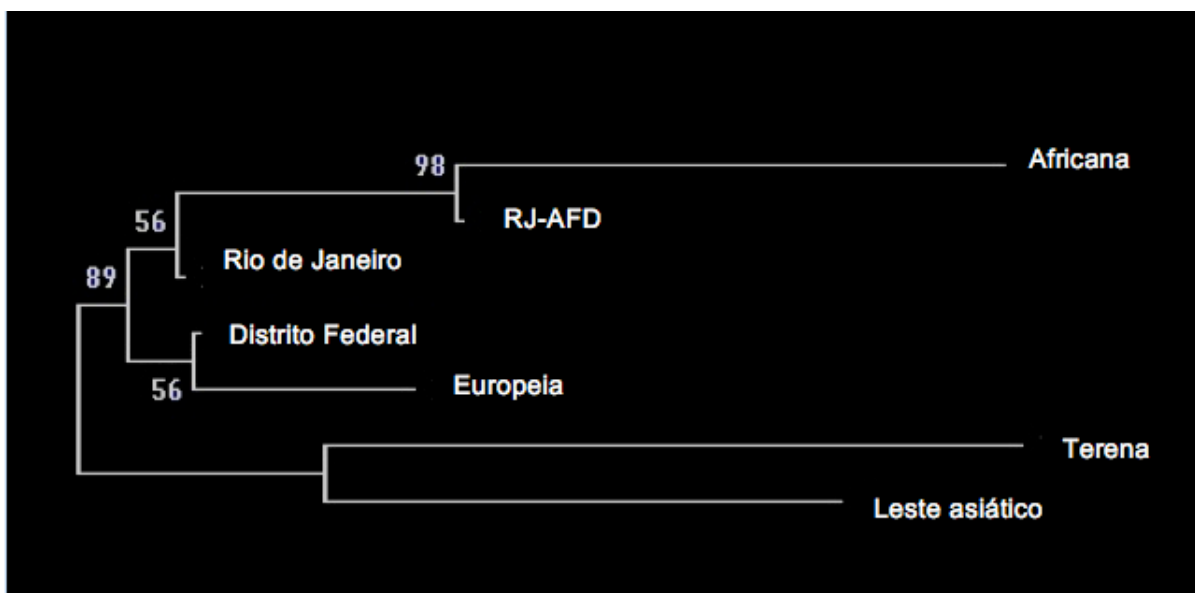


Figura 4.2 - Dendrograma gerado pelo software Dispan (método *neighbor-joining*) a partir da matriz de distâncias genéticas de Nei (DA) das populações estudadas.

RJ-AFD - população do Rio de Janeiro e auto declarada como afrodescendentes

4.5 DISCUSSÃO

No presente estudo descreveu-se as frequências alélicas e parâmetros forenses de trinta e oito polimorfismos do tipo inserção e deleção em uma amostra populacional residente no Distrito Federal e, além disso, investigou-se a composição desta população utilizando como ferramenta o DNA de seus indivíduos. Os Indels são marcadores genéticos bem distribuídos no genoma humano, apresentam baixa taxa de mutação, são facilmente amplificados e por isso tem sido recentemente introduzido na identificação forense como ferramenta complementar. Neste sentido, recomenda-se o uso de frequências alélicas locais para que os cálculos envolvidos na ciência forense sejam o mais realista possível da população estudada.

4.5.1 Frequências alélicas

Os trinta e oito Indel-plex avaliados foram: rs34541393, rs16624, rs2307689, rs35769550, rs2307700, rs140809, rs3047269, rs33972805, rs33917182, rs16402, rs1610871, rs2067238, rs2067294, rs2307710, rs2308242, rs2307580, rs1160956, rs34511541, rs2307978, rs3051300, rs10629077, rs10688868, rs2067208, rs2307579, rs2308020, rs3080855, rs1610919, rs2307839, rs2308137, rs36040336, rs1160886, rs2308026, rs2307526, rs34811743, rs2308189, rs5895447, rs2308171 e rs35605984. Suas frequências alélicas em uma amostra populacional do Distrito Federal se encontram na tabela 4.1. O presente estudo é de grande relevância por caracterizar uma amostragem significativa (200 indivíduos) e específica do território. Assim, as frequências alélicas locais descritas neste trabalho agregam maior confiança estatística aos cálculos forenses e de vínculo genético.

4.5.2 Parâmetros Forenses

A diversidade genética dos marcadores foi primeiramente investigada por meio da heterozigose esperada e observada. A maioria dos marcadores apresentaram estes parâmetros maiores que 0,40 (40%) e frequências alélicas maiores que 0,25. Estes dados sugerem que o conjunto de 38 Indels autossômicos é altamente polimórfico e muito informativo na população estudada.

Em seguida, a análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg revelou que todos os *loci* analisados apresentavam-se estáveis ao longo das gerações, exceto rs10629077 ($p = 0,03$). Entretanto, a significância foi perdida após correção de Bonferroni para análises múltiplas, já que o valor de P para todos os *loci* são analisados simultaneamente pelo software Arlequin. Nestas circunstâncias, o conjunto de 38 Indel-plex analisados está em equilíbrio de Hardy-Weinberg tornando possível seu uso em teste de paternidade e identificação humana. Ademais, estes dados corroboram com estudos envolvendo o mesmo conjunto de Indels (52, 66, 84).

O teste para desequilíbrio de ligação avaliado em 12 cromossomos autossômicos distintos (28 marcadores no total) mostrou que especificamente no cromossomo 9 (rs2067294, rs16402 e rs2307580), o *locus* rs2067294 estava em desequilíbrio, assim, ele foi excluído das análises posteriores. Para determinar as características analíticas do conjunto de Indels é importante incluir somente marcadores que estejam em equilíbrio de ligação, isto é, que não apresentem sinais de associação e, portanto, podem ser tratados como marcadores independentes na análise estatística forense (73). O cromossomo 9 possui três marcadores que respeitam a distância mínima de 30 megabases entre eles, por isso não foi analisado em outros estudos (52), entretanto na investigação observou-se desequilíbrio de ligação em um *locus*.

Por motivo de comparação, os parâmetros forenses são normalmente descritos e comparados de forma combinada. Os índices de probabilidade de coincidência combinada e poder de discriminação combinado, juntamente com o parâmetro de paternidade, esclarecem as características analíticas do conjunto estudado. Assim, na população do Distrito Federal, a probabilidade

de coincidência combinada (probabilidade de ocorrência de 02 perfis de DNA idênticos ao acaso) é $7,2 \times 10^{-15}$. Para uma melhor contextualização deste valor, a probabilidade de ser sorteado na megasena com uma única tentativa é de $1,1 \times 10^{-8}$ (85). Assim, é $1,5 \times 10^6$ (15 milhões) vezes mais provável ganhar na megasena do que encontrar dois indivíduos com o mesmo genótipo ao acaso utilizando o conjunto de 37 Indels deste trabalho.

Pereira e colaboradores demonstraram que a probabilidade de coincidência nas populações africana, europeia e asiática foram $3,4 \times 10^{-14}$, $3,6 \times 10^{-15}$ e $1,7 \times 10^{-14}$, respectivamente (52). A probabilidade de coincidência combinada (PMC) para as populações do estado de Rio de Janeiro e tribo Terena variaram nas ordens de magnitude de 10^{-13} à 10^{-15} (66). Fondevila e colaboradores ao avaliar diferentes populações ($n = 712$) também determinou que a média da PMC variou entre 10^{-14} à 10^{-15} (84). Em suma, os dados obtidos neste trabalho assemelham-se com a literatura, pois as ordens de grandeza estão próximas. Portanto, os 37 *loci* Indels são altamente informativos na população do Distrito Federal.

Neste estudo, o poder de discriminação combinado, ou seja, probabilidade de diferenciar indivíduos escolhidos aleatoriamente, foi de 0,999999999999993 ou 99,9999999999993% (13 casas após a vírgula). Para facilitar a compreensão, quanto mais próximo de 100%, melhor a capacidade de diferenciação. O poder de discriminação combinado obtido foi 99,9999999999999% (13 casas após a vírgula) para Rio de Janeiro, 99,9999999999997% (11 casas após a vírgula) para Terena, 99,9999999999997% para Rio de Janeiro afrodescendente (66), 99,9999999999994% (12 casas após a vírgula) para africanos, 99,9999999999995% (13 casas após a vírgula) para europeus e 99,9999999999997% (12 casas após a vírgula) para asiáticos (52). Em todos os trabalhos supracitados o conjunto de Indels multiplex utilizado foi o mesmo deste estudo. Nota-se que este conjunto na população do Distrito Federal, assim como em outros grupos populacionais, apresenta parâmetros forenses satisfatórios de informatividade.

Os valores de probabilidade de coincidência combinada e poder de discriminação combinado obtidos com o kit de 15 microssatélites autossômicos na população do Distrito Federal foram $4,85 \times 10^{-20}$ e

99,99999999999999995% (18 casas após a vírgula), respectivamente (86). Os valores obtidos com quinze microssatélites são consideravelmente superiores quando comparados com o conjunto de 37 Indels. No entanto, estes resultados são esperados pois os marcadores Indels são bialélicos (alelo longo ou alelo curto), diferentemente dos microssatélites que são multialélicos (vários alelos para o mesmo marcador), gerando maior poder de discriminação (32). Ademais, o número de Indels necessários para atingir o poder de discriminação obtido por 15 *loci* STRs em uma análise de parentesco, como por exemplo, seria de aproximadamente 60 Indels (84). Todavia, o uso de STR em determinados contextos como amostras altamente degradadas ou em pequenas quantidades é desvantajoso, pois a análise de STR pode apresentar dificuldades de amplificação devido ao tamanho relativamente grande do fragmento (100 a 400 pb) obtendo-se perfis genéticos parciais ou até mesmo ausência de perfil (87, 88).

4.5.3 Parâmetro De Paternidade

O poder de exclusão combinado obtido neste trabalho é de 0,9981 ou 99,81%, valor idêntico ao obtido por Manta e colaboradores nas populações do Rio de Janeiro (99,83%), Rio de Janeiro afrodescendentes (99,88%) e Terena (99,26%) (66). Conclui-se que o conjunto de 37 Indels na população do Distrito Federal pode ser utilizado como marcadores adicionais na análise de parentesco e para alcançar maior poder de exclusão é necessário genotipar um número maior de Indels.

Os Indels bialélicos podem funcionar como uma ferramenta complementar nas investigações de paternidade devido a ocorrência de incompatibilidades mendelianas entre o suposto pai e a criança.

Poucas incompatibilidades entre os STR do filho e do suposto pai não é um cenário incomum nas investigações de paternidade e muitas vezes tornam-se problemáticas. Em algumas situações, pode existir duas incompatibilidades em um teste de paternidade do tipo trio (mãe, filho e suposto pai) e mesmo assim, o índice de paternidade e probabilidade de paternidade podem até serem relativamente baixos, mas não exclui o homem

em questão. Neste cenário pode surgir a dúvida se o suposto pai era o verdadeiro pai da criança e duas mutações de STR haviam ocorrido, ou se o homem testado é um parente próximo de primeiro grau do verdadeiro pai, como por exemplo, seu irmão, pai e tio. Sabe-se que os microssatélites possuem altas taxas de mutação, e este problema pode ser superado pelo uso de um grande número de marcadores com baixas taxas de mutação, que é o caso de marcadores como Indels ou polimorfismos de único nucleotídeo (53, 54, 89).

4.5.4 Distância Genética

As distâncias genéticas de Nei (DA) foram calculadas a partir das frequências alélicas descritas por Pereira (52), Manta (66) e as originadas neste trabalho. Como os valores das distâncias correspondem a comparação das populações aos pares, o formato da matriz dificulta a visualização e a interpretação dos resultados. Por isto, usa-se o gráfico de coordenadas principais e/ou dendrograma. A comparação entre as duas representações gráficas revela uma concordância completa.

Os resultados indicam que a população do Distrito Federal é mais próxima geneticamente do Rio de Janeiro, assumindo uma posição intermediária em relação à Europa e Rio de Janeiro Afrodescendente e era bastante distante dos nativos americanos, africanos e do leste asiático. Este resultado está em consonância com a composição da população estudada de acordo com os Inquérito de Pesquisa Nacional (2010), em que as principais contribuições de imigrantes foram as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, populações com composição genética muito similar; principalmente de ascendência europeia (56-61%), seguido por africanos (26-28%) e depois nativos americanos (12-16%) (65, 90).

Conclusões semelhantes podem ser extraídas do dendrograma (*neighbor-joining* com distâncias genéticas). Embora o Rio de Janeiro ter sido colocado em um ramo diferente do Distrito Federal e da Europa, o valor de bootstrap associado a esta separação de ramificação foi de 56, o que significa uma menor confiança (91). Ademais, vários ramos bifurcados com

valores baixos de bootstrap são combinados em ramos multibifurcados (92). De fato, a análise das coordenadas principais pode refletir relações evolutivas mais precisas do que o dendrograma, porque não impõe um modelo bifurcador em uma matriz de distância genética, que pode ser inadequada para populações intimamente relacionadas (64, 93).

Em conclusão, observou-se que os 37 Indel-plex autossômicos caracterizados neste estudo poderiam ser utilizados para fins forenses gerais na população do Distrito Federal (Brasil).

4.6 CONCLUSÃO

As frequências alélicas, os parâmetros forenses e de paternidade revelam que o conjunto de 37 polimorfismos de inserção e deleção é um sistema genético altamente informativo para a população do Distrito Federal. O poder de discriminação combinado e o poder de exclusão combinado foram 99,9999999999993% e 99,81%, respectivamente.

O Distrito Federal é geneticamente mais próximo do Rio de Janeiro, assumindo uma posição intermediária em relação à Europa e Rio de Janeiro Afrodescendente e mais distante dos nativos americanos, africanos e do leste asiático.

5 REFERÊNCIAS

1. Wagner J, Dzijan S, Marjanović D, Lauc G. Non-invasive prenatal paternity testing from maternal blood. *Int J Legal Med.* 2009;123(1):75-9.
2. Guo X, Bayliss P, Damewood M, Varney J, Ma E, Vallecillo B, et al. A noninvasive test to determine paternity in pregnancy. *N Engl J Med.* 2012;366(18):1743-5.
3. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2007;110(3):687-94.
4. Ryan A, Baner J, Demko Z, Hill M, Sigurjonsson S, Baird ML, et al. Informatics-based, highly accurate, noninvasive prenatal paternity testing. *Genet Med.* 2013;15(6):473-7.
5. Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet.* 1989;2(8676):1363-5.
6. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350(9076):485-7.
7. Lo YM, Powell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, et al. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet.* 1993;341(8853):1147-8.
8. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(51):20458-63.
9. Flock A, Tu NC, Ruland A, Holzgreve W, Gembruch U, Geipel A. Non-invasive prenatal testing (NIPT): Europe's first multicenter post-market clinical follow-up study validating the quality in clinical routine. *Archives of gynecology and obstetrics.* 2017;296(5):923-8.
10. Barrett AN, McDonnell TC, Chan KC, Chitty LS. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. *Clin Chem.* 2012;58(6):1026-32.

11. Agarwal A, Sayres LC, Cho MK, Cook-Deegan R, Chandrasekharan S. Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States. *Prenat Diagn.* 2013;33(6):521-31.
12. Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta.* 2014;35 Suppl:S64-8.
13. Orozco AF, Bischoff FZ, Horne C, Popek E, Simpson JL, Lewis DE. Hypoxia-induced membrane-bound apoptotic DNA particles: potential mechanism of fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1075:57-62.
14. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn.* 2007;27(5):415-8.
15. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013;33(7):662-6.
16. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2004;50(1):88-92.
17. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem.* 2004;50(6):1002-11.
18. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem.* 2010;56(8):1279-86.
19. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999;64(1):218-24.
20. Yu SC, Lee SW, Jiang P, Leung TY, Chan KC, Chiu RW, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin Chem.* 2013;59(8):1228-37.
21. Hill M, Finning K, Martin P, Hogg J, Meaney C, Norbury G, et al. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Genet.* 2011;80(1):68-75.

22. Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, Bossers B, van Erp F, de Haas M. Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. *Obstet Gynecol.* 2010;115(1):117-26.
23. Roewer L. Y chromosome STR typing in crime casework. *Forensic Sci Med Pathol.* 2009;5(2):77-84.
24. Mayntz-Press KA, Ballantyne J. Performance characteristics of commercial Y-STR multiplex systems. *J Forensic Sci.* 2007;52(5):1025-34.
25. Calacal GC, Delfin FC, Tan MM, Roewer L, Magtanong DL, Lara MC, et al. Identification of exhumed remains of fire tragedy victims using conventional methods and autosomal/Y-chromosomal short tandem repeat DNA profiling. *Am J Forensic Med Pathol.* 2005;26(3):285-91.
26. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003;423(6942):825-37.
27. Gusmão L, Sánchez-Diz P, Calafell F, Martín P, Alonso CA, Alvarez-Fernández F, et al. Mutation rates at Y chromosome specific microsatellites. *Hum Mutat.* 2005;26(6):520-8.
28. Gusmão L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci Int.* 2006;157(2-3):187-97.
29. Rong Y, Gao J, Jiang X, Zheng F. Multiplex PCR for 17 Y-Chromosome Specific Short Tandem Repeats (STR) to Enhance the Reliability of Fetal Sex Determination in Maternal Plasma. *Int J Mol Sci.* 2012;13(5):5972-81.
30. Angert RM, LeShane ES, Lo YM, Chan LY, Delli-Bovi LC, Bianchi DW. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem.* 2003;49(1):195-8.
31. Asamura H, Sakai H, Ota M, Fukushima H. MiniY-STR quadruplex systems with short amplicon lengths for analysis of degraded DNA samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(1):56-61.
32. Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR markers.* Second Edition ed. Press EA, editor 2005.

33. Willuweit S, Roewer L, Group IFYCU. Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(2):83-7.
34. Rolf B, Keil W, Brinkmann B, Roewer L, Fimmers R. Paternity testing using Y-STR haplotypes: assigning a probability for paternity in cases of mutations. *Int J Legal Med.* 2001;115(1):12-5.
35. Gjertson DW, Brenner CH, Baur MP, Carracedo A, Guidet F, Luque JA, et al. ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(3-4):223-31.
36. Barra GB, Santa Rita TH, Chianca CF, Velasco LF, de Souza CF. Allele frequencies for 15 autosomal STRs in a population sample from the Federal District (Brazil)-a territory that arose from nothing. *Int J Legal Med.* 2014;128(5):741-2.
37. Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, et al. Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *Am J Hum Genet.* 2010;87(3):341-53.
38. Vlková B, Hodosy J. Vanishing twin as a potential source of bias in non-invasive fetal sex determination: a case report. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40(4):1128-31.
39. Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaidis K, Holzgreve W, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2005;51(9):1598-604.
40. Butler JM. Advanced topics in forensic DNA typing: methodology 2012.
41. Butts ELR, Kline MC, Dueller DL, Hill CR, Butler JM, Vallone PM. NIST validation studies on the 3500 Genetic Analyzer. 2011;3:e184-e5.
42. Fernandez-Martinez FJ, Galindo A, Garcia-Burguillo A, Vargas-Gallego C, Nogues N, Moreno-Garcia M, et al. Noninvasive fetal sex determination in maternal plasma: a prospective feasibility study. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics.* 2012;14(1):101-6.
43. Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *Jama.* 2011;306(6):627-36.

44. Wright CF, Wei Y, Higgins JP, Sagoo GS. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res Notes*. 2012;5:476.
45. Newson AJ. Ethical aspects arising from non-invasive fetal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008;13(2):103-8.
46. Chandrasekharan S, Minear MA, Hung A, Allyse M. Noninvasive prenatal testing goes global. *Science translational medicine*. 2014;6(231):231fs15.
47. Barra GB, Santa Rita TH, Chianca CF, Velasco LF, de Sousa CF, Nery LF, et al. Fetal male lineage determination by analysis of Y-chromosome STR haplotype in maternal plasma. *Forensic Sci Int Genet*. 2015;15:105-10.
48. Prince AM, Andrus L. PCR: how to kill unwanted DNA. *BioTechniques*. 1992;12(3):358-60.
49. Schwark T, Poetsch M, Preusse-Prange A, Kamphausen T, von Wurmb-Schwark N. Phantoms in the mortuary--DNA transfer during autopsies. *Forensic science international*. 2012;216(1-3):121-6.
50. Bruch MK. Toxicity and safety of topical sodium hypochlorite. *Contributions to nephrology*. 2007;154:24-38.
51. Levine JM. Dakin's solution: past, present, and future. *Advances in skin & wound care*. 2013;26(9):410-4.
52. Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo A, Gusmão L. A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. *Electrophoresis*. 2009;30(21):3682-90.
53. Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo A, Gusmão L. Insertion/deletion polymorphisms: A multiplex assay and forensic applications. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2009.
54. Phillips C, Fondevila M, Garcia-Magarinos M, Rodriguez A, Salas A, Carracedo A, et al. Resolving relationship tests that show ambiguous STR results using autosomal SNPs as supplementary markers. *Forensic Sci Int Genet*. 2008;2(3):198-204.
55. Fregeau CJ, Bowen KL, Leclair B, Trudel I, Bishop L, Fourney RM. AmpFISTR profiler Plus short tandem repeat DNA analysis of casework samples, mixture samples, and nonhuman DNA samples amplified under

reduced PCR volume conditions (25 microL). *Journal of forensic sciences*. 2003;48(5):1014-34.

56. Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *American journal of human genetics*. 2002;71(4):854-62.

57. Mullaney JM, Mills RE, Pittard WS, Devine SE. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Human molecular genetics*. 2010;19(R2):R131-6.

58. Lin M, Whitmire S, Chen J, Farrel A, Shi X, Guo JT. Effects of short indels on protein structure and function in human genomes. *Scientific reports*. 2017;7(1):9313.

59. Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome research*. 2006;16(9):1182-90.

60. Nachman MW, Crowell SL. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics*. 2000;156(1):297-304.

61. Investigator DIPplex Kit. Available from: <https://http://www.qiagen.com/us/shop/detection-solutions/human-identity/investigator-diplex-kit/-orderinginformation>.

62. Habermalz U. Brasília - eine Stadt aus dem Nichts: auf den Spuren Oscar Niemeyers. Berner Fachhochschule 2006.

63. Censo Demográfico (2010) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2010 [cited 26 de Janeiro de 2013]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=df>.

64. Raimann PE, Hirschfeld-Campolongo G, Schumacher S, de Mattos Almeida SE, da Silva CM, Rodenbusch R, et al. Population genetic analyses of the AmpFISTR® NGM™ in Brazil. *Int J Legal Med*. 2012;126(2):337-41.

65. Manta F, Pereira R, Vianna R, Araújo A, Gitaí D, Silva DA, et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PloS one*. 2013.

66. Manta F, Caiafa A, Pereira R, Silva D, Amorim A, Carvalho EF, et al. Indel markers: genetic diversity of 38 polymorphisms in Brazilian populations

and application in a paternity investigation with post mortem material. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(5):658-61.

67. QIAamp DNA Mini Kit. Available from:

[https://http://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiaamp-dna-mini-kit/ - orderinginformation.](https://http://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiaamp-dna-mini-kit/-orderinginformation)

68. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10(3):564-7.

69. McMANUS C, PAIVA S, CORRÊA PS, SEIXAS L, MELO CB. Estatísticas para descrever genética de populações. INCT: Informação genético-sanitária da pecuária brasileira; 2011.

70. Rice WR. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution; international journal of organic evolution.* 43:1989. p. 223-5.

71. Wall JD, Pritchard JK. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature reviews Genetics.* 2003;4(8):587-97.

72. Szibor R, Hering S, Kuhlisch E, Plate I, Demberger S, Krawczak M, et al. Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. *International journal of legal medicine.* 2005;119(6):363-9.

73. Guo X, Elston RC. Linkage information content of polymorphic genetic markers. *Hum Hered.* 1999;49(2):112-8.

74. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980;32(3):314-31.

75. Tereba A. Tools for analysis of population statistics. . 1999. p. 14-6.

76. Fisher RA. Standard calculations for evaluating a blood-group system. *Heredity (Edinb).* 1951;5(1):95-102.

77. Jones BJ, Brewer JK. An analysis of the power of statistical tests reported in the Research Quarterly. *Res Q.* 1972;43(1):23-30.

78. Tillmar A. Populations and Statistics in Forensic Genetics. Linköping University, Faculty of Health Sciences 2010.

79. Huston KA. Statistical Analysis of STR Data. *Profiles in DNA.* 1998:14-5.

80. *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM): Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories*. United States 2010.
81. Ota T. *DISPAN: Genetic distance and phylogenetic analysis* Pennsylvania 1993. p. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University.
82. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-9.
83. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406-25.
84. Fondevila M, Phillips C, Santos C, Pereira R, Gusmao L, Carracedo A, et al. Forensic performance of two insertion-deletion marker assays. *International journal of legal medicine*. 2012;126(5):725-37.
85. Caixa Econômica Federal 2013 [cited 2013]. Available from: <http://www1.caixa.gov.br/loterias/loterias/megasena>.
86. Barra GB, Santa Rita TH, Chianca CF, Velasco LF, de Souza CF. Allele frequencies for 15 autosomal STRs in a population sample from the Federal District (Brazil)-a territory that arose from nothing. *Int J Legal Med*. 2013.
87. Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(3):179-92.
88. Zidkova A, Horinek A, Kebrdlova V, Korabecna M. Application of the new insertion-deletion polymorphism kit for forensic identification and parentage testing on the Czech population. *International journal of legal medicine*. 2013;127(1):7-10.
89. Borsting C, Morling N. Mutations and/or close relatives? Six case work examples where 49 autosomal SNPs were used as supplementary markers. *Forensic Sci Int Genet*. 2011;5(3):236-41.
90. Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME, et al. Historical genetics: spatiotemporal analysis

of the formation of the Brazilian population. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council*. 2003;15(6):824-34.

91. Efron B, Halloran E, Holmes S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(23):13429-34.

92. Lin GN, Zhang C, Xu D. Polytoomy identification in microbial phylogenetic reconstruction. *BMC systems biology*. 2011;5 Suppl 3:S2.

93. Comas D, Schmid H, Braeuer S, Flaiz C, Busquets A, Calafell F, et al. Alu insertion polymorphisms in the Balkans and the origins of the Aromuns. *Annals of human genetics*. 2004;68(Pt 2):120-7.

6 ANEXOS

6.1 ANEXO I – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **188/12**

Título do Projeto: “Investigação do vínculo genético fetal pela análise do sangue materno”.


Pesquisadora Responsável: Gustavo Barcelos Barra

Data de Entrada: 23/11/12

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **188/12** com o título: “Investigação do vínculo genético fetal pela análise do sangue materno”, analisado na 11ª Reunião Ordinária, realizada no dia 11 dezembro de 2012.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 19 de fevereiro de 2013.


Prof. Natália Monsore
Coordenador do CEP-FS/UnB

6.2 ANEXO II – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação do sexo fetal pela análise do sangue materno colhido por punção digital (furo no dedo).

Pesquisador: Gustavo Barcelos Barra

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 52869116.1.0000.0023

Instituição Proponente: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

Patrocinador Principal: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.414.100

Apresentação do Projeto:

Esse parecer relata as informações do projeto: "Determinação do sexo fetal pela análise do sangue materno colhido por punção digital (furo no dedo)". A sexagem fetal é um ensaio capaz de indicar o sexo bebê no início da gestação, mais especificamente após a oitava semana. Neste ensaio, pesquisa-se o cromossomo Y na circulação materna. A presença deste cromossomo indica a gestação de um menino e sua ausência uma menina. O teste é simples, não-invasivo, de fácil execução e envolve a coleta de 4 mL de sangue em tubo por punção de veia do braço. Com a intenção de trazer maior conforto para a gestante e avaliar a presença do DNA fetal na microcirculação materna, idealizou-se executar a sexagem fetal no sangue capilar a partir de 0,5 mL de sangue colhido por uma punção digital. O objetivo primário desse projeto será investigar se a sexagem fetal executada no sangue capilar e no sangue venoso são comparáveis. A metodologia consiste no recrutamento de 80 grávidas com mais de 8 semanas de gestação. Após assepsia da pele com lenço de álcool isopropílico 70%, serão colhidos dois tubos (Vacuette K2 EDTA, Greiner-bio-one) de 4 mL de sangue por punção de venosa e um tubo (Minicollect K3 EDTA, Greinerbio-one) de 0,5 mL por punção digital. O plasma será imediatamente separado por centrifugação, submetido a extração de DNA no equipamento EasyMag (Biomérieux) e analisado pela reação de

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3966-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.414.100

qPCR já validada no laboratório. A qPCR tem como alvo a região multicópia DYS-14 e é executada no equipamento StepOne (Thermo Fisher). Com relação à metodologia de análise de dados, serão avaliadas sensibilidade e especificidade do novo teste (punção digital) em relação com o ensaio tradicional (venipuntura) por meio das ferramentas tradicionais de comparação de metodologias para métodos qualitativos (tabela 2 x 2, índice de correlação Kappa, teste exato de Fisher ou Chi-quadrado). Foi apresentado o critério de inclusão dos participantes da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário será investigar se a sexagem fetal executada no sangue capilar e no sangue venoso são comparáveis.

Não foi apresentado o objetivo secundário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos associados a este projeto foram definidos pelos pesquisadores como sendo os mesmos associados a coletas de material para exames bioquímicos tradicionais, considerados risco mínimo aos participantes, definido como aquele geralmente encontrado na vida cotidiana ou durante a realização e avaliações físicas de rotina, incluindo coleta de espécimes por punção venosa, procedimentos não-invasivos empregados rotineiramente em práticas clínicas. Se necessário, o pesquisador principal se dispõe para o esclarecimento de qualquer dúvida em relação aos resultados e se necessário fornecer o aconselhamento genético.

E como benefícios os pesquisadores informam que este trabalho fornecerá evidências se o DNA fetal está presente na microcirculação materna e se a venipuntura pode ser substituída pela punção digital, que é mais confortável para a paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O parecer diz respeito ao projeto "Determinação do sexo fetal pela análise do sangue materno colhido por punção digital (furo no dedo)", que tem como objetivo primário investigar se a sexagem fetal executada no sangue capilar e no sangue venoso são comparáveis. Serão recrutadas 80 gestantes com mais de 8 semanas de gestação e serão feitas duas coletas: 1 - 4 mL de sangue por punção de venosa; 2 - 0,5 mL por punção digital. O pesquisador apresentou o critério de inclusão dos participantes da pesquisa.

O projeto é de interesse clínico por tentar uma estratégia para coleta de sangue de forma menos invasiva e dolorosa. À princípio o projeto satisfaz aos princípios preconizados na Resolução 466/2012/CNS/MS.

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 70.790-075
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3966-1511 **E-mail:** cep.uniceub@uniceub.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB



Continuação do Parecer: 1.414.100

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes termos: 1) Folha de rosto devidamente preenchida; 2) Informações básicas do projeto; 3) Documento de autorização para a realização da pesquisa em unidade dos laboratórios Sabin; 4) Termo de responsabilidade; 5) Projeto de pesquisa; 6) TCLE.

Recomendações:

O CEP-UniCEUB ressalta a necessidade de desenvolvimento da pesquisa, de acordo com o protocolo avaliado e aprovado, bem como, atenção às diretrizes éticas nacionais quanto aos incisos XI.1 e XI.2 da Resolução nº 466/12 CNS/MS concernentes às responsabilidades do pesquisador no desenvolvimento do projeto:

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

- Resolução CNS n. 441/11, referente à análise ética de projetos de pesquisa que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores. Observação: Ao final da pesquisa enviar Relatório de Finalização da Pesquisa ao CEP. O envio de relatórios deverá ocorrer pela Plataforma Brasil, por meio de notificação de evento. O modelo do relatório encontra-se disponível na página do UniCEUB

http://www.uniceub.br/instituicao/pesquisa/ins030_pesquisacomitebio.aspx, em Relatório de Finalização e Acompanhamento de Pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atendeu às solicitações desse CEP e, dessa forma, tem condições de aprovação.

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 70.790-075
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3966-1511 **E-mail:** cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.414.100

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo previamente avaliado por este CEP, com parecer N° 1.408.101/2016, tendo sido homologado na 1ª Reunião Ordinária do CEP-UniCEUB, em 05 de fevereiro de 2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_654759.pdf	28/01/2016 14:11:22		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_concordancia_sexagem_capilar.pdf	28/01/2016 14:08:32	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_sexagem_v1.pdf	28/01/2016 14:07:29	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoSexagemCapilar.pdf	28/01/2016 13:54:12	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_responsabilidade_sexagem_capilar.pdf	28/01/2016 13:52:27	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_assistente1.pdf	28/01/2016 13:20:15	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_pesquisador.pdf	28/01/2016 13:19:31	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP_sexagem_v1.pdf	28/01/2016 13:18:28	Gustavo Barcelos Barra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

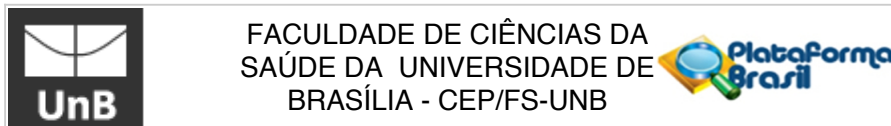
Não

BRASILIA, 18 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Marília de Queiroz Dias Jacome
(Coordenador)

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 70.790-075
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3966-1511 **E-mail:** cep.uniceub@uniceub.br

6.3 ANEXO III – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de 38 loci INDEL nas populações de Brasília, Salvador e Manaus.

Pesquisador: Gustavo Barcelos Barra

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 5

CAAE: 15253913.5.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 491.475

Data da Relatoria: 02/12/2013

Apresentação do Projeto:

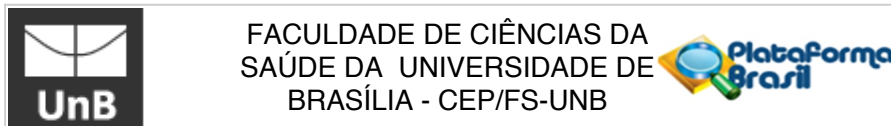
Esta é a quinta relatoria do presente projeto. A última relatoria ocorreu em 12/11/2013.

Resumo do Projeto: a proposta trata de estudo transversal com componente descritivo e analítico sobre as frequências alélicas de 38 loci INDEL em 300 voluntários das cidades de Brasília (DF), 100 voluntários das cidades de Salvador (BA) e Manaus (AM) totalizando 500 sujeitos de pesquisa, visando o uso destes novos marcadores de DNA em aplicações forenses, estudos de vínculo genético e análises filogenéticas. A escolha da população se deu por conveniência da existência de unidades de análises clínica do Patrocinador, Laboratório Sabin de Análises Clínicas LTDA.

Objetivo da Pesquisa:**OBJETIVO PRIMÁRIO:**

Descrever as frequências alélicas de 38 loci INDEL (rs3047269, rs2307579, rs16624, rs2308242, rs2308026, rs2307526, rs1160956, rs1610871, rs2307710, rs2307839, rs2308137, rs2307978, rs35769550, rs5895447, rs16402, rs2067294, rs2307580, rs140809, rs1160886, rs10688868, rs34811743, rs33972805, rs1610919, rs2067238, rs2308171, rs2308189, rs2308020, rs2067208, rs3051300, rs3080855, rs34511541, rs36040336, rs2307689, rs33917182, rs34541393, rs35605984, rs10629077, rs2307700) em 300 voluntários das cidades de Brasília,

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br



Continuação do Parecer: 491.475

100 voluntários das cidades de Salvador e Manaus totalizando 500 sujeitos de pesquisa.

OBJETIVOS SECUNDÁRIO:

Desenvolver uma metodologia baseada em PCR alelo específica em tempo real para enotipagem dos INDELS listados no objetivo primário, visando comparação e validação frente à técnica de eletroforese capilar.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS:

Os riscos associados a este projeto são os relacionados a coletas de material para exames bioquímicos tradicionais, considerados de risco mínimo aos participantes, definidos como aqueles geralmente encontrados na vida cotidiana ou durante a realização de avaliações físicas ou psicológicas de rotina, incluindo coleta de espécimes por punção venosa e procedimentos não-invasivos empregados rotineiramente em praticas clínicas.

BENEFÍCIOS:

Determinação das frequências dos polimorfismos em questão possibilitando seu uso em análises forense e desenvolvimento de técnica baseada em PCR tempo real para genotipagem de indels.

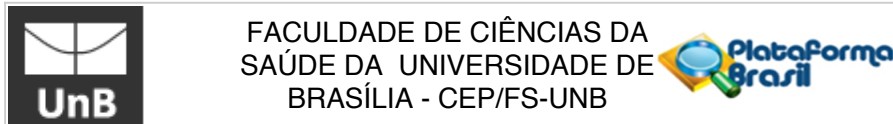
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta se refere a um estudo transversal com componente descritivo e analítico sobre as frequências alélicas de 38 loci INDEL, em 300 voluntários das cidades de Brasília, 100 voluntários das cidades de Salvador e Manaus, totalizando 500 sujeitos de pesquisa. O projeto visa o uso destes novos marcadores de DNA em aplicações forenses, estudos de vinculo genético e análises filogenéticas. É alvo do referido estudo a comparação e validação entre as técnicas de PCR em tempo real e eletroforese capilar. Os dados serão avaliados quanto a parâmetros forenses (equilíbrio de Hardy-Weinberg, poder de discriminação, conteúdo de informação polimórfica, e poder de exclusão) e serão determinados para cada população por meio dos softwares Arlequin v3.1 e GeneALEx 6.5. Adicionalmente, o cálculo de estatística Kappa para correlação entre as duas metodologias será realizado por meio do site QuickCalc (Graphpad Software).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes documentos foram anexados ao processo: Projeto de Pesquisa, Folha de Rosto, Carta

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br



Continuação do Parecer: 491.475

de Encaminhamento do CEP-FS/UnB, Termo de Responsabilidade, Termo de Concordância, Cronograma de execução, Orçamento, TCLE e Lattes dos pesquisadores.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Na relatoria anterior, ficaram pendentes a inclusão da logomarca, ou cabeçalho, da Instituição de pesquisa, bem como telefone e e-mail do CEP-FS/UnB. O pesquisador atendeu às exigências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BRASILIA, 12 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Natan Monsores de Sá
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br