

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DOUTORADO

PAULO EDUARDO RAIMANN

**USO DOS MINI-STR NC01 E NC02 NA PRÁTICA FORENSE:
(I) VALIDAÇÃO; (II) ANÁLISE EM DNA DEGRADADO;
(III) ESTUDO POPULACIONAL NO RIO GRANDE DO SUL.**

Porto Alegre
Agosto 2011

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

PAULO EDUARDO RAIMANN

**USO DOS MINI-STR NC01 E NC02 NA PRÁTICA FORENSE:
(I) VALIDAÇÃO; (II) ANÁLISE EM DNA DEGRADADO;
(III) ESTUDO POPULACIONAL NO RIO GRANDE DO SUL**

**Porto Alegre
Agosto 2011**

PAULO EDUARDO RAIMANN

**USO DOS MINI-STR NC01 E NC02 NA PRÁTICA FORENSE:
(I) VALIDAÇÃO; (II) ANÁLISE EM DNA DEGRADADO;
(III) ESTUDO POPULACIONAL NO RIO GRANDE DO SUL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS como requisito parcial e último para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Clarice Sampaio Alho

**Porto Alegre
Agosto 2011**

"A utopia está lá no horizonte.
Me aproximo dois passos,
ela se afasta dois passos.
Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos.
Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei.
Para que serve a utopia?
Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar".
Eduardo Galeano

DEDICATÓRIA

Dedico às minhas filhas Eduarda e Manuela,
que me ensinaram o que é ser Pai, o que é o
Amor e que ainda não entendem tudo ou que
tudo já entendem.

AGRADECIMENTOS

À Doutora Clarice Sampaio Alho pela coragem de me acompanhar novamente nesta nova empreitada que é a Genética Forense e por acreditar em mim sempre! Mesmo quando não tenho muita certeza...

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Biociências da PUCRS.

A todos os ex-colegas do Laboratório de Perícias, Setor de Genética Forense e ao Diretor do Instituto-Geral de Perícias, pela oportunidade oferecida para desenvolver este projeto.

Agradecimento especial à Perita Trícia Kommers Albuquerque pela ajuda intelectual e pela amizade incondicional.

Aos todos os colegas do LABGEN, em especial a minha pequena grande amiga Juliane Bentes Picanço pela incansável ajuda e parceria durante estes quatro anos de gestação.

À Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) nas pessoas das Dra Sabrina Esteves de Matos Almeida e Dra Cláudia Dorneles.

Ao meu pai, Ivo Antônio Raimann, que me levou para ver o trabalho dele quando eu tinha 12 anos e achava que já sabia tudo, e minha mãe, Maria Loracy Schmidt Raimann, por ter sido minha primeira ouvinte quando eu lia para ela enquanto ela lavava a roupa!!! A tua sabedoria supera qualquer curso universitário!

A minha esposa, Adriana Alves Touguinha Raimann, e minhas filhas, Eduarda Touguinha Raimann e Manuela Touguinha Raimann. Fifis!!! Tudo isso é pra vocês!!!

Abreviaturas

°C	graus Celsius
CODIS	Combined DNA Index System - FBI
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EXO I	Exonuclease I - <i>E. coli</i>
6FAM	fluoróforo na cor azul
HCl	ácido clorídrico
H ₂ O	água
LCN	low copy numbers (em português: baixo número de cópias)
LIZ	fluoróforo na cor laranja
M	molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mM	mili molar
mtDNA	DNA mitocondrial
µL	micro litro
NaOH	hidróxido de sódio
NED	fluoróforo na cor amarela
ng	nano grama
nm	nanômetro
pb	par de bases
PET	fluoróforo na cor vermelha
pg	pico grama
PCR Polimerase)	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (em português: Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	potencial hidrogeniônico
SAP camarão	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (em português: Fosfatase alcalina de camarão)
SDS	dodecil sulfato de sódio
STR	<i>Short tandem repeats</i> (em português: Repetições curtas em Tandem)
Tris	hidroximetil amino metano
VIC	fluoróforo na cor verde

RESUMO

Apresento esta tese, a qual vem atender aos propósitos do convênio de cooperação entre o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS e o Instituto Geral de Perícias da Secretaria de Segurança do Estado do Rio Grande do Sul, na intenção de estabelecer uma rotina de identificação molecular humana a partir de DNA degradado que seja funcional e que tenha embasamento científico.

Mesmo com os avanços dos kits comerciais de amplificação de DNA e dos equipamentos para extração e genotipagem, as amostras forenses continuam sendo desafiadoras. Com a ocorrência de desastres massivos ou com o aumento de amostras de vestígios, que irão fazer parte do banco de dados CODIS, é de extrema importância que os Laboratórios Forenses tenham a disposição marcadores que logrem amplificar fragmentos de tamanho reduzidos. O uso de miniSTRs é uma ferramenta importante para esse fim.

Tanto o uso de miniSTR para a identificação de amostras de DNA degradado quanto a obtenção da frequência alélica de seis miniSTR foram realizados nas amostras de indivíduos provenientes da população do Rio Grande do Sul. O estudo de validação foi realizado conforme orientação do *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM)*, cujo objetivo foi examinar a robustez dos MiniPlex de miniSTR NC01 e NC02 em casos forenses. Neste estudo de validação foram testados fatores que potencialmente afetam negativamente as tentativas de genotipagens através da amplificação de STRs. O estudo do DNA degradado de amostras forenses foi realizado com 22 amostras de restos humanos (21 dentes e 1 osso). Devido à dificuldade de amplificação deste tipo de amostras nos laboratórios forense muitas vezes se faz necessário o uso da técnica do seqüenciamento do mtDNA que é demorada, de elevado custo e que indica somente o vínculo materno. Neste caso, o uso dos miniSTRs NC01 e NC02 para amostras difíceis se mostrou uma ferramenta plenamente eficiente, uma vez que permitiu a obtenção do perfil genético em todas as amostras analisadas. Diante dos resultados do presente trabalho, é possível sugerir que o uso dos miniSTRs NC01 e NC02, em conjunto com outros kits comerciais de marcadores de tamanho reduzido, será de grande auxílio para os Cientistas Forenses.

Com o estudo populacional aqui realizado passa a ser possível o emprego imediato destes marcadores nos casos forenses criminais e na identificação de vínculos familiares, dado que aumentam os índices obtidos através dos cálculos estatísticos.

ABSTRACT

I offer this thesis, which is fulfill the purposes of the cooperation agreement between the Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS and Instituto Geral de Perícias, State Security from Rio Grande do Sul, with the intention to establish a routine for molecular identification of human DNA from degraded to be functional and scientific basis.

Even with the advances of commercial amplification kits and equipment for DNA extraction and genotyping, forensic samples remain challenging. With the occurrence of massive disasters or the increase in trace samples that will be part of the CODIS database, it is very important that forensic laboratories have the available markers to amplify fragments of small size and the use of miniSTRs may be an important tool for this purpose.

The use of miniSTRs for the identification of degraded DNA samples and obtaining the allele frequency of six miniSTRs took place in samples from the population of Rio Grande do Sul for its use in forensics. The validation study was conducted as directed by the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). The validation is to examine the robustness of miniPlex NC01 and NC02 in forensic cases. This study evaluated factors that potentially affect the results of genotyping obtained by amplification of STRs. The study of forensic samples of degraded DNA was performed with 22 samples of human remains (21 teeth and one bone). Due to the difficult amplification of such samples in forensic laboratories often is necessary to use the technique of sequencing of the mtDNA that is time consuming, costly and only indicates the maternal bond. Thus, the use of miniSTRs NC01 and NC02 in challenging samples proved to be a useful tool in generating human identification profile in all samples. The use of miniSTRs NC01 and NC02, in conjunction with other commercial kits with markers of small size will be of great assistance to the Forensic Scientists.

With the study population as possible is the immediate use of these markers for forensic and criminal cases in the identification of family linkages, increasing the odds obtained by the statistical calculations.

SUMÁRIO

Capítulo I - Apresentação	1
1 – Introdução	2
1.1 – Histórico.....	2
1.2 – Short tandem repeats (STR)	2
1.3 – Análises de amostras degradadas e forenses.....	3
1.4 – Kits comerciais e mtDNA (DNA mitocondrial)	3
1.5 – Os miniSTRs	4
2 – Justificativa	6
3 – Objetivos	6
3.1 - Objetivo Geral	6
3.2 - Objetivos Específicos	6
4 - Referências Bibliográficas	7
Capítulo II - Artigos	11
Internal Validation of the non CODIS miniSTR NC01 and NC02 for use in forensic casework	12
Identification of skeletal remains using NC 01 and NC02 of several degraded DNA extracted from tooth and bone.	14
Genetic data for D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434 and D22S1045 miniSTR loci from the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil	16
Capítulo III - Considerações finais	20

Capítulo I - Apresentação

1 – Introdução

1.1 – Histórico

Desastres em massa como os ocorridos no *World Trade Center* em setembro de 2001 nos Estados Unidos (Biesecker *et al.*, 2005), Tsunami no Oceano Índico em dezembro de 2004, o incêndio ocorrido em 1º de agosto de 2004 no supermercado Ycuá Bolaños em Assunção-Paraguai, o furacão Katrina em agosto de 2005, acidentes aéreos como o ocorrido com o voo TAM JJ 3054 ou ainda o recente voo AF 447, são um desafio para os médicos, odonto-legistas, papiloscopistas e para os setores de biologia molecular encarregados da identificação das vítimas e dos restos mortais. A identificação de corpos humanos em avançado estado de decomposição, como por exemplo, exumados, afogados, esquartejados, ocultados, expostos ao tempo, ação de animais ou carbonizados fica extremamente prejudicada (Grévin *et al.*, 1998, Bilge *et al.*, 2003). Isto ocorre porque os elementos utilizados pelos médico-legistas, odonto-legistas e/ou papiloscopistas para tal identificação, como impressões digitais, sexo, compleição física, grupo étnico, estatura e arcada dentária podem estar alterados a ponto de impossibilitar qualquer conclusão. Desta forma, a única possibilidade de identificação é através do uso das técnicas de DNA (Clayton *et al.*, 1995, Graw *et al.*, 2000).

Aproximadamente 25% das ossadas de cadáveres encaminhadas ao Departamento Médico Legal do Instituto Geral de Perícias do Estado Rio Grande do Sul, Brasil (DML-IGP-RS) para identificação, são encaminhadas ao Setor de Biologia Molecular do Laboratório de Perícias, isto é, um quarto das ossadas encontradas e que possuem possíveis familiares para a sua identificação pela técnica de DNA. Nos anos de 2005 a 2006, 111 identificações foram realizadas no Setor de Genética Forense. Em 12 destes casos foi necessária a realização do seqüenciamento do mtDNA, sendo que em 10 casos houve a não exclusão de vínculo matrilineo, e em dois casos o resultado foi inconclusivo.

1.2 – *Short tandem repeats* (STR)

STRs são regiões do DNA com seqüências que se repetem adjacentes uma a outra com tamanho que pode variar de dois a seis pares de base. O perfil de DNA baseado em STR é o método mais popular de identificação devido à natureza altamente polimórfica e sua fácil genotipagem (Edwards *et al.*, 1991, Hammond *et al.*, 1994). A amplificação do DNA ocorre através da técnica conhecida com reação em cadeia da polimerase (Saiki *et al.*, 1988), onde milhões de cópias de STR são feitas, resultando em alta especificidade e sensibilidade.

1.3 – Análises de amostras degradadas e forenses

A degradação do DNA pode ocorrer por ação de elementos como fogo, ação bacteriana, ou por processo oxidativo (Bär *et al.*, 1988; Grévin *et al.*, 1998; Bilge *et al.*, 2003).

Em muitas situações, a amostra de DNA recolhida na cena do crime não está somente degradada, mas em concentrações muito baixas (Van Hoofstat *et al.*, 1998, Lowe *et al.*, 2003). Uma forma para melhorar a sensibilidade¹ da reação de PCR é aumentar o número de ciclos de amplificação. Esta possibilidade é amplamente utilizada por pesquisadores forenses (Gill *et al.*, 1994) para obter o perfil de amostras de DNA antigo. Muitos dos kits comerciais de STR multiplex tem um limite inferior de sensibilidade de 250 pg e uma eficiência ótima quando 1 ng de DNA é amplificado (Sparkes, *et al.*, 1996). O esperado é que, amplificando com miniSTRs, seja possível obter perfil genético de pequenas quantidades de cópias do DNA molde (*low copy numbers* – LCN) devido ao seu reduzido tamanho.

Muitas amostras de casos forenses reais contêm DNA de mais de um contribuinte (Ladd *et al.*, 2001). Desta forma, a potencialidade do multiplex de STR em distinguir entre os contribuintes com maior e menor quantidade de material na amostra torna-se importante.

O substrato ou suporte onde a amostra forense é encontrada pode afetar a qualidade da amostra de DNA. O substrato pode acelerar a degradação do DNA ou possuir contaminantes da PCR que serão co-extraídos com o DNA molde. Por exemplo, pigmentos e corantes que inibem a reação da PCR podem ser co-extraídos em brim ou couro (Larkin e Harbison 1999).

1.4 – Kits comerciais e mtDNA (DNA mitocondrial)

Na prática forense, frequentemente, kits comerciais de STR multiplex falham em amplificar produtos de PCR maiores (300 a 500 pares de bases), resultando em alelos ou *locus dropout*, por causa de DNA degradado (Findlay *et al.*, 1997, Grubwieser *et al.*, 2006), de inibidores da PCR ou de efeitos estocásticos (McCord *et al.*, 2005). Em amostras em decomposição, o DNA molde pode estar muito fragmentado, reduzindo a completa visualização das regiões de STR alvo, pois a qualidade e a quantidade do DNA humano extraído dependem muito do local onde a amostra foi depositada (Graw *et al.*, 2000, Iwamura *et al.*, 2005). Isto pode ocorrer em kits multiplex onde existam fragmentos de amplificação (*amplicons*) muito grandes. Nestes casos, uma curva de decaimento normalmente é observada, onde o tamanho do pico é inversamente

¹ Sensibilidade pode ser definida como a menor concentração de DNA molde que possa produzir um perfil genético completo, com tamanhos de pico superior ao *threshold* em relação às condições de tempo de injeção e números de ciclos utilizados (*Internal Validation of STR Systems*, Promega, USA).

proporcional ao tamanho do *amplicon* (Krenke, *et al.*, 2002). Desta forma, uma perda de sinal é tipicamente observada em produtos maiores de STR (Figura 1). Esta perda de sinal pode ser resultado da presença de inibidores de PCR na evidência forense ou da fragmentação do DNA molde que está em pequenos pedaços (Coble e Butler 2005).

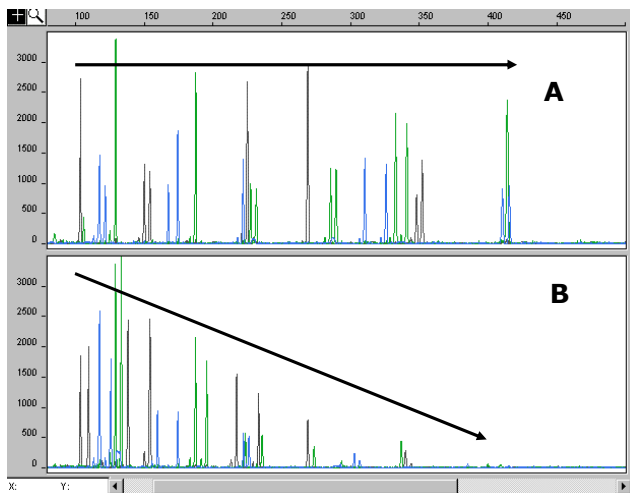


Figura 1: Efeito *slope* característico na análise de amostras com DNA degradados quando comparado ao controle. A: amostra controle; B: amplificação de uma amostra degradada (osso, dente, músculo).

A amplificação de STR, frequentemente, produz artefatos chamados “stutter”. Estes picos são geralmente quatro pares de bases menor do que o pico do alelo principal e são produzidos pelo efeito *slippage* da DNA polimerase. A presença destes artefatos pode complicar a análise de misturas. Porque ele pode ser confundido com um alelo que possa estar em menor quantidade ou ser produto do alelo do contribuinte com maior concentração de DNA (Walsh *et al.*, 1996)

Em amostras muito degradadas, os pesquisadores forenses podem contar com o sequenciamento do mtDNA para obter algum resultado. Contudo, o teste do mtDNA é laborioso e com custo proibitivo para muitos laboratórios (Coble *et al.*, 2006). Ademais o mtDNA é um marcador haplóide, indicando somente a linhagem matrilinea, e o cálculo para determinar a identificação pode não ser definitivo como nos casos em que é possível usar STR de DNA autossômico (McCord *et al.*, 2005).

1.5 – Os miniSTRs

Vários estudos têm demonstrado o sucesso na análise de DNA degradado proveniente de desastres em massa ou evidências forenses com produtos de PCR de menor tamanho, também chamados de miniSTRs (Butler *et al.*, 2003, Schneider *et al.*,

2004, Chung, *et al.*, 2004; Coble *et al.*, 2005 e 2006, Grubwieser *et al.*, 2006, Parsons *et al.*, 2007). A *European DNA Profiling Group* (EDNAP) recomendou a adição dos marcadores de MiniSTR D2S441, D10S1248, D14S1434 e D22S1045 ao sistema já utilizado de identificação humana (Dixon *et al.*, 2006, Gill *et al.*, 2006). MiniSTRs também podem ser uma alternativa para o seqüenciamento mitocondrial na análise forense de DNA degradado (Butler *et al.*, 2003).

Os miniSTRs, designados NC01 e NC02 (non-CODIS 01 e 02), são regiões que não estão presentes como marcadores do sistema CODIS (Figura 2). Os NC01 e NC02 são regiões que podem ser utilizadas para aumentar os índices encontrados com os kits comerciais Identifiler™ (Applied Biosystems, CA, USA) e PowerPlex® 16 (Promega, Madison, WI, USA) pois segregam diferentemente e pode-se utilizar a regra do produto para eventos independentes.

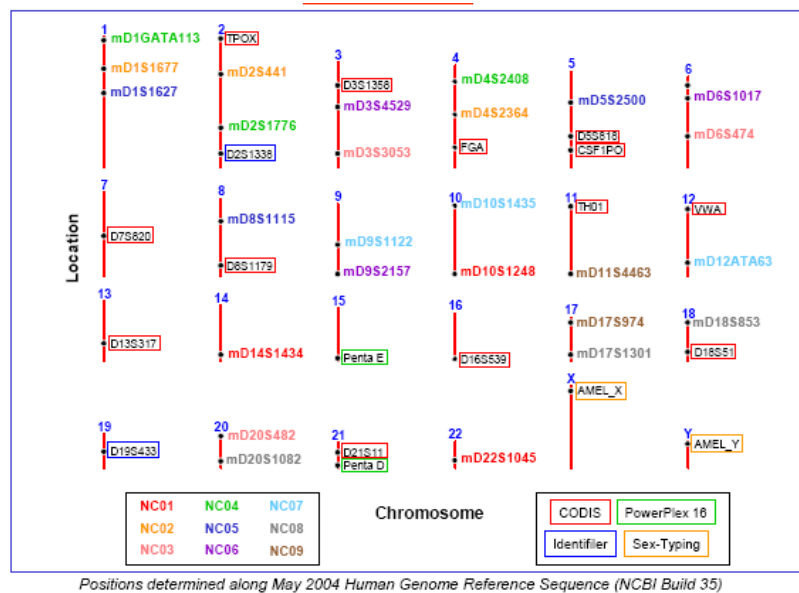


Figura 2: Localização nos cromossomos dos loci que serão analisados (NC01, NC02 e AmpF ℓ STR® Identifiler™. Extraído do site

http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/pub_pres/Promega2006_Hill.pdf, acessado em 31 de agosto de 2010.)

2 – Justificativa

Na nossa realidade forense, a identificação de amostras degradadas e a amplificação com marcadores de kits de STR comerciais se mostra, em várias situações, impossibilitada. Além disso o uso da técnica do seqüenciamento do mtDNA é demorada, de custo elevado e indicativo somente do vínculo materno. Desta forma, a validação e a padronização para o uso forense, bem como o estudo populacional dos miniSTRs, poderão ser importantes no auxílio da identificação de materiais muito degradados.

3 – Objetivos

3.1 - Objetivo Geral

Validar o uso na prática forense em casos de identificação de amostras degradadas, otimizar a construção dos MiniPlex de MiniSTR NC01 e NC02 e obter a frequência alélica dos seis MiniSTR da população do Rio Grande do Sul.

3.2 - Objetivos Específicos

1. Realizar a validação dos miniSTRs para amostras forenses através de estudos experimentais;
2. Construir uma escada alélica;
3. Registrar dados das amostras de DNA obtidas com os miniSTR segundo as variáveis: quantidade e qualidade do DNA, presença de inibidores, tempo de morte do cadáver; local e condição do corpo;
4. Verificar se há associação entre as variáveis acima indicadas;
5. Obter a frequência alélica dos seis MiniSTR na população do Rio Grande do Sul;
6. Obter os parâmetros forenses: heterozigosidade observada, poder de discriminação, conteúdo de informação polimórfica (PIC)², poder de exclusão, índice de paternidade e P (teste exato para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, baseado em 2000 meioses).

² O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), descrito por Botstein *et al.* (1980), é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade). Segundo a classificação de Botstein *et al.* (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos.

4 - Referências Bibliográficas

- Alonso A., Andelinovic S., Martín P., Sutlovic D., Erceg I., Huffine E., Simón L. F., Albarrán C., Gojanovic M. D., Rodriguez A. F., García P., Drmic I., Rezić B., Kuret S., Sancho M., Primorac D., DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat. Med. J.* 42 (2001) 260-266.
- Alonso A., Martín P., Albarrán C., García P., García O., Simón L. F., Hirschfeld J. G., Sancho M., Rúa C., Piqueras J. F., Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 141-149.
- Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 (1981) 457-465.
- Bär W., Kratzer A., Machler M., Schmid W., Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci. Int.* 39 (1988) 59-70.
- Biesecker L. G., Bailey-Wilson J. E., Ballantyne J., Baum H., Bieber F. R., Brenner C., Budowle B., Butler J. M., Carmody G., Conneally P. M., Duceman B., Eisenberg A., Forman L., Kidd K. K., Leclair B., Niezgodá S., Parsons T. J., Pugh E., Shaler R., Sherry S. T., Sozer A., Walsh A., DNA Identifications After the 9/11 World Trade Center Attack. *Science* 310 (2005) 1122-1123.
- Bilge Y., Kedici P.S., Alakoç Y. D., Ülküer K. Ü., Ilkyaz Y.Y., The identification of a dismembered human body: a multidisciplinary approach. *Forensic Sci. Int.* 137 (2003) 141-146.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W., Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32 (1980) 314-331.
- Butler J. M., Buel E., Crivellente F., McCord B. R., Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* 25 (2004) 1397-1412.
- Butler J. M., Shen Y., McCord B. R., The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* 48 (2003) 1054-1064.
- Clayton T. M., Whitaker J. P., Maguire C. N., Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Sci. Int.* 76 (1995) 7-15.
- Chung D. T., Drábek J., Opel K. L., Butler J. M., McCord B. R., A Study on the Effects of Degradation and Template Concentration on the Amplification Efficiency of the STR Miniplex Primer Sets. *J Forensic Sci.* 49 (2004) 733-740

- Coble M. D. e Butler J. M., Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci.* 50 (2005) 43-53.
- Coble M. D., Hill C. R., Vallone P. M., Butler J. M., Characterization and performance of new MiniSTR loci for typing degraded samples. *International Congress Series 1288* (2006) 504-506.
- Dixon L A., Dobbins A. E., Pulker H. K., J Butler. M., Vallone P. M., Coble M. D., Parson W., Berger B., Grubwieser P., H Mogensen. S., Morling N., Nielsen K., Sanchez J. J., Petkovski E., Carracedo A., P Sanchez-Diz., Ramos-Luis E., Brión M., Irwin J. A., Just R. S., Loreille O., Parsons T. J., Syndercombe-Court D., Schmitter H., Stradmann-Bellinghausen B., K Bender., Gill P., Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs-results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Sci. Int.* 164 (2006) 33-44.
- Edwards A., Civitello A., Hammond H. A., Caskey C. T., DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. *Am.J.Hum.Genet* 49 (1991) 746-756.
- Findlay I., Taylor A., Quirke P., Frazier R., Urquhart A., DNA fingerprinting from single cells. *Nature* 389 (1997) 555-556.
- Gill P., Fereday L., Morling N., Schneider P. M., The evolution of DNA databases – Recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci. Int.* 156 (2006) 242-244.
- Graw M., Weisser H. J., Lutz S., DNA typing of human remains found in damp environments. *Forensic Sci. Int.* 113 (2000) 91-95.
- Grévin G., Bailet P., Quatrehomme G., Ollier A., Anatomical reconstruction of fragments of burned human bones: a necessary means for forensic identification. *Forensic Sci. Int.* 96 (1998) 129-134.
- Grubwieser P., Mühlmann R., Berger B., Niederstätter H., Pavlic M., Parson W., A new “miniSTR-multiplex” displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. *Int J Leg Med* 120 (2006) 115-120.
- Hammond H. A., Jin L., Zhong Y., Caskey C. T., Chakraborty R., Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am. J. Hum. Genet.* 55 (1994)175-189.
- Internal Validation of STR Systems. Reference Manual. Promega. USA. disponível em <http://www.promega.com/techserv/apps/hmnid/referenceinformation/powerplex/ValidationManual.pdf>
- Iwamura E. S. M., Oliveira C. R. G. C. M., Vieira J. A. S., Nascimento S. A. B., Muñoz D. R., A qualitative study of compact bone microstructure and nuclear short tandem repeat obtained from femur of human remains found on the ground and exhumed 3 years after death. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 26 (2005) 33-44

- Krenke B. E., Tereba A., Anderson S. J., Buel E., Culhane S., Finis C. J., Tomsey C. S., Zachetti J. M., Masibay A., Rabbach D. R., Amiott E. A., Sprecher C. J. Validation of a 16-Locus Fluorescent Multiplex System. *J. Forensic Sci.* 47 (2002) 773-785.
- Ladd C., Lee H. C., Nicholas Y., Frederick R. B., Interpretation of Complex Forensic DNA Mixtures. *Croat Med J* 42 (2001) 244-246.
- Lowe A., Richardson P., Wivell R., Gill P., Murray C., Tully G., Whitaker J., Use of low copy number DNA in forensic inference. *International Congress Series 1239* (2003) 799–801
- McCarthy C., Chromas 1.45. Griffith University. Gold Coast Campus. Southport. Queensland. Australia. Copyright 1996-1998.
- McCord B., Opel K., Chung D., Drabek J., Tatarek N., Jantz L. M., Butler J., The Development of Miniplex Primer Sets for the Analysis of Degraded DNA. *Proceedings of the SPIE.* 5778 (2005) 617-625.
- Parsons T. J., Huel R., Davoren J., C Katzmarzyk., Miloš A., Selmanović A., Smajlović L., Coble M. D., Rizvić A., Application of novel "mini-amplicon" STR multiplexes to high volume case work on degraded skeletal remains. *Forensic Sci. Int.: Genetics* 1 (2007) 175-179.
- Raimann P. E. Um método rápido e econômico para a obtenção de DNA de dentes para estudos forenses. 2006. 30 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Biociências. PUCRS. Porto Alegre. 2006.
- Rao-Coticone S., Collins P., Dimsoski P., Ganong C., Hennessy L., Leibelt C., Shadravan F., Reeder D., Applications of 5-dye technology in forensic DNA typing and analysis. *International Congress Series 1239* (2003) 3-4
- Richards B. Skoletsky J. Schuber AP. Balfour R. Stern RC. Dorkin HL. et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum Mol Genet.* 2 (1993) 159-63.
- Saiki R. K Gelfand., D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239 (1988) 487-491.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. 1989.
- Schneider P. M., Bender K., Mayr W. R., Parson W., Hoste B., Decorte R., Cordonnier J., Vanek D., Morling N., Karjalainen M., Marie-Paule Carlotti C., Sabatier M., Hohoff C., Schmitter H., Pflug W., Wenzel R., Patzelt D., Lessig R., Dobrowolski P., O'Donnell G., Garafano L., Dobosz M., Knijff P., Mevag B., Pawlowski R., Gusmão L., Vide M. C., Alonso A. A., Fernandez O. G., Nicolás P. S., A Kihlgreen., Bär W., Meier V., Teyssier A., Coquoz R., Brandt C., U Germann., Gill P., J Hallett., Greenhalgh M., STR analysis of artificially

degraded DNA – results of a collaborative European exercise. *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 123-134.

- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* 24 (1997) 4876-4882.
- Van Hoofst D. E. O., Deforce D. L. D., Brochez V., I. De Pauw. Janssens K., Mestdagh M., Millecamps R., Van Geldre E., Van den Eeckhout E. G., DNA typing of fingerprints and skin debris: sensitivity of capillary electrophoresis in forensic applications using multiplex PCR. In *Second European Symposium of Human Identification*. Promega Corporation 1998. Innsbruck. Austria.
- Walsh P. S., Fildes N. J., Reynolds R., Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.*, 24 (1996) 2807–2812.
- Wilson M. R., DiZinno J. A., Polansky D., Replogle J., Budowle B., Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med* 108 (1995) 68–74

Capítulo II - Artigos

TITLE

Internal Validation of the non CODIS miniSTR NC01 and NC02 for use in forensic casework

Author names and affiliations:

Paulo Eduardo Raimann^{a,b,*}

^aLaboratório de Genética Humana e Molecular, Faculdade de Biociências. Av. Ipiranga, 6681, prédio 12C, sala 290, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90619-900.

Juliane Bentes Picanço^a

^aLaboratório de Genética Humana e Molecular, Faculdade de Biociências. Av. Ipiranga, 6681, prédio 12C, sala 290, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90619-900. E-mail: jbpicanco@gmail.com; Tel: +55 51 33203500 ramal 4534.

Rodrigo Rodenbusch^a

^aLaboratório de Genética Humana e Molecular, Faculdade de Biociências. Av. Ipiranga, 6681, prédio 12C, sala 290, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90619-900. Email: rodrigo_rodenbusch@yahoo.com. Tel: +55 51 33203500 ramal 4534

Trícia Cristine Kommers Albuquerque^b

^bSetor de Genética Forense, Laboratório de Perícias, Instituto-Geral de Perícias, Secretaria da Segurança Pública do Estado do Rio Grande do Sul, Av. Azenha, 255, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90.160-004. E-mail: tricia-albuquerque@igp.rs.gov.br Tel: +55 51 32336477.

Clarice Sampaio Alho^a

^aLaboratório de Genética Humana e Molecular, Faculdade de Biociências. Av. Ipiranga, 6681, prédio 12C, sala 290, Porto Alegre, RS, Brazil, Cep 90619-900. Email: csalho@pucrs.br; Tel: +55 51 33203500 ramal 4534.

***Corresponding author:**

Ph.D. Paulo Eduardo Raimann; Tel: +55 51 99432849
E-mail address: pauloraimann@gmail.com;

Internal Validation of the non CODIS miniSTR NC01 and NC02 for use in forensic casework

ABSTRACT

The Miniplex are designed to genotype degraded DNA samples when the others commercial kits for human identification were incapable of generating a complete genetic profile. Validation experiments, following the SWGDAM guidelines, were designed to evaluate the performance of Non-CODIS 01 and 02 (NC01 and NC02). This article describes the internal validation study of MiniPlex NC01 and NC02 to demonstrate the robustness in cases where current STRs genotyping does not work. The optimum DNA template range was found to be between 31.25 pg and 1 ng DNA. The degraded DNA study demonstrated that the samples stored under the following conditions: more than 56 days at room temperature when amplified with the Miniplex NC01 and NC02 showed complete profile (data not shown). The mixture study demonstrated that the Miniplex NC01 and NC02 are capable of producing profiles for the minor component at ratios of 4:1, to NC01, and at ratios 6:1 to NC02.

Our data demonstrated that NC01 and NC02, when used in conjunction with AmpF[®]STR[®] Identifiler[™] and AmpF[®]STR[®] MiniFiler[™] PCR Amplification Kits, provided an increased ability to obtain genetic profiles from challenged samples.

KEYWORDS:

forensic science, DNA typing, short tandem repeat, non CODIS, NC01, NC02, D10S1248, D14S1434, D22S1045, D1S1677, D2S441, D4S2364

TITLE

Identification of skeletal remains using NC 01 and NC02 of several degraded DNA extracted from tooth and bone.

Author names and affiliations:

Paulo Eduardo Raimann^{a,b,*}

^aLaboratório de Genética Humana e Molecular, Faculdade de Biociências. Av. Ipiranga, 6681, prédio 12C, sala 290, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90619-900.

Juliane Bentes Picanço^a

^aLaboratório de Genética Humana e Molecular, Faculdade de Biociências. Av. Ipiranga, 6681, prédio 12C, sala 290, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90619-900. E-mail: jbpicanco@gmail.com; Tel: +55 51 33203500 ramal 4534.

Rodrigo Rodenbusch^a

^aLaboratório de Genética Humana e Molecular, Faculdade de Biociências. Av. Ipiranga, 6681, prédio 12C, sala 290, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90619-900. Email: rodrigo_rodenbusch@yahoo.com. Tel: +55 51 33203500 ramal 4534

Trícia Cristine Kommers Albuquerque^b

^bSetor de Genética Forense, Laboratório de Perícias, Instituto-Geral de Perícias, Secretaria da Segurança Pública do Estado do Rio Grande do Sul, Av. Azenha, 255, Porto Alegre-RS, Brazil, Cep 90.160-004. E-mail: tricia-albuquerque@igp.rs.gov.br Tel: +55 51 32336477.

Clarice Sampaio Alho^a

^aLaboratório de Genética Humana e Molecular, Faculdade de Biociências. Av. Ipiranga, 6681, prédio 12C, sala 290, Porto Alegre, RS, Brazil, Cep 90619-900. Email: csalho@pucrs.br; Tel: +55 51 33203500 ramal 4534.

***Corresponding author:**

Ph.D. Paulo Eduardo Raimann; Tel: +55 51 99432849
E-mail address: pauloraimann@gmail.com;

Identification of skeletal remains using NC 01 and NC02 of several degraded DNA extracted from tooth and bone.

ABSTRACT

The short amplicon autosomal short tandem repeat (miniSTR) are designed to genotype degraded DNA samples especially for highly degraded DNA samples that typically result in partial profiles and total loss of information from regular STR amplicons. In this study miniSTRs NC01 (D10S1248, D14S1434, D22S1045) and NC02 (D1S1677, D2S441, D4S2364) were used to amplify DNA extracted from skeletal remains, teeth and bones, ranging from 5 to 35 years of time of death and found in many local and under different ambient conditions. Data obtained demonstrated that NC01 and NC02, when used in conjunction with AmpF^{STR}® Identifiler™ and AmpF^{STR}® MiniFiler™ PCR Amplification Kit, provided an increased ability to obtain genetic profiles from challenged samples.

KEYWORDS:

Degraded DNA analysis, non CODIS, NC01, NC02, D10S1248, D14S1434, D22S1045, D1S1677, D2S441, D4S2364, Mini-STR

Genetic data for D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434 and D22S1045 miniSTR loci from the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil

G Model
FSIGEN-716; No. of Pages 2

ARTICLE IN PRESS

Forensic Science International: Genetics xxx (2011) xxx–xxx



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsig



Letter to the Editor

Genetic data for D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434 and D22S1045 miniSTR loci from the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil

Dear Editor

We determined the allelic frequencies for six miniSTR loci D10S1248, D14S1434, D22S1045 (miniplex NC01) and D1S1677, D2S441, D4S2364 (miniplex NC02) in a sample of 439 unrelated individuals from the Rio Grande do Sul State (RS), Southern Brazil. This paper followed the FSI Genetics guideline recommendations [1].

Blood samples were collected from 439 subjects who were representative of the seven RS geopolitical regions [2], from the ring finger tip in a FTA card. All participants signed an informed consent. DNA was purified from blood spots on Whatman FTA cards using the manufacturer's protocols. A total of 0.5–1.0 ng of DNA, contained in a 1.2 mm punch of FTA paper, were amplified following the parameters outlined in [3] for the NC01 and NC02 miniplexes. Electrophoresis of the amplified fragments was performed in an ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer using the separation medium performance optimized polymer (POP) 4 and 47 cm capillaries (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Allelic designation was determined using Applied Biosystems GeneMapper[®] ID-X Software v1.2, calibrated with standard DNA cell lines K562, 9947A, 9948 and 007 (www.csl.nist.gov/div831/strbase/miniSTR/miniSTR_NC_Loci_types.htm). Corrected allele nomenclature for six miniSTR loci NC01 and NC02 were those reported in the website <http://www.csl.nist.gov/biotech/strbase/miniSTR.htm#NomenclatureErrata> and confirmed by Hill et al. [4] and according to recommendations of the DNA Commission of the ISFG [5]. The laboratory where this research was developed participates in the Proficiency testing of the GHEP-ISFG WG (Spanish–Portuguese Speaking Working Group of International Society for Forensic Genetics) (<http://www.GEP-isfg.org>).

Regarding data analysis, Hardy–Weinberg exact test (P), expected heterozygosity (H_e), observed heterozygosity (H_o), and polymorphic information content (PIC) were performed using the CERVUS version 3.0.3 [6]. Matching probability (MP), power of discrimination (PD), power of exclusion (PE), and typical paternity index (PI) were calculated using PowerStat version 1.2 software package [7].

The population from RS was compared with populations from the Parana State of Brazil [8] and the Central-East area of Argentina [9], in order to assess the genetic distance between these data, in a pairwise comparative analysis (F_{ST}) performed using Arlequin v3.5.1.2 software [10]. The genotype frequency distributions, summarized in supplementary Table 1, showed no deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) by exact test method after applying Bonferroni's correction. The combined power of discrimination and power of exclusion for the NC01 and NC02 panels were 0.999997 and 0.972873, respectively. The genetic

distance, F_{ST} (see supplementary Table 2) was calculated between Rio Grande do Sul and both the Parana and the Central-Eastern Argentina population.

After Bonferroni's correction, our population sample had significant differences only when compared to Central-Eastern Argentina in three out of six loci (D10S1248, D14S1434, and D1S1677). The comparison between RS and Parana populations detected no significant differences ($F_{ST} = 0.00088$; p value = 0.099 ± 0.037). Five of the six loci showed acceptable levels of polymorphisms, with heterozygosities greater than 0.71, meaning that all these loci have a sufficiently high level of informativeness in the Brazilian population of Rio Grande do Sul and, for that reason, can be applied as genetic markers in paternity and forensic analysis.

In more complex cases of human identification, like sibship cases, parentage testing with other familial relationships or paternity testing with few genetic inconsistencies, the commercial kits can generate inconclusive data and the use of six miniSTRs can help in the elucidation of such cases. In situations with degraded DNA reduced STR size becomes an important tool when combined with another commercial kit miniSTR like AmpF[®]STR[®] MiniFiler[™] PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgements

We kindly thank the researchers Marcelo Malaghini and Carlos Vullo for providing data on population frequencies. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), and Instituto Geral de Perícias (IGP) do Estado do Rio Grande do Sul. This investigation was approved by the Ethics Committee of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEP Resolution no. 08/04349).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.fsigen.2011.03.003.

References

- [1] A. Carracedo, J.M. Butler, L. Gusmão, W. Parson, L. Roewer, P.M. Schneider, Publication of population data for forensic purposes, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2010) 145–147.
- [2] S.P. Schwengber, T. Kommers, C.H. Matte, P.E. Raimann, B.A. Carvalho, F.P. Leite, M.A. Medeiros, L.F. Souza, C.S. Castro, F.G. Chassot, S.L. Bonatto, Population data of 17 Y-STR loci from Rio Grande do Sul state (South Brazil), *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2009) e31–e33.

1872–4973/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.fsigen.2011.03.003

Please cite this article in press as: P.E. Raimann, et al., Genetic data for D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434 and D22S1045 miniSTR loci from the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2011), doi:10.1016/j.fsigen.2011.03.003

- [3] M.D. Coble, J.M. Butler, Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA, *J. Forensic Sci.* 50 (2005) 43–53.
- [4] C.R. Hill, M.C. Kline, M.D. Coble, J.M. Butler, Characterization of 26 MiniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples, *J. Forensic Sci.* 53 (2008) 73–80.
- [5] B. Olaisen, W. Bär, B. Brinkmann, B. Budowle, A. Carracedo, P. Gill, P. Lincoln, W.R. Mayr, S. Rand, DNA recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics, *Vox Sang.* 74 (1998) 61–63.
- [6] S.T. Kalinowski, M.L. Taper, T.C. Marshall, Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment, *Mol. Ecol.* 16 (2007) 1099–1106. <http://www.fieldgenetics.com>.
- [7] A. Tereba, Profiles in DNA 3, Tools For Analysis of Population Statistics, Promega Corporation, 1999 <http://www.promega.com/geneticidtools/powerstats/>.
- [8] M. Malaghini, V. Schneider, F. Leite, Genetic analysis of 9 non-CODIS miniSTR loci in the Brazilian population of Parana, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl.* 2 (2009) 359–360.
- [9] C. Vullo, A. Borosky, C. Romanini, L. Catelli, T. Yamamoto, Frequency data for 12 mini STR loci in Argentina, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2010) e79–e81.
- [10] L. Excoffier, L. Guillaume, S. Schneider, Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis, *Evol. Bioinform. Online* 1 (2005) 47–50. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.

Paulo Eduardo Raimann^{a, b*}
Ana Paula Aidar de Oliveira^d
Rodrigo Rodenbusch^c
Juliane Bentes Picanço^b
Trícia Cristine Kommers Albuquerque^a
Clarice Sampaio Alho^b

^aSetor de Genética Forense, Laboratório de Perícias,
Instituto-Geral de Perícias, Secretaria da
Segurança Pública do Estado do Rio Grande do Sul,
Av. Azenha, 255, Porto Alegre Cep 90160-004, RS, Brazil

^bLaboratório de Genética Humana e Molecular,
Faculdade de Biociências, Av. Ipiranga, 6681,
prédio 12 C, sala 290,
Porto Alegre Cep 90619-900, RS, Brazil

^cLaboratório de Investigação de Paternidade,
Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT),
Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS),
Av. Ipiranga, 5400, Bairro Jardim Botânico,
Porto Alegre-RS, CEP 90610-000, Brazil

^dUSP – Universidade de São Paulo,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas,
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bl. 17,
Sao Paulo Cep 05508-900, SP, Brazil

*Corresponding author: Tel.: +55 51 99432849
E-mail address: pauloraimann@gmail.com (P.E. Raimann).

1 October 2010

Please cite this article in press as: P.E. Raimann, et al., Genetic data for D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434 and D22S1045 miniSTR loci from the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2011), doi:10.1016/j.fsigen.2011.03.003

Supplementary Data

Table 1– Allelic frequencies and forensic parameters of six miniSTR loci from Rio Grande do Sul (RS) DNA samples.

Alleles	Locus					
	D10S1248	D14S1434	D22S1045	D4S2364	D2S441	D1S1677
7	-	-	-	0.0011	-	-
8	-	-	-	0.1970	-	-
9	-	0.0023	-	0.5604	0.0057	0.0012
10	0.0011	0.1724	0.0069	0.2392	0.2620	0.0105
11	0.0046	0.0422	0.1009	0.0023	0.2995	0.0093
11.3	-	-	-	-	0.0467	-
12	0.0491	0.0297	0.0069	-	0.0535	0.1698
12.3	-	-	-	-	0.0011	-
13	0.2968	0.3664	0.0046	-	0.0342	0.2081
13.3	-	-	-	-	0.0011	-
14	0.3413	0.3345	0.0390	-	0.2574	0.3081
15	0.1884	0.0205	0.3796	-	0.0342	0.2244
16	0.1050	0.0034	0.3406	-	0.0034	0.0558
17	0.0126	0.0274	0.1147	-	0.0011	0.0128
18	0.0011	0.0011	0.0069	-	-	-
N	876	876	872	878	878	860
Ho	0.731	0.756	0.700	0.572	0.768	0.712
He	0.747	0.721	0.716	0.591	0.769	0.780
PD	0.893	0.870	0.883	0.769	0.909	0.920
PE	0.477	0.520	0.428	0.258	0.540	0.446
PIC	0.705	0.674	0.668	0.525	0.731	0.745
TPI	1.856	2.047	1.664	1.168	2.152	1.734
MP	0.107	0.130	0.117	0.231	0.091	0.080
<i>P</i>	0.379	0.633	0.491	0.099	0.624	0.026*

N, Numbers of Chromosomes; Ho, Observed Heterozygosity; He, Expected Heterozygosity; PD, Power of Discrimination; PE, Power of Exclusion; PIC, Polymorphic Information Content; TPI, Typical Paternity Index; MP, Match Probability; *P*, Hardy-Weinberg Equilibrium Probability Test; * *P*, Statistically Non-significant after Bonferroni's Correction.

Supplementary Data

Table 2– Genetic distances (F_{ST} analysis and p value) between Rio Grande do Sul, Parana and Central-East area of Argentina.

MiniSTR	Populations			
	RS vs. PR		RS vs. ARG	
	F_{ST}	p -value	F_{ST}	p -value
D10S1248	- 0.00162	0.90616	0.00484	0.00129*
D14S1434	0.00247	0.08113	0.00570	0.00079*
D22S1045	- 0.00061	0.53568	0.00246	0.02594
D4S2364	- 0.00050	0.45064	- 0.00044	0.55416
D2S441	- 0.00010	0.38221	0.00170	0.04861
D1S1677	0.00540	0.01466	0.00625	0.00020*

Data for NC01 and NC02. RS, Rio Grande do Sul; PR, Parana; ARG (Argentina – Central-East area);
 *significant genetic distance values after applying Bonferroni's correction ($p = 0.05/06 = 0.008$).

Capítulo III - Considerações finais

Considerações finais

Os resultados obtidos para os estudos de validação, populacional e com amostras forenses reais demonstraram que os marcadores miniSTRs NC01 (D10S1238, D14S1434 e D22S1045) e NC02 (D4S2364, D2S441 e D1S1677) são capazes de suprir as necessidades de Laboratório Forenses que lidam diariamente com amostras sujeitas a diversas condições ambientais. Seus amplicons de tamanho reduzido e um poder de discriminação elevado foram os motivos pelo qual a European DNA Profiling Group (EDNAP) recomendou a adição dos marcadores de D2S441, D10S1248, D14S1434 e D22S1045 ao sistema já utilizado de identificação humana (Dixon et al., 2006, Gill et al., 2006).

No estudo de validação interna foram criados os parâmetros de análise para os miniSTRs NC01 e NC02. *Panels* e *Bins* foram gerados para o *software* GeneMapper ID-X v.1.2. Com a construção da escada alélica possíveis deslocamentos causados por diferenças de migração na genotipagem podem ser corrigidos pelo algoritmo do *software*, tornando a genotipagem muito mais reprodutível.

No estudo com amostras forenses reais, dentes e osso, proveniente de ossadas que variaram de 5 a 35 anos de tempo de morte e em diversas condições ambientais, foi possível obter perfis completos com o uso dos miniSTRs NC01 e NC02 indicando a robustez destes marcadores neste tipo de amostras degradadas.

Com a utilização do CODIS no Brasil, inicialmente para amostras de local de crime, marcadores que amplifiquem regiões de menor tamanho e com concentrações reduzidas de DNA serão de grande utilidade. Por este motivo os miniSTRs NC01 e NC02, em conjunto com os atuais kits comerciais disponíveis, serão de grande valia para a elucidação dos mais diversos caso de identificação humana e forense.