

GREICIANE GABURRO PANETO

**UTILIZAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL
NO CONTEXTO FORENSE BRASILEIRO.**

ARARAQUARA

2006

Greiciane Gaburro Paneto

**Utilização do DNA mitocondrial
no contexto forense brasileiro.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas.

Área de Concentração: Biologia Molecular

Orientador: Profa. Dra. Regina Maria Barretto
Cicarelli

ARARAQUARA

2006

*Aos meus pais Zenóbia
(in memoriam) e Cleozadir*

AGRADECIMENTOS

À Profa Regina Maria Barretto Cicarelli pela orientação e confiança e pela contribuição a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Prof Dr Mario Hiroyuki Hirata pela doação das amostras utilizadas neste projeto.

Ao Prof Dr Rogério Nogueira de Oliveira pela colaboração no projeto, assim como pela disponibilidade de troca de idéias.

Ao Prof Dr Iúri Drumond Louro por possibilitar meu primeiro contato com a Biologia Molecular durante a iniciação científica e pela sugestão da área forense para o mestrado.

À perita Norma Bonaccorso do IC de São Paulo pela doação dos vestígios biológicos utilizados neste projeto.

As peritas Elza e Jenny do IC de Minas Gerais pelas primeiras orientações sobre o trabalho com o tema.

Aos meus pais que sempre me incentivaram nos estudos e sempre me apoiaram na tomada de decisões.

Ao Francisco por estar sempre ao meu lado, pela paciência, compreensão e incentivo.

Aos meus irmãos por terem sempre me apoiado e incentivado.

À Joyce pela disposição em ajudar a qualquer momento, pela troca de idéias, assim como pela amizade.

À Larissa por ter contribuído substancialmente neste trabalho, assim como pela amizade.

À Gabriella pela ajuda na rotina dos géis para sequenciamento, assim como pela amizade.

Ao Túlio e à Daniella que sempre estiveram dispostos a ajudar, assim como pela amizade.

A todos os amigos que mesmo longe torceram por mim.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida durante o mestrado.

À FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.”

Píndaro, poeta romano

RESUMO

A identificação humana através da análise de DNA utiliza o perfil genético de um indivíduo baseado na combinação de diversos marcadores que são herdados de seus progenitores. Esses marcadores são geralmente diferenças nas seqüências de DNA nuclear entre os indivíduos (polimorfismos). Em alguns casos, entretanto, a análise do DNA nuclear não pode ser aplicada. Isso ocorre quando o DNA da amostra apresenta-se degradado ou em casos onde o material biológico não apresenta o DNA nuclear. Nestes casos, a análise do DNA mitocondrial (DNA mt) é o método de escolha. Entretanto, em um mesmo indivíduo podem existir populações de DNA mt diferentes, fenômeno denominado heteroplasmia.

Este trabalho teve como objetivo o estudo da frequência de heteroplasmia no DNA mt extraído de amostras de cabelo, quando comparado ao DNA mt contido no sangue dos mesmos indivíduos; análise da terceira região hipervariável (HV3) do DNA mt em amostras de sangue para estudo do seu poder discriminatório em nossa população; e aplicação da técnica de análise do DNA mt em vestígios biológicos. Para isso foram seqüenciadas as regiões hipervariáveis HV1 e HV2 em amostras de cabelo e sangue de 100 indivíduos, além do sequenciamento da região hipervariável HV3 em amostras de 150 indivíduos, todos residentes na Grande São Paulo.

Uma frequência de 10,5% de heteroplasmia foi encontrada em amostras de cabelo, e uma diversidade haplotípica de 0,8233 e probabilidade de semelhança de 0,1822 na região HV3 do DNA mt em amostras de sangue. Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados relatados em outras populações e permitem sua aplicação no contexto forense brasileiro.

Palavras-chave: Identificação Humana. DNA Mitocondrial. Forense. Heteroplasmia. Cabelo.

ABSTRACT

The human identification by DNA analysis uses the genetic profile of an individual based on the combination of diverse markers that are inherited of its ancestors. These markers are generally differences in sequences of nuclear DNA between individuals (polymorphisms). In some cases, however, the analysis of the nuclear DNA cannot be applied. It occurs when the DNA sample is degraded or in cases which the biological material does not content nuclear DNA. In these cases, the mitochondrial DNA (mtDNA) analysis is the choice method. However, inside one individual can exist different mtDNA populations, phenomenon called heteroplasmy.

The objective of this work was to study the frequency of heteroplasmy in extracted mtDNA from hair, when compared with mtDNA contained in the blood of the same individuals; and to analysis the third hypervariable region (HV3) of mtDNA in blood samples to study its discriminatory power in our population. For it, hypervariable regions HV1 and HV2 in hair and blood samples from 100 individuals had been sequenced, beyond the sequencing of hypervariable region HV3 in 150 individuals samples, inhabitants of *Grande São Paulo*.

A heteroplasmic frequency of 10.5% was found in hair samples, and a haplotype diversity of 0.8233 and a random match probability of 0.1822 were found in the HV3 region of mtDNA in blood samples. These results are in agreeing with those obtained from other populations and allow its application in the Brazilian forensic context.

Keywords: Human Identification. Mitochondrial DNA. Forensic. Heteroplasmy. Hair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	DNA mitocondrial.....	20
Figura 2 -	Heteroplasmia de sequência.....	25
Figura 3 -	Heteroplasmia de comprimento.....	25
Figura 4 -	Exemplo de nomenclatura no caso de heteroplasmia de comprimento.....	28
Figura 5 -	Padrão obtido da amplificação na região HV1 de amostras de cabelo de 6 indivíduos.....	46
Figura 6 -	Eletroferogramas resultantes do sequenciamento do DNA mt em amostra de cabelo (superior) e sangue (inferior) de dois indivíduos.....	50
Figura 7 -	Frequência (%) das principais posições polimórficas de HV3 em nossa população.....	54
Figura 8 -	Frequência dos haplótipos resultantes da análise da região HV3.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Primers utilizados.....	37
Tabela 2 -	Relação tempo/custo entre protocolos de extração de DNA de cabelo.....	45
Tabela 3 -	Heteroplasmias de sequência encontradas.....	47
Tabela 4 -	Frequência de heteroplasmia de sequência relatada por diversos autores.....	48
Tabela 5 -	Heteroplasmia de comprimento (inserções encontradas apenas nas amostras de cabelo).....	51
Tabela 6 -	Haplótipos da região HV3 do DNA mt dispostos em ordem decrescente de frequência (n=150).....	52
Tabela 7 -	Posições polimórficas na região HV3 do DNA mt dispostas em ordem decrescente de frequência (n=150).....	53
Tabela 8 -	Índices de diversidade na região HV3 em nossa população e em diversas populações mundiais.....	55
Tabela 9 -	Diversidade haplotípica, probabilidade de semelhança e número de haplótipos do DNA mt observados em 150 amostras de nossa população.....	57
Tabela 10 -	Polimorfismos encontrados na região HV1 em amostras forenses.....	58
Tabela 11 -	Polimorfismos encontrados na região HV2 em amostras forenses.....	58
Tabela 12 -	Polimorfismos encontrados na região HV3 em amostras forenses.....	59

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A	Base nitrogenada adenina
APS	Persulfato de amônio
ATP	Adenina trifosfato
C	Base nitrogenada citosina
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CRS	<i>Cambridge Reference Sequence</i>
D	Deleção
D-loop	<i>Displacement loop</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA mt	DNA mitocondrial
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
FBI	<i>Federal Bureau of Investigation</i>
Fig	Figura
G	Base nitrogenada guanina
HV1	Região Hipervariável 1
HV2	Região Hipervariável 2
HV3	Região Hipervariável 3
IC	Instituto de Criminalística
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LML	<i>Low Mass Ladder</i>
mtDNA	<i>mitochondrial DNA</i>
min	Minuto
nt	Nucleotídeo
OBS	Observação
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PCA	Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico
qsp	Quantidade suficiente para

RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
seg	Segundos
T	Base nitrogenada timina
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
TEMED	N', N', N', N' - Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

LISTA DE SÍMBOLOS

bp	<i>base pair</i>
%	porcentagem
°C	grau Celsius
cm	centímetro
ml	mililitro
μl	microlitro
mM	milimolar
M	molar
μg	micrograma
mm	milímetro
pH	potencial hidrogeniônico
h	hora
g	grama
™	<i>trade mark</i>
U	unidade
pmol	picomol
X	vezes
	infinito
ng	nanograma
rpm	rotações por minuto
GL	Gay Lussac

DEFINIÇÃO DE TERMOS USADOS NA DISSERTAÇÃO

Forense:	(do latim, significa "antes do fórum") aplicação de um largo espectro das ciências para responder a perguntas de interesse ao sistema legal.
Gargalo genético:	evento evolucionário em que uma porcentagem significativa de uma população ou de uma espécie é dizimada ou impedida de se reproduzir, e a população é reduzida a 50% ou menos.
Haplótipo:	constituição genética de um cromossomo individual. O termo haplótipo pode se referir a somente um locus ou a um genoma inteiro. Pode também se referir a um conjunto de polimorfismos de uma única base (SNPs), presentes em uma única cromátide, que estão estatisticamente associados e que permitem predizer todos os outros polimorfismos de uma região.
Heteroplasmia:	presença simultânea de mais de um tipo de genoma em uma organela (DNA mitocondrial ou plasmidial) dentro de um indivíduo ou célula.
Heteroplásmica:	diz-se de uma organela que contém uma “mistura” de genomas.
Homoplásmica:	diz-se de uma organela que contém um único tipo de genoma.
Hotspots:	sítio do DNA que sofre mutação mais freqüentemente que o esperado, seja espontaneamente, seja por ação de um agente mutagênico.
Polimorfismo:	(do grego, <i>poli</i> “muitas”, <i>morfos</i> “formas”) ocorrência de variação de natureza genética em uma população para um ou mais locos cujo alelo mais raro apresenta freqüência de pelo menos 1% na população.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1:	1	INTRODUÇÃO.....	18
	2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
	2.1	O DNA mitocondrial e sua utilização como marcador genético forense.....	19
	2.2	Regiões hipervariáveis do DNA mitocondrial.....	21
	2.3	Exames forenses de DNA mitocondrial.....	22
	2.4	Heteroplasmia.....	23
	2.5	Histogênese do cabelo.....	29
	2.6	Justificativa e relevância do projeto.....	30
	3	OBJETIVOS.....	31
	3.1	Amostras de cabelo.....	31
	3.2	Amostras de sangue.....	31
	3.3	Amostras forenses.....	31
	4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
	4.1	Casuística.....	32
	4.2	Extração do DNA.....	33
	4.2.1	Cabelos.....	33
	4.2.2	Sangue.....	34
	4.2.3	Vestígios.....	34
	4.3	Reação de PCR.....	36
	4.4	Purificação do produto de PCR.....	38
	4.4.1	Cabelos e vestígios.....	38
	4.4.2	Sangue.....	38
	4.5	Reação de sequenciamento.....	39
	4.6	Purificação do produto da reação de sequenciamento.....	39
	4.7	Eletroforese e detecção.....	40
	4.8	Análise dos resultados.....	41
	4.8.1	Ferramentas de Bioinformática.....	41

4.8.2	Detecção de Heteroplasmia.....	41
4.8.3	Controle de Qualidade.....	42
4.8.3.1	<i>Qualidade dos Eletroferogramas</i>	42
4.8.3.2	<i>Prevenção à contaminação</i>	43
4.8.4	Análise Estatística Populacional.....	43
4.8.4.1	<i>Sangue</i>	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Cabelos	45
5.1.1	Escolha do protocolo de extração do DNA.....	45
5.1.2	Eficiência do protocolo de extração do DNA.....	46
5.1.3	Heteroplasmia.....	47
5.2	Sangue	51
5.3	Vestígios	58
6	CONCLUSÃO	60
CAPÍTULO 2:	ARTIGO	62
	REFERÊNCIAS	81

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A identificação humana por meio do DNA constitui um dos produtos mais revolucionários da Genética Moderna. Em menos de 20 anos tornou-se uma ferramenta indispensável na investigação criminal, sendo aceita rotineiramente em processos judiciais em todo o mundo. Sua importância não está apenas na possibilidade de provar a culpabilidade de uma pessoa ou inocentá-la, mas em estabelecer uma conexão irrefutável entre a pessoa e sua presença na cena do crime. O perfil genético de um indivíduo, comumente utilizado na identificação humana, é baseado na combinação de diversos marcadores que são herdados de seus progenitores. Esses marcadores são geralmente diferenças nas seqüências de DNA nuclear entre os indivíduos (polimorfismos). Em alguns casos, entretanto, a análise do DNA nuclear não pode ser aplicada. Isso ocorre quando o DNA da amostra apresenta-se degradado ou em situações onde o material biológico não apresenta o DNA nuclear, como em fragmentos de cabelo, por exemplo (SALAS; LAREU; CARRACEDO, 2001). Nestes casos, a única alternativa, ou pelo menos a alternativa de maior sucesso, é a análise do DNA mitocondrial (DNA mt).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O DNA mitocondrial e sua utilização como marcador genético forense

No contexto da análise forense, o interesse pelo DNA mt surgiu por vários motivos: primeiro esse DNA também contém regiões polimórficas que permitem sua individualização; segundo, os descendentes recebem esse DNA apenas da mãe, o que permite traçar a linhagem materna de uma pessoa; e, terceiro, é mais resistente à degradação que o DNA nuclear, além de estar presente em várias cópias por célula. Assim, em grandes desastres (incêndios, explosões, queda de avião, etc.), quando é mais difícil identificar os corpos, analisa-se o DNA mt (ANJOS et al., 2004), que é extraído dos restos mortais e a sequência de interesse é comparada com sequências obtidas de irmãos ou ascendentes maternos.

Por causa do genoma mitocondrial ser haplóide, ou seja, possui apenas a contribuição maternal, os diferentes DNA mts são ditos haplótipos.

A sequência completa do genoma mitocondrial (mt) humano foi determinada em 1981 por Anderson e colaboradores. Essa sequência foi reanalisada e revisada por Andrews e colaboradores em 1999, sendo modificada e denominada *Cambridge Reference Sequence* (CRS). O genoma mt é composto por 16.569 nucleotídeos e apresenta-se como uma dupla fita circular (Fig. 1). Uma fita é rica em purinas (chamada fita-pesada) e a outra fita é rica em pirimidinas (chamada fita-leve). Contém 37 genes, todos envolvidos na produção de energia e no estoque de ATP na célula. Treze desses genes codificam proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa. O restante dos genes codificam RNAs transportadores (22 genes) e RNAs ribossomais (2 genes).

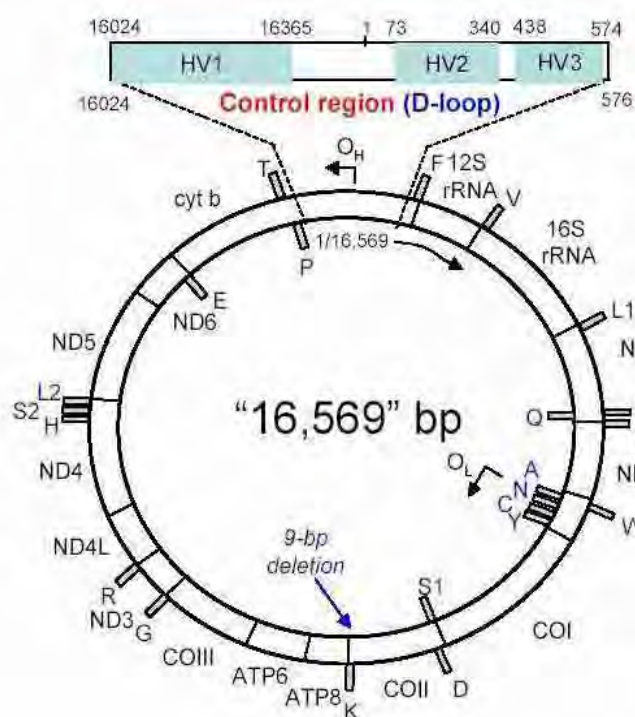


Figura 1 - DNA mitocondrial.

Fonte: BUTLER, J. M. Forensic DNA Typing. London:

Elsevier Academic Press, 2005.

A maior parte do genoma mt é formado por genes. Entretanto, uma região não codificadora de aproximadamente 1.200 nucleotídeos flanqueia a posição “0” do genoma e é conhecida como região controle, D-loop ou região hipervariável. A denominação de região controle refere-se ao fato desta região conter o sinal que controla a síntese de RNA e DNA. D-loop se refere à fase inicial de replicação, quando a nova fita recém sintetizada se desprende da fita molde formando uma “bolha” ou “loop”. A sequência da região controle é chamada hipervariável porque acumula mutações pontuais aproximadamente dez vezes mais comuns do que o DNA nuclear (BUDOWLE et al., 2003). Isso se deve à baixa fidelidade da DNA

polimerase mitocondrial (um erro a cada 440.000 nucleotídeos) e à perda do mecanismo de reparo no DNA mt (LEE; JOHNSON, 2006).

2.2 Região hipervariável do DNA mitocondrial

A região hipervariável do DNA mt é de interesse para a identificação humana por causa do alto grau de polimorfismo na sequência de nucleotídeos, e compreende três segmentos da região controle: HV1 (da posição 16024 a 16365), HV2 (da posição 73 a 340) e HV3 (da posição 438 a 574) (LUTZ et al. 2000) (Fig. 1). As duas primeiras regiões são utilizadas na rotina forense, a terceira região, entretanto, vem sendo explorada nos últimos anos (BINI et al., 2003; VANECEK; VOREL; SIP, 2004; HOONG; LEK, 2005; ZHANG et al., 2005; LEE et al., 2006).

De acordo com um estudo populacional com 200 indivíduos alemães não aparentados, a região HV1 apresentou 88 posições polimórficas em um total de 342 nucleotídeos (26%), a região HV2 apresentou 65 posições polimórficas em 268 nucleotídeos (24%) e a região HV3 apresentou 25 posições polimórficas em 137 nucleotídeos (18%). Isso contrasta claramente com outras regiões, também dentro da região controle, que apresentam níveis mais baixos de variabilidade. Entre as posições 16366 e 16569, juntamente com os nucleotídeos entre as posições 1 e 72, apenas 7% dos sítios foram polimórficos e dentre os nucleotídeos presentes entre as posições 341 e 437 apenas 3% dos sítios apresentaram polimorfismos (LUTZ et al., 2000), o que confirma a utilidade das três regiões (HV1, HV2 e HV3) na identificação humana.

2.3 Exames forenses de DNA mitocondrial

A maioria dos laboratórios que utiliza a tipagem do DNA mt se baseia nos polimorfismos presentes na sequência de nucleotídeos nas regiões HV1 e HV2 comparando a amostra questionada com a sequência referência (CRS) para a anotação das diferenças (polimorfismos). A sequência da amostra questionada é então comparada com a da amostra referência (do indivíduo em questão ou de parentes com vínculo materno). Se essas sequências diferirem em dois ou mais polimorfismos, uma exclusão inequívoca pode ser feita. Se as sequências corresponderem uma à outra, existe a possibilidade da amostra questionada pertencer ao indivíduo em questão ou demonstrar vínculo materno. Existe ainda a possibilidade da amostra pertencer a um outro indivíduo não aparentado. Por essa razão, a identidade de duas amostras na região HV1 e HV2 não pode ser considerada uma identificação conclusiva (FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION - FBI, 2003). Para se determinar a significância dessa identidade é necessário verificar a frequência com que esse conjunto de polimorfismos ocorre na população (frequência do haplótipo), o que gera a necessidade de um banco de dados populacional de DNA mt (HOLLAND; PARSONS, 1999). Haplótipos pouco frequentes indicam maior probabilidade da amostra questionada ser realmente de mesma origem da amostra referência. Haplótipos muito frequentes indicam menor probabilidade de coincidência, já que muitos indivíduos apresentam o mesmo conjunto de polimorfismos naquela população. No caso das amostras diferirem em apenas 1 nucleotídeo, o resultado é dito inconclusivo e procede-se à verificação de outras regiões polimórficas, como por exemplo HV3 (LUTZ et al., 2000).

A utilidade, aplicação e validade da utilização do DNA mt na análise forense estão bem documentadas (GINTHER et al., 1992; WILSON et al., 1995; IMAIZUMI et al., 2005). Essa foi

a primeira ferramenta utilizada na identificação de ossadas de soldados americanos que lutaram na Guerra do Vietnam (HOLLAND; FISHER; MITCHELL, 1993). Restos das vítimas da tragédia de 11 de setembro de 2001 no *World Trade Center* (EUA) também foram analisadas por essa técnica (HOLLAND et al., 2003). Além disso, a análise do DNA mt também vem sendo usada em estudos de evolução e antropologia (KRINGS et al., 1997; SVANTE; GIFFORDL; WILSON, 1988).

2.4 Heteroplasmia

Durante o desenvolvimento do indivíduo, as moléculas de DNA mt se replicam independentemente umas das outras e são ditas não-recombinantes. Somando-se o fato dessa replicação possuir baixa fidelidade, existe a possibilidade de uma população de moléculas de DNA mt, encontradas em um indivíduo, serem diferentes, com variantes das mesmas replicando e segregando de forma independente (HOLLAND; PARSONS, 1999). Essa condição denomina-se heteroplasmia.

A heteroplasmia, ou seja, a presença de dois ou mais tipos de DNA mt em um indivíduo, foi primeiro observada em humanos em associação com uma doença mitocondrial (HOLT; HARDING; MORGAN-HUGHER, 1988). Depois, a heteroplasmia foi também demonstrada na região controle do DNA mt (JAZIN et al., 1996). Mutações são acumuladas durante a vida de um indivíduo, logo é esperado que todos os indivíduos possuam heteroplasmia. A heteroplasmia pode ser observada em diferentes situações: 1) indivíduos podem possuir mais do que um tipo de DNA mt em um determinado tecido; 2) indivíduos podem exibir um tipo de DNA mt em um tecido e um tipo diferente em outro tecido; e/ou 3) o indivíduo pode ser heteroplásmico em uma

amostra de tecido e homoplásmico em outra amostra do mesmo tecido.

A heteroplasmia pode apresentar-se de duas formas: uma delas dita heteroplasmia de sequência quando os diferentes tipos de DNA mt diferem em apenas um nucleotídeo (Fig. 2). Esta é a forma mais rara, porém isso pode facilitar a identificação e diferenciação do indivíduo que a possuir; a heteroplasmia é dita de comprimento quando ocorre a deleção ou inserção de uma citosina em regiões contendo repetições mononucleotídicas (regiões homopoliméricas) (Fig. 3). Tanto HV1 como HV2 possuem regiões homopoliméricas (nt 16184-16193 e nt 303-315, respectivamente). Repetições mononucleotídeas são conhecidas como *hotspots*, potencialmente devido à maior probabilidade de erro da DNA polimerase durante a replicação, possibilitando o surgimento da heteroplasmia de comprimento (BONENGEL et al., 2004). Quando comparada a heteroplasmia de sequência, a heteroplasmia de comprimento é comumente encontrada e possui menos especificidade populacional. Entretanto, a heteroplasmia de comprimento vem sendo alvo de investigação genética, primariamente para melhor entender os fatores que possam influenciar a transmissão do DNA mt, particularmente relacionado ao mecanismo conhecido como “gargalo genético” (a teoria do gargalo genético foi proposta em estudos anteriores para calcular a rápida segregação de variantes de DNA mt observadas em animais) (LEE et al., 2004).

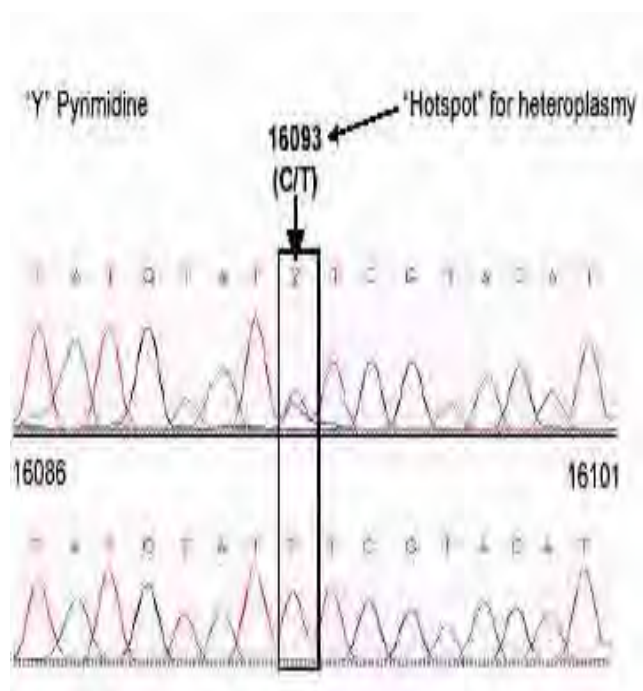


Figura 2 - Heteroplasma de sequência.

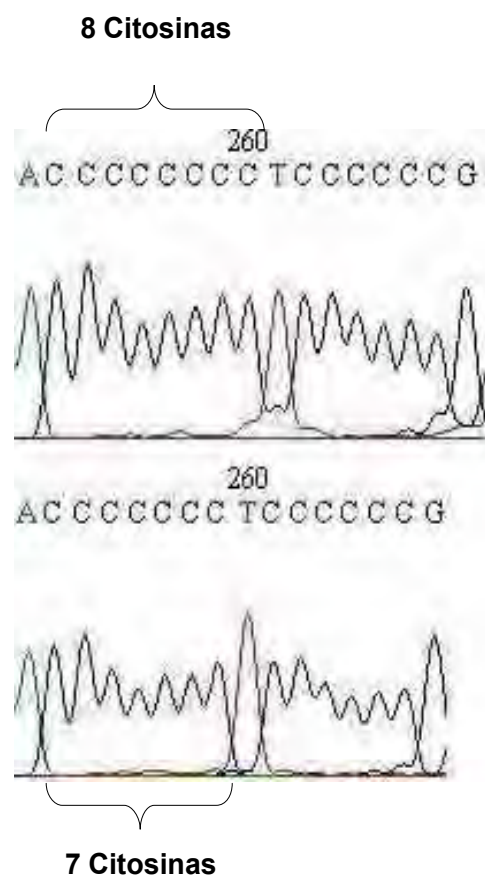


Figura 3 - Heteroplasma de comprimento.

Nos casos forenses, a heteroplasmia pode fortalecer ou complicar a identificação e deve ser levada em consideração. Os cientistas forenses devem ser preparados para lidar com esse processo e interpretá-lo. Dado que a heteroplasmia possa ocorrer, em algum nível, em um ou dois sítios em um indivíduo, isso não é um fato que, *a priori*, possa causar confusão na análise forense, pois pode representar um nível adicional de variação, aumentando o poder discriminatório do teste. Por exemplo, se uma amostra referência e uma amostra questionada possuírem a mesma constelação de polimorfismos, a co-ocorrência de heteroplasmia em um sítio em particular pode prover evidência adicional de que a amostra referência é a fonte da amostra questionada. Entretanto, se a heteroplasmia for encontrada em apenas uma das amostras, referência ou questionada, o resultado pode tornar-se duvidoso.

O primeiro caso de detecção de heteroplasmia de seqüência no âmbito forense surgiu na análise dos restos mortais do Tsar Nicholas II. Membros da família Real Russa, após serem brutalmente assassinados em 1918, foram queimados e enterrados em uma cidade da Sibéria, onde permaneceram não identificados por mais de 70 anos. Em 1991, um grupo de cientistas forenses identificou através da análise antropológica por DNA mt que as ossadas pertenciam ao Tsar e sua família, e que continham certo grau de heteroplasmia (IVANOV et al., 1996).

A freqüência de heteroplasmia de seqüência na população é relativamente baixa (de 2-8%) (HOLLAND; PARSONS, 1999). Entretanto essa freqüência pode variar entre tecidos diferentes (CALLOWAY et al., 2000; LAGERSTROM-FERME et al., 2001; GRZYBOWSKI et al., 2003; PFEIFFER et al., 2004; BINI; PAPALARDO, 2005). Um estudo recente mostrou uma freqüência de 11,4% de heteroplasmia em amostras forenses de fragmentos de cabelo (MELTON et al., 2005). A natureza clonal dos folículos capilares e o alto grau de energia requerido para a queratinização do cabelo são duas características presentes na sua histogênese que podem

contribuir para a alta presença de variantes heteroplásmicas (TULLY et al., 2004). Essa informação é relevante para a análise forense, pois cria a possibilidade de uma amostra referência e uma amostra questionada de um mesmo indivíduo diferirem em níveis de heteroplasmia, ou nos casos extremos, em uma aparente substituição homoplásmica.

A existência de heteroplasmia pode ser confirmada se duas bases claramente puderem ser observadas, após o sequenciamento, em um mesmo ponto em ambas as fitas do DNA mt com certo grau de expressividade. Entretanto, como ocorrem em baixos níveis, normalmente não são detectadas. Para que a heteroplasmia seja detectada por sequenciamento, ela deve estar presente em um nível acima de 20% da linha de base do eletroferograma para ser distinguida do “background” (SALAS; LAREU; CARRACEDO, 2001). A nomenclatura a ser utilizada nos casos de presença de heteroplasmia deve seguir as normas da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (FBI, 2003):

G/T = K	A/C = M
A/G = R	A/G/T = D
G/C = S	A/C/T = H
A/T = W	A/C/G = V
C/T = Y	C/T/G = B
A/C/G/T = N	Deleções = “-” ou D

Nos casos de presença de heteroplasmia de comprimento com inserções de citosinas nas regiões poli-C, a nomenclatura é dada pela posição da última citosina correspondente na sequência referência (CRS) seguida de ponto e numeração arábica progressiva seguida da letra “C” maiúscula (exemplo: 309.1C, 309.2C) (Fig. 4).

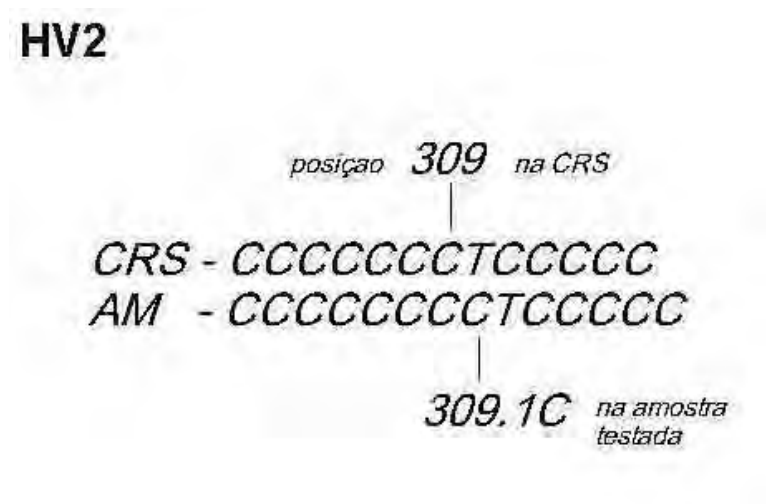


Figura 4 – Exemplo de nomenclatura no caso de heteroplasmia de comprimento.

Nota: CRS = sequência referência; AM = amostra

Outros métodos, além do sequenciamento, podem indicar a presença de heteroplasmia, como por exemplo: cromatografia líquida de alta performance desnaturante (DHPLC), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) e PCR em tempo real (RT-PCR), entretanto, não são utilizados na prática forense (TANNO et al., 1995; BOSCH et al., 2000; SEKIGUCHI; SATO; KASAI, 2004; NIEDERSTATTER et al., 2005).

2.5 Histogênese do cabelo

Os fios de cabelo podem ser descritos como um produto da multiplicação celular epitelial primitiva. A epiderme primitiva do embrião humano começa a organizar grupos de células para a produção de cabelo por volta de 9 a 12 semanas da gestação. Um grupo de células da zona basal primitiva (ectoderme) começa a se enraizar para a formação de uma prega que dará origem ao canal folicular (bulbo). Logo abaixo, um outro grupo de células, de origem mesenquimal, dará origem à papila dermal assim como o revestimento fibroso do folículo capilar. Uma vez estabelecida, as células ectodermas que formam a prega começam a circundar o grupo de células mesenquimais (papila). Esse arranjo forma o folículo capilar que dará origem ao fio de cabelo.

A papila dermal direciona a atividade mitótica das células ectodermas que constituem o bulbo (ou raiz), e suas células se dividem a cada 23 a 72 hs, dando origem aos cabelos (origem ectodérmica). Uma vez deixado o bulbo, as células filhas das células tronco não mais se dividirão, e seguirão regras distintas para sua diferenciação em cutícula, medula ou córtex do fio.

Um outro grupo de células, os melanócitos, migram para junto das células do bulbo e produzirão os melanossomos (pigmentos de melanina) que determinarão a cor do cabelo. O cabelo adquire coloração pois as células corticais transportaram os grânulos de melanina produzidos nos melanócitos (e também mitocôndrias) do bulbo para o fio de cabelo. Logo, as células corticais podem carregar pelo menos duas populações distintas de mitocôndrias (uma originária das células do bulbo e outra originária dos melanócitos), o que pode explicar a possibilidade de mistura de diferentes DNA mt neste tecido (heteroplasmia). Para a formação do fio de cabelo maduro, suas células corticais iniciam uma intensa síntese de proteína queratina, que toma completamente o citoplasma da célula, causando sua morte e a desintegração do DNA.

Entretanto, mitocôndrias persistem incrustadas nas células corticais queratinizadas, juntamente com seu DNA mt (LINCH; WHITING; HOLLAND, 2000).

2.6 Justificativa e relevância do projeto

A presença de duas ou mais populações de DNA mt em uma mitocôndria, célula ou indivíduo (heteroplasmia) é um estado biológico que parece ser mais comum do que foi reportado inicialmente (MONNAT; LOEB, 1985). Recentemente, diversos casos de detecção de heteroplasmia na região não codificadora foram publicados (MEIERHOFER et al., 2005; LO et al., 2005). Uma possível causa de falha na detecção de espécies heteroplásmicas em estudos anteriores deve-se ao uso de técnicas menos sensíveis do que as utilizadas atualmente.

A frequência de heteroplasmia é também de interesse prático nos testes para identificação forense, onde pode ser relevante na solução de um caso (SALAS; LAREU; CARRACEDO, 2001). Novos estudos são necessários para a confirmação dos dados já publicados a fim de que a utilização do DNA mt na presença de heteroplasmia seja regulamentada. Para isso o método de escolha é o seqüenciamento, já que é o método utilizado internacionalmente na rotina forense.

A utilização do DNA mitocondrial em casos forenses no Brasil é praticamente nula. Poucos laboratórios dispõem do *know-how* necessário para sua análise e interpretação. Entretanto, a atual política de segurança pública prevê para os próximos anos a montagem de laboratórios públicos de DNA, os quais utilizarão as diversas técnicas de identificação humana. Assim, faz-se necessário o estudo das frequências dos marcadores moleculares, como as frequências dos haplótipos do DNA mt, para que sejam organizados bancos de dados com frequências da nossa população viabilizando sua aplicação também no contexto brasileiro.

3 OBJETIVOS

3.1 Amostras de cabelo

- Testar alguns protocolos de extração de DNA de amostras de cabelos sem raiz, levando-se em conta o custo-benefício do método.
- Comparar as seqüências das regiões hipervariáveis (HV1 e HV2) do DNA mt obtidas de 100 amostras de sangue (já previamente seqüenciadas) com aquelas obtidas das respectivas amostras de cabelo de indivíduos residentes na Grande São Paulo, para o cálculo da freqüência de heteroplasmia nessa população.

3.2 Amostras de sangue

- Realizar o sequenciamento da região HV3 para análise do poder de discriminação nessa região, utilizando amostras de sangue de 150 indivíduos.

3.3 Amostras forenses

- Aplicar a técnica à análise de DNA mt em vestígios biológicos de casos forenses.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Neste projeto foram analisadas amostras de cabelo de 100 indivíduos residentes na Grande São Paulo, para os quais já havia sido realizado o sequenciamento de suas respectivas amostras de sangue (das regiões HV1 e HV2), para comparação das seqüências observadas no sangue e cabelo e observação dos possíveis casos de heteroplasmia. Além disso, também foi realizada a análise da região HV3 no sangue em 150 indivíduos, sendo que 100 destes correspondem aos já citados anteriormente.

OBSERVAÇÃO: As amostras de sangue e cabelo utilizadas neste projeto foram doadas, conforme Resolução nº 347 de 13 de janeiro de 2005 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), pelo Professor Dr Mário Hiroyuki Hirata do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Toxicológicas da USP (SP) e estão relacionadas com o Projeto “Estudo da frequência dos Haplótipos da Região Hipervariável do DNA Mitocondrial de Indivíduos Caucasianos e Negróides da População Brasileira para Estudo Forense” aprovado pelo CEP da FCF/USP (ofício nº 52, agosto de 2001).

As amostras de sangue e cabelo foram coletadas entre os anos de 2000 e 2003 e foram armazenadas a 8°C (em refrigerador) até a presente data.

Os vestígios biológicos de um caso forense sem solução foram cedidos pela perita Norma Bonaccorso do Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística (IC) do Estado de São Paulo.

4.2 Extração do DNA

4.2.1 Cabelos

Para a extração do DNA, foram usados 4 centímetros de cabelo (sem raiz) de cada indivíduo. Retirou-se a raiz cortando-se 0,5 cm da extremidade do fio a ser utilizada. OBS: Em indivíduos com fios menores que 4 cm foram utilizados diferentes fios até que totalizassem esse tamanho.

Os fios foram cortados em pedaços de 0,5 cm e colocados em tubo eppendorf de 1,5 ml. Procedeu-se ao protocolo de descontaminação conforme Jehaes et al. (1998) modificado como segue:

A cada amostra foram adicionados 500 µl de uma solução de lise diferencial (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,4% SDS, Proteinase-K 250 µg/ml) e incubou-se a 56°C por 30 min. Após essa incubação, foram feitas três lavagens com 400 µl das soluções de NaCl 0,9%, etanol 100% e água ultrapura (Milli-Q), respectivamente, vortexando por 10 segundos e descartando as soluções. Após essa etapa, procedeu-se à extração. Foram testados três protocolos de extração de DNA de fios de cabelo, descritos a seguir:

- Protocolo 1: as amostras foram incubadas *overnight* para digestão em 500 µl de buffer (10 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl) contendo 25 µg de Proteinase-K (Promega) e 39 mM de DTT (dithiothreitol) (Promega) a 56°C em banho-maria (LB-600, Boekel Grant), seguido pela extração com PCA (25:24:1-fenol/clorofórmio/álcool isoamílico) (USB) e purificação com kit DNA IQ (Promega), conforme recomendações do fabricante;

- Protocolo 2: as amostras foram incubadas por 1 hora para digestão com 75 µl de Proteinase-K 18 µg/µl em buffer e 100 µl de DTT 1M, utilizando o kit *Tissue and Hair Extraction* (Promega), seguido pela purificação com o kit DNA IQ;
- Protocolo 3: as amostras foram incubadas por 2 horas e 30 min para digestão com 75 µl de Proteinase-K (18 µg/µl em buffer) e 100 µl de DTT 1M (Promega) seguido de extração com PCA e purificação por coluna *GFX PCR DNA and gel band purification kit* (Amersham), conforme recomendações do fabricante.

4.2.2 Sangue

Para a extração do DNA das amostras de sangue, um disco de 1,2 mm de papel de filtro foi cortado utilizando *Harris Micro Punche e Cutting Mat* (Whatman-Bioscience) e depositado em tubo de 1,5 ml. Procedeu-se à extração utilizando *FTA Reagent* (Whatman) e eluição com TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5) deixando-se o papel (DNA adsorvido) secando em estufa por 2 horas.

4.2.3 Vestígios

Foi utilizado neste trabalho um caso forense composto de vestígio biológico (ossos) e amostra referência (sangue) fornecido pelo Instituto de Criminalística de São Paulo (IC). A amostra referência foi cedida pela mãe de um indivíduo desaparecido, que questionava os vestígios biológicos como pertencentes ao seu filho.

A extração do DNA das amostras de ossos foi realizada de acordo com metodologia padronizada pelo Laboratório de Investigação de Paternidade da UNESP-Araraquara (CICARELLI; ALVARENGA; CARVALHO, 2003). Os ossos foram previamente lavados em água corrente com ajuda de uma escova de cerdas de aço e secados a temperatura ambiente (TA) por 12 hs. Os mesmos foram então pulverizados com o auxílio de nitrogênio líquido e 0,2-0,3g do material foi incubado em banho-maria a 56°C durante 48 hs na presença de EDTA 0,5M, pH 8, e proteinase-K (500µg/mL). Durante a incubação os tubos foram agitados periodicamente. Em seguida foi feita a extração com PCA e purificação pelo kit DNA IQ (Promega).

A extração do DNA de sangue líquido das amostras-referência foi realizada com o kit GenomicPrep™ *Blood DNA Isolation* (GE Healthcare), a partir de 300µL de amostra que foram submetidos à lise celular com 900µL de *RBC Lysis Solution* e 300µL de *Cell Lysis Solution*, responsáveis pela lise da membrana celular das células vermelhas e brancas, respectivamente. Foi feita então a precipitação das proteínas com 100µL da solução *Protein Precipitation Solution* e, em seguida, o sobrenadante contendo o DNA foi submetido à precipitação com isopropanol absoluto. Por fim, o pellet de DNA foi eluído em 100µL de *DNA Rehydration Solution*, incubado por 24h à TA e, após incubação, armazenado a 4°C. A quantidade de DNA obtida pela técnica, segundo informações contidas no protocolo do kit GenomicPrep™ *Blood DNA Isolation*, pode ser de 0,1µg se o rendimento for de 100%.

Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA extraído das amostras sanguíneas líquidas para verificação de sua integridade.

4.3 Reação de PCR (*Reação em Cadeia da Polimerase*)

A reação de PCR foi realizada em tubos de 0,2 ml, utilizando-se:

2,5 µl de GoldStar Buffer (Promega)

0,2 µl (1 U) de AmpliTaqGold polymerase (Applied Biosystems)

5 pmols de cada primer (*forward* e *reverse*) (IDT) (Tabela 1)

5 µl de DNA líquido (cabelo ou vestígio) ou

1 disco de 1,2 mm de papel contendo o DNA

Água ultrapura (Milli-Q) autoclavada qsp. 25 µl.

OBS. A cada amplificação foi realizada uma reação do tipo “branco” utilizando água ultrapura autoclavada.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer) conforme o ciclo abaixo:

95°C – 11 min¹

96°C – 1 min

94°C – 30 seg	} 40 X
56°C – 30 seg	
72°C – 90 seg	

60°C – 11 min

4°C - ∞

¹ Etapa necessária à ativação da enzima AmpliTaqGold polimerase.

Tabela 1 – Primers utilizados

	Primer	Orientação	Seqüência
HV1	L15997	forward	5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3'
	H16401	reverse	5'-TGATTTACGGAGGATGGTG-3'
	L16209 ⁽¹⁾	forward	5'-CCCCATGCTTACAAGCAAGT-3'
HV2	L29	forward	5'-GGTCTATCACCTATTAACCAC-3'
	H408	reverse	5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA-3'
	L334 ⁽¹⁾	forward	5'-CCGCTTCTGGCCACAGCACTT-3'
HV3	F314	forward	5'-CCGCTTCTGGCCACAGCACT-3'
	R638	reverse	5'-GGTGATGTGAGCCCGTCTAAAC-3'

Fonte: Mitotyping Technology Protocol

Nota: (1) Primers internos à seqüência de interesse que foram utilizados, em substituição aos primers *forward* originais, quando não foi possível obter a leitura da seqüência devido à presença de heteroplasmia de comprimento.

Após a amplificação dos fragmentos, a avaliação dos produtos da reação e sua quantificação foram realizadas visualmente após eletroforese em gel de agarose 1,0% (Cuba Horizon 58, Model 200 - Gibco) por 15 minutos a 100 volts, utilizando-se 5 µl do produto da PCR e comparando-se a intensidade das bandas com aquelas do marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) após coloração com Brometo de Etídio (BrEt). O gel foi visualizado e fotografado em aparelho Flúor-S Multimager (Bio-Rad).

4.4 Purificação do produto de PCR

O produto de PCR foi purificado previamente à realização da reação de sequenciamento para retirada dos nucleotídeos não incorporados e excesso de primers. Nesta etapa, as amostras que não estavam na concentração mínima necessária para o sequenciamento foram concentradas.

4.4.1 Cabelos e vestígios

Para as amostras de cabelo e vestígio foram utilizadas as colunas de purificação *GFX PCR DNA and gel band purification* kit, conforme as recomendações do fabricante.

4.4.2 Sangue

Para as amostras de sangue, utilizou-se o método enzimático de purificação conforme o protocolo abaixo:

Em tubos de 0,2 ml, para cada 6 µl de produto de PCR adicionou-se 0,33 µl de Exonuclease I (USB), 0,33 µl de *Shrimp Alkaline Phosphatase* (USB) e água bidestilada qsp. 10 µl. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research) a 37°C por 30 minutos, seguida pela inativação das enzimas a 80°C por 15 minutos.

4.5 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada em tubos de 0,2 ml conforme protocolo abaixo:

Foram adicionados:

4 µl do produto de PCR purificado (concentração maior que 40 ng)

2 µl do primer *forward* ou *reverse* (1,6 picomolar)

2 µl de solução “*Save Money*” (200 mM Tris-HCl, pH 9; 5,0 mM MgCl₂)

2 µl de Big Dye Terminator v 1.0 (Applied Biosystems)

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador PTC-100 utilizando-se a ciclagem abaixo:

96°C – 1 min

96°C – 10 seg
56°C – 10 seg
60°C – 4 min

} 25X

4°C - ∞

OBS: O sequenciamento foi realizado em ambas as fitas do DNA.

4.6 Purificação do produto da reação de sequenciamento

O produto da reação de sequenciamento foi purificado para retirada de nucleotídeos não incorporados através da técnica de precipitação por álcool conforme o protocolo abaixo:

- Adicionou-se 80 µl de isopropanol a 75% ao produto da reação de sequenciamento (no mesmo tubo onde a reação foi realizada), homogeneizando e transferindo toda a mistura para novo tubo de 1,5 ml;
- A mistura foi deixada à TA por 15 min no escuro, centrifugando-se por 15 min a 14.000 rpm (rotações por minuto) em centrífuga (Eppendorf Centrifugal 5417R);
- O sobrenadante foi então cuidadosamente descartado, invertendo-se o tubo sobre papel absorvente e adicionando-se lentamente 1 ml de etanol 70% (pelas paredes do tubo);
- Procedeu-se a nova centrifugação por 5 min (14.000 rpm/TA), vertendo-se o sobrenadante cuidadosamente sobre papel absorvente;
- O precipitado foi seco a vácuo por 5 min em aparelho DNA Speed Vac (Savant) e guardado em freezer a -20°C até o dia da aplicação no gel (no máximo uma semana).

4.7 Eletroforese e detecção

Antes da aplicação no gel, os precipitados foram ressuspensos em 2 µl de *Loading Buffer* (1,65 µl de Formamida e 0,35 µl de uma mistura composta por 33% de *Even Lane Code* e 67% de *Odd Lane Loading Color*) (Applied Biosystems) e vortexados por 1 minuto. Imediatamente antes da aplicação, os mesmos foram aquecidos a 95°C por 2 minutos e conservados em gelo.

As amostras foram submetidas à eletroforese em seqüenciador ABI 377 (Applied Biosystems) utilizando-se placas de 36 cm para montagem do gel. O gel desnaturante foi preparado em um volume total de 40 ml conforme protocolo do fabricante (4 ml de solução gel Long Ranger 50% (Cambrex), 14,5 g uréia (Promega), 0,4 g Amberlite (Sigma) e 20 ml de água ultrapura); a mistura permaneceu em agitador magnético para dissolução por 10 min. A solução

foi filtrada em membrana HV 0,45 μ M de poro (Millipore) juntamente com 4 ml de TBE 1X (2 mM EDTA, 89 mM Tris, 89 mM ácido bórico) e deaerada por 10 min. Adicionou-se então 28 μ l de TEMED (Sigma) e 200 μ l APS 10% (persulfato de amônio) (Sigma). Aplicou-se a solução entre as placas para a montagem do gel deixando-se polimerizar por pelo menos 2 horas antes da aplicação das amostras. A corrida do gel sempre foi realizada por 7 horas nas condições especificadas no equipamento (ABI 377).

4.8 Análise dos resultados

4.8.1 Ferramentas de Bioinformática

A análise dos resultados do sequenciamento foi feita utilizando o programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Os resultados do sequenciamento de ambas as fitas foram comparados para se chegar a um consenso de sequência. Os polimorfismos encontrados foram anotados em planilha Excel 2000. Nas amostras de cabelo, os perfis encontrados foram comparados aos obtidos nas respectivas amostras de sangue. A leitura de heteroplasmia foi realizada visualmente em cada eletroferograma.

4.8.2 Detecção de Heteroplasmia

Como pré-requisitos para se afirmar presença de heteroplasmia nas amostras de cabelo foram considerados os seguintes parâmetros:

- Presença de dois nucleotídeos (dois picos) em uma mesma posição em ambas as fitas do DNA;
- Porcentagem do pico menor deve ser pelo menos 30% da área do pico maior;
- Reprodutibilidade do resultado.

4.8.3 Controle de qualidade

4.8.3.1 *Qualidade dos eletroferogramas*

A qualidade dos eletroferogramas foi avaliada utilizando o programa PHRED (CodonCode, Dedham, MA, USA) que expressa um valor que varia de 4 a 60 para cada base nucleotídica seqüenciada. Esses valores estão relacionados à probabilidade de erro de incorporação de nucleotídeo pela técnica de sequenciamento, de modo que um valor de 10 corresponde a uma acurácia de 90% daquela base estar correta e um valor de 50 corresponde a 99,999% de acurácia. Baseado em um estudo do *European DNA Profiling Group* (EDNAP) um valor acima de 20 deve ser padronizado para uma aceitável qualidade dos eletroferogramas para a análise forense (99% de acurácia), além da confirmação de cada nucleotídeo pelo sequenciamento da fita reversa do DNA (PARSON et al., 2004). Assim, neste trabalho utilizou-se um valor mínimo de 20 para todas as bases nitrogenadas analisadas.

4.8.3.2 *Prevenção à contaminação*

Tendo em vista o grande número de ciclos na reação de PCR utilizada neste trabalho (40 ciclos), que foi baseado nos dados relatados por outros autores (de 36 a 42 ciclos), assim como o grande número de cópias do DNA mt presente nas células em geral, fez-se necessário a padronização de uma série de medidas para a prevenção à contaminação. Todos os usuários do laboratório tiveram seu DNA mt tipados e os perfis foram armazenados para posterior comparação em caso de contaminação. Uma reação do tipo branco foi realizada a cada amplificação e, nos casos de contaminação, todas as reações daquele lote foram descartadas. Ainda assim, alguns casos de contaminação puderam ser detectados durante a análise do resultado do sequenciamento. Nesses casos, toda a metodologia, desde a extração do DNA, foi realizada novamente. Medidas de prevenção foram tomadas como uso de jalecos, luvas (e troca das mesmas a cada etapa da manipulação das amostras), limpeza das bancadas, aparelhos, e outros utensílios com solução de hipoclorito de sódio seguido de álcool 70° GL, e irradiação com UV, além da separação de área pré e pós PCR.

4.8.4 *Análise Estatística Populacional*

4.8.4.1 *Sangue*

Os cálculos das medidas de variação genética de HV3 nas amostras de sangue foram feitos manualmente utilizando as seguintes fórmulas matemáticas:

Probabilidade de semelhança (p)

$p = \sum x^2$, (STONEKING et al., 1991) onde

x : frequência de cada haplótipo

Diversidade haplotípica (h)

$h = n(1 - \sum x^2) / (n - 1)$, (NEI, 1987) onde

n : número amostral

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cabelos

5.1.1 Escolha do protocolo de extração do DNA

Os três protocolos de extração de DNA de fios de cabelo foram testados previamente para a escolha daquele de melhor custo-benefício (ver Tabela 2). Com os protocolos 1 e 3, houve êxito na extração, entretanto com o protocolo 2, não foi possível extrair DNA (confirmado apenas pela amplificação por PCR). Isso se deveu, provavelmente, à pequena quantidade de cabelo utilizada, quando comparada às recomendações do fabricante do kit. Comparando-se os três protocolos testados para a extração do DNA de fios de cabelo, o protocolo 3 mostrou-se mais adequado para nossos ensaios, uma vez que produziu uma alta porcentagem de eficiência nas extrações e em tempo menor de execução. Por isso, foi utilizado como protocolo padrão (Fig. 5).

Tabela 2 – Relação tempo/custo entre protocolos de extração de DNA de cabelo

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Tempo (horas) ⁽¹⁾	14 h	3 h	4 h
Custo por amostra	R\$ 16,15	R\$ 27,99	R\$ 13,69

Nota: (1) Tempo médio para preparo de 10 amostras.

Das amostras de cabelo utilizadas para a extração, em 52% dos casos apenas um fio de cabelo foi suficiente para suprir os 4 cm necessários para o desenvolvimento do protocolo e, em 48% dos casos, foi necessário realizar a extração com mais de um fio do mesmo indivíduo.

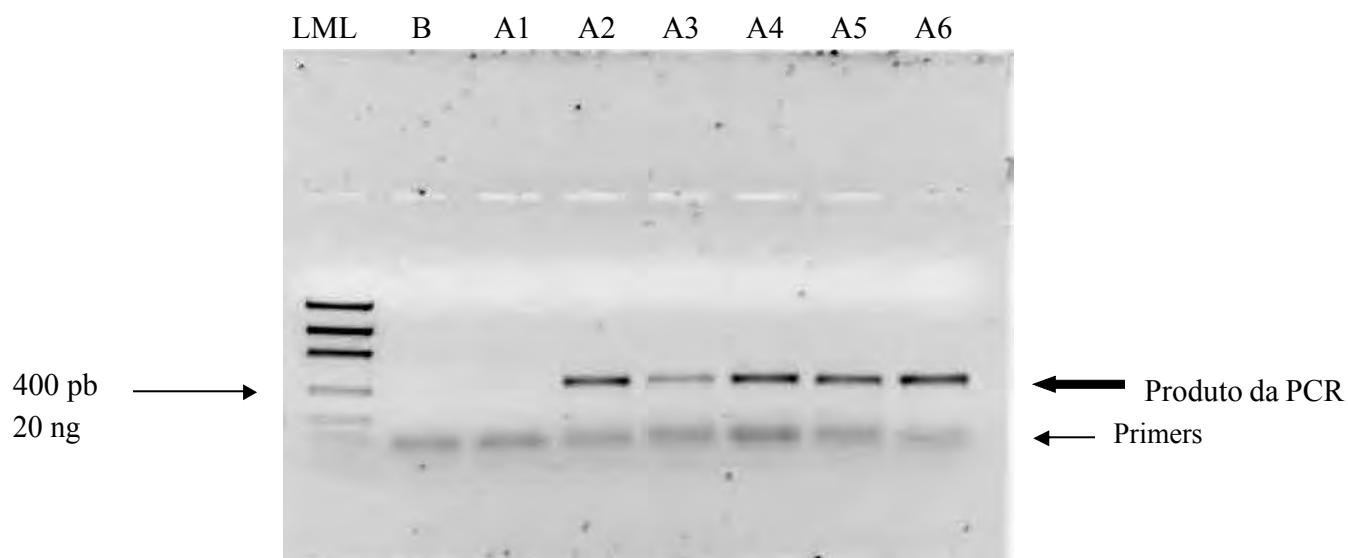


Figura 5 – Padrão obtido da amplificação de HV1 por PCR

em amostras de cabelo de 6 indivíduos (A1 a A6).

Eletroforese em agarose 1% corado com BrEt.

LML: *Low DNA Mass Ladder*.

B: Reação do tipo Branco.

5.1.2 Eficiência do protocolo de extração do DNA

Foram analisadas amostras de cabelo de 100 indivíduos nas regiões HV1 e HV2. Destas, 95 obtiveram êxito na extração e foram amplificadas; um cabelo apresentou-se resistente à digestão e outros quatro, aparentemente sofreram digestão, mas não puderam ser amplificados.

Esses resultados demonstram uma eficiência de 95% obtida por esse protocolo, um valor maior do que alguns já descritos na literatura que variam de 67 a 92% (GRAFFY; FORAN, 2005; HUHNE et al., 1999; WILSON; POLANSKEY; BUTLER, 1995; MELTON et al., 2005). Entretanto, os valores encontrados na literatura referem-se a amostras forenses, o que pode dificultar a extração pela possibilidade de degradação do DNA, ou foram utilizados fragmentos de cabelo menores que 4 cm, o que pode diminuir a disponibilidade de DNA mt e prejudicar a amplificação.

Dentre as 95 amostras amplificadas, 84 (88,42%) apresentaram o perfil completo (HV1 e HV2 amplificados). Onze amostras (11,58%) puderam ser amplificadas em apenas uma das duas regiões (HV1 ou HV2).

5.1.3 Heteroplasmias

Foram detectadas heteroplasmias de sequência em dez indivíduos, distribuídas em 7 posições entre as regiões HV1 e HV2 do DNA mt (Tabela 3).

Tabela 3 – Heteroplasmias de sequência encontradas

Amostra	HV1	HV2
Cabelo 15	16189Y	
Cabelo 27		203R
Cabelo 31	16192Y	
Cabelo 47	16093Y	
Cabelo 56	16093Y	

Amostra	HV1	HV2
Cabelo 67	16093Y	
Cabelo 69	16183M	
Cabelo 74	16093Y	
Cabelo 76		152Y
Cabelo 79	16344Y	

A frequência de heteroplasma de sequência encontrada neste trabalho (10,5%) condiz com os dados recentemente publicados por Melton et al. (2005) que encontrou uma frequência de 11,4% em fragmentos de cabelo. Entretanto, uma frequência variando entre 0 a 41% foi relatada por diferentes autores utilizando a técnica de sequenciamento (SULLIVAN et al., 1996; HUHNE et al., 1999; PFEIFFER et al., 1999; BRANDSTATTER; PARSON, 2003) (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência de heteroplasma de sequência relatada por diversos autores

Autor	Frequência
Sullivan et al. (1996)	41,6%
Huhne et al. (1999)	0%
Pfeiffer et al. (1999)	0%
Brandstatter; Parson (2003)	22,6%
Melton et al. (2005)	11,4%

Dentre as sete posições heteroplásmicas observadas, quatro foram descritas na literatura como sendo *hotspots* para heteroplasma (são elas 16093, 16189, 16192 em HV1 e 152 em

HV2), o que enfatiza a confiabilidade dos resultados obtidos. Dentre as três outras posições heteroplásmicas encontradas apenas a 16344 já foi citada por outros autores, entretanto, não é excluída a possibilidade da presença de heteroplasmia em qualquer sítio, assim como, não é excluída a possibilidade de contaminação (já que o protocolo de descontaminação das amostras, realizado previamente à extração, pode não ser eficaz em 100% dos casos).

As heteroplasmias nas posições 16183, 16189, 16344 de HV1 e nas posições 152 e 203 de HV2 foram encontradas apenas nas amostras de cabelo, não sendo observadas no sangue dos mesmos indivíduos. Já a heteroplasmia na posição 16192 foi encontrada em ambas as amostras, cabelo e sangue, com graus variados, sugerindo a presença de uma mistura de dois tipos de DNA mt naqueles tecidos do indivíduo (Fig. 6). A posição 16093, em 2 dos 4 indivíduos que a possuíam, apresentou-se tanto heteroplásmica quanto homoplásmica em amostras de cabelo, quando mais de um fragmento do mesmo fio foi analisado. O nucleotídeo predominante em todas as amostras de cabelo foi a timina, mas uma pequena porcentagem de citosina ainda pode ser detectada. Já as amostras de sangue apresentaram sempre citosina nessa região, sem vestígio de heteroplasmia (Fig. 6).

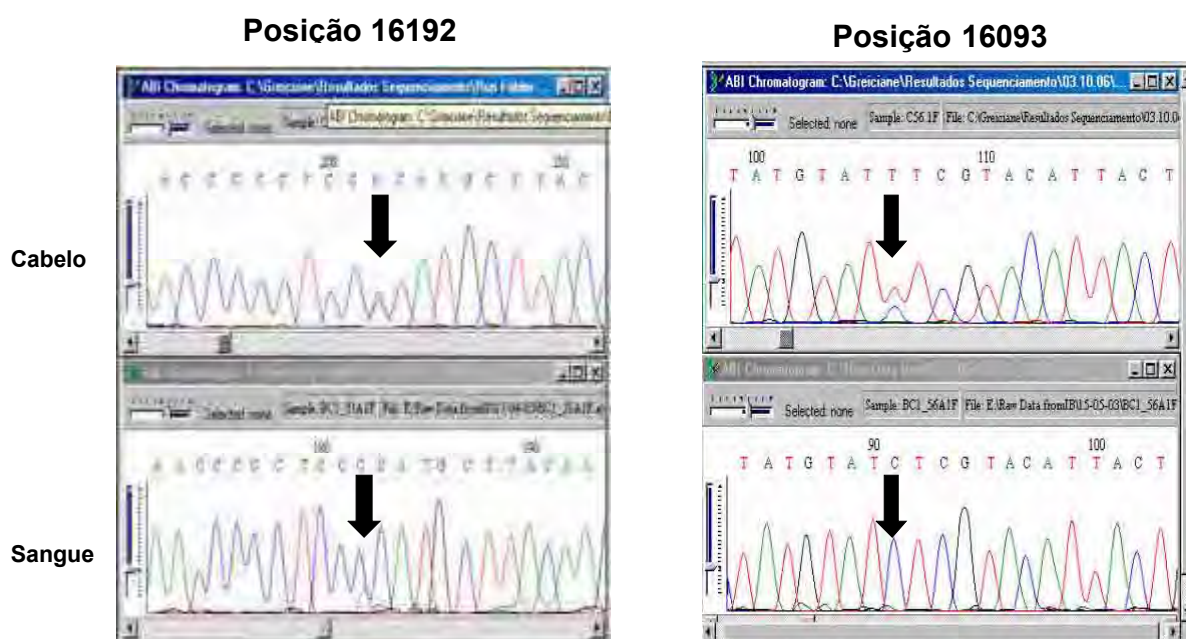


Figura 6 – Eletroferogramas resultantes do sequenciamento do DNA mt em amostra de cabelo (superior) e sangue (inferior) de dois indivíduos. Posições heteroplásmicas 16192 e 16093 (esquerda e direita respectivamente).

Apesar da técnica de sequenciamento não ser indicada para a avaliação do número de citosinas nas regiões poli-C, pela dificuldade de leitura dos resultados (LUTZ-BONENGEL et al., 2004) foram também detectadas diferenças no número de citosinas na região poli-C de HV2 em 3 amostras. Nos três casos, as amostras de cabelo apresentaram uma inserção de citosina na região poli-C que não foi detectada no sangue dos mesmos indivíduos (Tabela 5). Esses resultados também condizem com os dados de outros autores que concluíram que indivíduos não devem ser identificados apenas pelos polimorfismos presentes na região poli-C de HV2, pois nessa região, estes parecem variar entre tecidos do mesmo indivíduo (STEWART et al., 2001).

Tabela 5 – Heteroplasmia de comprimento (inserções encontradas apenas nas amostras de cabelo).

Amostra	HV2
Cabelo 35	309.2C
Cabelo 70	315.1C
Cabelo 108	309.1C

A interpretação dos resultados e a medida do “peso” da evidência de um perfil do DNA mt são provavelmente as tarefas mais complexas nos casos forenses. Alguns parâmetros biológicos devem ser levados em consideração antes da conclusão de que duas amostras são ou não originadas do mesmo indivíduo (ou possuem a mesma linhagem materna). Um deles é a taxa de mutação relativa a cada posição nucleotídica estudada. O nível de estabilidade molecular varia a cada nucleotídeo ao longo de todo o DNA mt, assim, um único polimorfismo diferenciando duas amostras forenses deve ser interpretado de acordo com a taxa de mutação neste sítio específico (SALAS et al., 2006).

5.2 Sangue

Foram analisadas 150 amostras de sangue na região HV3. Trinta e um haplótipos diferentes foram encontrados e estão listados na Tabela 6. Vinte e sete posições polimórficas foram encontradas e estão listadas na Tabela 7 juntamente com suas respectivas frequências.

Tabela 6 - Haplótipos da região HV3 do DNA mt dispostos em ordem decrescente de Frequência (n=150).

Haplótipo	Frequência absoluta
CRS	50
523D, 524D	35
499A	13
489C, 493G, 523D, 524D	10
489C	7
456T	3
497T, 523.1C, 523.2A	3
494T	2
460C, 499A	2
489C, 523D, 524D	2
499A, 523D, 524D	2
523.1C, 523.2A	2
477C	1
459D	1
513A	1
497T	1
462T, 489C	1
489C, 573.1C	1
508G, 523D, 524D	1
462T, 482C, 489C	1
513A, 523D, 524D	1
523D, 524D, 573.1C	1
492G, 523D, 524D	1
482C, 523D, 524D	1
471C, 523D, 524D	1
458T, 523D, 524D	1
573.1C, 573.2C, 573.3C	1
456T, 513A, 523D, 524D	1
489C, 493G, 513A, 523D, 524D	1
499A, 523.1C, 523.2A, 523.3C, 523.4A	1
523.1C, 523.2A, 523.3C, 523.4A, 523.5C, 523.6A	1

Tabela 7 – Posições polimórficas na região HV3 do DNA mt dispostas em ordem decrescente de frequência (n=150).

Posição polimórfica	Frequência absoluta
523D	65
524D	65
489C	23
499A	22
493G	11
523.1C	8
523.2A	8
456T	4
513A	4
497T	4
573.1C	3
482C	3
462T	3
460C	2
523.3C	2
523.4A	2
494T	2
459D	1
573.2C	1
573.3C	1
477C	1
508G	1
492G	1
458T	1
471G	1
523.5C	1
523.6A	1

As posições polimórficas mais frequentes podem ser visualizadas na Fig. 7.

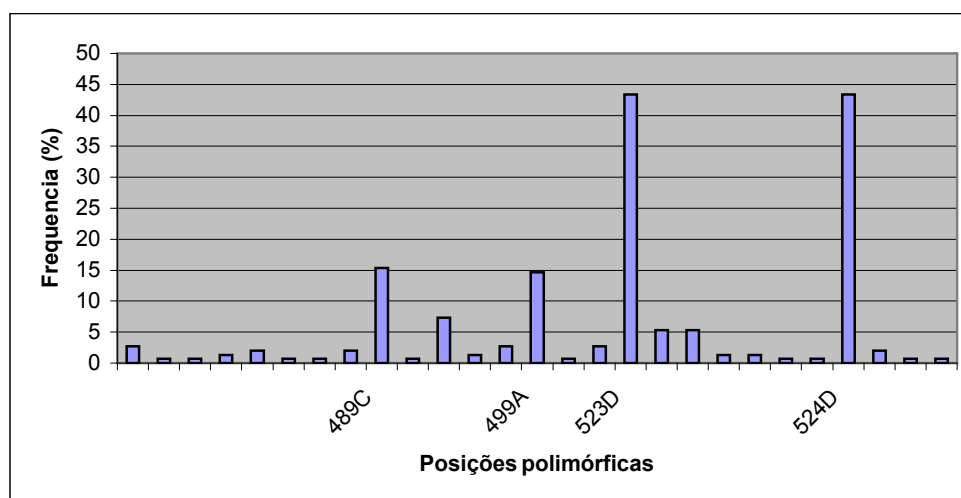


Figura 7 – Frequência (%) das principais posições polimórficas de HV3 em nossa população.

O haplótipo mais freqüente na região HV3 em nossa população foi o idêntico à sequência referência (CRS), ou seja, tais indivíduos não apresentaram nenhum polimorfismo em relação àquela sequência. Isso foi encontrado em 50 dos 150 indivíduos investigados (33,33%), seguido pelo haplótipo “523D, 524D” encontrado em 35 dos 150 indivíduos (23,33%) e o haplótipo “499A” encontrado em 13 dos 150 indivíduos (8,66%). Os outros 30 haplótipos foram encontrados em menos de 8% das amostras, sendo que 19 deles apareceram apenas uma única vez.

Substituições foram observadas em 15 posições de um total de 27 posições polimórficas. Dessas, 14 foram transições (predominantemente C para T ou T para C) e uma transversão (T para G).

Inserções e deleções foram observadas em 12 posições (9 inserções e 3 deleções). As deleções 523D e 524D juntas, relacionadas com repetições de CA na região HV3 do DNA mt, foram as posições polimórficas mais comumente encontradas em nossa população ocorrendo

em 43,33% das amostras analisadas. Inserções de C ocorreram na região poli-C de HV3 em 2% das amostras e inserções de CA na região de repetições dinucleotídicas de CA puderam ser observadas em 4,66% das amostras.

A Tabela 8 mostra os índices de diversidade encontrados em HV3 na população estudada e em diversas populações mundiais. Os resultados obtidos demonstram uma maior variabilidade na região HV3 em nossa população, apesar de os dois haplótipos mais comuns (CRS e 523D, 524D), quando somados, estarem presentes em mais de 50% dos indivíduos estudados (Figura 8).

Tabela 8 - Índices de diversidade na região HV3 em nossa população e em diversas populações mundiais.

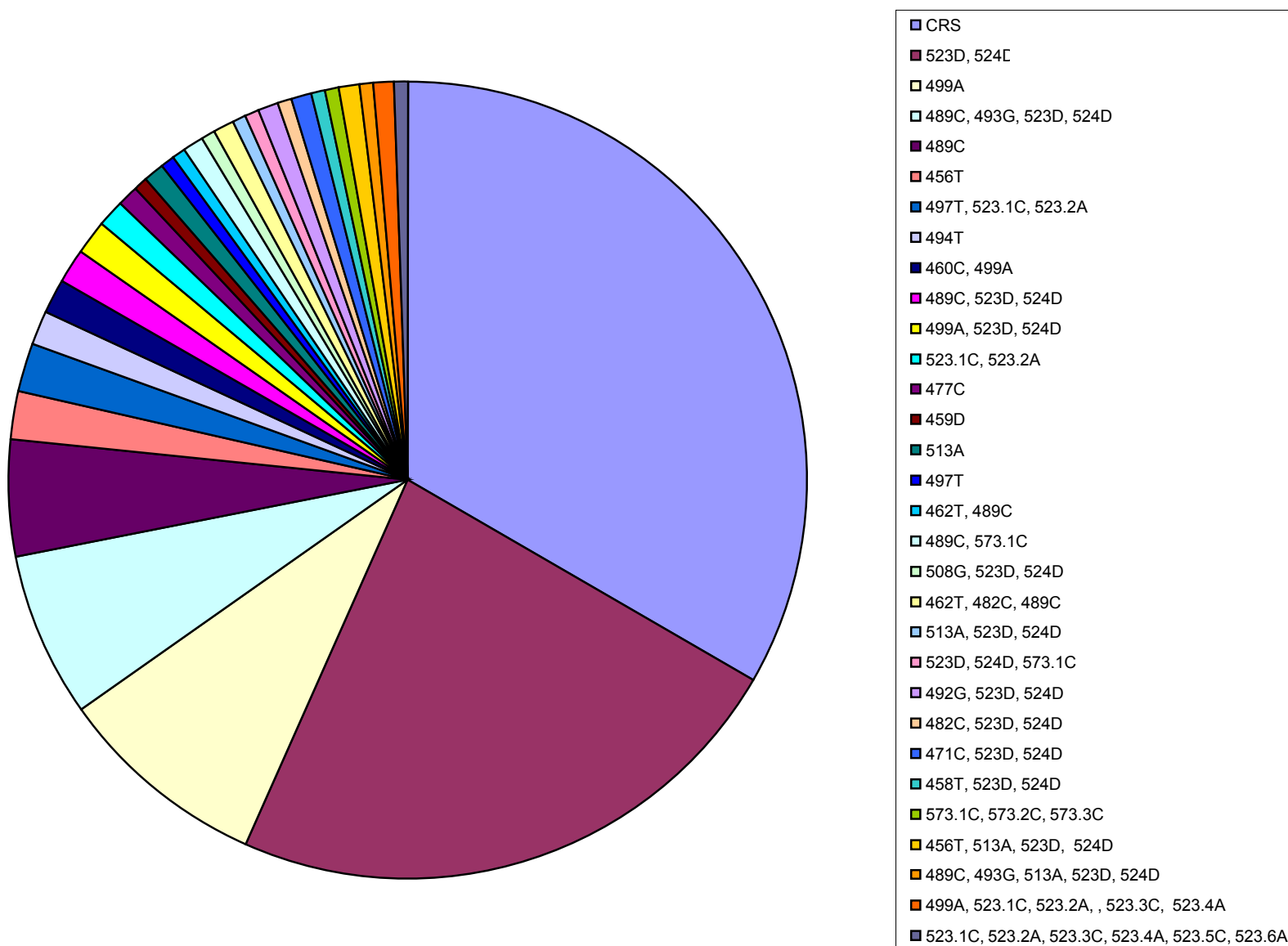
População	Brasileiros	Italianos	Tchecos	Coreanos
Autor, ano		Bini, 2003	Vanecek, 2004	Lee, 2006
N ⁽¹⁾	150	100	93	593
Diversidade Haplotípica (h)	0,8233	0,590	0,659 ⁽²⁾	0,798
Probabilidade de semelhança (p)	0,1822	0,415	0,348 ⁽²⁾	0,203
Substituições observadas	15	9	n/a	n/a
Deleções/inserções observadas	12	9	n/a	n/a
Sítios polimórficos	27	18	27 ⁽²⁾	31
Haplótipos	31	15	n/a	40

Nota: (1) Número amostral. (2) Extensão dos nucleotídeos editados de 438 a 574 (HV3)

para 341 a 574 (HV3ex).

*Em negrito a população estudada neste trabalho

Figura 8 – Frequência relativa dos haplótipos resultantes da análise da região HV3.



A Tabela 9 mostra os índices de diversidade obtidos quando cada segmento da região hipervariável (HV1, HV2 ou HV3) é analisado, separadamente e em conjunto, em nossa população. Analisando-se a região HV1 mais HV2 em nossa população, obtivemos 138 haplótipos diferentes em 150 indivíduos. Quando adicionamos a análise dos polimorfismos de HV3 o número de haplótipos sobe para 142, pois 4 novos haplótipos são criados.

Tabela 9 – Diversidade haplotípica, probabilidade de semelhança e número de haplótipos do DNA mt observados em 150 amostras de nossa população.

	Diversidade Haplotípica (h)	Probabilidade de semelhança (p)	Número de haplótipos
HV1	0,9946	0,0120	121
HV2	0,9910	0,0155	95
HV3	0,8233	0,1822	31
HV1 + HV2	0,9988	0,0078	138
HV1 + HV2 + HV3	0,9992	0,0074	142

Nota: Os polimorfismos das regiões poli-C foram considerados para os cálculos.

Dentre as amostras que apresentavam o mesmo haplótipo em HV1 e também HV2 (n=20), oito delas puderam ser distinguidas pela presença de pelo menos um novo polimorfismo pela análise de HV3 (40%). Entretanto, considerando a necessidade da presença de 2 ou mais polimorfismos não coincidentes para diferenciar dois indivíduos, apenas seis amostras puderam ser diferenciadas (30%) pela análise adicional de HV3. Esse resultado é significativo quando comparado aos resultados de Lutz et al. (2000) e Bini et al. (2003) que demonstraram uma diferenciação em menos de 20% dos casos, e se deve, provavelmente, à grande diversidade de

etnias que deram origem a nossa população e possibilitaram um alto grau de variabilidade do DNA mt.

Assim, esses dados nos permitem confirmar que a região HV3, por ser altamente polimórfica, também pode ser utilizada para identificação humana na população brasileira, principalmente nos casos onde as regiões HV1 e HV2 não forem suficientemente discriminatórias.

5.3 Vestígios

Caso 1 – Foram realizadas análises de polimorfismos do DNA mt de uma amostra de osso e do sangue da amostra referência (mãe de indivíduo desaparecido). Os resultados podem ser visualizados nas Tabelas 10, 11 e 12 abaixo.

Tabela 10 - Polimorfismos encontrados na região HV1 em amostras forenses.

Osso 1	16172C, 16304C, 16311C, 16360T
Amostra referência	16173T, 16183C, 16189C, 16217C

Tabela 11 - Polimorfismos encontrados na região HV2 em amostras forenses.

Osso 1	263G, 315.1C
Amostra referência	073G, 263G, 309.1C, 315.1C

Tabela 12 – Polimorfismos encontrados na região HV3 em amostras forenses

Osso 1	-
Amostra referência	481T
Nota: (-) não amplificado	

Conclusão: Concluiu-se por exclusão de vínculo materno entre os dois indivíduos, pois os mesmos apresentam mais de 2 polimorfismos que os diferem.

6 CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. O protocolo 3 de extração de DNA de fios de cabelo apresentou melhor custo-benefício e resultou em bom rendimento nas extrações comparativamente aos demais e por isso foi utilizado como protocolo padrão neste trabalho;
2. O protocolo padrão de extração de DNA de fios de cabelo utilizado neste trabalho obteve uma eficiência maior do que outros protocolos descritos na literatura;
3. A frequência de heteroplasmia de sequência em HV1 e HV2 encontrada nas amostras de cabelo está de acordo com a frequência encontrada relatada na literatura recentemente;
4. Os índices de diversidade encontrados na região HV3 em nossa população foram superiores aos encontrados em diversas populações mundiais e confirmam a possibilidade de sua utilização em casos de identificação humana na população brasileira, especialmente naqueles em que as regiões HV1 e HV2 não forem suficientemente discriminatórias.
5. Foi possível aplicar a metodologia padronizada para a conclusão de um caso forense duvidoso com amostra de ossos.

CAPÍTULO 2

Elsevier Editorial System(tm) for Forensic Science International

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Heteroplasmy in hair: differences among hair and blood from the same individuals are still a matter of debate.

Article Type: Original Research Paper

Section/Category: Forensic Genetics

Keywords: Mitochondrial DNA; Point heteroplasmy; Hair shafts; Blood; Hypervariable regions

Corresponding Author: Ms Greiciane Gaburro Paneto, MS

Corresponding Author's Institution: UNESP

First Author: Greiciane G Paneto, MS

Order of Authors: Greiciane G Paneto, MS; Joyce A Martins, BS; Larissa V G Longo; Gabriella A Pereira; Adriana Freschi; Vera L S Alvarenga, PhD; Bety Chen, MS; Rogério N Oliveira, PhD; Mário H Hirata, PhD; Regina M B Cicarelli, PhD

Abstract: The analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) is a useful tool in forensic cases when sample contents too little or degraded nuclear DNA to genotype by autosomal short tandem repeat (STR) loci, but it is especially useful when the only forensic evidence is a hair shaft. Several authors have related differences in mtDNA from different tissues within the same individual, with high frequency of heteroplasmic variants in hair, as also in some other tissues. It is still a matter of debate how the differences influence the interpretation forensic protocols. In order to investigate it differences in the mtDNA control region from hair shafts and blood in our population, sequences from the hypervariable regions 1 and 2 (HV1 and HV2) from 100 Brazilian unrelated individuals were compared. The frequency of point heteroplasmy observed in hair was 10.5% by sequencing. Our study confirms the results related by other authors that concluded that small differences within tissues should be interpreted with caution especially when analyzing hair samples.

*** Title Page (with authors and addresses)**

Heteroplasmy in hair: differences among hair and blood from the same individuals are still a matter of debate.

Greiciane G. Paneto^{a*}, Joyce A. Martins^a, Larissa V. G. Longo^a, Gabriella. A. Pereira^a, Adriana Freschi^a, Vera L. S. Alvarenga^a, Bety Chen^b, Rogério N. Oliveira^c, Mário H. Hirata^b, Regina M. B. Cicarelli^a

^aUNESP - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Investigação de Paternidade

Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, Campus

14801-902 - Araraquara, SP – Brasil.

*Corresponding author.

Tel: (+55) 16 3301-6950

E-mail: greiciane_gp@hotmail.com

^bUSP – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bl. 17, Cidade Universitária.

05508900 – São Paulo, SP – Brasil.

^cUSP – Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, Departamento de Odontologia Social

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária.

05508900 – São Paulo, SP - Brasil.

Introduction

Mitochondrial DNA analysis is a useful tool for human identification when degraded materials are available, and especially with hair shafts. Hair is a common sample in most crime scene and its' correct use, as evidence material, can be decisive in a forensic case [1].

Heteroplasmy, the presence of two or more types of mtDNA in the same mitochondrion, cell, tissue and individual, is a situation more common that has previously been reported [2,3]. Hairs appear to be more heteroplasmic than blood and its' level can vary within the hair shaft [4]. The clonal nature of hair follicles and the high-energy requirements of keratinizing hair shaft cells are two features of hair histogenesis that could contribute to the high observation of segregation of heteroplasmic variants in mtDNA from hair shafts [5]. In contrast, peripheral-blood samples consist of lymphocytes produced from very large numbers of hemopoietic stem cells in the bone marrow, and if proportions differ in individual stem cells, the heteroplasmy measured is an averaged value of the proportions in many stem cells. This information is relevant for the forensic analyses because two samples from the same individual can differ in levels of heteroplasmy, or sometimes in a homoplasmic substitution.

Two types of heteroplasmy are known, point-based heteroplasmy (also called sequence-based heteroplasmy) and length-based heteroplasmy. Point heteroplasmy is represented by the presence of two different populations of mtDNA varying from each other at a given nucleotide position. Length

heteroplasmy occurs in HV1 and HV2, and is represented by multiple populations of mtDNA containing polycytosine stretches (C-stretches) of various lengths.

Length heteroplasmy is frequently observed and cannot be used to support an interpretation of exclusion [6]. On the other hand, point heteroplasmy is not so common and could be lead into consideration when interpreting the evidence.

The occurrence of heteroplasmy may improve the value of mtDNA analyses for forensic purposes. If a suspect and a sample match at all mtDNA positions and share a heteroplasmic constellation at the same position, the mtDNA evidence is strengthened [7,8]. However, if both samples are interpreted as homoplasmic and differ slightly in sequence (i.e. typically at only one site), the result is inconclusive and further investigation is warranted [9]. Therefore, the knowledge of the mtDNA variations pattern, especially potential mutational “hotspots”, is of special interest because of it weight on it interpretation.

The frequency of heteroplasmy in hair is still matter of debate. Sullivan et al. [10] reported high levels of heteroplasmy among hair shaft and saliva samples (in 5 out of the 12 hairs analyzed). Pfeiffer et al. [11] and Huhne et al. [12] reported no heteroplasmy when comparing hair and blood sample from the same individuals by sequencing, however, Huhne et al. [12] considered a position heteroplasmic only if a secondary peak was more than 40% of the primary peak. Sekiguchi et al. [13] detected 4.4% of heteroplasmy in hair via sequencing and 5.8% when using a sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis (DGGE) system. Recently, Melton et al. [14] reported point heteroplasmy in 11.4% of forensic casework hairs by sequencing. The rate of heteroplasmy may depend on the methodology used

and the parameters used to distinguish heteroplasmy from the noise of the electropherogram. The detection threshold of sequencing technology is in the order of 20%. More sensitive methods like pyrosequencing, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), real-time PCR [13,15,16,17] can be used to detect heteroplasmy, however, sequencing is still the common method used worldwide in forensic mtDNA analysis.

The aim of our work was to investigate differences on the HV1 and HV2 sequences between hair and blood from the same individuals by sequencing in order to determine the frequency of point heteroplasmy in our population, using the protocol described below.

Materials and Methods

Samples

One hundred unrelated Brazilian individuals were analyzed in the present study. Samples from head hair and blood (spotted onto filter paper and air-dried) were collected from same individuals (3-6 years ago), and stored at 8°C (in refrigerator) until present.

DNA extraction

Hair shafts were cut off 0.5 cm above the skin surface previously, and 4 cm of the hair were cut into pieces of 0.5 cm each. More than one hair was used when

necessary. Decontamination protocol described by Jehaes et al. [18] was used prior to DNA extraction. DNA was extracted using Tissue and Hair extraction Kit (Promega, Madison, WI, USA) with following modifications: incubation for 2h 30min, followed by phenyl/chloroform/isoamyl alcohol (PCIA) extraction (USB - GE Chalfont St. Giles, UK) and purification using GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Chalfont St. Giles, UK). DNA was eluted in 50µL double-distilled H₂O (ddH₂O). Blood extraction was conducted using the FTA Reagent (Whatman, Brentford, UK).

PCR Amplification

Amplification was carried out using 5µL of hair extraction product or 1.2 mm of paper blood filter in a 25µL reaction containing 0.2 mM of each of the following primers: HV1 - L15997 (5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3') and H16401 (5'-GATTCACG GAGGATGGTG-3'), miniprimer L16209 (5'-CCCCATGCTTACAAGCAAGT-3'); HV2 – L29 (5'-GGTCTATCACCCCTATTAACCAC-3') and H408 (5'-CTGTATAAAGTGCATACCGCCA-3'), miniprimer L334 (CCGCTTCTGGCCACAGCACTT-3') (IDT, Coralville, IA), 2,5µL of GoldStar Buffer (Promega, Madison, WI), 0,2µL of AmpliTaqGold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA), brought to the volume with ddH₂O. Thermal cycling was performed using a GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) starting at 95°C, 11 min, then 1 min at 96°C, followed by 40 cycles at 94°C of 30 sec, 30 sec at 56°C and 90 sec at

72°C, and ending with 11 min at 60°C. Amplicon yield was evaluated by running 5µL of PCR product and comparing with 2µL of Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) on 1% agarose gel. Negative controls were included in the extraction and PCR reactions to detect any possible contamination. Additional primer pairs (“mini-primer sets”) were used wherever length heteroplasmy was observed. PCR products were cleaned using GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE, Chalfont, St. Giles, UK).

Sequencing

Cycle sequencing of both strands was carried out using Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with either the PCR or internal primers. Reaction products were ethanol precipitated and electrophoresed in ABI 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Data interpretation

Data interpretation was done using BioEdit software [19]. Only high quality sequences with little or no background signal were used. Sequences were aligned to the Revised Cambridge Reference Sequence [20]. Point heteroplasmy was only considered if a secondary peak of more than about 30% of the primary peak was present and confirmed in the reverse sequencing reaction, with at least two independent PCR reactions, to rule out sequencing artifact or mixtures.

Results and Discussion

The extraction method described showed an average success rate of 95% for all hair shafts tested. A full mtDNA profile (HV1+HV2) was obtained on 88.42% of hairs successfully extracted, and on 11.58% only a partial profile could be obtained (HV1 or HV2). In order to trace potential sources of contamination, all laboratory personnel involved in the mtDNA analysis were typed, and those mtDNA types were maintained on file.

Heteroplasmy was reproducibly detected in 10.5% of hair successfully extracted (10 individuals). All of them were heteroplasmic at only one position. Heteroplasmy was found in seven different positions (Table 1 and 2). The most common site for heteroplasmy in this study was 16093 (n=4). All of heteroplasmic hairs at position 16093 displayed T as the major variant (displaying sometimes less than 30% of the C variant or a completely base changed) while all blood was homoplasmic (displaying C at this site). This position is a recognizable mutational hotspot [21] and can be indicated as a frequent point of substitution homoplasmic in mtDNA. In one individual, C/T heteroplasmy was observed at position 16189 only in hair and it was associated with length heteroplasmy. Heteroplasmy was detected both in blood and hair at only one individual at position 16192. Howell and Bogolin Smejkal [22] have reported hypermutation of T at position 16192 when there is also a C polymorphism at position 16189, however our result was not linked to a 16189C polymorphism. Positions 16093, 16189, 16192 in HV1 and 152 in HV2 are known as fast mutation sites [23,24] already described by many authors

as heteroplasmic hotspots, which supports our results. Except for heteroplasmic position 16344, no other heteroplasmic position found had already been described in literature, however, heteroplasmy can occur at least in any position on mtDNA. Amongst all detected heteroplasmic hairs, with one exception, only one hair was used for extraction. Whenever possible, an additional extraction step, using the adjacent section of the same hair, was included in order to confirm heteroplasmies and their levels along the length of the hair. All heteroplasmies found were confirmed by a new PCR reaction from the same DNA extraction and by a new DNA extraction. Heteroplasmy level varied in almost all hairs tested using a new DNA extraction.

Although the threshold limit for the detection of heteroplasmy by sequencing is rated to be in the order of 20%, our choice to limit point heteroplasmy detection by more than 30% of the mtDNA was based on results of Hancock et al. [25] that developed, tested and evaluated between Laboratories a Standard Reference Material to determine the sensitivity of mutation detection techniques which showed that unambiguous peak could be distinguished from the background only at this level by sequencing.

Length heteroplasmy was not the focus of this study, but differences among hair and blood in the number of cytosines in pol-C in HV2 was observed in some samples, despite limitations in determining the number of these variants by sequencing.

The results of this work are in agreement with others studies [13,14,21] and show that heteroplasmy is more common in hair than in some other reference

tissues like blood. Some homoplasmic substitutions are also possible in hair, especially on hotspot position 16093. Mitochondrial DNA sequence analysis can provide significant evidence to exclude an individual as a source of an evidential sample, or to support an association between both samples. However, when the samples have minimum differences from each other, it would be desirable to weigh the evidence depending on the nature of such differences [26] and, when available, tissues sample other than hair should be typed when conducting mtDNA analysis for forensic cases to minimize the potential misinterpretation issues associated with heteroplasmy.

Conclusion

This study demonstrates that heteroplasmy is frequent in positions where high levels of evolutionary substitutions have been reported but it can also be found at any nucleotide position. A single-base change from the reference blood sample was observed in position 16093 in some hairs. In a forensic case, this situation would lead to the possibility of a failure to exclude, and should be considered during evaluation of results. A guide containing site-specific mutation rates must be standardized for mtDNA forensic use.

References

- [1] A. Salas, M.V. Lareu, A. Carracedo, Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. *Int. J. Legal Med.* 114 (2001) 186-190.
- [2] R.J. Monnat, L.A. Loeb, Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 (1985) 2895–99.
- [3] R.J. Monnat, D.T. Reay, Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissues. *Gene.* 43 (1986) 205–11.
- [4] G. Tully, S.M. Barritt, K. Bender, E. Brignon, C. Capelli, N. Dimo-Simonin, C. Eichmann, C.M. Ernst, C. Lambert, M.V. Lareu, B. Ludes, B. Mevag, W. Parson, H. Pfeiffer, A. Salas, P.M. Schneider, E. Staalstrom, Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding mitochondrial DNA heteroplasmy and segregation in hair shafts. *Forensic Sci. Int.* 140 (2004) 1-11.
- [5] C.A. Linch, D.A. Whiting, M.M. Holland, Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist. *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 844-853.

- [6] J.E. Stewart, C.L. Fisher, P.J. Aagaard, M.R. Wilson, A.R. Isenberg, D. Polanskey, E. Pokorak, J.A. Dizinno, B. Budowle, Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region. *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 862-70.
- [7] P.L. Ivanov, M.J. Wadhams, R.K. Roby, M.M. Holland, V.W. Weedn, T.J. Parsons, Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat. Genet.* 12 (1996) 417-420.
- [8] M.M. Holland, T.J. Parsons, Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework. *Forensic Sci. Rev.* 11 (1999) 22-50.
- [9] B. Budowle, M. Allard, M.R. Wilson, R. Chakraborty, Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations. *Annu. Rev. Genom. Human. Genet.* v. 4 (2003) 119-141.
- [10] K.M. Sullivan, R. Alliston-Greiner, F.I.A. Archampong, R. Piercy, G. Tully, P. Gill, C. Lloyd-Davies, A single difference in mtDNA control region sequence observed between hair shaft and reference sample from a single donor. *Proceeding: The Seventh International Symposium on Human Identification.* Promega, Madison (1996) 126-130.

[11] H. Pfeiffer, J. Huhne, C. Ortmann, K. Waterkamp, B. Brinkmann, Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts – success rate and sequence comparisons. *Int. J. Legal Med.* 112 (1999) 287-290.

[12] J. Huhne, H. Pfeiffer, K. Waterkamp, W. Brinkmann, Mitochondrial DNA in human hair shafts – existence of intra-individual differences? *Int. J. Legal Med.* 112 (1999) 172-175.

[13] K. Sekiguchi, H. Sato, K. Kasai, Mitochondrial DNA heteroplasmy among hairs from single individuals. *J. Forensic Sci.* 49 (2004) 986-991.

[14] T. Melton, G. Dimick, B. Higgins, L. Lindstrom, K. Nelson, Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs. *J. Forensic Sci.* 50 (2005) 1-8.

[15] H.E. White, V.J. Durston, A. Seller, C. Fratter, J. F. Harvey, N.C.P. Cross. Accurate Detection and Quantitation of Heteroplasmic Mitochondrial Point Mutations by Pyrosequencing. *Genetic Testing*. Vol. 9, No. 3 (2005) 190 –199.

[16] B.J. van Den Bosch, R.F. Coe, H.R. Sholte, J.G. Nijland, R. Bogaard, M. Visser, C.E. Die-Smulders, H.J. Smeets, Mutation analysis of the entire mitochondrial genome using denaturing high performance liquid chromatography. *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) E89.

- [17] H. Niederstatter, M.D. Coble, P. Grubwieser, T.J. Parsons, W. Parson, Characterization of mtDNA SNP typing and mixture ratio assessment with simultaneous real-time PCR quantification of both allelic states. *Int. J. Leg. Med.* Online First Issue, 2005.
- [18] E. Jehaes, A. Gilissen, J.J. Cassiman, R. Decorte, Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. *Forensic Sci. Int.* 94 (1998) 65-71.
- [19] Hall T: BioEdit. Biological sequence alignment editor for Windows. [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>] North Carolina State University, NC, USA; 1998.
- [20] MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. [<http://www.mitomap.org>], 2006.
- [21] L.A. Tully, T.J. Parsons, R.J. Steighner, M.M. Holland, M.A. Marino, V.L. Prenger, A sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis assay reveals a high frequency of heteroplasmy in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.* 67 (2000) 432-443.

[22] N. Howell, C.B. Smejkal, Persistent heteroplasmy of a mutation in the human mtDNA control region: hypermutation as an apparent consequence of simple repeat expansion/contraction. *Am. J. Hum. Genet.* 66 (2000) 1589-98.

[23] S. Meyer, G. Weiss, A. von Haeseler, Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics*. 150 (1999) 1103-1110.

[24] L. Excoffier, Z. Yang, Substitution rate variation among sites in mitochondrial hypervariable region I of humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 16 (1999) 1357-68.

[25] D.K. Hancock, L.A. Tully, B. Levin, A Standard Reference Material to determine the sensitivity of techniques for detecting low-frequency mutations, SNPs, and heteroplasmies in mitochondrial DNA. *Genomics*. 86 (2005) 446-461.

[26] A. Alonso, A. Salas, C. Albarrán, E. Arroyo, A. Castro, M. Crespilo, A.M. di Lonardo, M.V. Lareu, C.L. Cubria, M.L. Soto, J.A. Lorente, M.M. Semper, A. Palacio, M. Paredes, L. Pereira, A.P. Lezaun, J.P. Brito, A. Sala, M.C. Vide, M. Whittle, J.J., Yunis, J. Gomes, Results of the 1999-2000 collaborative exercise and proficiency testing program on mitochondrial DNA of the GEP-ISFG: an

inter-laboratory study of the observed variability in the heteroplasmy level of hair from the same donor. Forensic Sci. Int. 125 (2002) 1-7.

Acknowledgments

Acknowledgements This study was supported by a grant from FAPESP - Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (2005/03984-5). It's part of G.G. Paneto's master dissertation, who received a fellowship by CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Table

Table 1

HV1 site heteroplasmy observed in hair and blood from same individuals

N	HV1	
	Hair	Blood
4	16093Y or T	16093C
1	16183M	16183A
1	16189Y	16189T
1	16192Y	16192Y
1	16344Y	16344C

N: number of individuals

The numbers refer to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) nomenclature system for sites. The letters Y and M refer to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature system for the base call designation.

Table 2

HV2 site heteroplasmy observed in hair and blood from same individuals.

N	HV 2	
	Hair	Blood
1	152Y	152T
1	203R	203A

N: number of individuals

The numbers refer to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) nomenclature system for sites. The letters Y and R refer to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature system for the base call designation.

REFERÊNCIAS²

ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457-465, 1981.

ANDREWS, R. et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. **Nat. Genet.**, v.23, p.147, 1999.

ANJOS, M. J. et al. Individual genetic identification of biological samples: a case of an aircraft accident. **Forensic Sci. Int.**, v. 146S, p. S115–S117, 2004.

BINI, C.; PAPALARDO, D. mtDNA HVI length heteroplasmic profile in different tissues of maternally related members. **Forensic Sci. Int.**, v. 152, n. 1, p. 35-8, 2005.

BINI, C. et al. Different informativeness of the three hypervariable mitochondrial DNA regions in the population of Bologna (Italy). **Forensic Sci. Int.**, v. 135, p. 48-52, 2003.

BONENGEL, S. L. et al. Different methods to determine length heteroplasmy within the mitochondrial control region. **Int. J. Legal Med.**, v. 118, p. 274-281, 2004.

BOSCH, B. J. et al. Mutation analysis of the entire mitochondrial genome using denaturing high performance liquid chromatography. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 20, p. E89, 2000.

BRANDSTATTER, A.; PARSON, W. Mitochondrial DNA heteroplasmy or artifacts – a matter of the amplification strategy? **Int. J. Legal Med.**, v. 117, p. 180-184, 2003.

BUDOWLE, B. et al. FORENSICS AND MITOCHONDRIAL DNA: Applications, Debates, and Foundations. **Annu. Rev. Genom. Human. Genet.**, v. 4, p. 119-141, 2003.

² De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BUTLER, J. M. **Forensic DNA Typing**. 2.ed. London: Elsevier Academic Press, 2005.
- CALLOWAY, C. D. et al. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 66, n. 4, p. 1384-97, 2000.
- CICARELLI, R. M. B.; ALVARENGA, V. L. S.; CARVALHO, D.B. A Simplified methodology for DNA extraction of bones in forensic cases [resumo DNA-TP-12]. **Forensic Sci Int.**, v. 136, n. 1, p. 37, 2003.
- FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION - FBI. Guidelines for Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleotide Sequence Interpretation. Forensic Science Communications, v. 5, n. 2, 2003.
- Disponível em: < <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2003/swgdammitodna.htm> >
- Acesso em: 15/07/06.
- GINTHER, C.; ISSEL-TARVER, L.; KING, M. C. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. **Nat. Genet.**, v. 2, n. 2, p. 135-8, 1992.
- GRAFFY, E. A.; FORAN, D. R. A Simplified Method for Mitochondrial DNA Extraction from Head Hair Shafts. **J. Forensic Sci.**, v. 50, n. 5, p. 1-4, 2005.
- GRZYBOWSKI, T. et al. High levels of mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots: reanalysis and revision. **Electrophoresis**, v. 24, n. 7-8, p. 1159-65, 2003.
- HOLLAND, M. .M. et al. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. **Croatian Medical Journal.**, v. 44, p. 264-272, 2003.
- HOLLAND, M. M.; FISHER, D. L.; MITCHELL, L. G. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam war. **J. Forensic Sci.**, v. 38, n. 3, p. 542-53, 1993.
- HOLLAND, M. M.; PARSONS, T. J. Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework. **Forensic Sci. Rev.**, v. 11, p. 22-50, 1999.
- HOLT, I. J; HARDING, A. E.; MORGAN-HUGHER, J. A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. **Nature**, v. 25, p. 717-719, 1988.

HOONG, L. L.; LEK, K. C. Genetic polymorphisms in mitochondrial DNA hypervariable regions I, II and III of the Malaysian population. **AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.**, v. 13, n. 2, p. 79-85, 2005.

HUHNE, J. et al. Mitochondrial DNA in human hair shafts – existence of intra-individual differences? **Int. J. Legal Med.**, v. 112, p 172-175, 1999.

IMAZUMI, K. et al. DNA typing of bone specimens-the potential use of the profiler test as a tool for bone identification. **Legal Medicine**, v. 2, p. 31-41, 2005.

IVANOV, P. L. et al. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. **Nat. Genet.**, v. 12, n. 4, p. 417-20, 1996.

JAZIN, E. E. et al. Human brain contains high level of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, p. 12382-7, 1996.

JEHAES, E. et al. Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. **Forensic Sci. Int.**, v. 94, p. 65-71, 1998.

KRINGS, M. et al. Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. **Cell**, v. 90, p. 19–30, 1997.

LAGERSTROM-FERME, M. et al. Heteroplasmy of the Human mtDNA Control Region Remains Constant during Life. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 68, p. 1299–1301, 2001.

LEE, H. R.; JOHNSON, K. Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. **J. Biol. Chem.**, 2006. In press.

LEE, H. Y. et al. Quantitative and qualitative profiling of mitochondrial DNA length heteroplasmy. **Electrophoresis**, v. 25, p. 28-34, 2004.

LEE, H. Y. et al. Mitochondrial DNA control region sequences in Koreans: identification of useful variable sites and phylogenetic analysis for mtDNA data quality control. **Int. J. Legal Med.** v. 120, p. 5–14, 2006.

LINCH, C. A.; WHITING, D. A.; HOLLAND, M. M. Human hair histogenesis for the Mitochondrial DNA Forensic Scientist. **Forensic Sci. Int.** v.46, p. 844-853, 2000.

LO, M. C. et al. Analysis of Heteroplasmy in Hypervariable Region II of Mitochondrial DNA in Maternally Related Individuals. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1042, p. 130-5, 2005.

LUTZ, S. et al. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? **Forensic Sci. Int.**, v. 113, p. 97-101, 2000.

LUTZ-BONENGEL, S. et al. Different methods to determine length heteroplasmy within the mitochondrial control region. **Int. J. Legal Med.**, v. 118, p. 274-281, 2004.

MEIERHOFER, D. et al. Rapid screening of the entire mitochondrial DNA for low-level heteroplasmic mutations. **Mitochondrion**, v. 5, n. 4, p. 282-96, 2005.

MELTON, T. et al. Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs. **J. Forensic Sci.**, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2005.

MONNAT, R. J.; LOEB, L. A. Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 82, n. 9, p. 2895–2899, 1985.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics.**, New York: Columbia University Press, 1987.

NIEDERSTATTER, H. et al. Characterization of mtDNA SNP typing and mixture ratio assessment with simultaneous real-time PCR quantification of both allelic states. **Int. J. Legal Med.**, Online First Issue, 2005.

PARSON, W. et al. The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organization, results and perspectives. **Forensic Sci. Int.**, v. 139, p. 215–226, 2004.

PFEIFFER, H. et al. Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts – success rates and sequence comparisons. **Int. J. Legal Med.**, v. 112, p. 287-290, 1999.

PFEIFFER, H. et al. Mitochondrial DNA control region diversity in hairs and body fluids of monozygotic triplets. **Int. J. Legal Med.**, v. 118, n. 2, p. 71-4, 2004.

SALAS, A.; LAREU, M. V.; CARRACEDO, A. Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. **Int. J. Legal Med.**, v. 114, p. 186-190, 2001.

SALAS, A.; BANDELT, H. J.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M. B. Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics. **Forensic Sci Int.**, 2006. In press.

SEKIGUCHI, K.; SATO, H.; KASAI, K. Mitochondrial DNA heteroplasmy among hairs from single individuals. **J. Forensic Sci.**, v. 49, n. 5, p. 986-990, 2004.

STEWART, J. E. B. et al. Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region. **J. Forensic Sci.**, v. 46, p. 862-870, 2001.

STONEKING, M. et al. Populations variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 48, p. 370-382, 1991.

SULLIVAN, K. M. et al. A single difference in mtDNA control region sequence observed between hairshaft and reference samples from a single donor. **Proceeding: THE SEVENTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HUMAN IDENTIFICATION**. Promega, Madison, 1996, pp 126-130.

SVANTE, P.; GIFFORDL, J. A.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 20, p. 9775-87, 1988.

TANNO, Y. et al. Quantitation of heteroplasmy of mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene using PCR-SSCP. **Muscle Nerve**, v. 18, n. 12, p. 1390-7, 1995.

TULLY, G. et al. Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding mitochondrial DNA heteroplasmy and segregation in hair shafts. **Forensic Sci. Int.**, v. 140, p. 1-11, 2004.

VANECEK, T.; VOREL, F.; SIP, M. Mitochondrial DNA D-loop hypervariable regions: Czech population data. **Int. J. Legal Med.**, v. 118, p. 14-18, 2004.

WILSON, M. R. et al. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. **Int. J. Legal Med.**, v. 108, p. 68-74, 1995.

WILSON, M. R.; POLANSKEY, D.; BUTLER, J. Extraction, PCR Amplification and Sequencing of Mitochondrial DNA from Human Hair Shafts. **Biotechniques**, v. 18, n. 4, p. 662-669, 1995.

ZANG, Y. J. et al. Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region I, II and III in northeast China Han. **Forensic Sci. Int.**, v. 149, p. 267-269, 2005

