



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

Estudo Genético-Populacional dos Principais Grupos de Moçambique-Aplicação Forense

Armando Cinturão Semo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Biomédicas

(2º Ciclo de Estudos)

Orientadores

Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves - Faculdade de Medicina da
Universidade de Coimbra

Doutora Ana Mónica de Oliveira e Silva Rodrigues Garcia Ramos de Carvalho -
INML, Delegação do Centro- Serviço de Genética e Biologia Forense - Coimbra,
Portugal

Professora Doutora Isabel Maria Theriaga Gonçalves - Faculdade de Ciências de
Saúde da Universidade da Beira Interior

Covilhã, Junho de 2013

Dedicatória

Aos meus pais, **Cinturão Semo** (*in memorian*), e **Elina António Macaza**, que tudo fizeram na construção da minha personalidade.

À minha esposa **Rosária Chico Chingore Augusto**, que tem sido o melhor acontecimento na minha vida e o melhor presente da parte de Deus.

Aos meus filhos **Emanuel, Elina e Azaiel**

Agradecimentos

À Deus, que me proporciona saúde e energia necessárias para seguir em frente e realizar as tarefas que só ELE tem exclusivo domínio.

Ao Instituto Português de Apoio ao Desenvolvimento (IPAD), pelo financiamento da bolsa de estudos.

Ao Professor Doutor Duarte Nuno Vieira - Presidente do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP., pela simpatia, oportunidade concedida e pela vontade expressa em apoiar a Genética Forense em Moçambique.

Ao Professor Doutor Luís Taborda Barata - Presidente da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, pela confiança, encorajamento e apoio.

Ao Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves - Diretor da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP., pela amizade, disponibilidade e oportunidade dada para realizar este trabalho no Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP.

À Doutora Ana Mónica de Oliveira e Silva Rodrigues Ramos de Carvalho, pela colaboração, paciência e apoio técnico científico na análise crítica do trabalho.

À Professora Doutora Isabel Maria Theriaga Gonçalves, pela confiança que teve neste projeto, mostrando sua total disponibilidade, apoio e encorajamento.

Ao Professor Doutor Ilídio Joaquim Sobreira Correia, pelo apoio e disponibilidade.

À Doutora Maria João Anjos - Diretora do Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP., pela simpatia e encorajamento.

À Dr^a. Virgínia Lopes, pela colaboração no tratamento estatístico dos dados e disponibilidade.

À Mestre Lisa Cristina Longo Andrade Sampaio, pelo apoio e análise crítica do trabalho.

Ao Dr. Armando Serra, pelo apoio técnico científico.

À Dr^a. Filipa Balsa, pelo apoio técnico e pronta disponibilidade durante o tempo de integração.

À Dr^a. Vanessa Bogas e ao Mestre Pedro Brito, pela amizade, apoio técnico e palavras de encorajamento.

À toda equipe do pessoal técnico e administrativo do Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP., pela simpatia, amizade e apoio.

Ao Dr. Badrudino Rugnate - Chefe do Departamento da Saúde do Ministério do Interior de Moçambique, pelo apoio e encorajamento.

Ao camarada Clayton Emanuel Rodrigues, pela amizade, companheirismo e solidariedade.

Aos colegas do Centro de Saúde da Polícia da República de Moçambique - Cidade de Maputo, pela confiança.

Ao Departamento de Saúde do Comando Provincial da Polícia da República de Moçambique - Nampula, pela pronta disponibilidade e apoio.

À toda equipe do Centro de Saúde da Polícia da República de Moçambique - Cidade de Nampula, pelo apoio.

Ao Sr. **Seck Wing** Fone - Diretor Geral da Mozambique Scientific, pela disponibilidade e apoio.

À **minha família** especialmente, minha esposa e companheira **Rosária Chico Chingore Augusto** e os meus filhos, que sempre tiveram paciência pela minha ausência nos momentos em que mais precisaram de mim, muito obrigado.

Finalmente gostaria de agradecer a todos, que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

Resumo

O presente estudo teve lugar no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, em Coimbra, com o objetivo de caracterizar a diversidade genética dos principais grupos populacionais de Moçambique, nomeadamente Macua e Changana.

Para o efeito, foram analisados 15 *loci* STR autossómicos (D8S1779, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 e FGA assim como a amelogenina, em 160 amostras de indivíduos não aparentados de ambos os sexos das cidades de Maputo e Nampula. Foram colhidas amostras de sangue, depois da confirmação do grupo populacional e de obtido o consentimento informado. A extração do ADN foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Walsh *et al.* (1991). As amostras extraídas foram amplificadas usando o kit *AmpFISTR® Identifiler® Direct* (ABI). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese capilar (usando um padrão interno *GeneScan™ 500 Size Standard* e a designação alélica foi feita utilizando um *ladder* alélico) no sequenciador automático *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer*. As frequências alélicas, os parâmetros estatísticos de interesse forense bem como o valor *P* do teste exacto de Fisher para a verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, foram calculadas usando o algoritmo das cadeias de Markov no programa *ARLEQUIN* versão 3.11. As distâncias genéticas entre a população de Moçambique e as de alguns países de África, América Latina e Europa foram calculadas usando o programa *PHYLIP* versão 3.68 de acordo com o algoritmo *Neighbor-Joining*. Para o cálculo do valor exacto da probabilidade *P* das cadeias de Markov, foi usado o módulo *STRUC* do programa *GENEPOP* versão 4.1.4. A árvore filogenética foi gerada no programa *TreeView* versão 1.5.2.

As frequências alélicas nos 15 *loci* STR autossómicos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P > 0.05$) apresentando um poder de discriminação acumulado de 0.9999999997 e uma probabilidade de exclusão *a priori* acumulada de 0.999999466. Não foram encontradas diferenças genéticas significativas entre a população Macua e Changana ($P > 0.05$). A análise filogenética revela que a população de Moçambique se encontra geneticamente próxima de outras populações africanas (Angola, Guiné Equatorial, Uganda, Namíbia e Somália), distinguindo-se do grupo formado pelas populações da América Latina (Brasil, Venezuela, México, Argentina) e as europeias (Grécia, Polónia, Croácia, Servia-Montenegro, Suécia, Bélgica e Portugal). Os *loci* FGA e D21S11 apresentaram as variantes alélicas 16.1 e 24.3 respetivamente. Das 160 amostras analisadas, 6 exibiram um padrão trialélico no *locus* TPOX, sendo duas do sexo masculino e quatro do sexo feminino.

Palavras-chave: *Short Tandem Repeat, AmpFISTR® Identifiler® Direct PCR amplification kit, Frequências alélicas, Genética Forense, Moçambique.*

Abstract

This study took place at the Centre Branch of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Coimbra-Portugal, in order to characterise the genetic diversity of the main Mozambican's population groups namely, Macua and Changana.

For this purpose, 15 autosomal STR *loci* D8S1779, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 and FGA as well as amelogenin were analyzed in 160 samples from unrelated individuals of both sex from Maputo and Nampula cities. Blood samples were collected after confirmation of ethnicity and informed consent has been given.

Nuclear DNA was extracted by Chelex as proposed by Walsh *et al.* (1991). Samples were amplified using the AmpFISTR® Identifiler® Direct® PCR amplification kit. PCR products were detected and separated by capillary electrophoresis using an ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer.

Allelic frequencies, statistical parameters of forensic interest as well as unbiased estimates of Hardy-Weinberg exact P -value were assessed using the Markov chain algorithm with ARLEQUIN software version 3.11. Genetic distances between our population and those from Africa, Latin America and Europe were calculated using PHYLIP software version 3.68 according to neighbor-joining algorithm. *Locus by locus* computation of unbiased estimate of exact P -values of the probability test was assessed using Markov chains algorithm with the STRUC module of GENEPOP software version 4.1.4. Phylogenetic tree was visualized using TreeView Software version 1.5.2.

Allele frequencies in the 15 analyzed loci are in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$), the power of discrimination and combined probability of exclusion are 0.9999999997 and 0.999999466 respectively. There are no statistical differences between Macua and Changana Mozambican's populations ($P > 0.05$). According to phylogenetic analysis, both Mozambican's populations are genetically close to those from Africa (Angola, Uganda, Equatorial Guinea, Namibia and Somali) distinguishing themselves from Latin American (Brazil, Venezuela, Mexico and Argentina) and European (Greek, Poland, Croatia, Serbia-Montenegro, Sweden, Belgium and Portugal) populations. The allele's variants 16.1 and 24.3 at *loci* FGA and D21S11 respectively, were detected. Tri-allelic patterns at TPOX *locus* were found in six samples from two males and four females.

Keywords: Short Tandem Repeat, AmpFISTR® Identifiler® Direct PCR amplification kit, Allelic frequencies, Forensic Genetics, Mozambique

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Moçambique.....	1
1.1.1. Contexto Geográfico	1
1.1.2. Primeiros Habitantes de Moçambique.....	3
1.1.3. População de Moçambique.....	5
1.2. O Genoma Humano.....	6
1.2.1. O Ácido Desoxirribonucleico (ADN).....	8
1.2.2. Marcadores Genéticos - STR (<i>Short Tandem Repeats</i>).....	10
1.3. Genética Populacional.....	16
1.3.1. Princípios estatísticos da Genética Populacional.....	16
1.3.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e parâmetros de interesse forense	16
1.4. Determinação de um Perfil Genético e sua Aplicação Forense.....	19
2. Justificação e Objetivos	21
2.1. Objetivos.....	22
2.1.1. Gerais.....	22
2.1.2. Específicos	22
3. Material e Métodos	23
3.1. Amostragem.....	23
3.2. Processamento Laboratorial	25
3.2.1. Extração do ADN	25
3.2.2. Amplificação do ADN.....	28
3.2.3. Separação, Detecção dos Fragmentos e Designação Alélica.....	31
3.3. Análise Estatística	37
4. Resultados.....	39
4.1. Frequências Alélicas e Equilíbrio de Hardy-Weinberg	39
4.2. Parâmetros de Interesse Forense	40
4.3. Variantes Alélicas	41
4.4. Padrões Trialélicos no <i>Locus</i> TPOX.....	42
4.5. Estudos Comparativos	43
5. Discussão	48
5.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg	48
5.2. Parâmetros de Interesse Forense	48

5.3. Variantes Alélicas	49
5.4. Padrão Trialélico no <i>Locus</i> TPOX	49
5.5. Estudos Comparativos	50
6. Conclusões	52
7. Perspetivas.....	53
8. Referências	54
9. Anexos	59

Lista de Figuras

FIGURA 1. LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DE MOÇAMBIQUE	1
FIGURA 2. DIVISÃO ADMINISTRATIVA DE MOÇAMBIQUE.....	2
FIGURA 3. OS KHOISAN.....	3
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DA EXPANSÃO BANTU	4
FIGURA 5. O GENOMA HUMANO	6
FIGURA 6. ESTRUTURA BÁSICA DE UM CROMOSSOMA E NOMENCLATURA	7
FIGURA 7. COMPONENTES BÁSICOS DO ADN	8
FIGURA 8. EMPARELHAMENTO DAS BASES PARA FORMAR A DUPLA HÉLICE DA MOLÉCULA DO ADN	9
FIGURA 9. OS POLIMORFISMOS DE ADN	10
FIGURA 10. TIPOS DE MICROSATÉLITES (STR)	11
FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO DOS STUTTER.....	11
FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UM ELETROFEROGRAMA OBTIDO POR ELETROFORESE CAPILAR	13
FIGURA 13. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO QUADRO DE PUNNETT.	17
FIGURA 14. ETAPAS ENVOLVIDAS NO EXAME DE ADN.....	19
FIGURA 15. DIFERENTES TIPOS DE ZARAGATOAS	24
FIGURA 16. AMOSTRA DE SANGUE EM PAPEL DE FILTRO	24
FIGURA 17. ESTRUTURA DO CHELEX [®] COM O AUMENTO DO PH.....	25
FIGURA 18. A EXTRAÇÃO POR CHELEX [®] . ADAPTADO DE BUTLER (2012).....	26
FIGURA 19. A TÉCNICA TAQMAN 5´NUCLEASE.	26
FIGURA 20. VARIAÇÃO DAS TEMPERATURAS AO LONGO DOS CICLOS DA PCR.....	29
FIGURA 21. ESPECTRO DE EMISSÃO DOS CINCO MARCADORES FLUORESCENTES USADOS NO KIT AMPFLSTR [®] IDENTIFILER [®] DIRECT	30
FIGURA 22. REPRESENTAÇÃO DO INTERIOR DE UM CAPILAR.....	32
FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO DOS INSTRUMENTOS PARA A ELETROFORESE CAPILAR USADO NA ANÁLISE DO ADN	33
FIGURA 24. SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DOS ALELOS NOS SISTEMAS DE ELETROFORESE CAPILAR.....	34
FIGURA 25. OS LOCI STR AUTOSSÓMICOS AMPLIFICADOS PELO KIT AMPFLSTR [®] IDENTIFILER [®] DIRECT	35
FIGURA 26. PADRÃO TRIALÉLICO NO LOCUS TPOX.....	42
FIGURA 27. ÁRVORE FILOGENÉTICA	47

Lista de Tabelas

TABELA 1. <i>LOCi</i> DOS STRs AUTOSSÓMICOS	14
TABELA 2. FÓRMULAS USADAS NOS CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE DADOS POPULACIONAIS	18
TABELA 3. <i>LOCi</i> AMPLIFICADOS PELO KIT <i>AMPFLSTR® IDENTIFILER® DIRECT</i>	30
TABELA 4. CONDIÇÕES DA PCR	31
TABELA 5. CONDIÇÕES DA ELETROFORESE CAPILAR.....	36
TABELA 6. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS 15 STRs NA POPULAÇÃO DE MOÇAMBIQUE	39
TABELA 7. PARÂMETROS DE INTERESSE FORENSE EM CADA MARCADOR	40
TABELA 8. VARIANTES DE ALELOS. RESULTADOS DE VARIANTES ALÉLICOS EM DOIS MARCADORES.	41
TABELA 9. PADRÕES DE 3 ALELOS NO <i>LOCUS</i> TPOX. XX-SEXO FEMININO, XY-SEXO MASCULINO.	42
TABELA 10. TABELA MATRIZ DE DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE AS DUAS POPULAÇÕES DE MOÇAMBIQUE	43
TABELA 11. VALOR DA PROBABILIDADE ($P \pm$ DESVIO PADRÃO)	43
TABELA 12. TABELA DA MATRIZ DE DISTÂNCIAS GENÉTICAS/COMPARAÇÕES INTERPOPULACIONAIS.	44
TABELA 13. TABELA DOS VALORES DA PROBABILIDADE ($P \pm$ DESVIO PADRÃO)	45
TABELA 14. GENOTIPAGEM DE 160 AMOSTRAS DOS PRINCIPAIS GRUPOS POPULACIONAIS (MACUA E CHANGANA) DE MOÇAMBIQUE.	62

Lista de Abreviaturas

µl - microlitro

6-FAMTM - marcador de fluorescência

A - Adenina

ABI - *Applied Biosystems*

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

C - Citosina

CODIS - *Combined DNA Index System*

dNTP - *Desoxynucleotide Triphosphate*

G - Guanina

He - Heterozigosidade esperada

Ho - Heterozigosidade observada

INML - Instituto Nacional de Medicina Legal

ISFG - *International Society of Forensic Genetics*

LIZ[®] - marcador de fluorescência

ml - mililitro

NEDTM - marcador de fluorescência

pb - pares de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PET[®] - marcador de fluorescência STR - *Short Tandem Repeat*

T - Timina

VIC[®] - marcador de fluorescência

VNTR - *Variable Number of Tandem Repeat*

1. Introdução

1.1. Moçambique

1.1.1. Contexto Geográfico

A República de Moçambique é um país da região austral de África, situado na costa Sudeste (Figura 1), entre os paralelos 10° 27'e 26° 52' de Latitude Sul e entre os meridianos 30° 12' e 40° 51 de Longitude Este. Faz fronteira a Norte com a República da Tanzânia, a Noroeste com o Malawi e a Zâmbia, a Oeste com o Zimbabwe e a República da África do Sul e a Sul com a Suazilândia e novamente com a África do Sul, a Este é banhado pelo oceano Índico, com uma extensão de cerca de 2.470 quilómetros. Moçambique apresenta uma área aproximada de 799.380Km². O clima é geralmente tropical e húmido. Administrativamente é dividido em 11 províncias distribuídas em três zonas, nomeadamente, a norte que inclui as províncias de Niassa, Cabo Delgado e Nampula; a zona centro com as províncias da Zambézia, Tete, Manica e Sofala e finalmente a zona sul que engloba as províncias de Inhambane, Gaza, Maputo e a Cidade do Maputo (Figura 2).



Figura 1. Localização geográfica de Moçambique

<http://www.portaldogoverno.gov.mz/Mozambique>



Figura 2. Divisão administrativa de Moçambique.

<http://www.portaldogoverno.gov.mz/Mozambique>.

1.1.2. Primeiros Habitantes de Moçambique

Moçambique apresenta uma costa baixa, cortada por planícies de aluvião e parcialmente separada do oceano Índico por um cordão de dunas. Esta configuração confere à região uma grande fertilidade, ostentando grandes extensões de savana com muitos animais selvagens, condições para a fixação de povos caçadores-recoletores e mais tarde para o desenvolvimento da agricultura (<http://www.portaldogoverno.gov.mz/Mozambique>).

Toda a região a sul do deserto de Sahara, de onde Moçambique faz parte, é habitada por população de origem Bantu. A expansão Bantu foi um movimento de povos que terá espalhado as línguas Bantu em praticamente toda a África Subsaariana, levando à substituição de todos os povos que habitavam esta região, nomeadamente os povos Khoisan que eram caçadores-recoletores (**Figura 3**) (Firmino, 2011).

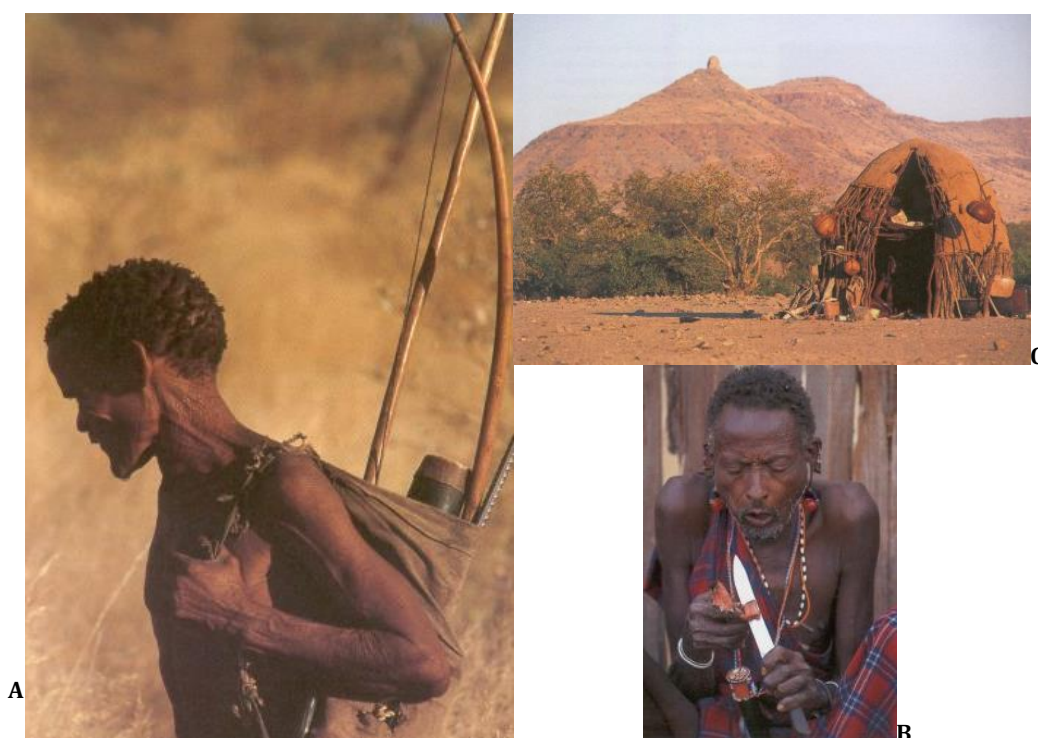


Figura 3. Os Khoisan, (A) Um caçador (B) Produzindo utensílio (C) Uma habitação típica.

<http://www.khoisan.org/social.htm>

Acredita-se que os povos Bantu sejam originários do vale do rio Benue, uma região situada entre o sudeste da Nigéria e noroeste de Camarões, de onde teriam saído rumo ao sul do continente Africano seguindo duas rotas distintas, a rota Oeste e a rota Este (Figura 4). O sucesso da expansão Bantu pode ter sido favorecido pelo domínio das técnicas de ferro e da agricultura em meados do primeiro milénio. Caracteristicamente, os Bantu constituem um grupo etnolinguístico que habita toda a África Subsaariana englobando cerca de 400 subgrupos etnolinguísticos que partilham usos e costumes (Pereira *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2002; Plaza *et al.*, 2004; Berniell-Lee *et al.*, 2009 e Montano *et al.*, 2011).



Figura 4. Representação da expansão Bantu. Na figura está assinalado o provável centro de origem Bantu ao longo do rio Benue entre Nigéria e Camarões. A expansão Bantu ocorreu seguindo duas rotas distintas, a rota Oeste e a rota Este em direção ao sul do continente. Adaptado de Gomes (2011).

1.1.3. População de Moçambique

A população moçambicana é estimada em 24.366.000 de habitantes (Chipembe *et al.*, 2012). Além do Português, a maioria da população é falante de línguas Bantu (91%). As línguas bantu mais faladas são Emákhua (Macua), Xichangana (Changana), Elomwe (Lomwé), Cisená (Sena) e Echuwabo (Chuabo), com 26%, 11%, 8%, 7% e 6% respetivamente, de indivíduos que têm estas línguas como língua materna, totalizando 58%, contra 33% correspondentes às restantes línguas Bantu. Os grupos etnolinguísticos de Moçambique encontram-se distribuídos nas três grandes regiões. Assim, aqueles que falam as línguas Macua, Maconde, Jauá e Suahíli, encontram-se maioritariamente a norte (Nampula, Cabo-Delgado e Niassa); a zona centro (Zambézia, Tete, Manica e Sofala) é maioritariamente habitada por aqueles que falam as línguas Chuabo, Nhungwe, Ngoni, Shona, Sena e Ndau; a Sul (Inhambane, Gaza e Maputo) encontram-se os que falam as línguas Tsongas (Chope, Tsua, Changana, Ronga) e Bitonga (Firmino, 2011 e <http://www.portaldogoverno.gov.mz/Mozambique>).

1.2. O Genoma Humano

O genoma é o conjunto de todo o ADN (ácido desoxirribonucleico) de um indivíduo. Nas células humanas, o ADN pode ser nuclear, quando se encontra no núcleo e mitocondrial, quando encontrado nas mitocôndrias. O ADN nuclear organiza-se em cromossomas, associados a histonas, as quais têm a função de proteger o ADN. O genoma humano nuclear consiste em 22 pares de cromossomas autossómicos e um par de cromossomas sexuais (**Figura 5**).

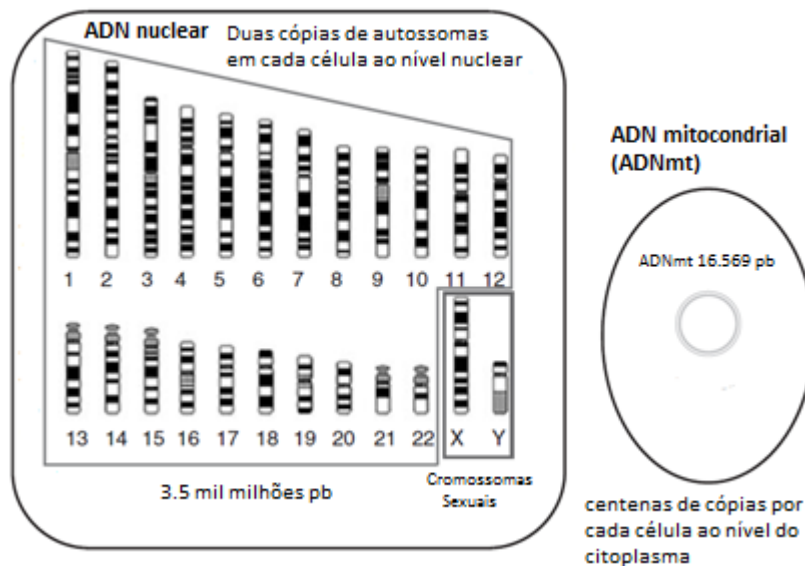


Figura 5. O genoma humano, presente em cada célula, consiste em 23 pares de cromossomas (22 autossómicos e o par de cromossomas sexuais), presentes no núcleo e o ADN mitocondrial, localizado nas mitocôndrias. A enumeração dos cromossomas, de 1 a 22, é feita de acordo com o tamanho relativo. Durante a fecundação, uma cópia é transmitida pela mãe e outra pelo pai do indivíduo. O ADN mitocondrial é transmitido via materna. Adaptado de Butler (2010).

Indivíduos do sexo masculino caracterizam-se por possuírem uma cópia dos cromossomas X e Y, enquanto os do sexo feminino possuem duas cópias do cromossoma X. Todas as células do organismo (células somáticas) estão num estado diplóide, pelo facto de coexistirem duas cópias de cromossomas, enquanto o espermatozóide e o óvulo estão num estado haplóide, por possuírem somente uma cópia de cada cromossoma. A combinação do óvulo com o espermatozóide resulta num zigoto (célula diplóide) (Butler, 2010).

O ADN é composto por regiões codificantes e não codificantes. As regiões codificantes possuem informação para a síntese de proteínas, e consistem em exões (porções com códigos para proteínas) e intrões (sequências intercalares). Cerca de 5% do genoma humano é constituído por região codificante e o restante corresponde a região não codificante. Os marcadores genéticos usados em genética forense são encontrados nas regiões não codificantes do genoma humano. A localização do marcador genético é denominada por *locus* (plural: *loci*). Os

cromossomas no genoma humano encontram-se agrupados dois a dois, por tamanho e estrutura, sendo designados por homólogos. Uma cópia de cada marcador genético encontra-se na mesma posição (*locus*) em cada par de cromossomas homólogos (Butler, 2010).

Alelo é a forma alternativa de um gene ou *locus* genético. Genótipo é a caracterização dos alelos presentes num *locus* genético. Se num *locus* de cromossomas homólogos existirem dois alelos, *A* e *a*, existem 3 genótipos possíveis: *AA*, *Aa*, e *aa*. Os genótipos *AA* e *aa* são homozigóticos por os alelos serem idênticos, enquanto o genótipo *Aa* é heterozigótico por os alelos serem diferentes. As regiões básicas de um cromossoma estão ilustradas na **Figura 6**. No centro encontra-se a região chamada de centrómero, responsável por controlar os movimentos do cromossoma durante a divisão celular. O braço curto do cromossoma é abreviado com a letra 'p', enquanto o braço longo é abreviado pela letra 'q'. O mapeamento dos marcadores do ADN é feito usando padrões das bandas ao nível do cromossoma metafásico. As bandas são classificadas de acordo com a sua posição relativa nos braços, curto (p) e longo (q), de um cromossoma específico. Assim, a localização 12p1 significa banda 1 no braço curto (p) do cromossoma 12. O número das bandas aumenta do centrómero para os telómeros do cromossoma, ou seja, para as extremidades. Depois de uma coloração adicional, os componentes de uma banda múltipla terão a nomeação p11, p12,..., se o desenvolvimento das técnicas melhorar a resolução, as sub-bandas visualizadas terão a designação p11.1, p11.11, e assim em diante. Para os marcadores localizados no final do braço do cromossoma será usado o sufixo 'ter' (ex: 15qter). Se o mapeamento de um dado marcador não for exato, a localização será anotada na forma de um intervalo (ex: 21q11.2-q21) (Butler, 2005 e Butler, 2010).

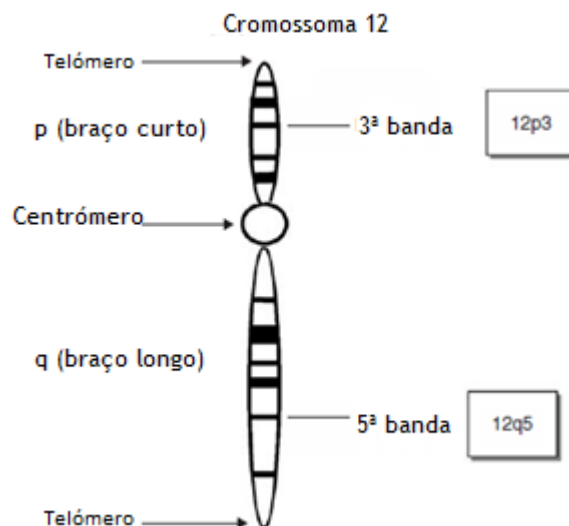


Figura 6. Estrutura básica de um cromossoma e nomenclatura. O centrómero tem o papel importante durante a divisão celular. Do centrómero para a periferia o cromossoma estende-se em dois braços cujas terminações são referidas por telómeros. O braço curto é representado pela letra (p), enquanto o braço longo pela letra (q). A enumeração das bandas é feita do centrómero para a periferia. Adaptado de Butler (2010).

1.2.1. O Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

O corpo humano é uma associação de células. No núcleo das células encontra-se o ADN (ácido desoxirribonucleico) contendo o código genético para a multiplicação celular e para a transmissão das características individuais aos descendentes. Uma das finalidades do ADN é a replicação para que cada célula filha, no final da divisão celular, receba uma cópia de ADN idêntica à da célula mãe. A outra finalidade é a de transportar instruções essenciais para a síntese de proteínas. Metade da informação genética presente no ADN de um indivíduo é do seu pai e a outra metade da sua mãe.

A nível estrutural, o ADN é constituído por nucleótidos os quais são compostos por uma base azotada, um açúcar (pentose) e um fosfato. As bases variam ao longo da estrutura do ADN e a molécula de açúcar e de fosfato mantêm-se constantes. As bases azotadas são: A (adenina), T (timina), C (citosina) e G (guanina). A diversidade dos seres vivos é resultante da combinação dos quatro nucleótidos, os quais adquirem o nome da respetiva base azotada. A sequência do ADN é replicada a partir da posição cinco linha (5') para a posição três linha (3'). Essa enumeração tem em conta a estrutura química do ADN e refere-se à posição do átomo de carbono na molécula do açúcar (**Figura 7**).

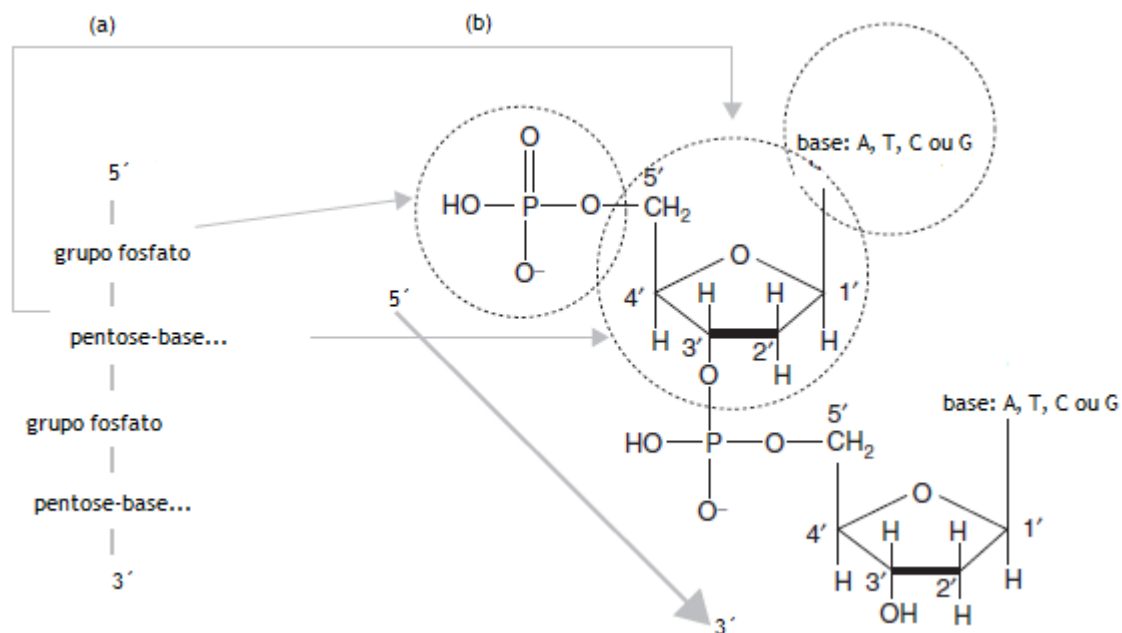


Figura 7. Componentes básicos do ADN: (a) representação esquemática do esqueleto do ADN, onde as bases se ligam à molécula do açúcar, (b) estrutura química das moléculas de fosfato e açúcar ilustrando a enumeração dos átomos de carbono. A sequência do ADN é convencionalmente escrita de 5' para 3'. Adaptado de Butler (2010).

No estado natural, a molécula do ADN é composta por duas cadeias ligadas entre si por um processo conhecido como hibridização. Os nucleótidos emparelham-se com os seus complementares através de pontes de hidrogénio. Adenina liga-se com Timina através de duas pontes de hidrogénio e Citosina com Guanina através de três pontes de hidrogénio (Figura 8). As duas cadeias são antiparalelas, sendo que uma cadeia tem orientação 5' - 3' e a outra apresenta uma orientação oposta, 3' -5' (Butler, 2010).

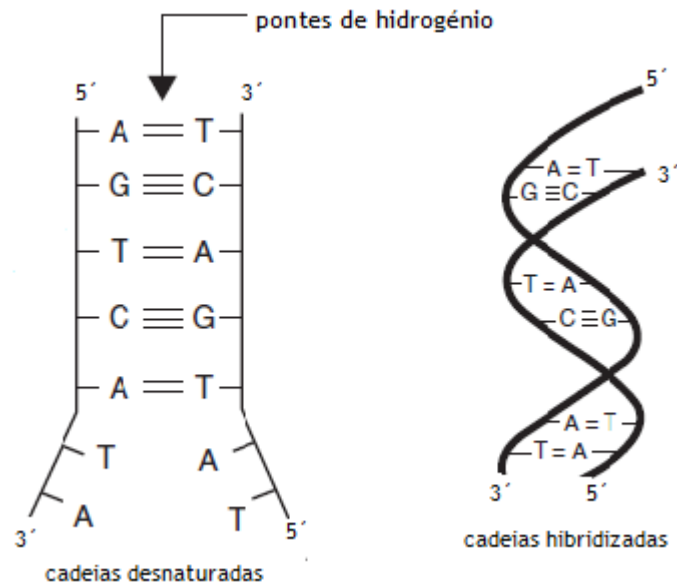


Figura 8. Emparelhamento das bases para formar a dupla hélice da molécula do ADN. Adaptado de Butler (2010).

A hibridização das duas cadeias é uma propriedade fundamental do ADN, no entanto, as pontes de hidrogénio entre as bases podem ser quebradas pelo processo conhecido por desnaturação, e para este efeito, a molécula do ADN é aquecida a 95°C. A dupla hélice pode também sofrer desnaturação quando exposta a agentes químicos como ureia, formamida e solução salina de fraca força iónica, que desestabilizam a molécula do ADN formando pontes de hidrogénio com as bases, limitando desta forma a sua associação com a cadeia complementar (Butler 2005, Butler 2010).

1.2.2. Marcadores Genéticos - STR (*Short Tandem Repeats*)

Um dado *locus* é polimórfico (variável) numa população se existirem pelo menos dois alelos sendo um deles com uma frequência igual ou superior a 1%. Os polimorfismos correspondem a variações ao nível de sequência e ao nível do tamanho da molécula de ADN. Assim, existem duas formas de polimorfismos: os polimorfismos de sequência que consistem na troca de uma base por outra numa determinada posição da molécula de ADN e os polimorfismos de comprimento que são variações na molécula de ADN como consequência de uma deleção ou inserção de uma ou mais bases, bem como no número de unidades de repetições das bases que são inseridas (**Figura 9**).

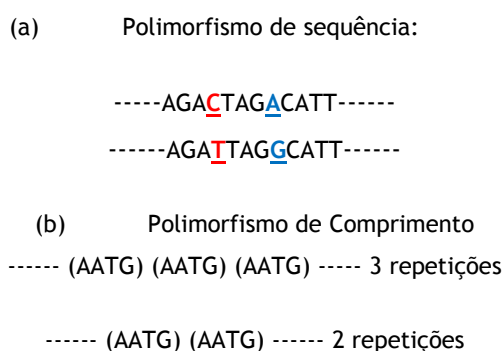


Figura 9. Os polimorfismos de ADN. (a) Polimorfismos de sequência; (b) Polimorfismos de comprimento. Na genética forense são mais usados os segmentos de ADN com polimorfismo de comprimento (STR - *Short Tandem Repeat*). Adaptado de Butler (2010).

O genoma dos seres eucarióticos é maioritariamente composto por sequências de ADN repetitivo, que de acordo com as unidades de repetição podem ser classificadas em satélites, minissatélites e microssatélites. O ADN satélite é encontrado à volta do centrómero e apresenta unidades de repetições na ordem de 100 a 1000 pares de bases (pb), enquanto o ADN minissatélite apresenta um comprimento médio na ordem aproximada de 10-100pb. O ADN microssatélite apresenta unidades de repetição de 2-6pb em comprimento. O número de unidades de repetição no ADN microssatélite pode ser de duas (dinucleotídeos), três (trinucleotídeos), quatro (tetranucleotídeos), cinco (pentanucleotídeos) e seis (hexanucleotídeos). Quando estas unidades de repetição se encontram seguidas (em *tandem*) os microssatélites denominam-se STRs (*Short Tandem Repeats*) (**Figura 10**) (Butler, 2010).

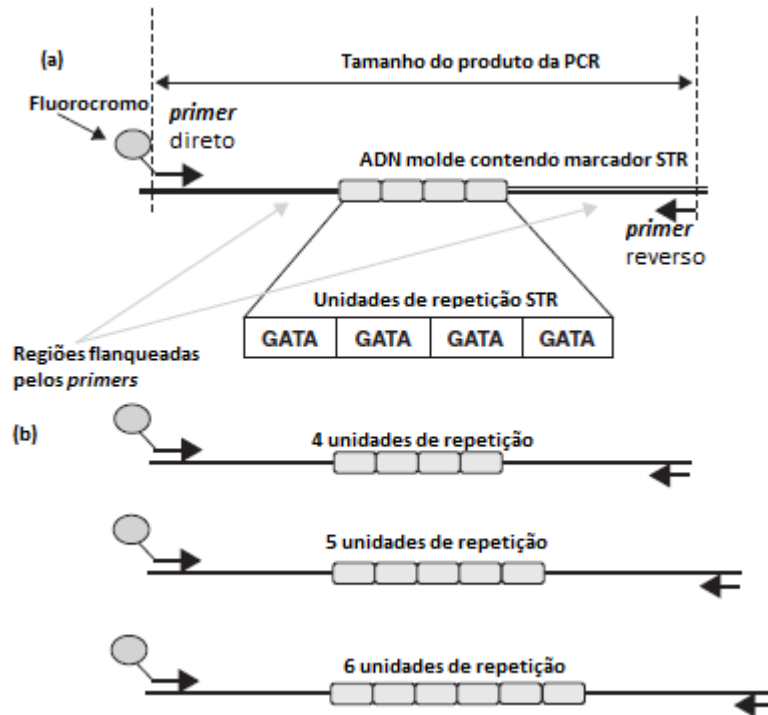


Figura 10. Tipos de microssatélites (STR). (a) Iniciadores da PCR (*Primers*) marcados com fluorocromos, flanqueiam os limites da sequência (*Flanking Regions*); (b) O número de unidades de repetições é variável, tornando os STRs marcadores eficientes na genética forense. Adaptado de Butler (2010).

Os STRs são os marcadores de eleição em genética forense devido ao seu reduzido tamanho, o que facilita a sua amplificação pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e ao elevado grau de polimorfismo evidenciado pelo número de unidades de repetição (Figura 10) (Pinheiro, 2010).

Entre os diferentes STRs, os tetranucleótidos são os mais utilizados em genética forense pelo facto dos *stutters* (produtos da PCR, que diferem do alelo verdadeiro em uma unidade de repetição, quatro pares de bases, a menos ou a mais) resultantes da sua amplificação apresentarem picos com altura inferior a cerca de 15% do alelo verdadeiro (Figura 11), enquanto nos di e trinucleótidos os *stutters* apresentam picos com altura que chega a cerca de 30% ou mais, dificultando a interpretação nos casos de amostras de misturas de material biológico (Butler, 2005 e Butler, 2010).



Figura 11. Representação dos *stutter*. Adaptado de Butler (2010).

Considerando o padrão das unidades de repetição, os STRs podem ser: simples, compostos e complexos. Os STRs simples contêm unidades de repetição iguais em tamanho e sequência. Os STRs compostos são formados por duas ou mais unidades de repetição que diferem apenas nas sequências e finalmente os complexos são constituídos por vários blocos de unidades de repetição cujos tamanho e sequências são variáveis (Butler, 2010).

Os desafios técnicos na análise dos STRs para além da formação dos *stutters* incluem, entre outros, a existência de mutações, variantes alélicas e variações no padrão alélico.

Mutações podem ocorrer ao nível das células reprodutoras ou ao nível das células somáticas. A mutação pode ocorrer mudando uma base ou toda a unidade de repetição. Os mecanismos envolvidos na mutação ainda são desconhecidos. Pensa-se que a mutação nos STR resulte do deslizamento das cadeias durante a replicação (*replication slippage*) ou de defeito na capacidade de reparação da replicação. Atualmente, estudos sugerem que a taxa de mutação é proporcional ao grau de polimorfismo (número de alelos) de cada *locus* STR, sendo maior nos alelos mais polimórficos (Butler, 2010 e Pinheiro, 2010).

Alguns *loci* STR contêm unidades de repetição incompletas. Este fenómeno resulta em variantes alélicas, ou seja, alelos que, para um dado marcador de ADN, apresentam na sua composição unidades de repetição incompletas. Por exemplo, o alelo 9.3 do *locus* TH01 contém nove repetições de tetranucleótidos e uma repetição incompleta de três nucleótidos (Butler, 2010).

A ocorrência de padrões trialélicos parece resultar da duplicação de uma sequência de ADN molde em um dos cromossomas. Existem dois tipos de padrões trialélicos: Tipo 1 e 2 (Clayton *et al.*, 2004 e Butler, 2010). No tipo 1 são identificados 3 alelos com alturas não balanceadas, em que a soma das alturas dos dois alelos menores equivale à altura do terceiro alelo maior. Foi proposto que o padrão tipo 1 é resultado de uma mutação somática num locus heterozigótico. Por outro lado, no padrão tipo 2 (Figura 12A), todos os alelos tendem a apresentar uma altura balanceada dos picos e acredita-se que esse padrão resulte de uma duplicação pontual num locus heterozigótico ao nível das células germinativas (Clayton *et al.*, 2004).

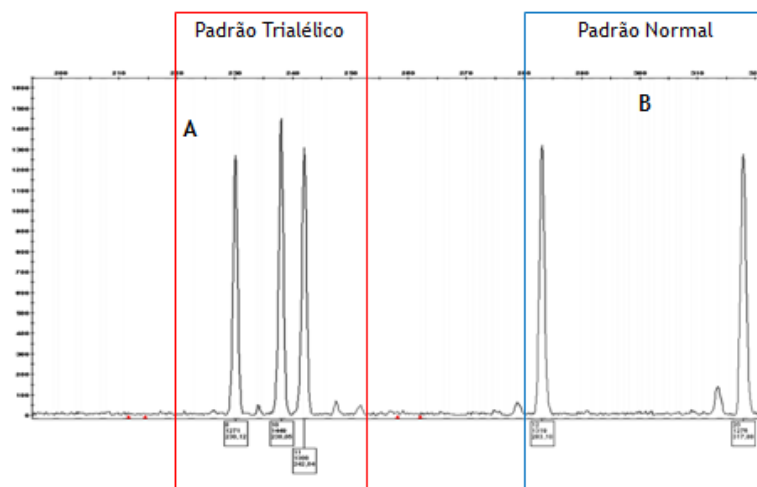


Figura 12. Representação gráfica de um eletroferograma obtido por eletroforese capilar. (A) - Alelos com o padrão de 3 alelos, (B) Alelos com o padrão de 2 alelos

STRs mais Usados em Genética Forense

Em outubro de 1998, o FBI (*Federal Bureau of Investigation*) criou uma base de dados de ADN, que em 2003 passou a ser designada por CODIS (*Combined DNA Index System*). Atualmente o CODIS é constituído por 13 *loci* nomeadamente CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 e D21S11 (Butler, 2010).

Em Junho de 2001 foi proposta a primeira lista de marcadores genéticos aos estados membros da União Europeia, para fins judiciais. Tendo em conta a relevância do exame de ADN na investigação criminal e em conformidade com a resolução de 9 de Junho de 1997, foi proposta a lista dos sete marcadores de ADN que constituiu o ESS - *European Standard Set*, que incluía 7 *loci*: D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01 e VWA, respeitando o princípio de que os marcadores genéticos para fins forenses não devem conter informação sobre características hereditárias e sua análise deve ser feita recorrendo a técnicas previamente validadas (União Europeia, 2001).

As características dos STRs mais estudados em genética forense, e que incluem os marcadores do CODIS e do ESS, encontram-se na **Tabela 1**.

Tabela 1. *Loci* dos STRs autossómicos (Butler 2005 e Butler 2010). Onde: *Locus* a **Negrito** - *locus* CODI; *Locus* a **Negrito e Sublinhado** - *locus* ESS.

<i>Locus</i>	Localização no Cromossoma	Motivo repetitivo (formato ISFG)	Alelos
CSF1PO	5q33.1 <i>c-fms proto-oncogene</i> , 6º intrão	TAGA Simples	5-16
FGA	4q31.3 <i>α - fibrinogene</i> , 3º intrão	[CTTT] [TTCC] Composto	12.2 – 51.2
TH01	11p15.5 tirosina hidroxilase, 1º intrão	TCAT Simples	3 -14
TPOX	1p25.3 tiroide peroxidase, 10º intrão	GAAT Simples	4 -16
VWA	12p13.31 <i>Factor von Willebrand</i> , 40º intrão	[TCTG] [TCTA] Composto	10 - 25
D3S1358	3p21.31	[TCTG] [TCTA] Composto	8 - 21
D5S818	5q23.2	AGAT Simples	7 - 18
D7S820	7q21.11	GATA Simples	5 -16
D8S1179	8q24.13	[TCTA] [TCTG] Composto	7 - 20
D13S317	13q31.1	TATC Simples	5 -16
D16S539	16q24.1	GATA Simples	5 -16
D18S51	18q21.33	AGAA Simples	7 – 39.2
D21S11	21q21.1	[TCTA] [TCTG] Complexo	12 – 41.2
D2S1338	2q35	[TGCC] [TTCC] Composto	15 – 28
D19S433	19q12	[AAGG] [TAGG] Composto	9 – 17.2
SE33	6q14 <i>β-actin-related pseudogene</i>	[AAAG] Complexo	4.2 – 37
Penta E	15q26.2	[AAAGA] Simples	5 – 24
Penta D	21q22.3	[AAAGA] Simples	2.2 - 17

Em 2009, atendendo as recomendações do *DNA Working Group of European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI)*, o primeiro *European Standard Set (ESS)* de 2001 foi acrescido de mais cinco marcadores (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391 e D22S1045) para análise de amostras degradadas (União Europeia, 2009).

Os marcadores FGA, D21S11 e D18S51 são os três mais polimórficos, enquanto o marcador TPOX e TH01 apresentam menor variação. Os marcadores TPOX, CF1PO, D5S818, D13S317, D16S539 apresentam repetições simples, os marcadores TH01, D18S51 e D7S820 apresentam repetições simples com alelos não consenso (exemplo: 9.3). Os marcadores vWA, FGA, D3S1358 e D8S1179 apresentam repetições complexas com alelos não consenso e o marcador D21S11 apresenta repetições complexas (Butler, 2005 e Butler, 2010).

1.3. Genética Populacional

População é considerada como um conjunto de indivíduos que vivem num determinado lugar compartilhando um ancestral comum. Para o seu estudo, parte dessa população (amostra populacional) é selecionada aleatoriamente para que represente a população. Neste contexto, a genética populacional analisa as variações genéticas de um ou mais marcadores, herdadas no tempo e no espaço, ou seja, faz uma análise quantitativa das frequências dos alelos e genótipos observadas numa população ou em diferentes grupos da população, que residem numa determinada área e num determinado momento (Butler, 2005 e Butler, 2010).

O cálculo da frequência de um determinado perfil de ADN numa dada população é possível com recurso a uma base de dados populacional respetiva, a qual compreende a frequência dos alelos dos marcadores genéticos na população (Butler, 2005 e Butler, 2010).

1.3.1. Princípios estatísticos da Genética Populacional

A variabilidade genética de uma população reflete-se no número de alelos de um determinado marcador genético, ou seja, quanto maior for o número de alelos de um marcador, maior é a sua variabilidade. No geral, para n alelos existem n homozigóticos e $n(n-1)/2$ heterozigóticos. As frequências alélicas de um marcador são determinadas pela distribuição dos heterozigóticos observados na população. A migração (fluxo de genes), mutações, seleção natural, estão entre os fatores que afetam a variabilidade genética das populações. Populações isoladas ou fechadas apresentam baixos índices de heterozigosidade devido a casamentos consanguíneos (Butler, 2005 e Butler, 2010).

1.3.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg e parâmetros de interesse forense

A probabilidade de um evento ocorrer dá-se num campo entre zero e um (0-1). A probabilidade de um evento certo é um (1), enquanto a de um evento impossível é zero (0). Os eventos podem ser mutuamente exclusivos, significando que a ocorrência de um anula a ocorrência do outro, e a probabilidade de ocorrer um ou outro é igual à soma das probabilidades individuais dos eventos (regra da soma). Sendo dois eventos independentes um do outro, a probabilidade dos dois eventos ocorrerem em simultâneo é igual ao produto das probabilidades individuais dos eventos (regra do produto) (Butler, 2010).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A genética fundamenta-se nas leis mendelianas da hereditariedade (Gregor Mendel 1822-1884). A 1ª lei (lei de segregação) postula que os dois membros de cada par de cromossoma se separam durante a meiose de forma que cada gâmeta (célula sexual) receba metade de cada par de cromossomas (estado haplóide). A 2ª Lei (lei de segregação independente) postula que diferentes genes são herdados de forma independente (Butler, 2010).

A distribuição das frequências alélicas dos marcadores genéticos numa população tem que estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg, para que estes possam fazer parte de uma base de dados populacionais. Assim, segundo o princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, definido independentemente por *Godfrey Hardy* (1877-1947) e *Wilhelm Weinberg* (1862-1937), para um dado marcador, com dois alelos *A* e *a*, numa população com casamentos aleatórios, sem mutações, seleção ou migração, as frequências esperadas dos genótipos *AA*, *Aa* e *aa* são dadas por p^2 , $2pq$, e q^2 , onde *p* e *q* são as frequências alélicas de *A* e *a* respetivamente, com $p+q=1$ (Figura 13). Esta representação gráfica dos cruzamentos entre os alelos *A* e *a* dos progenitores é designado por quadro de *Punnett* (Butler, 2005; Butler, 2010 e Pinheiro, 2010).

A frequência alélica é o quociente entre o número de cópias de um alelo e o número total de alelos observados numa população. Por outro lado, o quociente entre o número de indivíduos com um genótipo particular e o total dos indivíduos analisados é referido por frequência genotípica (Butler, 2005 e Butler, 2010).

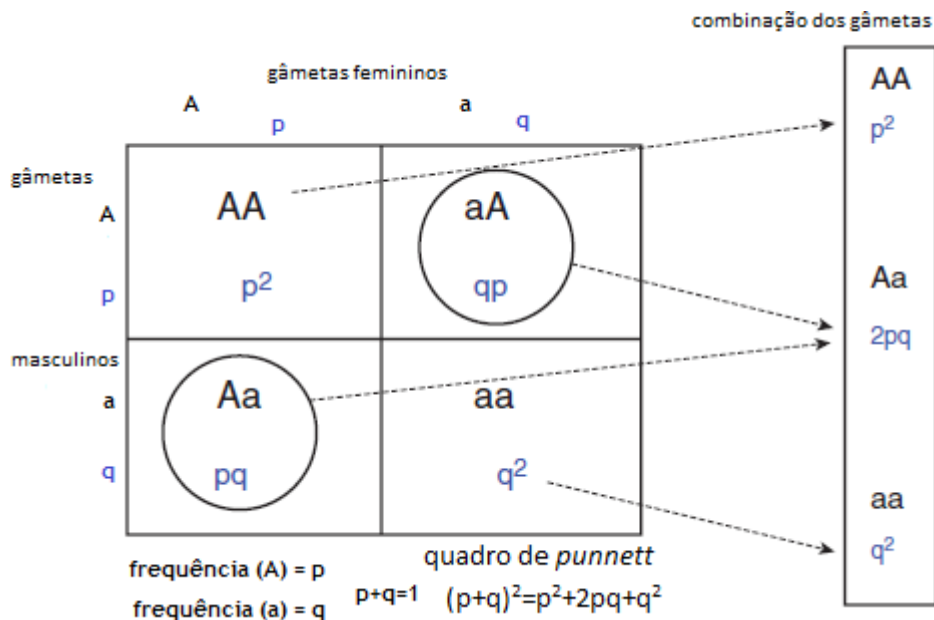


Figura 13. Esquema representativo do quadro de *Punnett*. A combinação de dois alelos (*A* e *a*) com frequências p e q representando as frequências de Hardy-Weinberg que por outro lado são a expansão binomial de $(p + q)^2$ ou de $p^2 + 2pq + q^2$. Adaptado de Butler (2005).

A verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* é feita calculando as frequências dos genótipos esperados a partir dos genótipos observados, tendo como base as frequências alélicas. Se as frequências dos genótipos observados estão de acordo com as frequências dos genótipos esperados, então, a população está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e assume-se que a combinação dos alelos é independente. Isto significa que as frequências dos alelos e genótipos permanecem constantes ao longo das gerações e os marcadores genéticos que estão numa combinação aleatória estão em equilíbrio de ligação (Guo and Thompson, 1992; Butler, 2005 e Butler, 2010).

Depois de calculadas as frequências alélicas, podemos determinar os parâmetros estatísticos de interesse forense, nomeadamente a heterozigosidade (H), o poder de discriminação (PD) e o poder de exclusão *a priori* (PE) (Butler, 2005; Butler, 2010 e Pinheiro, 2010).

A heterozigosidade (H) é a proporção de indivíduos heterozigóticos na população, calculada dividindo o número de heterozigóticos pelo total de amostras. Quanto maior for a heterozigosidade maior é a diversidade alélica, portanto menor a probabilidade de amostras aleatórias serem iguais (Tabela 2) (Nei and Roychoudhury, 1974; Nei, 1978 e Butler, 2005).

Tabela 2. Fórmulas usadas nos cálculos dos parâmetros de dados populacionais. P_i é a frequência de i alelos numa população de n amostras; H - Heterozigosidade (Nei and Roychoudhury 1974; Nei 1978 e Butler 2005).

Parâmetro	Fórmula
Heterozigosidade (H)	$H = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$
Poder de discriminação (PD),	$PD = 1 - 2 \left[\sum_{i=1}^n P_i^2 \right]^2 - \sum_{i=1}^n P_i^4$
Probabilidade de exclusão <i>a priori</i>	$PE = H^2 [1 - (1 - H)H^2]$

O poder de discriminação (PD) é a probabilidade de dois indivíduos não aparentados e escolhidos numa população apresentarem genótipos diferentes para um dado marcador (*locus*). Quanto maior for o número de marcadores, maior é a capacidade de discriminar os indivíduos da população.

A probabilidade de exclusão *a priori* (PE) é a probabilidade que um marcador tem de excluir um indivíduo, a qual é função direta do polimorfismo de um marcador, ou seja, quanto mais polimórfico for um marcador e quanto mais equilibrada for a distribuição das suas frequências alélicas, tanto maior será a sua probabilidade de exclusão *a priori*.

1.4. Determinação de um Perfil Genético e sua Aplicação Forense

O perfil genético de um indivíduo é o conjunto dos genótipos obtidos nos marcadores genéticos analisados. A genotipagem é o processo pelo qual se determina o genótipo presente nos múltiplos *loci* (marcadores genéticos) ao longo da molécula de ADN.

A análise do ADN envolve vários processos. De forma sumária, o primeiro passo é a colheita do material biológico. Depois da colheita do material, segue-se a extração e quantificação do ADN. Regiões específicas do ADN (marcadores genéticos) são amplificadas numa reação em cadeia da polimerase (PCR), podendo recorrer-se a *kits* comercialmente disponíveis. A eletroforese capilar é a técnica utilizada na separação e deteção dos fragmentos amplificados, obtendo-se desta forma o perfil de ADN.

Depois de obtidos os perfis, segue-se a comparação entre os perfis, por exemplo, de um suspeito com o de uma evidência, no caso de uma investigação de criminalística biológica; de um alegado pai com o do suposto filho, no caso de uma investigação de paternidade e entre os perfis dos restos de uma vítima de desastre em massa com o (s) do (s) familiar (es) biológico (s), no caso de uma identificação genética individual. O resultado da comparação pode ser (a) inclusão, (b) exclusão ou (c) inconclusivo. A inclusão pode ser referida como coincidente ou consistente. Um resultado inconclusivo é verificado em amostras com perfis incompletos ou complexos devido à qualidade e quantidade do ADN, e nos casos de misturas. No caso de coincidência, segue-se a valorização estatística do resultado, isto é, a probabilidade de um dado perfil pertencer a um dado indivíduo da população, que foi indicado como sendo o autor/alegado pai. Finalmente é elaborado um relatório e remetido à entidade requisitante (Figura 14) (Pinheiro, 2010 e Butler, 2012).

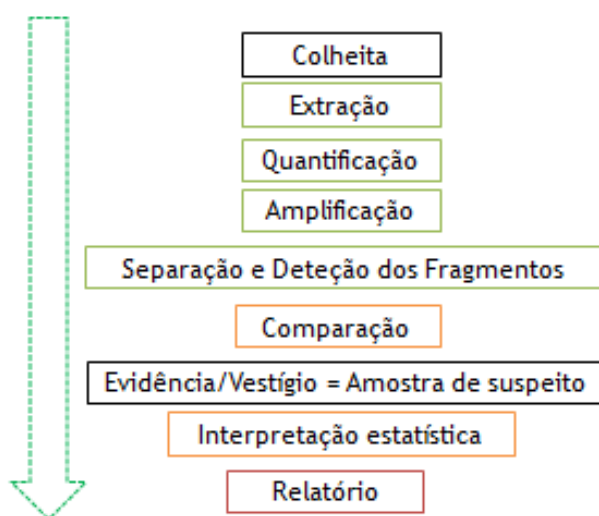


Figura 14. Etapas envolvidas no exame de ADN. Adaptado de Butler (2012)

A investigação de paternidade envolve, na maioria dos casos, um trio composto por uma mãe, filho (a) e o presumível pai. Assim, para um casal com genótipo 11,14 para o pai e 8,12 para a mãe num dado marcador genético, os descendentes podem ter os seguintes perfis: 8,11; 8,14; 11,12 ou 12,14. A determinação da paternidade baseia-se no facto de que cada progenitor transmite um alelo de cada *locus* genético investigado ao seu descendente. O teste estatístico calculado para valorizar a paternidade é o índice de paternidade. O índice de paternidade (IP) é calculado para cada alelo em cada marcador e os valores de IP para cada marcador são multiplicados entre si de forma a obter-se o índice acumulado de paternidade. O índice acumulado de paternidade reflete, de forma sumária, a possibilidade de um alegado pai ser o pai biológico, tendo como referência uma base de dados populacional (Butler, 2010).

A identificação genética individual tem lugar nos desastres em massa, como por exemplo: terremotos, incêndios, acidentes de aviação e nos casos de desaparecidos onde os restos mortais são difíceis de identificar. Assim, a identificação genética é de vital importância nessas situações, visto necessitar de pouco material biológico com ADN intacto e haver possibilidade de obter amostras de referências dos familiares ou objetos pessoais da vítima, para comparação. No entanto, a identificação de vítimas de desastres em massa apresenta desafios, uma vez que o material recolhido no local pode conter misturas, dependendo do número de vítimas e do tipo de desastre (Butler, 2010).

No âmbito da criminalística biológica, a valorização estatística dos resultados consiste na determinação do valor de *LR* (*Likelihood Ratio*) ou razão das verosimilhanças. Tendo em conta os perfis genéticos obtidos e as coincidências verificadas entre a (s) amostra (s) problema ou vestígios e a (s) de referência ou do (s) suspeito (s), o valor de *LR* indica a possibilidade da hipótese de um indivíduo suspeito ser a fonte biológica de um vestígio biológico encontrado no cenário do crime, quando confrontado com a hipótese do suspeito ser um indivíduo ao acaso da população (Pinheiro, 2010).

2. Justificação e Objetivos

Em Moçambique, o exame de ADN para fins forenses ainda não é uma prática no âmbito dos processos judiciais, no entanto, a genética forense é uma ferramenta crucial para o sistema judicial, pela sua capacidade de auxiliar a justiça no âmbito de processos criminais, civis de investigação de paternidade e identificação de vítimas, por exemplo nos desastres em massa. Adicionalmente a genética forense é uma peça chave no campo da antropologia forense e, atualmente, a informação sobre a genética da população de Moçambique é muito escassa. A escassez de publicações no campo da genética forense, referente à população de Moçambique, pode estar relacionada com a falta de incentivo à pesquisa e ausência do serviço de genética e de biologia forenses no país. Os poucos estudos disponíveis foram realizados com a população da Cidade de Maputo (Corte-Real *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2001 e Alves *et al.*, 2004).

A população moçambicana, estimada em cerca de 24.366.000, é maioritariamente de origem Bantu (91%), apresentando uma diversidade étnica composta por vários povos, sendo as populações Macua (26%) a norte e Changana (8%) a sul os principais grupos populacionais (Firmino, 2011; Chipembe *et al.*, 2012 e <http://www.portaldogoverno.gov.mz/Mozambique>).

A valorização de um perfil genético de ADN é feita tendo como base as frequências alélicas de cada *locus* na população de referência (Corte-Real 2004 e Butler 2012). Neste contexto, pretendeu-se no presente estudo, avaliar 15 *loci* STR autossómicos (D8S1779, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 e FGA) e amelogenina, em 160 amostras dos dois principais grupos populacionais de Moçambique, nomeadamente Macua e Changana, no sentido de que os resultados venham a ser um contributo para a construção de uma base de dados de frequências alélicas da população de Moçambique, assim como, uma plataforma para a identificação de perfis genéticos em investigações de parentesco, de vestígios biológicos em criminalística ou em identificações genéticas individuais.

2.1. Objetivos

2.1.1. Gerais

- Caracterização da diversidade genética dos dois principais grupos populacionais de Moçambique, nomeadamente Macua e Changana e comparação entre eles para determinação da existência ou não de sub-estruturação populacional.
- Adquirir bases técnicas e científicas aplicadas à genética forense.

2.1.2. Específicos

- Determinar as frequências alélicas dos 15 STRs autossómicos nos dois grupos étnico-linguísticos nomeadamente, Macua e Changana.
- Determinar a variabilidade e o grau de polimorfismo dos STRs autossómicos nos dois grupos populacionais.
- Determinar os parâmetros estatísticos de interesse forense.
- Comparar as frequências alélicas dos dois grupos populacionais de Moçambique entre si e com os de outras populações já estudadas.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

Critério de inclusão

Neste estudo foram incluídos indivíduos de dois grupos étnico-linguísticos, não aparentados, cujos avós paternos e maternos pertencem ao respetivo grupo populacional, depois de darem o respetivo consentimento livre e informado.

Tamanho da amostra

No presente estudo foram analisadas 160 amostras de sangue total, de pessoas dos dois principais grupos populacionais de Moçambique, nomeadamente Macua e Changana, de ambos os sexos, selecionados aleatoriamente nas cidades de Maputo e Nampula, sendo no total 77 do sexo masculino (48%) e 83 do sexo feminino (52%). A população Macua participou com cerca de 112 amostras (70%), das quais 57 eram do sexo masculino e 55 do sexo feminino. Na população Changana foram analisadas 48 amostras (30%) onde, 20 eram do sexo masculino e 28 do sexo feminino.

Colheita das Amostras

A colheita é determinante na obtenção do perfil genético, pelo que durante a colheita e transporte das amostras deve ter-se em atenção a sua preservação e conservação. Segundo Butler (2012), durante a colheita de material biológico deve ter-se em consideração o seguinte:

1. Evitar contaminação da amostra e para tal nunca manipular o material biológico com mãos desprotegidas e sem máscaras;
2. Usar sempre luvas novas ao manipular cada evidência;
3. Nos casos de material biológico da mucosa bucal, usa-se uma zaragatoa a qual pode ter uma forma dentada (**Figura 15**);
4. O material deve ser seco, ao ar e ao abrigo da luz, antes da embalagem;
5. Cada evidência deve ser embalada em envelope ou contentor separado, para evitar contaminação entre material;
6. Usar um envelope de papel para não criar humidade.



Figura 15. Diferentes tipos de zaragatoas (Butler, 2012).

As amostras para o presente trabalho foram colhidas nos laboratórios de análises clínicas nos Centros de Saúde da Polícia da República de Moçambique ao nível das cidades acima mencionadas, por punção capilar. As gotas de sangue foram impregnadas em papel de filtro, postas a secar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, depois de devidamente identificadas com o número da ficha de inquérito (**Anexo I**), sexo, nome do grupo étnico-linguístico, data da colheita (**Figura 16**Figura 16). Depois de secas, as amostras foram embaladas num envelope de papel individual, contendo sílica gel avulsa para absorver a humidade (cerca de uma colher de chá de sílica gel) e transportadas para o serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Coimbra-Portugal, para o devido processamento laboratorial.

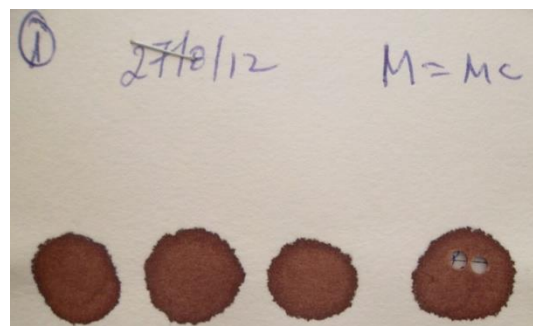


Figura 16. Amostra de sangue em papel de filtro.

3.2. Processamento Laboratorial

3.2.1. Extração do ADN

A extração visa recuperar o máximo de ADN em quantidade e qualidade (pureza) suficientes para se obter um perfil genético completo. A extração consiste na ruptura das membranas celulares (lise celular), desnaturação das proteínas e consequente isolamento do ADN. Existem vários métodos de extração do ADN, e entre eles, a extração por Chelex é um dos mais utilizados por ser rápido, robusto e pouco dispendioso. O ADN extraído deve ser conservado a baixas temperaturas, por exemplo -20°C ou -80°C , de forma a limitar a atividade das nucleases. Nucleases são enzimas celulares que degradam o ADN numa reação catalítica dependente de magnésio. Substâncias quelantes, como o EDTA e Chelex[®] 100, têm a capacidade de sequestrar o magnésio, limitando desta forma a atividade das nucleases. O Chelex[®] 100 é uma resina de troca iónica com alta afinidade por metais polivalentes incluindo o magnésio. A resina de Chelex[®] 100 é um copolímero de estireno divinilbenzeno contendo iões iminodiacetato emparelhados (**Figura 17**) que actuam como grupos quelantes de ligação aos iões metálicos polivalentes (Walsh *et al.*, 1991 e Butler, 2012).

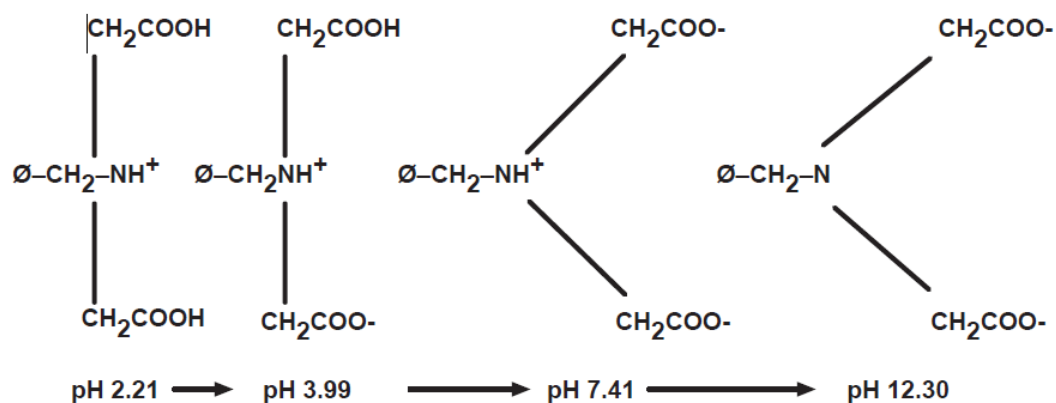


Figura 17. Estrutura do Chelex[®] com o aumento do pH (Bio-Rada, 2000).

O protocolo de extração por Chelex[®] consiste fundamentalmente: Na remoção de contaminantes e inibidores da amostra como o grupo heme da hemoglobina através da adição, ao tubo da amostra, da solução de Chelex a 5% e sujeitar ao aquecimento (56°C e 100°C) para promover a lise (ruptura) celular e desnaturar as proteínas (histonas) (**Figura 18**) (Butler, 2012).

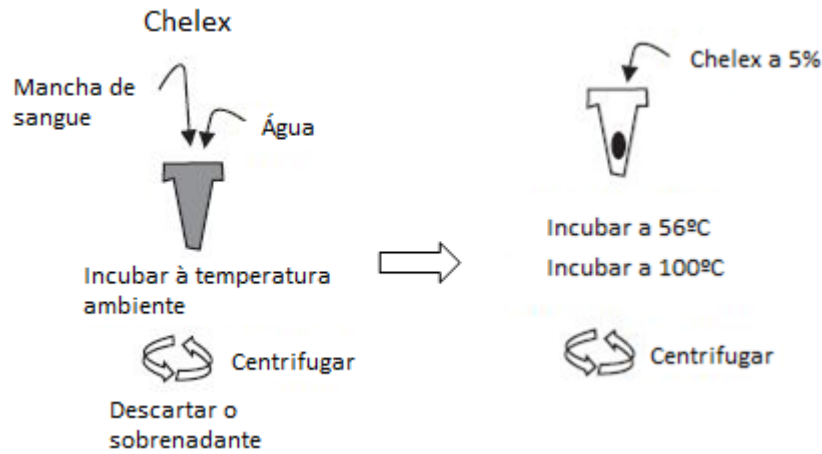


Figura 18. A extração por Chelex[®]. Adaptado de Butler (2012).

Quantificação

A quantificação é a fase que se segue à extração e visa determinar a quantidade e qualidade do ADN de interesse a incluir na amplificação (PCR) dos *loci* STR. Estão descritos vários métodos para a quantificação do ADN, no entanto, a PCR em tempo real é a técnica mais usada em genética, por fornecer não só a quantidade como também a qualidade do ADN amplificável. Esta técnica monitoriza, ao longo de cada ciclo da PCR, mudanças do sinal de fluorescência como resultado da amplificação da sequência de interesse. Existem várias abordagens da PCR em tempo real, e a *TaqMan* (Figura 19) e a *SYBR Green* estão entre as mais empregues.

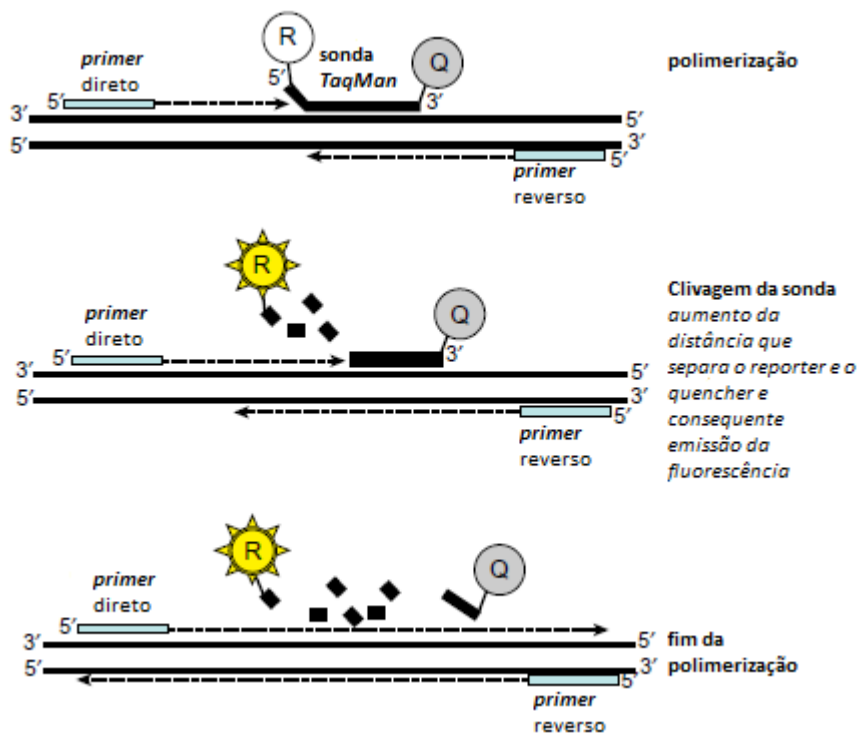


Figura 19. A técnica *TaqMan* 5' nuclease. Adaptado de Butler (2012).

A técnica *TaqMan* envolve sondas marcadas com fluorocromos (FAM ou VIC), um repórter, um *quencher* e uma enzima 5' nuclease. O marcador repórter encontra-se ligado à extremidade 5' da sonda, enquanto o *quencher* está associado à extremidade 3'. Numa sonda intacta o repórter está próximo do *quencher* que absorve a fluorescência emitida pelo repórter. Durante a polimerização, as sondas ligam-se a regiões específicas (complementares) do ADN de interesse entre os dois iniciadores (*primers*). A enzima que catalisa a reação de polimerização (ADN polimerase) apresenta igualmente a atividade exonucleásica 5'. À medida que vão sendo incorporados os dNTPs, vai-se verificando o afastamento das duas moléculas, repórter e *quencher*, com a consequente emissão de fluorescência cuja intensidade é proporcional à quantidade de ADN na amostra (**Figura 19**Figura 19) (Butler, 2012).

A presença de um controlo interno durante a reação da PCR (*IPC - Internal PCR Control*) permite verificar a eficiência da *Taq* ADN Polimerase, da química dos diferentes componentes da mistura, do funcionamento correto do instrumento e ainda verificar a presença de inibidores na amostra. A qualidade da amostra é avaliada pelo controlo interno da PCR (IPC). O IPC está correlacionado ao CT (*cycle threshold*). O CT indica o número de ciclos a partir do qual a fluorescência atinge o valor definido como limiar analítico (*threshold*). É neste momento que o produto amplificado é quantificado. Assim, elevados valores de IPC sugerem a presença de inibidores da PCR na amostra (Butler, 2012).

Procedimento

No presente estudo, a extração do ADN foi feita usando *Chelex*[®] 100, de acordo com o protocolo proposto por Walsh (Walsh *et al.*, 1991). A lista de todo o material, equipamentos e consumíveis, utilizados na fase de extração está disponível no **Anexo 2**.

Antes de cada etapa de extração foi elaborada uma lista de trabalho e uma etiqueta para cada amostra contendo a identificação da amostra, o método utilizado e a data da extração.

A câmara de trabalho contendo todo o material necessário (suportes, tubos de 1.5 ml, pipetas *Pasteur*, micropipetas, pontas, contentor para resíduos, solução *Chelex* 5%, água desionizada e autoclavada, papel de filtro limpo, alicate *paper punch single hole*), foi descontaminada submetendo-a por 15 minutos a radiação ultravioleta.

Com o auxílio do alicate *paper puncher single hole* foram feitos para cada amostra uma média de 4 cortes nas manchas de sangue com aproximadamente 3 mm de diâmetro. Os cortes foram transferidos para um tubo *ependorf* de 1.5 ml. O alicate era limpo fazendo 2 a 4 cortes num papel de filtro limpo e previamente descontaminado com luz ultravioleta, antes e depois do corte de uma amostra. Para cada lote de extração foi incluído um controlo de qualidade negativo resultante do corte de papel de filtro limpo.

Foi adicionado aos cortes da amostra 1ml de água desionizada e autoclavada, e deixados em suspensão por 30 minutos à temperatura ambiente. Os tubos contendo os cortes foram centrifugados por 3 minutos a 14000 rotações por minuto (RPM) e o sobrenadante foi descartado, com auxílio de pipetas *Pasteur* de uso único, de forma a que o volume remanescente no tubo fosse de 30 µl. Ao sedimento foram adicionados 170 µl da solução Chelex 5% previamente posta a agitar no agitador magnético. Os tubos foram colocados em suportes flutuantes e incubados a 56°C durante 30 minutos, seguida de agitação no agitador vortex por 10 segundos. As tampas foram furadas, para reduzir a pressão e de seguida sujeitas a ebulição por 8 minutos. Os tubos foram agitados no vortex por 10 segundos, centrifugados por 3 minutos a 14000 RPM, transferidos para um suporte e armazenados a -20°C.

Assim, as amostras foram extraídas tendo em consideração que se trata de amostras com ADN em quantidades e qualidades suficientes para a obtenção de um perfil genético completo. Naquelas em que não foi obtido um perfil genético completo foi realizada a quantificação do ADN extraído.

Em geral, a quantidade recomendada de ADN varia entre 0.5 a 2.0ng e IPC entre 28 a 31. O excesso ou a insuficiência de ADN e a presença de inibidores concorrem para ampliações deficientes e perfis genéticos difíceis de interpretar, dado que os marcadores apresentam alelos com valores de RFUs (unidades de referência de fluorescência) muito baixos (Applied Biosystems, 2012).

3.2.2. Amplificação do ADN

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é fundamental para a genética forense. Descrita pela primeira vez em 1985 por Kary Mullis, a PCR revolucionou a biologia molecular pela sua capacidade de produzir múltiplas cópias de uma sequência específica do ADN em poucas horas. A PCR é um processo enzimático onde ocorre a replicação de regiões específicas do ADN, envolvendo ciclos de aquecimento e arrefecimento (**Figura 20**).

O processo de amplificação visa aumentar o número de moléculas da sequência molde e marcar o produto da PCR (*amplicom*) com fluorocromos, facilitando a sua detecção. Os iniciadores direto e reverso, *forward primer* e *reverse primer*, pequenos fragmentos do ADN que flanqueiam a região a copiar no ADN molde, são componentes cruciais na PCR, incluindo os desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), ADN polimerase e o ADN da amostra a copiar. A ADN polimerase frequentemente usada é a *Taq polymerase*, proveniente da *Thermus aquaticus*, uma bactéria que habita nas águas térmicas (Butler, 2012).

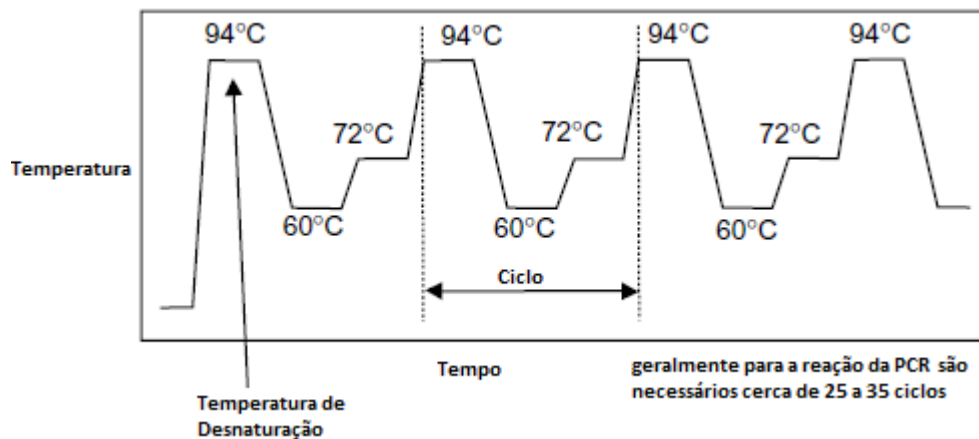


Figura 20. Variação das temperaturas ao longo dos ciclos da PCR. A PCR envolve 3 temperaturas (94, 60 e 72 °C) que se repetem ao longo dos ciclos. Aos 94 °C ocorre a desnaturação das cadeias. Os iniciadores ligam-se ao ADN molde em regiões específicas aos 60 °C. Ao atingir a temperatura de 72 °C, a ADN polimerase faz a extensão dos iniciadores usando os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs). Adaptado de Butler (2012).

Para a amplificação dos marcadores genéticos em análise foi usado o kit *AmpFISTR® Identifiler® Direct*, um kit *multiplex* que amplifica, numa reação única de PCR, 15 *loci* de STR (*Short Tandem Repeat*) autossômicos (D8S1779, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 e FGA) e Amelogenina para determinar o sexo (Tabela 3). O kit envolve uma combinação de cinco marcadores fluorescentes, o que permite uma amplificação simultânea e detecção eficiente, dos 15 *loci* STR autossômicos e amelogenina, durante a análise automática dos fragmentos.

A genotipagem é feita utilizando um *Ladder* alélico. Um *Ladder* alélico é um conjunto de alelos para um determinado *locus*, o qual contém o tamanho da maioria dos alelos reportados para cada um dos 15 *loci* e é crucial na correta atribuição dos alelos presentes em cada *locus*. Foi usado um padrão (*GeneScan™ 500 Size Standard*) para a determinação do tamanho dos produtos da PCR, que contém 16 fragmentos simples de 35 pares de bases, 50, 75, 100, 139, 160, 200, 250, 300, 340, 400, 450, 490 a 500 pares de bases (Butler, 2005; Butler, 2010; Applied Biosystems, 2011 e Butler, 2012).

Os *loci* no kit *AmpFISTR® Identifiler® Direct* são marcados com os seguintes fluorocromos: 6-FAM™, VIC®, NED™ e PET® (Tabela 3). O padrão interno é marcado com o fluorocromo LIZ®.

Tabela 3. Loci amplificados pelo kit AmpFISTR® Identifiler® Direct (Applied Biosystems, 2011).

Locus	Alelos incluídos Ladder	Fluorocromo
D8S1179	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™
D21S11	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	
D7S820	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
CSF1PO	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D3S1358	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	
TH01	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	VIC®
D13S317	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D16S539	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D2S1338	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	
D19S433	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	
vWA	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	NED™
TPOX	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	
D18S51	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	
Amelogenina	X, Y	
D5S818	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	PET®
FGA	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	

Cada fluorocromo emite fluorescência máxima num comprimento de onda específico. Durante a eletroforese capilar o sinal da fluorescência é separado por gradiente de difração de acordo com o seu comprimento de onda (Figura 21) e é projetado para um dispositivo CCD (*Charged-coupled Device*) segundo um padrão espacial previsível. O marcador 6-FAM™ é visualizado como azul, seguido do marcador VIC® (verde), NED™ (amarelo), PET® (vermelho), e LIZ® (alaranjado).

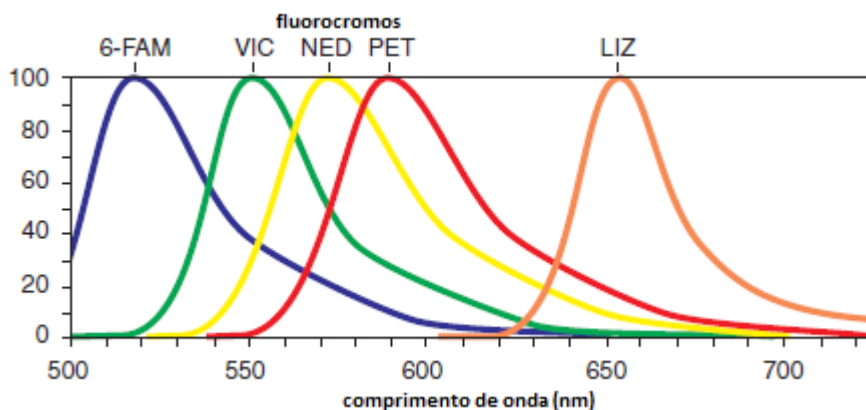


Figura 21. Espectro de emissão dos cinco marcadores fluorescentes usados no kit AmpFISTR® Identifiler® Direct. Adaptado de Applied Biosystems (2011).

Procedimento

Depois de cada lote de extração, seguiu-se a amplificação do ADN. Foi elaborada uma lista de trabalho das amostras a amplificar. Foram identificados os tubos de 0.2 ml com o número da amostra, data da amplificação e o nome do *kit* a utilizar. Em cada lote da amplificação foram incluídos controlos, um negativo e um positivo. Um tubo de 1.5 ml foi identificado para a mistura *master mix* e *primers*. A sala foi descontaminada usando a luz ultravioleta por 10 minutos. As amostras contendo o ADN a amplificar foram descongeladas à temperatura ambiente, sujeitas a agitação com vortex por 10 segundos e centrifugadas a 14000 RPM por 3 minutos na sala de extração de amostras de referência.

Os reagentes para a PCR (*master mix* e *primers*) foram submetidos a uma agitação com vortex por 3 segundos, seguida de centrifugação a rotação máxima por 5 segundos, e foi preparada a mistura destes reagentes numa proporção de 1:1 seguida de agitação com vortex por 3 segundos e centrifugação à rotação máxima por 5 segundos. Cerca de 25µl da mistura foi distribuída para cada tubo de 0.2ml e seguida de adição de 3µl de ADN. As amostras foram amplificadas no termociclador *GeneAmp PCR System 2700* por 27 ciclos (Tabela 4). No final da reação as amostras foram conservadas a -20 °C e protegidas contra a luz.

Tabela 4. Condições da PCR (Applied Biosystems, 2011).

Etapa inicial de incubação	27 ciclos				
	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Retenção final
95 °C 11 minutos	94 °C 20 segundos	59 °C 2 minutos	72 °C 1 minuto	60 °C 25 minutos	4 °C ∞

3.2.3. Separação, Deteção dos Fragmentos e Designação Alélica

Na genética forense, a eletroforese capilar é a técnica mais utilizada para separar os fragmentos de ADN. A técnica utiliza um estreito tubo, denominado capilar, contendo um polímero, ao longo do qual se verifica a separação dos fragmentos de ADN.

O capilar é feito de sílica fundida (dióxido de sílica, SiO₂) contendo grupos hidroxilos (silanol, SiOH) ao longo das paredes internas que apresentam cargas negativas (SiO⁻) num pH 5. O tampão da eletroforese apresenta geralmente um pH 8 e os iões H⁺ (do tampão) associam-se com o óxido de silício (SiO⁻) ao nível da parede interna do capilar formando uma dupla camada. Quando uma corrente de tensão é aplicada durante a eletroforese capilar, força os iões H⁺ a migrarem para o elétrodo negativo (cátodo) criando o fluxo eletro-osmótico (EOF). O revestimento ao nível da

parede interna do capilar previne a exposição das cargas negativas minimizando o fluxo eletro-osmótico (Figura 22) (Butler, 2012).

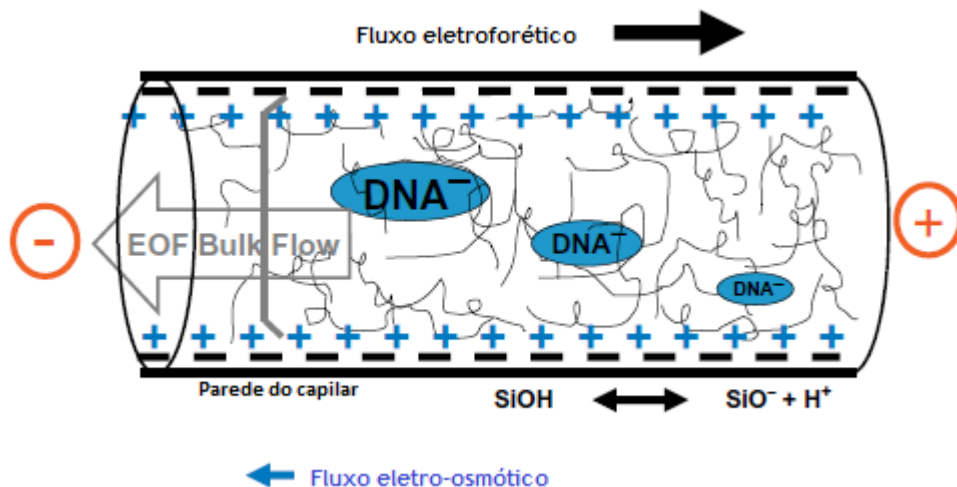


Figura 22. Representação do interior de um capilar e as forças que atuam no deslocamento das moléculas de ADN (Butler, 2012).

Assim, a configuração instrumental de base na eletroforese capilar inclui o capilar de sílica fundida com uma janela ótica contendo polímero, uma fonte controlável de alta tensão, dois conjuntos de elétrodos (cátodo e ânodo), dois reservatórios de tampão e um detetor de raios laser. As extremidades do capilar são imersas na solução de tampão eletrolítica enquanto a janela ótica do capilar é alinhada junto ao detetor (Figura 23) (Butler, 2012).

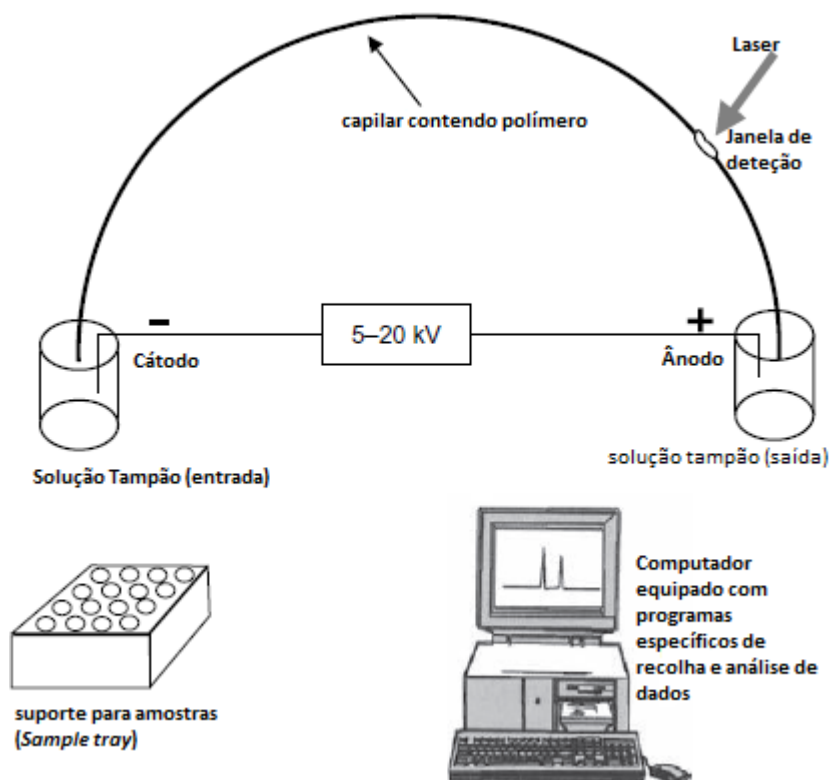


Figura 23. Representação dos instrumentos para a eletroforese capilar usado na análise do ADN. O capilar é um tubo de vidro com aproximadamente 50cm de comprimento e 50 μ m de diâmetro, no seu interior encontra-se uma solução viscosa de polímero. As amostras são colocadas no *sample tray* e uma aplicação de corrente faz com que sejam injetadas para o capilar de forma sequenciada. Depois da injeção, é aplicada uma corrente de alta tensão de forma a separar os fragmentos de ADN. Produtos da PCR, previamente marcados com fluorocromos, são excitados por um laser logo que alcançam a janela de detecção. Os dados são processados e guardados usando um programa específico no computador. Adaptado de Butler (2012).

O polímero usado para a eletroforese capilar é constituído por dimetil poliacrilamida que forma uma malha cuja matriz se torna mais apertada com o aumento da concentração. Os polímeros mais frequentemente utilizados são: o POP-4, POP-6 e POP-7 (*Performance Optimized Polymer*) com concentrações de 4%, 6% e 7% respetivamente. O POP-4 é geralmente empregue na análise de fragmentos de ADN (STR) e o POP-6 na análise de sequenciação de ADN que requer polímero de maior resolução. O POP-7 é aplicado tanto na análise de STR como na sequenciação de ADN (Butler, 2012).

O tubo contendo a amostra para análise de fragmentos é posto em contacto com o eléctrodo negativo (cátodo) e um terminal do capilar contendo o polímero. Um eléctrodo positivo (ânodo) é imerso no tampão e colocado na outra extremidade do capilar. Uma pequena quantidade da amostra passa para o capilar por injeção eletrónica e vai migrar ao longo deste por ação da corrente elétrica, ou seja, os fragmentos de ADN ao adquirirem carga negativa vão migrar para o ânodo através do polímero por ação da corrente elétrica.

Quando os fragmentos de ADN atingem a janela de detecção (*detector window*), o laser excita os fluorocromos. A fluorescência emitida é recolhida pelo painel CCD (*Charge-Coupled Device*). Um *software* específico (*ABI PRISM® 310 GeneMapper®*) converte os resultados de leitura da intensidade da fluorescência em tamanho e/ou quantidade de fragmentos na amostra (**Figura 24**) (Butler, 2012 e Applied Biosystems, 2001).

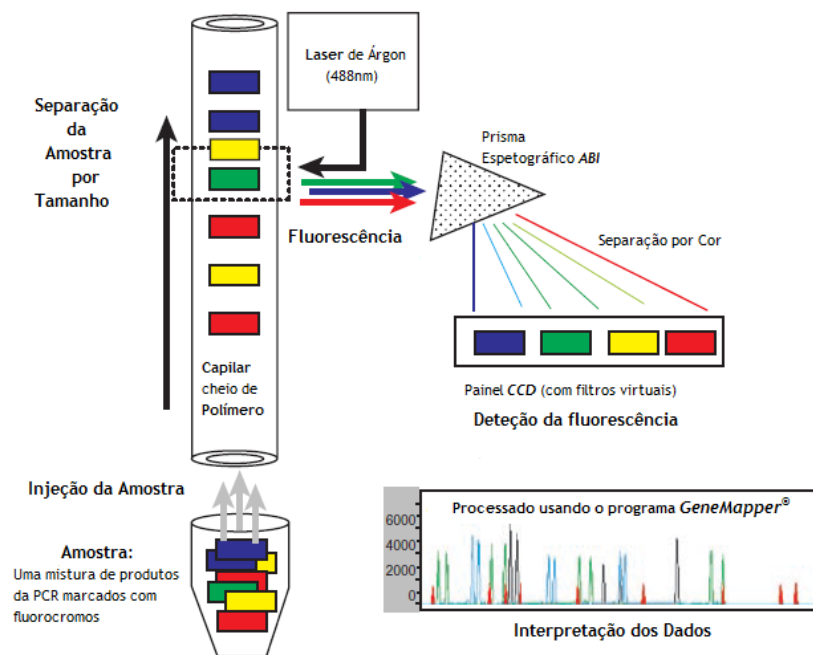


Figura 24. Separação e detecção dos alelos nos sistemas de eletroforese capilar. Adaptado de Butler (2012).

Neste estudo, o equipamento usado para analisar os produtos da PCR foi o *ABI PRISM® 310 Genetic Analyser*, um sistema composto por um equipamento de eletroforese capilar e um computador com os programas (Software) necessários para a detecção automática por eletroforese capilar dos fragmentos de ADN, previamente marcados com fluorocromos.

Foram usados dois Softwares, nomeadamente *ABI PRISM® 310 Data Collection* versão 3.1.0 e *GeneMapper* versão 3.2, para análise de fragmentos de ADN. O programa *Data Collection* armazena os dados brutos (fluorescência) produzidos durante a eletroforese. Um padrão interno, com fragmentos de diferentes tamanhos (**Figura 25**) é adicionado ao tubo da amostra. O programa *ABI PRISM® GeneMapper* permite a atribuição alélica dos fragmentos tendo como referências o padrão interno e o *ladder* alélico (Applied Biosystems, 2001).

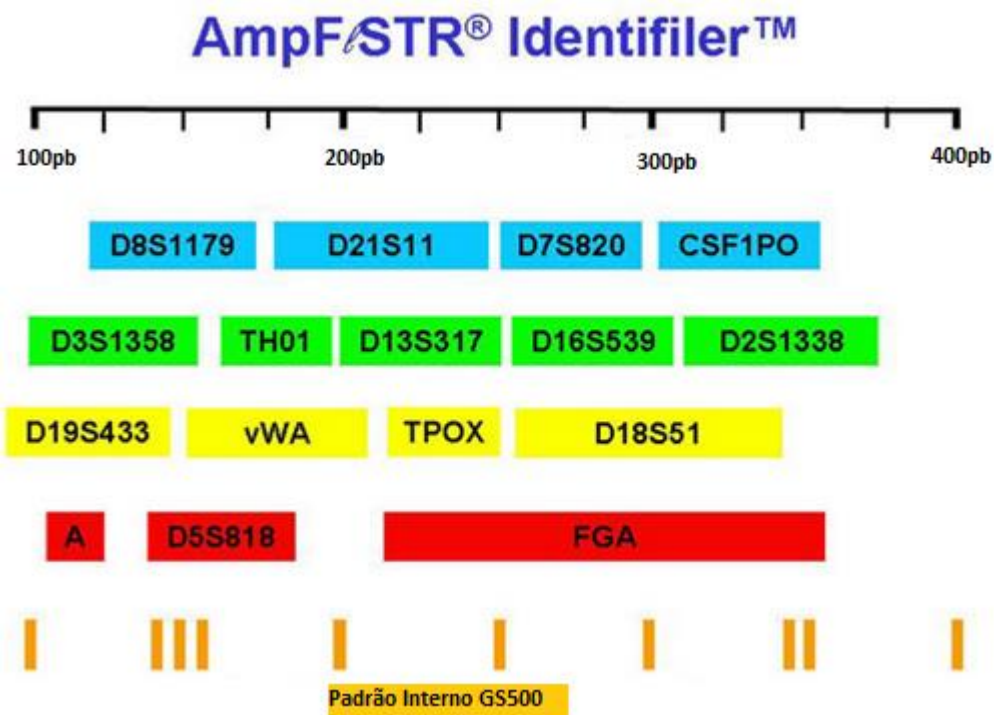


Figura 25. Os loci STR autossômicos amplificados pelo kit AmpFISTR® Identifiler® Direct, onde a distinção é feita, da esquerda à direita, pelo tamanho, e de cima para baixo, pelas diferenças de cor. Adaptado de Butler and Reeder (2012).

Procedimento

Antes de iniciar a eletroforese todos os reagentes e amostras foram postos à temperatura ambiente. Para cada análise dos fragmentos foram elaborados duas listas de trabalho, nomeadamente a *Sample Sheet* e a *Injection List*, no programa *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Data collection*.

Para cada aplicação, tubos de 0.5 ml foram marcados com a identificação do suporte (A1, A3, ...A11, B2, B4, ...B12, ...), um tubo de 1.5 ml foi marcado para a mistura de formamida e padrão LIZ 500, e juntamente com pontas e micropipetas, os tubos foram descontaminados pela luz ultravioleta por 15 minutos na câmara de trabalho.

Tanto a formamida como o padrão interno LIZ 500 e o *ladder* alélico foram homogeneizados por agitação num vortex e centrifugados rapidamente para remover líquido nas paredes e tampa dos tubos. Foi preparada uma mistura de formamida e padrão interno numa proporção de 15:1, assim:

$$(N^* + 2) \times 15\mu\text{L} = \text{Volume da Formamida}$$

$$(N^* + 2) \times 1\mu\text{L} = \text{Volume do Padrão interno}$$

Onde N^* - número de amostras incluindo o ladder).

A mistura foi homogeneizada por agitação com vortex, centrifugada rapidamente e 16 µl da mistura foram distribuídos por cada tubo de 0.5 ml. Cerca de 2 µl de cada amostra (produto da PCR) e 1 µl do *ladder* alélico foram adicionados aos respectivos tubos de acordo com a lista *Injection List*. Os tubos foram homogeneizados num vortex, centrifugados rapidamente e sujeitos a uma desnaturação térmica por 3 minutos a 95°C. Depois da desnaturação, os fragmentos de ADN foram sujeitos a eletroforese, para a respetiva separação nas condições previstas na **Tabela 5**.

Tabela 5. Condições da eletroforese capilar

Parâmetros da eletroforese capilar	Unidades
Módulo	GS STR POP4 (1 mL) G5.md5
Tempo de injeção em segundos	10
Tensão de injeção em kV	15.0
Tensão da corrida em kV	15.0
Temperatura da corrida em °C	60
Tempo da corrida em minutos	32
Matriz	MxIdentifiler25.08.10.mx
Polímero	POP4

3.3. Análise Estatística

As frequências alélicas de cada *locus* STR autossômico foram calculadas usando a folha de cálculo *Microsoft® Excel 2007* (Lopes, 2012).

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *ARLEQUIN*, versão 3.11 (Excoffier *et al.* 2005), a fim de verificar se a distribuição das frequências alélicas se encontra em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* nos grupos populacionais em análise.

A verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi feita usando o teste exato de Fisher, recorrendo ao algoritmo das cadeias de Markov e as populações em estudo foram consideradas estarem em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* se $P > 0.05$ (Guo and Thompson, 1992 e Excoffier *et al.*, 2005).

Igualmente com o programa *ARLEQUIM* versão 3.11, foi determinada a probabilidade de exclusão *a priori* (PE), o poder de discriminação (PD), a heterozigosidade observada (Ho), a heterozigosidade esperada (He). O poder de discriminação acumulado foi calculado de acordo a fórmula:

$$PD_{\text{acumulado}} = 1 - [PD_1 \times PD_2 \times \dots PD_{15}],$$

Onde 1, 2, ... e 15 são os diferentes *loci* (Jones, 1972).

A probabilidade de exclusão acumulado foi calculada de acordo com a fórmula:

$$PE_{\text{acumulado}} = 1 - [(1 - PE_1) \times (1 - PE_2) \times \dots (1 - PE_{15})],$$

Onde 1, 2, ... e 15 são os diferentes *loci* (Ohno *et al.* 1982 e Lopes 2012).

Com o programa *ARLEQUIM* versão 3.11 foi também construída a matriz de distância genética de Nei entre os dois grupos populacionais. As distâncias genéticas expressam as diferenças genéticas entre duas populações e são importantes para inferir a sua filogenia. As diferenças foram consideradas significativas para $P < 0.05$ (Nei and Roychoudhury, 1974; Nei, 1978 e Weir, 1996).

Foi usado o programa *PHYLIP* versão 3.68 para comparar as frequências dos genótipos dos dois grupos populacionais de Moçambique (Macua e Changana) com as das outras populações, nomeadamente Angola (Melo *et al.*, 2010); Brasil (Santos *et al.*, 2004); Venezuela (Bernal *et al.*, 2006); México (Hernandez-Guitierrez *et al.*, 2005); Argentina (Bozzo *et al.*, 2007); Somália (Tillmar *et al.*, 2009); Uganda (Gomes *et al.*, 2009); Guiné Equatorial (Alves *et al.*, 2005); Grécia (Sánchez-Diz *et al.*, 2008); Polónia (Czarny *et al.*, 2005); Croácia (Projić *et al.*, 2007); Servia-Montenegro (Veselinović *et al.*, 2004); Suécia (Montelius *et al.* 2008); Bélgica (Decorte *et al.*, 2004); Portugal (Lopes *et al.*, 2009) e Namíbia (Muro *et al.*, 2008), de acordo com o algoritmo de Neighbor-Joining e, calcular a matriz de distância genética. O módulo *STRUC* do programa *GENEPOP* versão 4.1.4. foi usado nas comparações populacionais duas a duas para cada *locus* (Moçambique com algumas

populações publicadas), tendo sido determinada a probabilidade P , de acordo com o algoritmo das cadeias de Markov, a um nível de significância de 0.05. Foram consideradas diferenças significativas para $P < 0.05$ (Rousset, 2008). A árvore filogenética foi construída usando o programa *TreeView*, versão 1.5.2 (Nei and Roychoudhury, 1974; Nei, 1978; Page, 1996 e Weir, 1996).

4. Resultados

A genotipagem das 160 amostras dos principais grupos populacionais (Macua e Changana) de Moçambique para os 15 marcadores STR (D8S1779, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 e FGA) encontra-se na **Tabela 14** em anexo.

4.1. Frequências Alélicas e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências alélicas dos 15 *loci* STR estudados para os dois grupos populacionais encontram-se na **Tabela 6**. Do total das amostras analisadas, 6 não foram incluídas na análise dos dados por apresentarem três alelos no marcador TPOX.

Tabela 6. Frequências alélicas dos 15 STRs na população de Moçambique (N=154). Os alelos mais frequentes para cada *locus* estão a **negrito**.

Alelo	D8S1779	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	VWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	Alelo
6						0.12662						0.08442				6
7			0.00649	0.08442		0.37663						0.01623				7
8			0.21429	0.03896		0.26623	0.01623	0.01299				0.24351		0.09416		8
9			0.12662	0.02597		0.21753	0.01299	0.23701				0.20779	0.00649	0.01948		9
9.3						0.01299				0.00325						9.3
10	0.00325		0.33117	0.23052			0.04870	0.14935		0.00649		0.11039	0.00325	0.04870		10
11	0.05844		0.22403	0.23052			0.37013	0.34416		0.10065	0.00649	0.32792		0.20455		11
12	0.13636		0.05844	0.31169	0.00974		0.34740	0.15909		0.13312		0.00649	0.01299	0.40909		12
12.2										0.05844						12.2
13	0.19156		0.03896	0.06494	0.00325		0.14936	0.09091		0.29870	0.00974	0.00325	0.03896	0.20779		13
13.2										0.04545			0.00649			13.2
14	0.31169			0.00974	0.05519		0.05519	0.00649		0.21104	0.04870		0.06169	0.00649		14
14.2										0.05844						14.2
15	0.20455			0.00325	0.34091				0.00649	0.03896	0.20779		0.14610	0.00974		15
15.2					0.00974					0.02273			0.00325			15.2
16	0.09090				0.35390				0.08442	0.00974	0.24675		0.21104		0.00649	16
16.1															0.00649	16.1
16.2					0.00974					0.00974					0.00325	16.2
17	0.00325				0.19480			0.06494		0.00325	0.13312		0.18831			17
18					0.01948			0.04870			0.20130		0.15260		0.00649	18
18.2															0.00325	18.2
19					0.00325					0.13312		0.08442	0.08766		0.06494	19
19.2															0.02922	19.2
20								0.09091			0.04545		0.04221		0.02273	20
20.2													0.00325			20.2
21								0.19805			0.01299		0.02273		0.09416	21
21.2													0.00325			21.2
22								0.17532			0.00325		0.00325		0.14610	22
23								0.04870					0.00325		0.15584	23
24								0.05195					0.00325		0.16234	24
24.3		0.00325														24.3
25								0.05195							0.16234	25
26		0.00325						0.02922							0.10713	26
27		0.09740						0.01623							0.01299	27
28		0.25972													0.00974	28
29		0.12013														29
30		0.12338														30
30.2		0.01948														30.2
31		0.11039														31
31.2		0.10390														31.2
32		0.01299													0.00325	32
32.2		0.06494														32.2
33		0.00325														33
33.2		0.00974														33.2
34		0.00974														34
34.2		0.00649														34.2
35		0.03571														35
36		0.01299														36
37		0.00325														37
46.2															0.00325	46.2

O teste exato de Fisher demonstrou que as proporções dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg $P > 0.05$ ou seja, todos os marcadores apresentaram valor de P superior a 0.05 (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros de interesse forense em cada marcador. Valor de P e respetivo desvio padrão (DP) para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, probabilidade de exclusão *a priori* (PE), poder de discriminação (PD), Heterozigosidade observada (Ho) e Heterozigosidade esperada (He) para a população de Moçambique.

Locus	Ho	He	$P \pm DP$	PD	PE
D8S1179	0.76623	0.79703	0.50272 \pm 0,00063	0.79402	0.59813
D21S11	0.81169	0.86675	0.81470 \pm 0,00036	0.86393	0.73275
D7S820	0.81818	0.77573	0.74308 \pm 0,00085	0.77321	0.56262
CSF1PO	0.78571	0.78690	0.75504 \pm 0,00081	0.78293	0.58122
D3S1358	0.62987	0.71568	0.48110 \pm 0,00058	0.71686	0.47260
TH01	0.76623	0.72943	0.37330 \pm 0,00123	0.72375	0.47660
D13S317	0.72078	0.71456	0.81005 \pm 0,00080	0.71416	0.47515
D16S539	0.77922	0.77222	0.21315 \pm 0,00079	0.76929	0.55687
D2S1338	0.85065	0.88460	0.54838 \pm 0,00058	0.88141	0.76301
D19S433	0.83766	0.82965	0.97179 \pm 0,00030	0.82721	0.66765
vWA	0.83117	0.82850	0.87300 \pm 0,00078	0.82581	0.65487
TPOX	0.81169	0,77288	0.55119 \pm 0,00074	0.77037	0.55677
D18S51	0.87662	0.86254	0.41992 \pm 0,00044	0.85974	0.72015
D5S818	0.72078	0.73827	0.94105 \pm 0,00045	0.73587	0.51486
FGA	0.86364	0.87764	0.31337 \pm 0,00036	0.86239	0.74174
PD (acumulado)				0.99999999970261	
PE (acumulado)					0.999999466

4.2. Parâmetros de Interesse Forense

Na Tabela 7, são apresentados os parâmetros estatísticos de interesse forense. À exceção do locus D3S1358 ($H_o=0,62987$), a heterozigosidade média observada em cada locus foi superior a 0.7. Relativamente aos parâmetros de eficácia *a priori* pode constatar-se que o poder de discriminação é superior a 0.7 para todos os marcadores, sendo o valor acumulado de 0.9999999997 e a probabilidade de exclusão variou entre 0.47260 (D3S1358) e 0.76301 (D2S1338), sendo o valor acumulado de 0,999999466.

4.3. Variantes Alélicas

Foram identificadas duas variantes de alelos nos marcadores D21S11 e FGA (Tabela 8Tabela 8), as quais não constam nos ladders alélicos dos kits ID- *Identifiler*[®] *Direct* e PP-*PowerPlex*[®].

Tabela 8. Variantes de alelos. Resultados de variantes alélicas em dois marcadores.

<i>Loci</i>	Alelo	Observado
D21S11	24.3	1
FGA	16.1	2

4.4. Padrões Trialélicos no *Locus* TPOX

Das 6 amostras analisadas com 3 alelos para o *locus* TPOX (Figura 26), 4 são do grupo populacional Macua e 2 do grupo Changana. Relativamente ao sexo, duas são do sexo masculino (grupo Macua) e as restantes 4 são do sexo feminino, sendo duas para cada grupo populacional (Tabela 9).

Na Tabela 9 estão apresentadas as designações alélicas atribuídas para o marcador TPOX em cada amostra. Os resultados obtidos foram confirmados com o kit *Powerplex®-16HS* da Promega (<http://www.promega.com/>), depois de uma nova extração. O alelo 10 é comum a todas as amostras.

Tabela 9. Padrões de 3 alelos no *locus* TPOX. XX-sexo feminino, XY-sexo masculino.

Alelo	Genótipo	Observados	Sexo	Grupo populacional	Frequência %
6	6,9,10	1	XX	Changana	0.625
7	6,10,11	1	XY	Macua	0.625
7	7,10,11	1	XX	Changana	0.625
8	8,10,11	2	XX	Macua	1.250
9	9,10,11	1	XY	Macua	0.625
10					
11	-				
Total		6			3.749

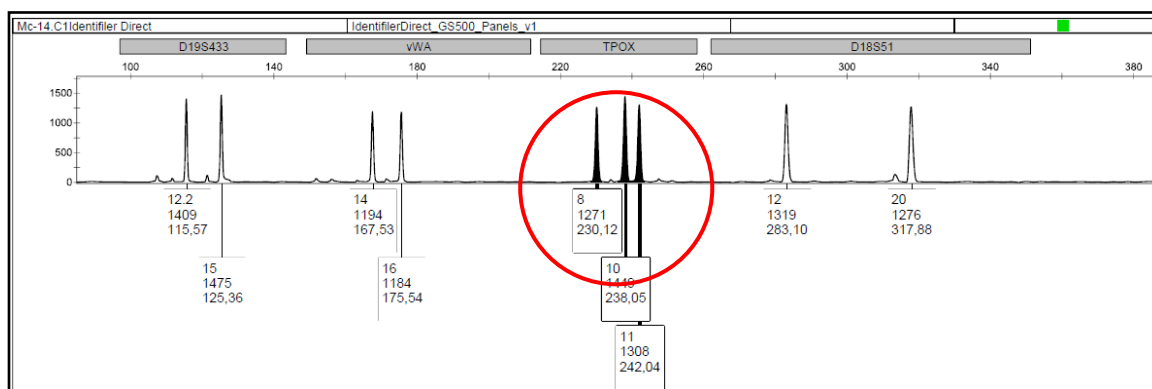


Figura 26. Padrão trialélico no *locus* TPOX.

4.5. Estudos Comparativos

Foi calculada a matriz de distância genética entre os dois grupos populacionais de Moçambique, **Tabela 10**, (Macua e Changana) e não houve diferenças estatísticas significativas ($P=0.08138\pm 0.0026$), **Tabela 11**, tendo por isso sido tratados, para efeitos de estudo de comparação com outras populações, como um só grupo populacional.

Tabela 10. Tabela matriz de distâncias genéticas entre as duas populações de Moçambique

	Macua	Changana
Macua	-	0.00201
Changana	0.00201	-

Tabela 11. Valor da probabilidade ($P \pm$ desvio padrão). Comparação da matriz de distâncias genéticas entre as duas populações de Moçambique.

	Macua	Changana
Macua	-	0.08138 \pm 0.0026
Changana	0.08138 \pm 0.0026	-

Igualmente, foi determinada a matriz de distância genética (**Tabela 12**) entre a população de Moçambique com outras populações, nomeadamente Angola (Melo *et al.*, 2010); Brasil (Santos *et al.*, 2004); Venezuela (Bernal *et al.*, 2006); México (Hernandez-Guitierrez *et al.*, 2005); Argentina (Bozzo *et al.*, 2007); Somália (Tillmar *et al.*, 2009); Uganda (Gomes *et al.*, 2009); Guiné Equatorial (Alves *et al.*, 2005); Grécia (Sánchez-Diz *et al.*, 2008); Polónia (Czarny *et al.*, 2005); Croácia (Projić *et al.*, 2007); Servia-Montenegro (Veselinović *et al.*, 2004); Suécia (Montelius *et al.*, 2008); Bélgica (Decorte *et al.*, 2004); Portugal (Lopes *et al.*, 2009) e Namíbia (Muro *et al.*, 2008).

A Tabela 12 mostra os valores da matriz de distâncias genéticas entre a população de Moçambique e 16 populações, Angola, Brasil, Venezuela, México, Argentina, Somália, Uganda, Guiné Equatorial, Grécia, Polónia, Croácia, Servia-Montenegro, Suécia, Bélgica, Portugal, e Namíbia.

Tabela 12. Tabela da Matriz de distâncias genéticas/comparações interpopulacionais.

	Moçambique	Angola	Brasil	Venezuela	México	Argentina	Somália	Uganda	Guiné Equatorial	Grécia	Polónia	Croácia	Sérvia-Montenegro	Suécia	Bélgica	Portugal	Namíbia
Moçambique	-	0.022325	0.093968	0.128304	0.156890	0.124435	0.088658	0.061869	0.027224	0.137059	0.164686	0.151063	0.162927	0.175283	0.148709	0.134769	0.040162
Angola	0.022325	-	0.088095	0.126156	0.153691	0.125021	0.074750	0.047536	0.010007	0.131107	0.164351	0.149473	0.166658	0.166239	0.141209	0.133049	0.012507
Brasil	0.093968	0.088095	-	0.025455	0.045585	0.025715	0.073073	0.084669	0.075775	0.026723	0.040892	0.034955	0.038984	0.040031	0.031385	0.023642	0.106757
Venezuela	0.128304	0.126156	0.025455	-	0.022577	0.019050	0.079131	0.097370	0.104875	0.026880	0.034281	0.024784	0.031904	0.027691	0.027010	0.019595	0.150357
México	0.156890	0.153691	0.045585	0.022577	-	0.025609	0.095345	0.118546	0.133939	0.045461	0.060840	0.049364	0.058738	0.050652	0.045284	0.043223	0.173523
Argentina	0.124435	0.125021	0.025715	0.019050	0.025609	-	0.089006	0.111330	0.108614	0.027577	0.040800	0.032737	0.037593	0.032677	0.026294	0.020993	0.147139
Somália	0.088658	0.074750	0.073073	0.079131	0.095345	0.089006	-	0.038141	0.065940	0.095335	0.121233	0.111797	0.121008	0.119562	0.103474	0.101711	0.093781
Uganda	0.061869	0.047536	0.084669	0.097370	0.118546	0.111330	0.038141	-	0.046710	0.115809	0.139065	0.131950	0.141995	0.137566	0.123195	0.121710	0.065877
Guiné Equatorial	0.027224	0.010007	0.075775	0.104875	0.133939	0.108614	0.065940	0.046710	-	0.113279	0.139918	0.125072	0.142892	0.145124	0.121031	0.112108	0.023164
Grécia	0.137059	0.131107	0.026723	0.026880	0.045461	0.027577	0.095335	0.115809	0.113279	-	0.022321	0.017000	0.017503	0.022066	0.017068	0.012245	0.144199
Polónia	0.164686	0.164351	0.040892	0.034281	0.060840	0.040800	0.121233	0.139065	0.139918	0.022321	-	0.009613	0.014639	0.012673	0.013116	0.013232	0.180148
Croácia	0.151063	0.149473	0.034955	0.024784	0.049364	0.032737	0.111797	0.131950	0.125072	0.017000	0.009613	-	0.012404	0.010718	0.012555	0.009563	0.166795
Sérvia-Montenegro	0.162927	0.166658	0.038984	0.031904	0.058738	0.037593	0.121008	0.141995	0.142892	0.017503	0.014639	0.012404	-	0.015540	0.016693	0.014169	0.182625
Suécia	0.175283	0.166239	0.040031	0.027691	0.050652	0.032677	0.119562	0.137566	0.145124	0.022066	0.012673	0.010718	0.015540	-	0.008041	0.013297	0.184993
Bélgica	0.148709	0.141209	0.031385	0.027010	0.045284	0.026294	0.103474	0.123195	0.121031	0.017068	0.013116	0.012555	0.016693	0.008041	-	0.008943	0.154390
Portugal	0.134769	0.133049	0.023642	0.019595	0.043223	0.020993	0.101711	0.121710	0.112108	0.012245	0.013232	0.009563	0.014169	0.013297	0.008943	-	0.149982
Namíbia	0.040162	0.012507	0.106757	0.150357	0.173523	0.147139	0.093781	0.065877	0.023164	0.144199	0.180148	0.166795	0.182625	0.184993	0.154390	0.149982	-

Na **Tabela 13** estão representados os valores da probabilidade P resultante das comparações populacionais (Moçambique com algumas populações africanas, europeias e as da América Latina), de acordo com o algoritmo das cadeias de Markov, com o nível de significância de 0.05.

Tabela 13. Tabela dos valores da probabilidade ($P \pm$ desvio padrão). Comparação *locus a locus* entre Moçambique e 16 populações. As diferenças estatísticas estão marcadas a **negrito** ($P < 0.05$); *Locus* sem diferenças significativas: resultados estão marcados a **verde** ($P \geq 0.05$)

<i>Locus</i>	Angola	Brasil	Venezuela	México	Argentina	Somália	Uganda	Guiné Equatorial	<i>Locus</i>
D8S1179	0.18353 ± 0.00785	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.01032 ± 0.00126	0.07772 ± 0.00342	0.00372 ± 0.00059	D8S1179
D21S11	0.18121 ± 0.00715	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.24737 ± 0.00738	D21S11
D7S820	0.44453 ± 0.00937	0.07403 ± 0.00339	0.00007 ± 0.00005	0.00000 ± 0.00000	0.00022 ± 0.00002	0.00000 ± 0.00000	0.04700 ± 0.00345	0.07277 ± 0.00388	D7S820
CSF1PO	0.05968 ± 0.00359	0.00047 ± 0.00011	0.00021 ± 0.00008	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.02154 ± 0.00166	0.00942 ± 0.00105	0.48508 ± 0.00777	CSF1PO
D3S1358	0.01322 ± 0.00190	0.00014 ± 0.00007	0.00012 ± 0.00001	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00016 ± 0.00006	0.00558 ± 0.00076	D3S1358
TH01	0.00019 ± 0.00011	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.35208 ± 0.00782	HUMTH01
D13S317	0.01847 ± 0.00208	0.00064 ± 0.00004	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.02623 ± 0.00188	0.05433 ± 0.00313	D13S317
D16S539	0.35358 ± 0.00929	0.00010 ± 0.00009	0.00074 ± 0.00005	0.00000 ± 0.00000	0.00018 ± 0.00002	0.00000 ± 0.00000	0.00198 ± 0.00055	0.00773 ± 0.00086	D16S539
D2S1338	0.59234 ± 0.00948	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00145 ± 0.00045	0.00014 ± 0.00001	D2S1338
D19S433	0.78912 ± 0.00664	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.17521 ± 0.00584	D19S433
VWA	0.02667 ± 0.00186	0.00121 ± 0.00024	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00008 ± 0.000001	0.00359 ± 0.00055	VWA
TPOX	0.68842 ± 0.00686	0.00121 ± 0.00024	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	TPOX
D18S51	0.75681 ± 0.00665	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.24725 ± 0.00850	0.58712 ± 0.00941	D18S51
D5S818	0.02014 ± 0.00154	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.01070 ± 0.00091	0.72630 ± 0.005801	0.02595 ± 0.00162	D5S818
FGA	0.00098 ± 0.00006	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00104 ± 0.00031	0.00014 ± 0.00001	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00026 ± 0.00002	FGA

Tabela 13 “Continuação”

<i>Locus</i>	Grécia	Polónia	Croácia	Sérvia-Montenegro	Suécia	Bélgica	Portugal	Namíbia	<i>Locus</i>
D8S1179	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00225 ± 0.00044	D8S1179
D21S11	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.04739 ± 0.00292	D21S11
D7S820	0.00348 ± 0.00078	0.00211 ± 0.00055	0.00456 ± 0.00061	0.00000 ± 0.00000	0.00081 ± 0.00018	0.01197 ± 0.00109	0.00012 ± 0.00001	0.23333 ± 0.00516	D7S820
CSF1PO	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	CSF1PO
D3S1358	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00036 ± 0.00004	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.03055 ± 0.00222	D3S1358
TH01	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00111 ± 0.00031	TH01
D13S317	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00014 ± 0.00005	D13S317
D16S539	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00417 ± 0.00007	D16S539
D2S1338	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.02604 ± 0.00200	D2S1338
D19S433	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.35821 ± 0.00823	D19S433
VWA	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00143 ± 0.00036	VWA
TPOX	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.03850 ± 0.00250	TPOX
D18S51	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.06547 ± 0.00482	D18S51
D5S818	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00054 ± 0.00003	D5S818
FGA	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	0.00000 ± 0.00000	FGA

As distâncias genéticas entre as populações de Moçambique e as da Europa, África e América Latina estão representadas na forma de árvore filogenética na **Figura 27**, de acordo o algoritmo *Neighbor-Joining* (Nei and Roychoudhury, 1974; Nei,1978; Page, 1996 e Weir, 1996).

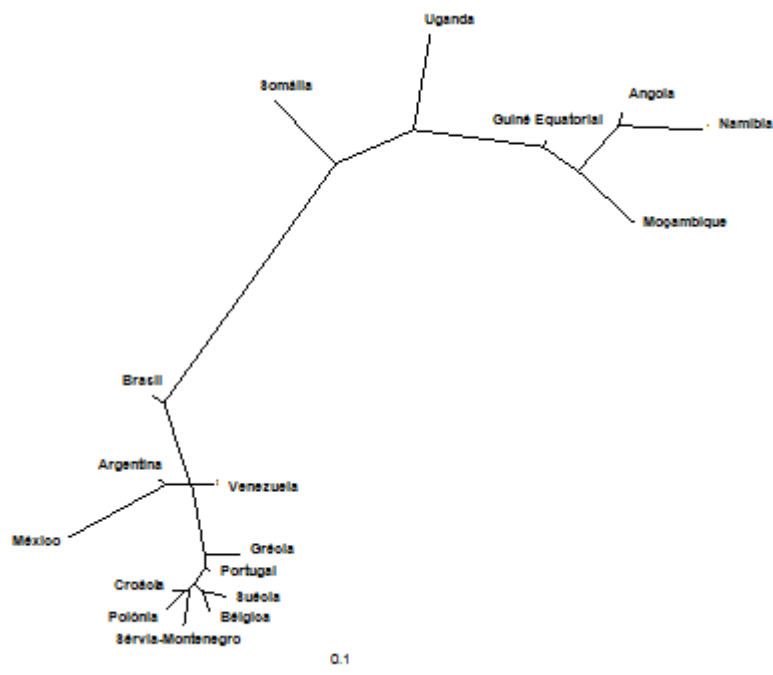


Figura 27. Árvore filogenética. Comparação entre população de Moçambique e 16 populações da Europa, África e Américas.

5. Discussão

Uma base de dados de ADN populacional é o conjunto das frequências alélicas dos marcadores genéticos de um grupo representativo (referência) de uma dada população, fornecendo uma informação de todos os alelos presentes nessa população. Estes dados são fundamentais nos cálculos estatísticos de probabilidades, permitindo assim a valorização de um perfil de ADN (Corte-Real *et al.*, 1999; Butler, 2012 e Applied Biosystems, 2011).

5.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para que as frequências alélicas de uma população de referência possam ser utilizadas em cálculos estatísticos de probabilidade, numa prova de ADN, estas têm que estar em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. De acordo com esta lei, numa população com cruzamentos aleatórios, ignorando as mutações e a seleção ou migração, as frequências alélicas e genotípicas são constantes de geração em geração (Guo and Thompson, 1992).

A aplicação do teste exato de Fisher nos 15 *loci* STR resultou em valores de *P* superiores a 0.05 (nível de significância escolhido), sugerindo que as proporções dos genótipos, nos dois grupos populacionais de Moçambique, estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Tabela 7).

Os resultados do presente estudo confirmam os obtidos por Corte-Real *et al.* (1999), no estudo referido, onde participaram indivíduos da Cidade de Maputo. Alves *et al.* (2004) constataram que apenas o *locus* FGA não esteve em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando analisados 17 STR em 144 indivíduos de Moçambique (Maputo), no entanto, depois da correção de Bonferroni, não houve desvios significativos no equilíbrio para este *loci*.

5.2. Parâmetros de Interesse Forense

Os *loci* D21S11, D2S1338, D19S433, vWA, D18S51 e FGA apresentaram valores de heterozigidade e de poder de discriminação, em média acima de 0.8, sugerindo maior variabilidade e consequentemente forte capacidade informativa (Tabela 7).

A heterozigidade (H_o) média observada foi superior a 0.7 em todos os *loci*, com uma variação de 0.72078 (D13S317 e D5S818) a 0.87662 (D18S51), exceto o *locus* D3S1358 que apresentou $H_o=0.62987$ (Tabela 7).

O poder de discriminação médio obtido teve uma variação entre 0.71416 (D13S317) a 0.88141 (D2S1338), com um valor acumulado de 0.9999999997 (Tabela 7).

A probabilidade de exclusão a *prior* obtida variou entre 0.47260 (D3S1358) a 0.76301 (D2S1338), sendo o valor acumulado de 0.999999466. (Tabela 7).

Os resultados do presente trabalho estão em concordância com os obtidos por Alves *et al.* 2001, 2004, sugerindo uma boa eficácia dos sistemas avaliados. Como refere Urquart *et al.* (1996) para que um *loci* tenha aplicação forense é desejável que apresente uma heterozigosidade e poder de discriminação acima de 0.7 (70%) e 0.8 (80%), respetivamente.

5.3. Variantes Alélicas

No presente trabalho identificaram-se duas variantes alélicas, não incluídas nos ladders utilizados: o alelo 24.3 para o *locus* D21S11 com uma frequência de 0.00325 e o alelo 16.1 para o *locus* FGA com uma frequência de 0.00649 (Tabela 8).

O marcador FGA (FIBRA ou HUMFIBRA) é um STR com 4 unidades de repetição (CTTT) encontrado no *locus* que codifica o fibrinogénio alfa no 3º intrão, braço longo do cromossoma 4. A deleção de pares de bases produz alelos microvariantes, muito frequentes neste *locus* (Butler, 2012); assim o alelo 16.1 pode ser resultado da deleção de 3 pares de bases (3pb) na unidade de repetição. Esta variante não foi encontrada na bibliografia existente para a população moçambicana, no entanto foi reportada na população de Angola (Melo *et al.*, 2010).

O *locus* D21S11 é um tetranucleótido complexo localizado no braço longo do cromossoma 21. As microvariantes resultam da inserção de pares de bases na extremidade 3' (Butler, 2012). Estudos realizados com a população de Moçambique também constataram a presença da variante 24.3 (Alves *et al.*, 2001 e Alves *et al.*, 2004).

5.4. Padrão Trialélico no *Locus* TPOX

Das 160 amostras, 3.75% apresentaram um padrão de três alelos tipo 2 para o marcador TPOX (Figura 26), de acordo com a classificação definida por Clayton *et al.* (2004), a qual caracteriza este tipo de padrão pelo fato de os três alelos se apresentarem com picos balanceados. O TPOX é um STR autossómico com quatro unidades de repetição (GAAT) encontrado no intrão 10 do gene que codifica para a peroxidase da tiróide humana. Localiza-se perto do braço curto do cromossoma 2. Os padrões de 3 alelos são comuns neste marcador (Butler, 2012).

Ainda segundo Clayton *et al.* (2004), a causa genética do padrão trialélico do tipo 2 é a duplicação numa pequena região do cromossoma onde se encontra o STR. O padrão trialélico resulta assim de uma duplicação localizada, que é herdada pelos descendentes nas situações em que os gâmetas estejam afetados (Zamir *et al.*, 2002; Clayton *et al.*, 2004; Lukka *et al.*, 2006 e Diaz *et al.*, 2009).

O alelo 10 é comum a todos os padrões trialélicos encontrados (Tabela 9), tal como acontece, noutros estudos (Alves *et al.*, 2004; Lukka *et al.*, 2006 e Lane, 2008).

O padrão trialélico do TPOX geralmente é mais frequente nos indivíduos do sexo feminino (2.499%) (Tabela 9), o que de acordo com o proposto por Lane (2008) se deve ao fato de que o alelo duplicado (alelo 10) se poder encontrar inserido no cromossoma X, visto que há estudos que indicam que um homem com 3 alelos no TPOX nunca transmite os dois aos descendentes do sexo masculino mas sim aos descendentes do sexo feminino (Díaz *et al.*, 2009).

A África Austral é a zona do globo com mais casos de ocorrência do padrão trialélico onde cerca de 2.4% da população autoctone apresenta 3 alelos no TPOX, sugerindo que este fenômeno seja anterior à expansão Bantu (Lane, 2008 e Díaz *et al.*, 2009).

5.5. Estudos Comparativos

Os dois grupos populacionais de Moçambique, nomeadamente Changana a sul e Macua no extremo norte, não mostram diferenças estatísticas significativas nas frequências alélicas dos marcadores estudados ($P=0.08138\pm 0.0026$) (Tabela 11), o que sugere ausência de subestruturação na população de Moçambique, e reforça a hipótese de uma ligação comum com os povos Bantu.

As frequências alélicas dos marcadores estudados nas 154 amostras dos dois principais grupos populacionais (Macua e Changana) foram comparadas com as frequências alélicas de outras populações, nomeadamente Angola (Melo *et al.*, 2010), Brasil (Santos *et al.*, 2004); Venezuela (Bernal *et al.*, 2006); México (Hernandez-Guitierrez *et al.*, 2005), Argentina (Bozzo *et al.*, 2007), Somália (Tillmar *et al.*, 2009); Uganda (Gomes *et al.*, 2009); Guiné Equatorial (Alves *et al.*, 2005); Grécia (Sánchez-Diz *et al.*, 2008); Polónia (Czarny *et al.*, 2005); Croácia (Projić *et al.*, 2007); Servia-Montenegro (Veselinović *et al.*, 2004); Suécia (Montelius *et al.*, 2008); Bélgica (Decorte *et al.*, 2004); Portugal (Lopes *et al.*, 2009) e Namíbia (Muro *et al.*, 2008).

Os resultados do estudo comparativo que estão refletidos na **Figura 27** sugerem uma proximidade genética da população moçambicana (os dois grupos populacionais em conjunto) às outras populações africanas, nomeadamente Angola, Guiné Equatorial, Namíbia e Uganda, distanciando-se do grupo formado pelas populações do Brasil, Argentina, Venezuela, Portugal, Grécia, Bélgica, Croácia, México, Servia-Montenegro, Polónia e Suécia, resultados estes que estão de acordo com os obtidos por Alves *et al.* (2004) e Melo *et al.* (2010).

Comparações *locus a locus* entre a população Moçambicana e as populações acima mencionadas, recorrendo aos valores da probabilidade P das cadeias de Markov Tabela 13, mostram diferenças estatísticas significativas ($P<0.05$), em 6 *loci* com a população de Angola; em 8 *loci* com a população da Guiné Equatorial; em 12 *loci* com as populações de Uganda e da Namíbia; em 14 *loci* com a população do Brasil e finalmente nos 15 *loci* com as populações da

Venezuela, do México, da Argentina, da Somália, da Grécia, da Polónia, da Croácia, da Servia-Montenegro, da Suécia, da Bélgica, e de Portugal, sendo de referir que o maior número de diferenças estatísticas significativas se verifica com as populações da Europa e América do Sul, bem como com a população da Somália.

Vários estudos populacionais (Melo *et al.*, 2010), (Santos *et al.*, 2004); (Bernal *et al.*, 2006); (Hernandez-Guitierrez *et al.*, 2005), (Bozzo *et al.*, 2007), (Tillmar *et al.*, 2009); (Gomes *et al.*, 2009); (Alves *et al.*, 2005); (Sánchez-Diz *et al.*, 2008); (Czarny *et al.* 2005); (Projić *et al.*, 2007); (Veselinović *et al.*, 2004); (Montelius *et al.*, 2008); (Decorte *et al.* 2004); (Lopes *et al.*, 2009) e (Muro *et al.*, 2008) também encontram diferenças estatísticas significativas em alguns dos marcadores estudados nas comparações populacionais efetuadas.

6. Conclusões

- ✓ As frequências alélicas de 15 *loci* microssatélites, D8S1779, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01 (HUMTH01), D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 e FGA (HUMFIBRA) nos grupos populacionais Macua e Changana estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- ✓ A heterozigosidade média obtida é superior a 70% em todos os *loci* estudados, tendo apresentado uma variação de 72.078% (D13S317 e D5S818) a 87.662% (D18S51), exceto o *loci* D3S1338 que apresentou um valor de heterozigotidade de 62.987%. O poder discriminação acumulado foi de 0.9999999997 e a probabilidade de exclusão *a priori* acumulada foi de 0.999999466.
- ✓ As frequências alélicas determinadas no presente estudo podem constituir uma base de dados de referência das populações Macua e Changana no âmbito da genética forense.
- ✓ Nos marcadores genéticos D21S11 e FGA, foram identificadas duas variantes de alelos: o alelo 24.3 para o *locus* D21S11 e o alelo 16.1 no *locus* FGA, salientando que o alelo 16.1 *locus* FGA não estava descrito na população de Moçambique.
- ✓ O *locus* TPOX exibiu um padrão de 3 alelos em 6 amostras, das quais 4 pertenciam a indivíduos do sexo feminino
- ✓ Não existem diferenças genéticas significativas entre os dois grupos populacionais de Moçambique (Macua e Changana).
- ✓ A comparação das distâncias genéticas entre a população moçambicana (considerando os dois grupos em conjunto) com as de outras populações publicadas na literatura revelou um padrão filogenético com dois agrupamentos populacionais, no qual Moçambique, Angola, Guiné Equatorial, Uganda, Namíbia e Somália formam um grupo distinto de Brasil, Venezuela, México, Argentina, Polónia, Croácia, Servia-Montenegro, Suécia, Bélgica e Portugal.

7. Perspetivas

Moçambique é um país com uma população estimada em 24.366.000 de habitantes. Tendo em conta a grande diversidade étnica, futuros trabalhos populacionais deverão incluir mais grupos de modo a complementar os resultados do presente estudo.

Os *loci* STR autossómicos não são os únicos marcadores com aplicação forense. Atendendo ao facto de que em muitos casos de identificação de pessoas a integridade da molécula do ADN é comprometida, futuros estudos deverão ser conduzidos para avaliar a diversidade e o grau de polimorfismo dos STRs dos cromossomas Y e X, bem como a avaliação da diversidade do ADN mitocondrial e dos SNPs (*Single Nucleotide Polimorphisms*) da população de Moçambique.

8. Referências

- ALVES, C., L. GUSMÃO and A. AMORIM (2001). STR data (AmpFISTR Pro®ler Plus and GenePrint CTTv) from Mozambique. Forensic Science International, **119**: 131-133.
- ALVES, C., L. GUSMÃO, A. DAMASCENO, B. SOARES and A. AMORIM (2004). "Contribution for an African autosomic STR database (AmpF/STR Identifiler and Powerplex 16 System) and a report on genotypic variations". Forensic Science International, **139**: 201-205.
- ALVES, C., L. GUSMÃO, A. M. LÓPEZ-PARRA, M. S. MESA, A. AMORIM and E. ARROYO-PARDO (2005). STR allelic frequencies for an African population sample (Equatorial Guinea) using AmpFISTR Identifiler and Powerplex 16 kits. Forensic Science International, **148** (2-3): 239-242.
- APPLIED BIOSYSTEMS (2001). ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer-User Guide, Applied Biosystems.
- APPLIED BIOSYSTEMS (2011). AmpFISTR® Identifiler® Direct PCR Amplification Kit: User Guide, Life Technologies Corporation.
- APPLIED BIOSYSTEMS (2012). Quantifiler® Duo DNA Quantification kit User's Manual, Life Technologies Corporation.
- BERNAL, L. P., L. BORJAS, W. ZABALA, M. G. PORTILLO, E. FERNANDEZ, W. DELGADO, F. TOVAR, N. LANDER, M. A. CHIURILLO, J. L. RAMIREZ and O. GARCIA (2006). "Genetic variation of 15 STR autosomal loci in the Maracaibo population from Venezuela." Forensic Science International **161**(1): 60-63.
- BERNIELL-LEE, G., F. CALAFELL, E. BOSCH, E. HEYER, L. SICA, P. MOUGUIAMA-DAOUDA, L. V. D. VEEN, J. M. HOMBERT, L. QUINTANA-MURCI and D. COMAS (2009). Genetic and Demographic Implications of the Bantu Expansion: Insights from Human Paternal Lineages. Molecular Biology and Evolution, **26**(7): 1581-1589.
- BIO-RAD (2000). "Chele® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin: Instruction Manual." Bio-Rad Laboratories.
- BOZZO, W. R., M. A. PENA, M. I. ORTIZ and M. M. LOJO (2007). "Genetic data from Powerplex 16 system and Identifiler kits from Buenos Aires province (Argentina)." Legal Medicine (Tokyo) **9**(3): 151-153.
- BUTLER, J. M. (2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of Str Markers. Second Edition. 680pp. USA. Academic Press.
- BUTLER, J. M. (2010). Fundamentals of Forensic DNA Typing. 519pp. USA. Academic Press.
- BUTLER, J. M. (2012). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. 699pp. USA. Academic Press.

BUTLER, J. M. and D. J. REEDER (2012). "Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase. <http://www.cstl.nist.gov/strbase/kits/Identifiler.htm>.

CHIPEMBE, C. S., L. DUARTE, D. KHOSSA, M. IBRAIMO, J. D. LOUREIRO, M. C. GASPAR, C. VILANCULOS, F. LANGA e M. CHIVAMBO (2012). Mulheres e Homens em Moçambique Indicadores Seleccionados de Género - 2011. Instituto Nacional de Estatística - Direcção de Estatísticas Sectoriais e de Empresas, <http://www.ine.gov.mz>.

CLAYTON, T. M., J. L. GUEST, A. J. URQUHART, and P. D. GILL (2004). A Genetic Basis for Anomalous Band Patterns Encountered During DNA STR Profiling. Journal of Forensic Science, **49**(6): 1-8.

CORTE-REAL, F., L. ANDRADE, D. N. VIEIRA, A. CARRACEDO and M. C. VIDE (1999). Allele distribution of three STRs in a population from Mozambique. International Journal of Legal Medicine, **112**(5): 345-347.

CROUSE, C. A., S. ROGERS, E. AMIOTT, S. GIBSON and A. MASI-BAY (1999). Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems. Journal of Forensic Science, **44**(1): 87-94.

CZARNY, J., T. GRZYBOWSKI, M. V. DERENKO, B. A. MALYARCHUK and D. M. SLIWKA (2005). Genetic variation of 15 STR *loci* (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, and D19S433) in populations of north and central Poland. Forensic Science International, **147**: 97-100.

DECORTE, R., M. ENGELEN, L. LARNO, K. NELISSEN, A. GILISSEN and J-J. CASSIMAN (2004). Belgian population data for 15 STR *loci* (AmpFISTR1 SGM Plus and AmpFISTR™ profiler PCR amplification kit). Forensic Science International, **139**: 211-213.

DÍAZ, V., P. RIVAS and A. CARRACEDO (2009). The presence of tri-allelic TPOX genotypes in Dominican Population. Forensic Science International: Genetics, **2**: 371-372.

EXCOFFIER, L., GUILLAUME and L. S. SCHNEIDER (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, **1**: 47-50.: 145.

FIRMINO, G. (2011). "A situação do Português no Contexto Multilíngue de Moçambique. <http://www.fflch.usp.br/dlcv/lport/pdf/mes/06.pdf>. Obtido em Dezembro 2012.

GOMES, V. D. R (2011). Ethnicity and Genetics in sub-Saharan Africa. Instituto de Ciências Forenses Luis Concheiro. Faculdade de Medicina e Odontologia. Universidade de Santiago de Compostela. Tese de Doutoramento.

GOMES, V., P. SANCHEZ-DIZ, C. ALVES, I. GOMES, A. AMORIM, A. CARRACEDO and L. GUSMAO (2009). Population data defined by 15 autosomal STR *loci* in Karamoja population (Uganda) using AmpF/STR Identifiler *kit*. Forensic International Genetics, **3**(2): 55 - 58.

GUO, S. W. and E. A. THOMPSON (1992). "Performing the exact test of hardy-weinberg proportion for multiple alleles." Biometrics **48**(2): 361-372.

HERNANDEZ-GUTIERREZA, S., P. HERNANDEZ-FRANCOA, S. MARTINEZ-TRIPPA, M. RAMOS-KURI and H. RANGEL-VILLALOBOS (2005). "STR data for 15 *loci* in a population sample from the central region of Mexico." Forensic Science International, **151**(1): 97-100.

JONES, D. A. (1972). "Blood samples: probability of discrimination." J Forensic Sci Soc, **12**(2): 355-359.

LANE, A.B. (2008). The nature of tri-allelic TPOX genotypes in African populations. Forensic Science International: Genetics, **2**: 134-137.

LOPES, V. (2012). Instruções para utilização do software excel. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses I.P. - Serviço de Genética e Biologia Forense - Delegação do Centro. Coimbra-Portugal, 1- 4.

LOPES, V., A. SERRA, J. GAMERO, L. SAMPAIO, F. BALSÀ, C. OLIVEIRA, F. CORTE-REAL, D. N. VIEIRA, M. C. VIDE, M. J. ANJOS and M. CARVALHO (2009). "Allelic frequency distribution of 17 STRs from Identifiler and PowerPlex-16 in Central Portugal area and the Azores archipelago." Forensic Science International Genetic, **4**(1): 1-7.

LUKKA, M., G. TASA, P. ELLONEN, K. MOILANEN, V. VASSILJEV and I. ULMANEN (2006). Triallelic patterns in STR *loci* used for paternity analysis: Evidence for a duplication in chromosome 2 containing the TPOX STR *locus*. Forensic science International, **164**: 3-9.

MELO, M. M., M. CARVALHO, V. LOPES, M. J. ANJOS, A. SERRA, D. N. VIEIRA, J. SEQUEIROS and F. CORTE-REAL (2010). "Genetic study of 15 STRs *loci* of Identifiler system in Angola population." Forensic Sci Int Genet, **4**(5): 153-157.

MONTANO, V., G. FERRI, V. MARCARI, C. BATINI, O. ANYAELE, G. DESTRO-BISOL and D. COMAS (2011). The Bantu expansion revisited: a new analysis of Y chromosome variation in Central Western Africa. Molecular Ecology, **20**: 2693-2708.

MONTELIUS, K., A. O. KARLSSON and G. HOLMLUND (2008). STR data for the AmpF/STR Identifiler *loci* from Swedish population in comparison to European, as well as with non-European population. Forensic Science International Genetics, **2**: 49-52.

MURO, T., J. FUJIHARA, S. IMAMURA, H. NAKAMURA, T. YASUDA and H. TAKESHITA (2008). "Allele frequencies for 15 STR *loci* in Ovambo population using AmpF/STR Identifiler *Kit*." Legal Medicine (Tokyo) **10**(3): 157-159.

- NEI, M. (1978). "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals." Genetics **89**(3): 583-590.
- NEI, M. and A. K. ROYCHOUDHURY (1974). "Sampling variances of heterozygosity and genetic distance." Genetics **76**(2): 379-390.
- OHNO, Y., M. I. M. SEBETAN and S. AKAISHI (1982). "A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles." Forensic Sci Int, **19**(1): 93-98.
- PAGE, R. D. M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers, Computer Applications in the Biosciences.
- PEREIRA, L., L. GUSMAO, C. ALVES, A. AMORIM and M. J. PRATA (2002). Bantu and European Y-lineages in Sub-Saharan Africa. Ann. Hum. Genet., **66**: 369-378.
- PEREIRA, L., V. MACAULAY, A. TORRONI, R. SCOZZARI, M.-J. PRATA and A. AMORIM (2001). Prehistoric and historic traces in the mtDNA of Mozambique: insights into the Bantu expansions and the slave trade. Ann. Hum. Genet., **65**: 439-458.
- PINHEIRO, M. F. T. (2010). Genética Forense: Perspectivas da Identificação Genética, Universidade Fernando Pessoa.
- PLAZA, S., A. SALAS, F. CALAFELL, F. CORTE-REAL, J. BERTRANPETIT, Á. CARRACEDO and D. COMAS (2004). Insights into the western Bantu dispersal: mtDNA lineage analysis in Angola. Hum Genet, **115**: 439-447.
- PROJIĆ, P., V. ŠKARO, I. ŠAMIJA, N. POJSKIĆ, A. DURMIĆ-PAŠIĆ, L. KOVAČEVIĆ, N. BAKAL, D. PRIMORAC and D. MARJANOVIĆ (2007). Allele Frequencies for 15 Short Tandem Repeat *Loci* in Representative Sample of Croatian Population. Croat Med J., **48**: 473-477.
- ROUSSET, F. (2008). Genepop`007: A complete re-implentation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, **8**(1): 103-106.
- SÁNCHEZ-DIZ, P., P.G. MENOUNOS, A. CARRACEDO and I. SKITSA (2008). 16 STR data of a Greek population. Forensic Science International Genetics, **2**: 71-72.
- SANTOS, M. V., M. J. ANJOS, L. ANDRADE, M. C. VIDE, F. CORTE-REAL and D. N. VIEIRA (2004). Population genetic data for the STR *loci* using the AmpFISTR® Identifiler™ *Kit* in Bahia, Brazil. International Congress Series, **1261**: 219-222.
- TILLMAR, A. O., G. BACKSTRON and K MONTELIUS (2009). Genetic variation of 15 autosomal STR *loci* in a Somali population. Forensic Sci Int Genet, **4**(1): 19-20.
- UNIÃO EUROPEIA (2001). Council Resolution of 25 June 2001 on the exchange of DNA Analysis Results (2001/C 187/01). Official Journal of European Communities. **3.7**: 1-4.

UNIÃO EUROPEIA (2009). Council Resolution of 30 November 2009 on the exchange of DNA Analysis Results (2009/C 296/01). Official Journal of European Communities. **5.12**: 1-3.

URQUHART, A. J., N. J. OLDROYD, T. DOWNES, M. BARBER, R. ALLISTON-GREINER, C. P. KIMPTON and P. D. GILL (1996). Selection of STR *loci* for forensic identification systems. *Advances in Forensic Haemogenetics*, **6**: 115-117.

VESELINOVIĆ, I., M. KUBAT, I. FURAC, J. ŠKAVIĆ, I. MARTINOVIĆ KLARIĆ and M. TASIĆ (2004). Allele frequencies of the 15 AmpFI STR Identifiler *loci* in the population of Vojvodina Province, Serbia and Montenegro. *Int J Legal Med*, **118**: 184-186.

WALSH, P. S., D. A. METZGER and R. HIGUCHI (1991). "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material." *Biotechniques*, **10**(4): 506-513.

WEIR, B. S. (1996). *Genetic data analysis II*. 480pp. USA. Sinauer Associates.

ZAMIR, A., M. SHPITZEN, C. OZ, U. MOTRO, V. MEINER, and R. GAFNY (2002). Presentation of a Three-Banded Allele Pattern—Analysis and Interpretation. *Journal of Forensic Science*, **47**(4): 1-3.

<http://www.khoisan.org/social.htm>. Acesso em Janeiro/2013

<http://www.portaldogoverno.gov.mz/Mozambique>. Acesso em Janeiro/2013

<http://www.promega.com/>. Acesso em Janeiro/2013

9. Anexos

Anexo I. Ficha de inquérito a acompanhar cada amostra

Adaptado de (Melo, Carvalho et al. 2010).

Moçambique - grupos étnicos-linguísticos. Nº _____ Data ____/_____/2012. Sexo: M F Local de Nascimento _____ Província _____ Grupo étnico-linguístico _____ Residente _____ *****
Pai: Local de nascimento _____ Província _____ Grupo étnico-linguístico _____ Avó paterno: local de nascimento _____ Avó paterna: local de nascimento _____ *****
Mãe: Local de Nascimento _____ Província _____ Grupo étnico-linguístico _____ Avó Materno: local de nascimento _____ Avó Materna: local de nascimento _____ *****
Local da colheita _____ Província _____

Anexo 2: Reagentes, material e equipamento

Extração

Agitador magnético

Agitador vortex

Água Desionizada e autoclavada

Alicate *paper puncher single hole*

Balaça analítica

Banho de aquecimento

Barra magnética de 2,5 cm de comprimento ``magnete``

Câmara de trabalho *DNA work stanion*

Centrífuga

Chelex® 100

Como graduado de 100 ml

Copo e saco plástico para residuos

Cronómetro

Espátula de madeira

Luvas sem pó descartáveis

Máscaras descartáveis

Micropipetas 200 µl, 1000 µl

Papel de filtro limpo

Papel *parafilm*®

Pipetas *Pasteur* 1 ml

Placa térmica e panela

Pontas de 1000µl

Pontas *wide bore* de 200µl

Proveta graduada de 25 ml

Solução de Chelex 5%

Suportes para tubos 1.5 ml

Suportes, para tubos 1.5 ml, flutuantes

Preparação da Solução de Chelex 5%

Foi, prepara a solução Chelex 5% pesando 1.25 g de Chelex® 100, colocada num copo graduado de 100 ml e adicionado 25 ml de água desionizada-autoclavada. Foi colocado na solução uma barra magnética 2,5 mm de comprimento, o copo foi selado com papel parafilm e identificado com a data da preparação, tipo de solução e nome de quem preparou. A solução sempre foi conservada a 2-8°C.

Amplificação

Sala pré-PCR para amostras *referências*

- Câmara de fluxo laminar
- Centrífuga
- Agitador vortex
- Pontas de 10, 20, e 200 µl
- Micropipetas de 10, 20, e 200 µl
- Tubos 0.2 ml
- Kit AmpFISTR® Identifiler® Direct**
- Batas descartáveis
- Luvas sem pó descartáveis
- Mascaras descartáveis

Sala de PCR e Eletroforese

- Termociclador *GenAmp PCR System 2700*

Eletroforese capilar para a detecção dos fragmentos

- Agitador tipo vortex,
- Câmara de trabalho *DNAworkstation*,
- Centrífuga,
- Cronómetro,
- Formamida Hi-Di,
- Ladder alélico,
- Luvas descartáveis sem pó,
- Máscaras descartáveis,
- Micropipetas de 10, 100 e 200 µl,
- Padrão *LIZ® 500*,
- Pontas com filtro de 10, 20, 200 µl,
- Termo bloco,
- Tubos de 1.5 ml,
- Tubos de 500 ml e tampas de borracha semi-abertas.

Tabela 14. Genotipagem de 160 amostras dos principais grupos populacionais (Macua e Changana) de Moçambique para os 15 marcadores STR (D8S1779, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA).

Amostras		D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	AMEL
Mc - 1	Alelo 1	14	28	10	10	16	6	11	9	23	12	18	8	14	10	22	X
	Alelo 2	15	31	11	12	17	7	12	13	25	14,2	18	11	19	13	23	Y
Mc - 2	Alelo 1	13	29	8	12	15	6	11	10	17	11	17	7	16	12	23	X
	Alelo 2	14	32,2	10	12	17	7	12	12	22	13	19	8	17,3	12	25	X
Mc - 3	Alelo 1	13	28	8	7	16	8	10	10	18	14	15	8	18	9	25	X
	Alelo 2	14	30	10	10	18	8	12	10	19	14	16	8	19	12	26	Y
Mc - 4	Alelo 1	12	27	8	9	16	7	12	10	16	13	15	10	17	11	23	X
	Alelo 2	14	31	10	12	17	9	13	12	22	14	18	11	17	13	23	Y
Mc - 5	Alelo 1	12	27	8	10	15	8	10	11	18	13,2	13	8	15	12	23	X
	Alelo 2	15	28	10	10	16	8	12	11	21	14	17	11	17	12	24	Y
Mc - 6	Alelo 1	15	28	8	7	15	8	11	9	21	13	15	6	15	8	22	X
	Alelo 2	15	28	10	12	17	9	12	10	21	14	18	9	17	12	23	Y
Mc - 7	Alelo 1	14	31,2	10	10	15	6	11	9	16	11	16	9	15	12	21	X
	Alelo 2	16	32	11	10	16	8	11	11	16	15	21	11	15	13	26	Y
Mc - 8	Alelo 1	12	31	8	10	14	7	11	9	16	13	15	6	15	12	19	X
	Alelo 2	14	32,2	12	10	15	7	11	10	21	13,2	17	11	20	15	24	Y
Mc - 9	Alelo 1	12	31,2	11	7	14	7	12	11	25	12	18	9	17	13	19	X
	Alelo 2	16	31,2	13	11	14	8	12	11	26	14	18	11	17	13	25	X
Mc - 10	Alelo 1	13	31,2	9	10	15	7	12	9	21	12,2	15	11	17	12	24	X
	Alelo 2	14	32,2	11	12	15	7	14	11	21	13	19	11	18	12	26	X
Mc - 11	Alelo 1	12	27	10	8	15	6	11	11	21	11	16	9	15	10	24	X
	Alelo 2	14	29	11	8	17	9	14	12	27	13	19	11	16	13	24	X
Mc - 12	Alelo 1	13	27	9	10	16	9	11	9	21	13,2	16	8	18	12	24	X
	Alelo 2	13	28	11	12	16	9	11	11	21	14	18	11	19	12	25	Y
Mc - 13	Alelo 1	11	30	9	11	15	7	11	11	16	14	15	11	18	12	19	X
	Alelo 2	14	32,2	12	13	17	9	13	11	21	16	17	11	21	12	22	X
Mc - 14	Alelo 1	13	27	9	11	15	7	11	9	17	12,5	14	8	12	11	25	X
	Alelo 2	16	28	12	12	16	8	12	11	25	15	16	10,11	20	12	26	X
Mc - 15	Alelo 1	13	29	9	12	17	7	11	9	16	12	17	9	12	8	24	X
	Alelo 2	14	30	10	12	17	9	11	11	22	13	17	11	14	12	24	Y
Mc - 16	Alelo 1	13	30,2	8	11	15	7	12	11	15	12	15	6	14	11	22	X
	Alelo 2	14	32,2	9	11	16	7	12	11	22	15	20	10	15	11	24	X
Mc - 17	Alelo 1	14	28	8	12	16	6	10	9	16	13	16	6	15	13	22	X
	Alelo 2	15	32,2	10	12	17	8	14	12	22	14	18	11	20	13	24	X
Mc - 18	Alelo 1	12	32,2	9	11	13	7	12	9	20	14	16	8	16	12	21	X
	Alelo 2	14	32,2	11	11	16	7	12	12	23	14	18	10	18	13	26	Y
Mc - 19	Alelo 1	14	29	8	11	15	7	8	11	20	9	17	6	16	12	21	X
	Alelo 2	15	30	11	11	16	8	12	12	21	12	17	9	16	13	24	X
Mc - 20	Alelo 1	14	28	8	11	14	7	10	11	17	12	15	7	12	11	23	X
	Alelo 2	16	32	10	13	17	8	12	14	22	14	17	9	18	12	26	Y
Mc - 21	Alelo 1	12	30	8	11	15	7	12	10	21	13	16	11	13	10	19,2	X
	Alelo 2	13	31	11	12	18	9	12	12	22	14	17	11	18	12	25	X
Mc - 22	Alelo 1	11	31	9	7	15	7	11	11	20	11	16	9	16	8	21	X
	Alelo 2	14	36	10	13	15	7	12	12	24	13	18	10	16	13	24	Y
Mc - 23	Alelo 1	11	28	10	10	15	6	11	10	19	11	15	6	16	11	24	X
	Alelo 2	11	30	10	11	16	8	11	11	24	12	15	12	16	12	26	X
Mc - 24	Alelo 1	14	27	10	7	16,2	7	11	9	18	13	16	9	17	12	19	X
	Alelo 2	15	29	11	11	17	8	13	12	25	14	19	10	19	12	24	Y
Mc - 25	Alelo 1	13	30	11	10	15	8	11	9	20	14	15	8	15	13	24	X
	Alelo 2	14	31	12	10	16	8	12	11	22	14	18	9	16	13	26	X
Mc - 26	Alelo 1	14	30	11	11	15	8	12	10	21	14	15	6, 10	13	13	24	X
	Alelo 2	15	36	13	11	15	9	12	11	23	14	16	11	16	13	25	Y

Amostras		D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	AMEL
Mc - 27	Alelo 1	15	28	9	8	15	7	11	9	16	13	16	6	17	12	23	X
	Alelo 2	16	28	11	11	15	7	11	11	17	14.2	17	10	19	12	24	X
Mc - 28	Alelo 1	15	28	8	11	17	7	12	11	17	13	18	9	16	8	22	X
	Alelo 2	16	35	10	12	17	10	12	12	18	14	19	11	18	10	26	X
Mc - 29	Alelo 1	15	28	11	10	16	7	11	11	16	13	16	9	15	11	19.2	X
	Alelo 2	16	28	12	11	17	8	12	12	19	14	17	11	19	13	25	X
Mc - 30	Alelo 1	12	31.2	10	10	14	7	11	9	20	11	16	10	16	8	24	X
	Alelo 2	15	31.2	13	10	17	9	12	11	26	14	18	11	17	11	26	X
Mc - 31	Alelo 1	14	30.2	10	10	14	9	12	11	16	12	15	8	16	8	23	X
	Alelo 2	15	33	10	11	16	9	13	12	21	13	16	11	18	12	23	Y
Mc - 32	Alelo 1	12	28	8	11	15	7	11	8	19	13	15	9	13	11	22	X
	Alelo 2	13	32.2	10	12	15.2	8	12	13	25	15.2	18	11	16	12	23	Y
Mc - 33	Alelo 1	13	28	10	11	16	9	12	9	17	12.2	17	8	14	8	25	X
	Alelo 2	13	31	10	11	17	9	12	10	25	14	18	10	16	12	26	Y
Mc - 34	Alelo 1	14	28	8	7	15	8	12	10	22	11	16	11	18	12	25	X
	Alelo 2	15	30	11	11	16	8	12	12	22	13.2	18	12	19	12	26	X
Mc - 35	Alelo 1	13	28	8	7	15	7	11	11	17	13	18	9	10	10	22	X
	Alelo 2	15	31.2	11	12	15	9	11	12	22	14	18	11	16	12	25	X
Mc - 36	Alelo 1	16	28	8	10	17	7	11	9	16	13	17	8	14	10	24	X
	Alelo 2	16	28	11	12	18	7	12	11	20	15.2	18	9	16	13	24	Y
Mc - 37	Alelo 1	13	28	8	10	16	7	11	9	20	13	18	6	13	8	24	X
	Alelo 2	14	31	10	11	16	7	13	11	22	13	18	11	16	12	26	Y
Mc - 38	Alelo 1	13	30	11	8	16	6	11	11	16	12.2	15	8	12	12	21	X
	Alelo 2	14	31.2	11	10	17	7	11	12	16	12.2	18	11	13	13	24	Y
Mc - 39	Alelo 1	14	31.2	10	10	15	7	11	9	22	11	18	8	15	11	21	X
	Alelo 2	14	32	10	12	17	9	13	10	24	13	18	11	18	12	22	X
Mc - 40	Alelo 1	14	31	9	11	17	7	10	9	20	11	15	8	16	10	21	X
	Alelo 2	14	31.2	10	11	17	9	12	11	27	14.2	19	11	18	12	21	X
Mc - 41	Alelo 1	13	29	9	7	15	6	9	11	23	11	16	9, 10	14	11	22	X
	Alelo 2	14	29	11	10	15	10	11	12	23	13	18	11	16	13	24	Y
Mc - 42	Alelo 1	13	27	10	7	15	7	11	11	19	12.2	14	9	16	12	23	X
	Alelo 2	15	28	11	10	15	7	12	11	22	13.2	14	11	20	15	26	X
Mc - 43	Alelo 1	14	28	10	10	15	7	11	10	20	12	15	10	15	12	19	X
	Alelo 2	15	36	13	11	19	8	12	12	22	14	15	11	16	13	23	X
Mc - 44	Alelo 1	13	28	9	10	15	7	10	11	18	13	16	6	16	13	22	X
	Alelo 2	14	28	10	12	15	9	11	12	24	15	18	11	20	13	25	X
Mc - 45	Alelo 1	15	29	8	10	16	7	10	11	17	11	16	8	13.2	12	21	X
	Alelo 2	16	30	10	10	16	8	11	11	19	13	16	9	18	13	22	Y
Mc - 46	Alelo 1	14	29	8	9	15	8	11	9	15	13	16	11	14	8	20	X
	Alelo 2	15	30	9	12	16	9	11	12	21	13.2	16	11	16	11	26	X
Mc - 47	Alelo 1	14	28	11	11	15.2	6	11	11	23	11	15	9	13	12	22	X
	Alelo 2	14	31	13	12	16	9	12	11	23	12.2	20	11	15	13	25	X
Mc - 48	Alelo 1	12	29	9	11	15	7	11	9	23	13	15	10	17	12	22	X
	Alelo 2	15	31	10	12	16	7	12	11	24	13	18	11	17	13	22	X
Mc - 49	Alelo 1	11	27	11	7	16	6	12	9	17	14	17	8	14	10	22	X
	Alelo 2	15	35	13	11	17	7	14	10	19	16.2	18	10	18	12	23	Y
Mc - 50	Alelo 1	12	28	8	8	14	6	10	11	8	21	14	9	16	13	23	X
	Alelo 2	13	28	10	12	15	8	11	11	21	16	19	9	18	13	25	X
Mc - 51	Alelo 1	11	28	9	11	16	7	12	10	21	13	14	8, 10	16	11	22	X
	Alelo 2	12	30	11	12	17	8	14	11	22	14	19	11	18	13	26	X
Mc - 52	Alelo 1	10	29	8	11	16	6	11	11	22	13	15	8	19	9	23	X
	Alelo 2	15	31.2	11	12	16	7	13	12	25	14	20	8	20	11	26	X
Mc - 53	Alelo 1	14	27	8	10	12	7	12	11	17	12.2	13	8	17	11	21	X
	Alelo 2	15	31	13	12	16	9	13	13	24	14	16	11	20	12	26	Y
Mc - 54	Alelo 1	14	28	8	7	14	9	11	9	19	13	16	11	17	11	23	X
	Alelo 2	14	29	10	10	16	9	12	12	20	13	18	11	21	13	25	X

Amostras		D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	AMEL
Mc - 55	Alelo 1	15	31.2	8	10	15	9	11	11	18	13	19	8	17	10	25	X
	Alelo 2	15	31.2	8	11	15	9	12	13	21	14	20	8	17	11	26	Y
Mc - 56	Alelo 1	13	31	8	12	16	7	12	11	20	11	14	8	13	8	23	X
	Alelo 2	13	32	8	12	16	8	12	12	22	14.2	16	11	19	12	24	X
Mc - 57	Alelo 1	12	28	8	10	15	6	11	9	24	12.2	14	10	15	12	22	X
	Alelo 2	14	31	12	10	15	8	12	9	27	14.2	17	11	16	12	22	Y
Mc - 58	Alelo 1	11	27	8	12	15	9	11	11	22	13	15	6	17	11	23	X
	Alelo 2	12	35	10	12	16	9	12	12	22	14	18	10	21	13	24	X
Mc - 59	Alelo 1	15	28	10	10	16	7	11	9	17	13	18	8	15	11	23	X
	Alelo 2	15	28	11	11	16	9	11	10	19	14.2	19	8	20	11	26	Y
Mc - 60	Alelo 1	14	28	9	12	16	7	11	11	16	13	16	11	14	12	19	X
	Alelo 2	15	32.2	11	12	17	8	12	13	18	14	17	11	16	12	26	X
Mc - 61	Alelo 1	11	27	8	12	16	7	11	9	17	12	15	7	16	12	25	X
	Alelo 2	15	29	8	15	17	9	12	12	21	13	18	9	21	12	25	X
Mc - 62	Alelo 1	14	27	10	10	16	7	11	10	17	12	16	8	15	12	25	X
	Alelo 2	14	30	11	12	16	9	11	11	22	13	16	11	17	13	26	Y
Mc - 63	Alelo 1	14	29	10	11	16	7	11	10	16	12	17	8	14	12	23	X
	Alelo 2	16	30	11	12	17	9	12	13	21	14.2	17	11	20	12	25	X
Mc - 64	Alelo 1	12	32.2	8	10	15	6	12	9	21	14	15	11	17	12	19	X
	Alelo 2	14	34	10	12	17	8	13	11	21	15	18	11	21	13	46.2	X
Mc - 65	Alelo 1	14	29	8	11	15	6	12	8	19	13	16	8	15	12	21	X
	Alelo 2	14	35	13	12	16	8	12	10	24	13	18	10	19	15	24	X
Mc - 66	Alelo 1	15	29	10	12	15	8	11	11	22	11	15	8	19	11	22	X
	Alelo 2	16	30	10	13	17	9	12	12	24	14	17	11	22	12	24	X
Mc - 67	Alelo 1	12	28	10	11	15	6	8	12	17	13	17	9	9	10	22	X
	Alelo 2	15	28	12	11	17	7	11	12	25	15.2	19	11	17	12	25	Y
Mc - 68	Alelo 1	13	28	8	8	16	8	13	12	19	13	14	6	16	11	22	X
	Alelo 2	14	30	11	10	16	9.3	13	13	20	13	19	9	16	12	27	Y
Mc - 69	Alelo 1	12	28	9	10	15	6	11	9	19	13	15	11	19	12	21	X
	Alelo 2	12	34.2	10	10	17	7	13	9	23	13	16	11	21	13	21	Y
Mc - 70	Alelo 1	12	28	8	10	15	6	13	11	19	12	16	9	18	12	22	X
	Alelo 2	16	32.2	11	12	17	7	13	11	22	14	17	9	19	12	24	Y
Mc - 71	Alelo 1	14	27	11	7	16	6	12	11	20	13	15	9	14	11	25	X
	Alelo 2	15	29	12	10	17	7	12	12	26	13	16	11	20	13	26	Y
Mc - 72	Alelo 1	11	28	8	7	15	7	11	10	22	13	15	9	15	12	20	X
	Alelo 2	15	29	10	12	18	8	12	12	22	14.2	19	9	17	12	22	X
Mc - 73	Alelo 1	12	30	8	7	16	7	11	9	19	13	16	8	16	8	18.2	X
	Alelo 2	14	32.2	9	13	16	8	13	12	21	16.2	17	9	17	13	23	X
Mc - 74	Alelo 1	12	30	10	9	15	7	12	9	21	11	16	8	17	12	23	X
	Alelo 2	14	30	11	12	15	8	12	11	25	13	20	8	19	12	25	X
Mc - 75	Alelo 1	13	29	8	8	15	6	11	9	18	11	18	9	15	10	22	X
	Alelo 2	16	31.2	10	12	18	7	12	10	20	14	20	10	18	12	23	Y
Mc - 76	Alelo 1	11	28	10	10	16	6	12	10	19	11	18	9	16	12	24	X
	Alelo 2	14	29	11	10	16	9	13	11	19	16	19	11	17	13	25	X
Mc - 77	Alelo 1	14	31	8	11	14	8	12	11	18	12	15	6	15	13	23	X
	Alelo 2	15	35	10	11	17	9	12	13	21	14	17	9	24	13	26	X
Mc - 78	Alelo 1	13	30	10	9	15	8	12	11	16	11	19	8	15	12	18	X
	Alelo 2	14	30	10	10	15	9	13	11	21	12.2	20	11	17	12	25	X
Mc - 79	Alelo 1	13	31	11	8	16	7	11	10	16	12	18	9	17	8	19	X
	Alelo 2	13	31.2	11	11	16	7	12	13	19	13	19	10	17	8	19.2	X
Mc - 80	Alelo 1	11	28	8	10	15	6	11	8	16	12.2	15	8	13	9	19.2	X
	Alelo 2	15	30.2	10	12	15	8	12	10	21	14	17	10	17	12	22	Y
Mc - 81	Alelo 1	14	27	8	7	16	7	11	9	21	13	18	6	17	11	22	X
	Alelo 2	15	31.2	9	11	17	7	13	9	21	13.2	20	11	18	13	23	Y
Mc - 82	Alelo 1	12	28	11	10	15	6	10	10	18	12	15	8	15	8	22	X
	Alelo 2	12	28	11	11	15	7	11	13	21	13	19	11	16	11	31.2	Y

Amostras		D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	AMEL
Mc - 83	Alelo 1	13	27	8	11	16	6	12	9	18	13	15	11	13.2	13	23	X
	Alelo 2	14	28	9	12	16	7	12	10	26	13	16	13	18	13	23	Y
Mc - 84	Alelo 1	13	28	10	10	15	7	12	11	21	13	16	8	15	12	16.1	X
	Alelo 2	14	30	10	12	15	8	12	12	22	14.2	20	11	16	12	22	X
Mc - 85	Alelo 1	12	28	10	11	16	7	13	11	16	14	18	9	19	11	25	X
	Alelo 2	14	35	10	12	16	8	13	12	20	14	20	11	20	13	25	X
Mc - 86	Alelo 1	13	28	10	12	15	6	12	9	26	13.2	11	8	16	8	22	X
	Alelo 2	15	29	12	13	15	7	13	11	26	14.2	15	11	18	11	22	X
Mc - 87	Alelo 1	14	31	7	11	15	8	11	9	22	11	15	9	15	11	21	X
	Alelo 2	15	36	10	11	17	8	14	10	23	12.2	16	10	17	12	26	X
Mc - 88	Alelo 1	11	27	8	8	14	7	11	9	19	11	14	9	15	11	19	X
	Alelo 2	14	29	8	13	16	9	14	10	22	12	22	10	17	12	21	Y
Mc - 89	Alelo 1	12	27	8	9	15	7	11	9	22	11	15	9	16	12	19.2	X
	Alelo 2	13	28	10	12	16	7	13	9	22	14	17	11	17	13	24	Y
Mc - 90	Alelo 1	13	31.2	9	10	15	7	12	11	21	12.2	15	6	16	11	19	X
	Alelo 2	14	36	11	12	15	8	12	13	22	13	20	9	18	12	24	Y
Mc - 91	Alelo 1	12	31.2	8	12	15	7	9	9	16	12	14	6	16	8	22	X
	Alelo 2	16	32.2	9	12	15	8	12	12	25	13	18	8	16	12	23	X
Mc - 92	Alelo 1	13	24.3	10	11	15	9	12	10	20	12	14	8	14	8	22	X
	Alelo 2	14	28	11	12	16	9	12	13	26	12	18	10	16	12	26	Y
Mc - 93	Alelo 1	12	28	10	11	15	8	12	9	16	13	16	8	13	12	19	X
	Alelo 2	14	28	11	12	17	8	12	10	25	14	16	8	18	13	25	Y
Mc - 94	Alelo 1	12	27	11	12	15	7	11	11	20	12	16	8	14	11	23	X
	Alelo 2	13	27	11	12	17	8	13	13	22	13	16	9	18	12	26	Y
Mc - 95	Alelo 1	15	31	8	11	15	6	11	9	22	14	16	9	12	11	19	X
	Alelo 2	15	31	11	12	16	9.3	13	10	22	15	18	9	19	13	19	Y
Mc - 96	Alelo 1	15	30.2	8	12	15	7	11	9	19	13	15	10	16	12	20	X
	Alelo 2	16	31.2	10	12	16	9	11	13	21	14.2	16	11	18	12	22	X
Mc - 97	Alelo 1	12	30	12	10	15	7	10	10	19	14	18	10	14	11	21	X
	Alelo 2	14	30	12	14	17	8	13	13	20	14	18	11	20	11	24	X
Mc - 98	Alelo 1	11	28	11	7	16	6	11	9	19	12	15	10	15	8	22	X
	Alelo 2	16	31	12	10	17	6	11	10	21	13	21	11	18	12	22	Y
Mc - 99	Alelo 1	15	29	8	10	15	8	12	12	25	11	17	8	18	12	23	X
	Alelo 2	15	34.2	13	10	16	9	14	12	26	11	18	11	19	14	25	Y
Mc - 100	Alelo 1	13	29	10	10	15	6	12	11	20	12	15	8	14	12	20	X
	Alelo 2	15	31	10	12	15	9	13	11	21	12.2	16	11	19	13	25	Y
Mc - 101	Alelo 1	13	28	10	11	15	6	12	11	21	13	15	8	9	8	24	X
	Alelo 2	14	35	10	12	15	9	12	13	24	14	15	8	18	12	24	Y
Mc - 102	Alelo 1	14	28	8	7	16	6	11	10	16	14	18	9	15	8	19	X
	Alelo 2	15	31	10	12	16	9	14	11	21	14.2	19	11	17	12	25	Y
Mc - 103	Alelo 1	12	27	9	10	15	7	12	11	19	11	16	10	17	10	20	X
	Alelo 2	13	31	11	12	16	9	13	13	19	13	18	11	18	13	21	Y
Mc - 104	Alelo 1	13	30	8	8	15	7	11	11	21	12	14	10	15	11	20	X
	Alelo 2	15	35	10	12	17	8	11	13	24	13	15	11	19	13	21	X
Mc - 105	Alelo 1	13	28	8	12	16	7	10	11	18	10	16	9	16	12	19	X
	Alelo 2	14	31.2	10	13	17	8	13	13	21	12	21	11	18	13	22	X
Mc - 106	Alelo 1	12	28	8	10	15	8	11	11	14	11	18	6	15	12	19.2	X
	Alelo 2	16	28	10	12	17	8	12	11	21	13.2	19	8	15	13	21	Y
Mc - 107	Alelo 1	13	28	10	11	16	7	11	11	16	12	18	6	14	11	23	X
	Alelo 2	14	31.2	12	12	16	8	14	13	23	13	20	8	19	12	26	Y
Mc - 108	Alelo 1	14	28	9	7	16	7	12	9	19	13	15	9	16	11	24	X
	Alelo 2	14	31.2	10	10	17	7	14	9	19	14	18	11	16	11	25	Y
Mc - 109	Alelo 1	12	28	8	12	14	7	11	11	21	13	15	6	13	11	25	X
	Alelo 2	15	31.2	11	12	15	8	12	11	25	13	19	11	17	12	28	Y
Mc - 110	Alelo 1	14	30	9	12	15	8	11	9	16	14	16	6	17	11	19	X
	Alelo 2	15	31	10	12	16	9	12	10	23	14.2	18	11	18	12	25	Y

Amostras		D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	AMEL
Mc - 140	Alelo 1	11	29	9	12	15	7	12	9	22	13	18	10	17	12	21	X
	Alelo 2	14	30.2	10	12	15.2	8	12	9	22	13	19	11	18	12	25	X
Mc - 141	Alelo 1	15	28	8	7	16	7	12	11	22	13	15	9	13	11	20	X
	Alelo 2	15	31	11	10	16	7	14	11	27	14	16	11	15	12	25	X
Ch - 111	Alelo 1	13	27	8	9	15	7	10	9	16	14	16	10	17	8	19.2	X
	Alelo 2	13	30	10	10	16	8	11	11	19	14.2	20	11	23	12	24	Y
Ch - 112	Alelo 1	15	29	9	10	14	7	13	10	20	13.2	14	8	15	11	19	X
	Alelo 2	15	32.2	10	13	16	8	13	11	21	14	15	10	17	12	24	Y
Ch - 113	Alelo 1	11	29	10	11	15	6	11	10	21	15	15	6	18	11	22	X
	Alelo 2	15	31.2	11	12	15	7	13	12	22	16.2	21	9	19	11	24	X
Ch - 114	Alelo 1	11	27	11	10	17	8	11	9	22	12	16	9	14	12	21	X
	Alelo 2	13	31	11	11	17	9	11	9	22	15	19	11	19	13	23	X
Ch - 115	Alelo 1	14	27	10	7	16	7	11	11	17	13	16	8	17	8	23	X
	Alelo 2	15	30	10	12	16	9	12	13	24	13	16	9	19	13	25	X
Ch - 116	Alelo 1	14	29	9	7	16	7	11	9	19	14	15	8	14	11	16.1	X
	Alelo 2	17	29	10	11	17	9	12	10	22	14.2	16	11	16	12	24	X
Ch - 117	Alelo 1	14	28	9	11	15	6	11	9	19	12	16	11	16	8	16.1	X
	Alelo 2	15	28	11	13	17	7	14	10	20	13.2	17	11	18	11	23	X
Ch - 118	Alelo 1	12	27	10	10	15	7	11	9	17	11	17	6	15	12	24	X
	Alelo 2	16	30	13	13	15	8	12	11	21	14	17	8	16	13	26	Y
Ch - 119	Alelo 1	11	31	10	8	15	6	12	10	21	14	18	11	16	9	23	X
	Alelo 2	14	31	11	11	16	8	13	12	22	15	19	11	20.2	10	25	X
Ch - 120	Alelo 1	14	28	7	11	15	7	8	9	21	13	16	9	15	8	22	X
	Alelo 2	14	28	10	12	15	8	11	11	25	14	17	9	18	11	25	X
Ch - 121	Alelo 1	11	27	8	9	15	6	9	10	18	11	16	8	17	8	16.1	X
	Alelo 2	13	31.2	11	12	15	9	12	13	23	14	18	9	17	11	21	Y
Ch - 122	Alelo 1	15	28	9	11	15	6	11	9	16	12	16	8	16	11	25	X
	Alelo 2	15	29	11	12	17	7	14	13	20	13	16	11	17	12	27	Y
Ch - 123	Alelo 1	16	27	9	10	17	8	11	8	17	12	16	9	17	10	22	X
	Alelo 2	16	32.2	11	13	17	8	12	11	22	13.2	17	11	18	11	25	Y
Ch - 124	Alelo 1	13	29	9	11	15	7	11	11	21	13	16	8	17	9	24	X
	Alelo 2	14	30	11	13	16	7	12	11	21	13	18	11	20	12	24	Y
Ch - 125	Alelo 1	14	27	10	7	14	8	11	11	22	11	16	8	16	11	25	X
	Alelo 2	14	28	11	12	17	8	13	12	23	12	18	9	20	12	26	Y
Ch - 126	Alelo 1	13	30	10	10	16	7	9	9	21	11	15	6	16	8	24	X
	Alelo 2	15	35	12	12	16	9	12	13	22	12.2	18	8	18	13	27	Y
Ch - 127	Alelo 1	13	29	10	7	16	9	12	9	19	13	15	8	17	12	19.2	X
	Alelo 2	14	31	11	12	17	9.3	13	12	25	14.2	17	9	18	13	24	Y
Ch - 128	Alelo 1	12	31	10	9	16	7	11	10	22	12.2	15	6	17	13	23	X
	Alelo 2	15	31	11	10	18	8	12	11	23	13	15	9	17	13	24	Y
Ch - 129	Alelo 1	13	28	10	12	16	8	12	9	19	13	16	8	16	12	18	X
	Alelo 2	15	31.2	10	13	16	9	12	13	21	15	17	10	17	13	28	Y
Ch - 130	Alelo 1	14	29	10	11	15	7	12	9	19	13	16	10	18	12	21	X
	Alelo 2	14	35	11	14	16	8	13	9	22	14	16	11	18	13	23	X
Ch - 131	Alelo 1	13	30	8	10	16	7	11	11	17	14.2	15	8	16	11	23	X
	Alelo 2	15	30	9	12	16	8	12	12	21	15.2	16	9	18	11	25	X
Ch - 132	Alelo 1	14	31.2	8	11	15	6	11	12	18	12.2	16	9	15	11	22	X
	Alelo 2	15	32.2	12	12	16	9	11	13	21	13	19	11	18	13	25	Y
Ch - 133	Alelo 1	13	28	10	10	15	6	11	11	21	12	14	11	15	12	21	X
	Alelo 2	16	29	10	11	17	8	13	12	21	12.2	16	11	17	12	22	Y
Ch - 134	Alelo 1	13	30.2	9	10	16	9	12	10	19	12	14	8	15	10	19	X
	Alelo 2	14	32.2	10	14	16	9	13	10	21	13	17	8	19	12	23	Y
Ch - 135	Alelo 1	12	28	9	12	16	7	11	9	21	12	15	8	17	11	21	X
	Alelo 2	14	30	12	13	17	9	13	11	26	14	16	11	18	12	21	Y
Ch - 136	Alelo 1	14	32.2	9	7	14	8	11	11	19	12	15	8	15	11	23	X
	Alelo 2	14	37	9	11	17	9	14	13	22	12	15	11	17	12	25	X

Amostras		D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	AMEL
Ch - 137	Alelo 1	13	29	8	10	15	7	11	11	21	13	16	8	15	11	21	X
	Alelo 2	16	33.2	10	11	16	8	12	11	22	13	18	8	19	11	24	X
Ch - 138	Alelo 1	14	26	10	12	14	8	10	10	18	14	16	8	15	11	19	X
	Alelo 2	14	29	11	12	15	9.3	13	11	27	15	19	11	16	12	23	X
Ch - 139	Alelo 1	16	28	10	11	17	8	11	9	19	10	15	6	14	9	24	X
	Alelo 2	16	31.2	10	12	17	9	12	11	22	12	19	11	17	11	26	X
Ch - 142	Alelo 1	14	27	10	10	16	8	13	11	22	13	15	7, 10	13	8	19	X
	Alelo 2	14	28	10	11	16	9.3	13	11	22	14	16	11	18	8	27	X
Ch - 143	Alelo 1	12	27	9	11	12	7	11	9	21	12	14	8	17	12	22	X
	Alelo 2	15	28	11	12	15	8	12	9	25	13	17	11	17	13	22	Y
Ch - 144	Alelo 1	11	28	10	11	16	8	11	11	19	13	15	6, 9	12	8	25	X
	Alelo 2	14	30	12	12	18	9	12	11	23	15	17	10	17	9	26	X
Ch - 145	Alelo 1	13	29	10	10	15	7	11	11	19	12.2	15	6	15	11	24	X
	Alelo 2	16	34	11	11	16	8	13	12	20	14	18	9	15	12	25	X
Ch - 146	Alelo 1	14	27	10	7	15	7	11	10	20	13.2	15	6	15	13	26	X
	Alelo 2	14	27	12	10	16	8	11	12	22	14	18	10	16	13	27	X
Ch - 147	Alelo 1	12	31.2	10	12	16	6	11	12	17	13	15	11	15	11	23	X
	Alelo 2	16	31.2	11	12	16	7	12	13	21	14.2	18	11	18	11	28	X
Ch - 148	Alelo 1	13	28	8	7	12	7	10	9	21	11	15	7	16	11	19.2	X
	Alelo 2	13	33.2	9	13	16	9	11	11	24	12	17	9	21.2	11	24	X
Ch - 149	Alelo 1	12	27	10	10	16	6	11	11	21	11	16	11	14	12	23	X
	Alelo 2	16	28	11	13	17	7	12	11	22	14	19	11	16	14	25	X
Ch - 150	Alelo 1	11	31.2	8	12	15	6	9	11	17	14	15	8	16	12	24	X
	Alelo 2	12	33.2	12	13	16	8	11	12	20	14	17	11	17	12	25	X
Ch - 151	Alelo 1	12	29	10	8	14	9	11	10	19	12	11	8	16	12	22	X
	Alelo 2	14	31	12	12	14	9	13	11	24	13	16	9	19	13	23	Y
Ch - 152	Alelo 1	12	28	8	10	15	7	10	10	17	13	15	7	13	12	25	X
	Alelo 2	14	28	9	14	15	9	13	11	23	14	17	10	16	12	25	Y
Ch - 153	Alelo 1	13	30	9	11	16	7	12	11	19	12	16	10	16	12	22	X
	Alelo 2	14	31.2	11	12	16	8	13	11	24	15	20	11	16	13	25	X
Ch - 154	Alelo 1	13	28	13	11	16	7	12	11	19	13	16	8	15.2	12	23	X
	Alelo 2	14	31	13	12	17	9	13	11	19	15	18	11	17	12	25	Y
Ch - 155	Alelo 1	12	30	9	11	16	7	11	11	20	14	13	10	16	8	21	X
	Alelo 2	13	32.2	10	12	16	9	11	12	22	15.2	15	11	18	12	21	X
Ch - 156	Alelo 1	14	28	8	7	17	7	11	9	19	13	16	9	13	8	19	X
	Alelo 2	14	35	11	11	17	9	11	9	22	13	16	9	16	12	26	X
Ch - 157	Alelo 1	12	28	11	10	15	8	11	11	22	13	16	8	16	8	23	X
	Alelo 2	12	30	13	11	16	8	14	11	23	13	17	11	21	13	26	Y
Ch - 158	Alelo 1	13	28	11	12	15	8	11	9	20	11	17	8	17	11	19	X
	Alelo 2	13	29	11	13	16	9	13	13	21	14	18	9	19	13	24	X
Ch - 159	Alelo 1	14	30	10	11	16	7	8	9	19	15	14	8	16	12	23	X
	Alelo 2	16	34	11	12	17	9	13	12	25	15.2	15	9	18	13	26	X
Ch - 160	Alelo 1	13	30	8	12	16	7	8	9	20	13.2	16	8	15	12	22	X
	Alelo 2	14	31	8	12	16	9	14	14	23	15.2	16	8	18	12	24	X

Mc - População Macua, Ch - População Changana, AMEL - Marcador Genético Amelogenina