



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PPGBIOTEC

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX Mini-STR DE CROMOSSOMO
Y e ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA CIDADE
DE MANAUS**

LARISSA BARROS MUNIZ ORLANDO

MANAUS, 2015

LARISSA BARROS MUNIZ ORLANDO

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX Mini-STR DE CROMOSSOMO
Y e ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA CIDADE
DE MANAUS**

Documento apresentado ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para a obtenção de título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração biotecnologia para saúde.

ORIENTADOR: Dr. SPARTACO ASTOLFI FILHO

CO-ORIENTADORAS: Dra. ISABEL DA MOTA PONTES

Dra. DAYSE APARECIDA DA SILVA

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O71d

Orlando, Larissa Barros Muniz

Desenvolvimento de um sistema multiplex mini-STR de cromossomo y e análise das frequências haplotípicas na população da cidade de Manaus / Larissa Barros Muniz Orlando. 2015

183 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho

Coorientador: Isabel da Mota Pontes

Coorientador: Dayse Aparecida da Silva

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. DNA degradado. 2. Haplótipos. 3. Análise molecular. 4. Microssatélites (STRs) . I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

MANAUS, 2015

À Ugo Souto Orlando Filho. Meu filho, meu amor e meu maior presente. Enviado de Deus no início do Doutorado me acompanhando e me dando força nesta jornada e sempre !

AGRADECIMENTOS

- * Ao meu querido orientador, professor Dr. Spartaco Astolfi Filho por toda orientação, paciência, apoio, amizade, e pela enorme importância que exerceu (e exerce) na minha formação.
- * À minha querida e mais que Co-Orientadora, Dra. Dayse Aparecida da Silva por toda atenção, orientação, oportunidade de aprendizado e desenvolvimento, pela disponibilidade, paciência, amizade e co-orientação neste trabalho.
- * À querida Co-Orientadora Isabel da Mota Pontes, pela confiança depositada em mim, acreditando e me incentivando bastante, para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tudo.
- * Aos meus queridos Pais e irmãs pelo grande incentivo e confiança depositada em mim.
- * Ao meu querido Esposo Ugo Souto Orlando, por toda paciência e confiança em acreditar que mais este sonho seria realizado.
- * Aos meus tios, tias, que mesmo distantes, sempre deram o incentivo e carinho necessário.
- * À querida Regina Cardoso Dantas, companheira mais que fundamental cuidando do meu filho e nos acompanhando sempre .

- ★ Às Colegas do Laboratório de Diagnóstico por DNA da Uerj, Oly e Sílvia, pela grande atenção e apoio dado a mim durante os experimentos realizados neste Laboratório.
- ★ Aos Colegas do Laboratório de Genética Forense Da Polícia Civil do Estado do Amazonas, pela compreensão da minha ausência por diversas vezes deste local de trabalho.
- ★ Às minhas queridas amigas Daniela, Maryellen, Laura, pela compreensão quando muitas vezes estive ausente.
- ★ A todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

"HÁ UMA FORÇA MOTRIZ MAIS PODEROSA QUE O VAPOR, A ELETRICIDADE E A ENERGIA ATÔMICA: A VONTADE"

Alebert Enstein

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Esquema ilustrativo do ideograma do cromossomo Y humano com as duas regiões PAR 1 e PAR 2.	26
Figura 2. Esquema ilustrativo demonstrando a diferença entre <i>primers</i> de STR convencionais e de Mini-YSTRs.	31

CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX DO TIPO MINI-YSTR

Figura 1. Ideograma dos marcadores YSTR no cromossomo Y. A linha horizontal de coloração cinza sobre cada um, indica a região em que está localizada o YSTR selecionado. Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov , 2011.	46
Figura 2. Eletroferograma dos marcadores DYS442, DYS444, DYS445 e DYS448. A escala na lateral esquerda da figura demonstra a RFU referente ao marcador analisado.	54
Figura 3. Continuação do eletroferograma dos marcadores DYS461 e DYS447. A escala na lateral esquerda da figura demonstra a RFU referente ao marcador analisado.	55
Figura 4. Análise do eletroferograma do Mutliplex Mini YSTR09. Os picos azul, verde, vermelho e preto identificados, referem-se a cada locos do multiplex.	55
Figura 5. Eletroferograma de uma amostra de DNA degradado (osso humano) amplificada com o multiplex Mini YSTR09.	56
Figura 6. Gráfico demonstra em porcentagem, a amplificação total dos 09 locos do multiplex Mini YSTR09 para as quatro amostras analisadas, com exceção do valor de 0,031ng, o qual não houve amplificação total para todas as quatro amostras.	58
Figura 7. Gráfico do perfil de mistura homem/homem, nas concentrações relativas de 19:1 a 1:19. As barras verticais referem-se às médias (em porcentagem) dos locos amplificados entre as amostras da mistura, H1:H2 em azul e H2:H3 em vermelho.	60

Figura 8. O gráfico demonstra a amplificação total dos 09 locus do multiplex, quando no sistema existe de 10 a 200ng de DNA feminino. Em 400ng de DNA feminino, a amplificação torna-se parcial.

60

Figura 9. O gráfico demonstra a amplificação de DNA masculino quando na presença de DNA feminino em 400ng.

61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX DO TIPO MINI-YSTR

CAPÍTULO II: ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA

Tabela 1. Características dos Mini- YSTR utilizados neste trabalho	47
Tabela 2. Características dos RM- YSTR utilizados neste trabalho	48
Tabela 3. Definições das condições da PCR para os marcadores Mini Y-STR monoplex.	47
Tabela 4. Definições das condições da PCR para teste de temperatura de anelamento.	49
Tabela 5. Comparação das médias dos resultados de amplificação obtido nos três sistemas.	62

CIDADE DE MANAUS

Tabela 1. Informações dos locos presentes no kit comercial <i>PowerPlex® Y23 System</i> (Promega).	71
Tabela 2. Definições das condições da PCR para o multiplex comercial <i>PowerPlex® Y23 System</i> .	72
Tabela 3. Definições das condições da PCR para o multiplex Mini YSTR09.	72
Tabela 4. Frequências alélicas e diversidade gênica (DG) para os locos do Multiplex Mini YSTR09.	75
Tabela 5. Frequências alélicas e diversidade gênica (DG) para os 23 YSTRs do kit comercial <i>PowerPlex® Y23 System</i> .	75
Tabela 6. Frequências alélicas e diversidade gênica (DG) para o conjunto de locos de YSTRs do kit comercial <i>PowerPlex® Y23 System</i> mais o Mini YSTR09.	78
Tabela 7. Resumo da diversidade gênica dos locos mais informativos presentes nos grupos I, II e III analisados.	87
Tabela 8. Parâmetros genéticos obtidos nos indivíduos selecionados na população de Manaus-AM.	89

Tabela 9. Parâmetros genéticos obtidos com os locos DYS447, DYS626 nos indivíduos selecionados na população de Manaus-AM.	91
Tabela 10. Parâmetros genéticos obtidos com os locos DYS447, DYS626 nos indivíduos selecionados na população de Manaus-AM	92

ANEXOS

CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX DO TIPO MINI-YSTR

Anexo I. Amostras de DNA de osso humano amplificadas com o multiplex Mini YSTR09	117
Anexo II. Amostras de DNA de osso humano com o número de locos amplificados para o sistema I: Multiplex Mini YSTR09 mais o kit comercial <i>AmpFISTR® Minifiler™</i> .	118
Anexo III. Amostras de DNA de osso humano com o número de locos amplificados para o sistema II: Multiplex Mini YSTR09 mais o kit comercial <i>AmpFISTR® Identifiler™</i> (em azul) e sistema III: Multiplex Mini YSTR09 mais o kit comercial <i>AmpFISTR Yfiler™</i> (em vermelho)®	119
ANEXO IV: BONE DNA TYPING USING A NEW mini YSTR MULTIPLEX. Forensic Science International	120

CAPÍTULO II: ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA CIDADE DE MANAUS

ANEXO V. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE	123
ANEXO VI. Frequência haplotípica e haplótipos incluídos neste estudo considerando os 9 Mini-YSTRs em 189 haplótipos analisados, sendo 181 únicos (0,00529) e 8 compartilhados (0,0106; 0,0212; 0,0159)	127
ANEXO VII. Frequência haplotípica e haplótipos incluídos neste estudo considerando os 23 Y-STRs em 204 haplótipos analisados, sendo 202 únicos (0,0049) e 2 compartilhados (0,0098)	134
ANEXO VIII. Frequência haplotípica e haplótipos incluídos neste estudo considerando os 29 Y-STRs e Mini YSTR em 168 haplótipos únicos analisados (0,00595).	141
ANEXO IX. Frequência haplotípica e haplótipos incluídos neste estudo considerando os 17 Y-STRs presentes no kit <i>AmpFISTR®Yfiler™</i> em 168 haplótipos, sendo 167 únicos (0,00595) e 1 compartilhado (0,0119).	148

AENXO X. Frequênci haplotípica e haplótipos incluídos neste estudo considerando 25 marcadores, sendo 17 presentes no kit AmpFISTR®Yfiler™ mais 08 marcadores do Mini YSTR09. Houve a ocorrência de 168 haplótipos únicos, (0,00595).

154

ANEXO XI. Artigo a ser publicado: Desenvolvimento e Validação de nove miniSTRs do cromossomo Y para identificação de DNA de amostras degradadas de casos forense. 160

ANEXO XII. Diversidade haplotípica de 29 Y-STRs, em homens da população de Manaus-Norte do Brasil.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO GERAL	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 O DNA e genoma humano	21
2.2 A Identificação humana por DNA.	22
2.2.1 Marcadores moleculares para a identificação humana.	22
2.3.Cromossomo Y.	25
2.3.1 Os STRs do cromossomo Y	27
2.3.1.1 Y-STR	27
2.3.1.2 Mini- YSTR	30
2.3.1.3. (RM)-YSTR	32
2.4. Marcadores simples e multicópia	33
2.5. Aplicações forenses do YSTRs	34
2.6 Parâmetros populacionais relativos aos Y-STRs	36
2.6.1 Determinação das frequências dos alelos e haplótipos	37
2.6.2 Diversidade gênica	37
2.6.3 Diversidade haplotípica	38
2.6.4 Capacidade ou poder de discriminação (CD)	38
2.7 Da análise de Y-STR e bases de dados genéticos	38

CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX DO TIPO MINI-YSTR

RESUMO	41
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Amostras biológicas	45
2.2 Construções dos Locos de MiniY- STR	45

2.2.1 Seleção dos locos de Y-STR	45
2.2.2 Desenho dos iniciadores (primers)	46
2.3 Amplificação através da reação em cadeia de polimerase-PCR	48
2.3.1 Para o Mini Y-STR em sistemas monoplex	48
2.3.2 Para o sistema multiplex Mini-YSTR, Mini YSTR09	49
2.4 Teste de temperatura de anelamento dos primers	49
2.5 Preparação das amostras (produto da PCR) e detecção por eletroforese capilar	49
2.5.1 Análise dos produtos de PCR	50
2.6 Construção dos bins	50
2.7 Etapas de validação	50
2.7.1 Teste de sensibilidade	50
2.7.2 Teste de mistura	51
2.7.3 Teste em amostras de DNA degradado	51
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 Desenvolvimento do sistema Multiplex	53
3.1.1 Desenho dos <i>primers</i> , amplificação do monoplex e multiplex e eletroforese capilar	57
3.1.2 Desenho dos <i>primers</i> e análise do multiplex Mini YSTR09	56
3.1.3 Estratégias de validação	57
3.1.3.1. Teste de sensibilidade	57
3.1.3.2. Teste de mistura	58
3.1.4 Teste em amostras biológicas	61
4.CONCLUSÃO	65

CAPÍTULO II: ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA CIDADE DE MANAUS

RESUMO	66
ABSTRACT	67
1.INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Amostras biológicas	70

2.2 Coleta das amostras	70
2.2.1 Extração de DNA	70
2.2.2.Determinação da concentração de DNA	70
2.3 Amplificação das regiões STR do cromossomo Y	71
2.3.1 Sistemas de amplificação multiplex utilizados	71
2.3.2 Reação de amplificação dos sistemas multiplexs	72
2.4 Preparação das Amostras (Produto de PCR) e detecção por eletroforese Capilar	73
2.5 Análise dos produtos de PCR	73
2.6 Análises estatísticas	72
3. RESULTADOS	75
3.1 Determinação das frequências dos alelos e da diversidade gênica	75
3.2 Determinação das frequências de haplótipos do cromossomo Y na amostra populacional estudada.	80
3.3 Diversidade haplotípica	82
3.4 Capacidade de discriminação	83
4 DISCUSSÃO	84
4.1 Estudo da População da Cidade de Manaus	84
4.2 Análises estatísticas	84
4.2.1 Frequência Alélica e diversidade gênica	84
4.2.2 Diversidade e frequência haplotípica	88
4.2.3 Capacidade de discriminação	88
5. CONCLUSÃO	93
6. CONSIDERAÇÕES FINAS	95
7. PERSPECTIVAS	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	116

RESUMO GERAL

Metodologias para análise molecular relacionadas com estudos populacional e forense, têm sido desenvolvidas a partir de marcadores de microssatélites (STRs) e as aplicações desses marcadores, potencializam os sistemas de amplificação por PCR, seja utilizando apenas um par de STRs (*monoplex*) ou vários STRs (*multiplex*). Para a identificação humana por DNA, os primeiros sistemas multiplex foram estabelecidos com STRs de cromossomos autossomônicos, seguidos do uso de STRs de tamanho reduzido, conhecidos como Mini-STRs. Posteriormente, para o cromossomo Y, foram desenvolvidos os Y-STRs, os Mini-YSTRs e mais recentemente o uso dos YSTR de mutação rápida (RM)-YSTR. E por não existirem dados com STRs do cromossomo Y na população da Cidade de Manaus, o estudo com tais marcadores torna-se relevante. Assim, os objetivos deste trabalho foram desenvolver um sistema multiplex do tipo MiniY-STR para avaliar a eficiência na amplificação de amostras de casos forenses (DNA degradado) e além disso, em conjunto com o Kit comercial *PowerPlex®Y23 System* (Promega), determinar a frequência haplotípica da população da cidade de Manaus. Para tanto, foi construído um sistema multiplex “*in house*” denominado Mini YSTR09, contendo 9 locos de Mini-YSTR e (RM)-YSTR (Capítulo I). Para a validação, foram realizados testes de sensibilidade, de detecção em amostras com misturas e testes em amostras de DNA degradado (98 amostras de osso humano), conforme recomendação do SWGDAM. O multiplex foi capaz de amplificar todos os 09 (100%) locos nos sistemas de mistura de DNA e nos sistemas com amostras de DNA degradado (69,4%). Para o estudo populacional (capítulo II), as 214 amostras de sangue coletadas de indivíduos do sexo masculino não relacionados geneticamente, foram extraídas com kits comerciais e os produtos amplificados por PCR (31 Y-STRs em três grupos), foram submetidos a eletroforese capilar no sequenciador ABI 3500 e analisados no software *Genemapper v. 4,1*. 204 amostras foram tipadas com o kit comercial (grupo I), 189 com o Mini YSTR09 (grupo II) e 168 com o conjunto desses dois multiplexs, Kit comercial mais o Mini YSTR09 (grupo III). A presença de haplótipos únicos nos grupos I, II e III foi de 202, 181 e 168, respectivamente. A maior diversidade gênica foi dos DYS626, DYS570, DYS576 e DYS447, para o grupo I; dos DYS385, DYS570, DYS458, DYS481 e DYS456 para o grupo II e DYS385, DYS461, DYS626, DYS458, DYS576, DYS447 e DYS456 para o grupo III, sendo o DYS447, entre os mais polimórficos quando das análises no grupo I e III. Portanto, a aplicação do multiplex Mini YSTR09 aqui desenvolvido, possibilitou a amplificação desse DNA em quantidades mínimas e degradado e além disso, para as

análises populacionais proporcionou uma maior capacidade de discriminação quando foi utilizado em conjunto com o kit comercial *PowerPlex® Y23 System*, destacando-se os locos DYS447, DYS570, DYS576 e DYS626.

Palavras-chave: Mini –YSTR; DNA degradado; Haplótipos

ABSTRACT

Methodologies for molecular analysis population and forensic studies, have been developed based on microsatellites or STRs. The application of the markers, enhance the PCR amplification system, utilizing only one pair of primers (monoplex), or several pairs (multiplex). For human identification by using DNA techniques, the first multiplex system were stabilized with STRs on autossomal chromosomes followed by using of reduced-size STRs (Mini-STRs). Then to the Y chromosome, have been developed the Y-STRs, mini-YSTRs and more recently the rapidly mutating (RM)-YSTRs. However, there are no studies using STRs on Y chromosome for the population of Manaus city, the objective of this study was developed a multiplex system Mini-YSTR to evaluate the amplification efficiency of degraded forensic DNA samples. In addition, to determine haplotype frequency of the population in Manaus, a commercial Kit *PowerPlex ® Y23 System* (Promega) was used. Therefore, was developed a multiplex system denominated Mini YSTR09, combining nine mini-YSTR markers and (RM)-YSTR (Chapter I). For validation, tests to evaluate sensitivity, tests of detection sample containing mixtures and tests of degraded forensic DNA samples (98 samples of bones human) were conducted, by SWGDAM procedures. The multiplex was able to amplified 09 (100%) in a DNA mixture system and in 64,4% of degraded forensic DNA samples. For the population studies (chapter II), 214 blood samples were collected of male people, not correlated genetically. All samples were extracted by using commercial kits and the amplified PCR products (31 Y-STRs in three different groups) and they are subjected to capillary electrophoresis in ABI 3500, automatic DNA sequence and analyzing in Genemapper v.4.1 software. 204 DNA samples were typed with the commercial kit (group I), 189 with the Mini YSTR09 (group II) and 168 with the set (Mini YSTR09 more commercial Kit *PowerPlex ® Y23 System*), (group III). Results demonstrated the existing unique haplotypes in group I, II e III of the 202, 181 e 168, respectively. The greatest genetic diversity was found in loci DYS626, DYS570, DYS576, DYS447 (group I); DYS385, DYS570, DYS458, DYS481 e DYS456 (group II) e DYS385, DYS461, DYS626, DYS458, DYS576, DYS447 e DYS456 (group III). The locus DYS447, is the most polymorphic of group I and III. Therefore, the use of multiplex Mini YSTR09 developed made possible the forensic DNA samples amplification and for population analysis, provided a higher capacity of discrimination, when it was used in addition with the commercial kit *PowerPlex ® Y23 System*, highlighting the loci DYS447, DYS570, DYS576, DYS626.



Universidade Federal do Amazonas

Biblioteca Digital de Teses e Dissertações



**CONTEÚDO INDISPONÍVEL
PARTE DA PUBLICAÇÃO NÃO AUTORIZADA PELO AUTOR**