

22680

A
Da. Paula Angelo
com carinho
Isabel

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução

**Convênio de Cooperação Institucional com a
Universidade Federal do Amazonas**

**"DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MARCADORES
MICROSSATÉLITES PARA ANÁLISE GENÉTICA EM HUMANOS"**

Isabel da Mota Pontes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, convênio com a Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, na área de concentração: Genética e Evolução).

**Manaus-AM
Fevereiro/2003**

T
34/2003

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

P813dn Pontes, Isabel da Mota.
Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites
para análise genética em humanos / Isabel da Mota Pontes.
– São Carlos : UFSCar, 2003.
57 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São
Carlos, 2003.

1. Genética molecular. 2. Microssatélites. 3. Marcadores
genéticos. I. Título.

CDD: 574.87328 (20ª)


Amazônia Ocidental

Valor aquis.	
Data aquisição	31/03/10
Nº N. Fisc.	
Fornecedor	Paula Angelo
Nº OCS	
Origem	Jacard
Nº Registro	2010.00017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução

**Convênio de Cooperação Institucional com a
Universidade Federal do Amazonas**

**"DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MARCADORES
MICROSSATÉLITES PARA ANÁLISE GENÉTICA EM HUMANOS"**

Isabel da Mota Pontes

**Manaus-AM
Fevereiro/2003**

Orientador:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Spartaco Astolfi Filho', written in a cursive style.

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Diagnóstico Molecular - Divisão de Biotecnologia do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas, e contou com a imprescindível colaboração da **Dra. Paula Cristina Silva Ângelo** da Embrapa Amazônia Ocidental - Manaus-AM.

Dedico este trabalho à memória
de meus Pais
José Batista da Mota
Corina Souza da Mota

Ao meu esposo **Jerildo Thomé**, pelo amor, pela paciência, estímulo e pelos bons momentos compartilhados.

Aos meus filhos, **Célio, Orbélio e Jerildo Jr.**, por todos os momentos harmoniosos vividos, que sempre compreenderam minhas ausências o que certamente ajudou no desfecho deste trabalho, e que certamente servirá de exemplo para eles.

“A liberdade de deixar experimentar, é uma virtude que só os sábios possuem, ela depende de maior tempo, mas cria o que nenhuma imposição pode ensinar” (Anuniação, 2000).

Prof. Spartaco,

grata pela orientação, confiança e a oportunidade que me deu para desenvolver este trabalho, e pela grande amizade construída.

AGRADECIMENTOS

Ó **DEUS**, obrigado pela tua infinita bondade e pela tua compreensão de muitas vezes eu não poder estar ao seu lado, mas tu estavas comigo.

Ao Prof. **Dr. Luiz Alberto dos Santos Monjeló**, pela co-orientação, confiança e apoio nos procedimentos estatísticos.

À Dra. **Paula Cristina Ângelo** da EMBRAPA, em especial pela orientação no desenvolvimento dos iniciadores , na finalização deste trabalho e a grande amizade construída.

Aos **doadores voluntários**, que participaram deste trabalho doando uma amostra de sangue que muito contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. **Dr. José Odair Pereira**, amigo, pelo incentivo desde o início deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética da UFAM: **Profa. Maria das Neves, Profa. Rozana Medeiros** , pelo apoio nos momentos difíceis no início desta pesquisa.

Aos colegas do PPGEv/2000, **Themis de Jesus e Otávia Cunha** , pelo companheirismo.

Aos colegas do PPGEv e bolsistas do Laboratório de Biotecnologias de DNA: **Maria Marta, Pedro Neto, Karla Oliveira**,

Enedina Assunção, Marcia Neiva, Alessandra Nascimento, pelo apoio recebido.

Ao Dr. **Gustavo Dalton**, Diretor do Laboratório de DNA Forense da PCDF, pela atenção dispensada na elucidação das técnicas para o teste de DNA, e pela confiança .

À Técnica **Elza Quadros**, pela colaboração durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À **Larissa Muniz**, bolsista de iniciação científica, pela valiosa colaboração e companheirismo durante o desenvolvimento da prática deste trabalho.

Às doutorandas **Cíntia Mara, Doriane Picanço**, pela colaboração no momento das entrevistas e desenvolvimento do gel de poliacrilamida.

À Direção do **Hospital Universitário "Getúlio Vargas"**, pela parceria e liberação para a coleta do material.

Aos professores do Programa PPGGEv/UFSCar , **Prof. José das Neves Falcão, Prof. Orlando Moreira Filho , Prof. Gilberto Moraes, Prof. Flávio Henrique da Silva.**

Às Secretárias do Programa PPGGEv, em (Manaus) **Nazaré Barbosa**, (São Carlos) **Regeane** e **Rose**, pela colaboração na Secretaria e pela amizade.

A Dra **Cacilda S. Yano Mallmann**, responsável pelo Laboratório de Análises Clínica /HUGV e Funcionários.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1- Genes e Genomas	3
2.2- Marcadores Moleculares	5
2.2.1-Marcadores RFLP	6
2.2.2-Marcadores tipo PCR	7
2.2.3-Marcadores híbridos PCR - RFLP	8
2.3- Seqüências repetitivas "in tandem"	9
2.4- Análise de polimorfismo genético	11
2.5- Conceito de população	12
2.6- Freqüência gênica	12
2.7- Filogenética da espécie humana	12
3. OBJETIVOS	14
3.1- Objetivo geral	14
3.2- Objetivos específicos	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1- Estratégia do trabalho	15
4.2- Coleta do material	16
4.3- Local da coleta	16
4.4- Extração de DNA	17
4.5- Quantificação das amostras de DNA	18
4.5.1- Análise espectrofotométrica	18
4.5.2- Análise eletroforética	18
4.6- Prospecção computacional do <i>loci</i> microssatélites no banco de dados no genoma humano.	19
4.7- Amplificação das seqüências genômicas microssatélites através da técnica da PCR.	19

4.8- Análise dos produtos da PCR	21
4.8.1- Análise dos produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose	21
4.8.2- Análise dos produtos da PCR através de eletroforese em gel de poliacrilamida	21
4.8.2.1- Preparação das placas	21
4.8.2.2- Preparo do gel de poliacrilamida	22
4.8.2.3- Preparo das amostras da PCR para eletroforese	22
4.8.2.4- Coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata	23
4.9 – Análise Genética	24
4.10 - Soluções	24
4.10.1- Soluções estoque para reação da PCR	24
4.10.2- Soluções estoque para eletroforese	25
4.10.3- Solução para gel de agarose 0,8 %	26
4.10.4- Solução para gel de poliacrilamida	26
4.10.5- Solução para coloração em prata (Crest, 2001)	26
4.10.6- Solução para preparo das placas	27
4.10.7- Marcador (ladder) 100 pb	27
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	28
5.1 – Análise das preparações de DNA por eletroforese	29
5.2 – Busca de loci microssatélite e desenho dos iniciadores	30
5.3 – Análise da capacidade dos iniciadores de amplificar loci polimórficos.	33
5.4 – Padronização das reações da PCR	38
5.4.1 – Escolha da melhor concentração de MgCl ₂	38
5.4.2 – Escolha da melhor concentração de DNA	39
5.4.3 – Escolha da melhor concentração dos iniciadores	40
5.4.4 – Escolha da melhor concentração de Taq polimerase	41

5.5 – Amplificação do locus microssatélite escolhido das amostras de DNA humano	42
5.6 – Análise genética	47
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	52
6.1- Conclusões	52
6.2- Perspectivas	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8. ANEXOS	58

FIGURAS:

FIGURA 1: Genoma Humano	4
FIGURA 2: Estratégia de atividades	15
FIGURA 3: Análise eletroforética das preparações de DNA humano	29
FIGURA 4: Identificação de microsatélite GATA no genoma humano	31
FIGURA 5: Análise de polimorfismos de diferentes <i>loci</i> microsatélite por eletroforese	33
FIGURA 6: Localização da seqüência microsatélite escolhida no cromossomo 15	35
FIGURA 7: Seqüências do microsatélite escolhido e de suas bordas	36
FIGURA 8: Localização em detalhes do microsatélite IS05P	37
FIGURA 9: Análise da concentração de $MgCl_2$	38
FIGURA 10: Análise da concentração de DNA	39
FIGURA 11: Análise da concentração do Primer IS05P	40
FIGURA 12: Análise da concentração de Taq polimerase	41
FIGURA 13: Análise eletroforética dos produtos da PCR	43
FIGURA 14: Análise eletroforética dos microsatélites	45
FIGURA 15: Análise eletroforética dos microsatélites	46
FIGURA 16: Representação gráfica das freqüências alélicas observadas na amostra da população de Manaus	48
FIGURA 17: Representação gráfica das freqüências genotípicas observadas	49
FIGURA 18: Representação gráfica da heterozigosidade observada para loci de microsatélite em amostras de populações (Caucasiana, Hispano-americana e de Manaus-AM).	51

TABELAS:

TABELA 1: Relação dos iniciadores “primers” construídos.	32
TABELA 2: Análise do resultado obtido para 122 doadores da população de Manaus.	47
TABELA 3: Freqüência genótípicas verificadas pela amplificação do DNA dos 122 doadores.	48
TABELA 4: Análise estatística dos resultados obtidos para 122 doadores da população de Manaus.	49
TABELA 5: Valores de heterozigosidade de <i>locus</i> microssatélites de diferentes populações.	50

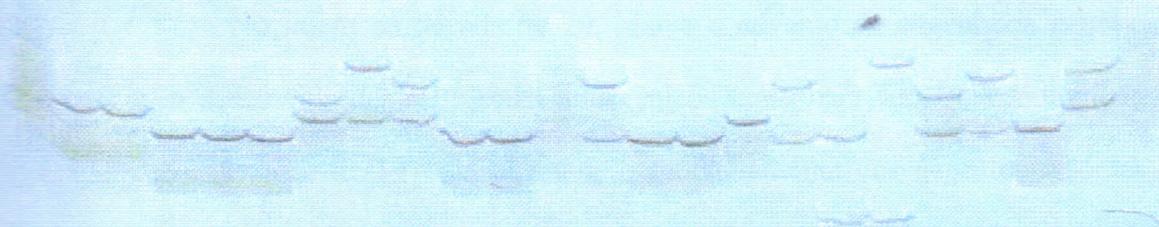
RESUMO

No presente estudo, seqüências de DNA repetitivo “in tandem” formadas por repetições de 4 nucleotídeos (microsatélites) foram identificadas no genoma humano por meio do programa BLAST-N. Pares de iniciadores específicos para amplificação de 15 *loci* de microsatélites foram desenhados e sintetizados quimicamente. Dos 15 *loci* microsatélites, 8 mostraram-se polimórficos quando amplificados por PCR e analisados por eletroforese em gel de agarose. Dos *loci* polimórficos, o escolhido IS05P que foi analisado em amostras de 122 indivíduos da população de Manaus. O resultado dos produtos de amplificação por PCR foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida e observou-se a presença de 7 diferentes alelos e índice de heterozigosidade igual a 0,72131. Em relação a este *locus*, foi possível mostrar que a população de Manaus está em equilíbrio de Hardy-Wainberg. Os estudos iniciados nessa dissertação abrem perspectivas para realização de testes de paternidade e análises forenses, em Manaus.

ABSTRACT

In the present study, repetitive DNA sequences *in tandem* made up by repetitions of 4 nucleotides (microsatellites), have been identified in the human genome by the BLAST-N program. Pairs of primers specific for amplification of 15 microsatellites loci were designed and chemically synthesized. From the 15 microsatellites *loci*, 8 have shown polymorphism after amplification by PCR and analysis by agarose gel electrophoresis. From these polymorphic *loci*, it was chosen one named IS05P which was analyzed from 122 individuals samples from Manaus city population; the result from the products of amplification by PCR was analyzed through polyacrylamide gel electrophoresis and it has shown the presence of 7 different alleles with heterozygosity of 0,72131. In relation to this *locus*, it has been possible show that the Manaus population is in Hardy-Wainberg *equilibrium*. Studies that have been started on this research open perspectives for paternity testing and forensic analysis in Manaus city.

Introdução



1 – INTRODUÇÃO

Após estabelecimento das leis de Mendel, o marco histórico do nascimento da biologia molecular (genética molecular). Foi o trabalho de Avery, MacLeod e M. McCarty (1944), que demonstrou ser o DNA o princípio transformante. A seguir, Watson e Crick propuseram a estrutura tridimensional do DNA na forma (B) e por duas décadas (50 e 60) foram sendo esclarecidos a estrutura e o funcionamento de um gene. Neste período, os marcadores genéticos morfológicos contribuíram para o desenvolvimento da análise de ligação gênica e à construção das primeiras versões de mapas genéticos.

No início da década de 70, houve o advento da engenharia genética, que permitiu, o desenvolvimento de seres transgênicos tanto para fins biotecnológicos como acadêmicos. A partir de 1970, decifrou-se o funcionamento dos genes eucariontes e as primeiras indústrias de produção de proteínas recombinantes (transgênicas) foram montadas. Jeffreys e colaboradores, em 1985, utilizaram pela primeira vez "fingerprinting" de DNA para fins forenses. Neste novo período inventou-se as técnicas de PCR e de seqüenciamento automático de DNA, com o estabelecimento de diferentes projetos genoma, inclusive o humano. A técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR - "Polymerase Chain Reaction") proposta por Mullis & Faloona, (1987); Saiki *et al.*, (1988) causou uma verdadeira revolução na biologia molecular, na pesquisa direcionada ao entendimento de processos biológicos e na aplicação de diagnóstico e melhoramento genético de plantas e animais.

O avanço da tecnologia de DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA através da PCR - "Polymerase Chain Reaction" abriram caminho para uma mudança no paradigma genético básico, onde Mendel foi

pioneiro. A mudança foi denominada transição da genética Mendeliana para a genética genômica (Beckmann, 1990).

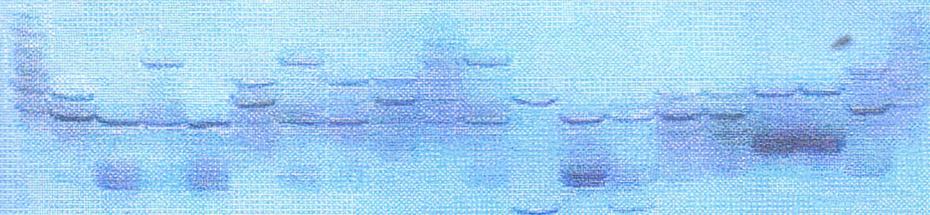
No Brasil, consolidou-se nas principais capitais o uso de técnicas de DNA para uso forense e diagnóstico molecular, realizou-se o primeiro projeto genoma, decifrando-se todo o genoma da *Xylella fastidiosa* e em 1999 entrou em operação a primeira indústria nacional produtora de uma proteína recombinante, a insulina humana (BIOBRÁS-Montes Claros/MG).

Em Manaus-AM, na UFAM e INPA, pesquisas com biologia molecular/engenharia genética iniciaram-se em 1995 e focalizaram o estabelecimento de procedimentos em diagnóstico molecular e de uso de marcadores moleculares no estudo de diversidade genética de populações nativas, visando a procedimentos de conservação, inclusive dando apoio ao estabelecimento de bancos de germoplasma. Recentemente, desenvolveu-se pesquisas para obtenção de novos sistemas de vetores X hospedeiros para uso em engenharia genética e completou-se, através de participação no Projeto Genoma Nacional, o seqüenciamento da *Chromobacterium violaceum*.

A biologia molecular tem contribuído com expressividade para o desenvolvimento de marcadores genéticos úteis no diagnóstico laboratorial e na avaliação da predisposição a inúmeras doenças. As diferenças nas seqüências do DNA têm se mostrado extremamente úteis à identificação de indivíduos por diferentes procedimentos "fingerprints".

Neste trabalho de dissertação, visando dar subsídio à implantação do teste de paternidade em humanos, localizou-se *loci* microssatélites no genoma humano, escolheu-se um *locus* polimórfico e estudou-se as freqüências de seus alelos na população de Manaus.

Revisão Bibliográfica



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Genes e Genoma

Os genes distribuem-se nos cromossomos de forma linear. Cada gene tem uma posição definida em um determinado cromossomo, cognominada de *locus*. As formas alternativas de um gene podem ocorrer em um determinado *locus* cromossômico e são designadas por alelos. Quando um indivíduo possui alelos idênticos para um dado *locus*, ele é homocigoto. Quando apresenta alelos diferentes em cada cromossomo homólogo, dizemos que ele é heterocigoto. Cada molécula de DNA contém vários genes – unidades físicas básicas e unidades com funções hereditárias.

Um gene estrutural é um segmento de DNA que contém o arquivo completo, com o código para a seqüência de aminoácidos para fabricar um polipeptídeo específico. Quando uma proteína é composta por mais de uma cadeia polipeptídica existe um arquivo para cada cadeia, portanto essa proteína é codificada por mais de um gene. O controle da expressão gênica é feito por outras seqüências de DNA. As seqüências promotoras e os genes reguladores, que ativam ou inibem os genes estruturais, informam o momento que devem se expressar e em que intensidade.

O genoma é o conjunto haplóide completo de cromossomos que contém toda a informação genética de um indivíduo. O genoma humano é organizado em 23 pares de cromossomos, contendo os genes estruturais, seqüências reguladoras da expressão gênica, além de seqüências de DNA repetitivo (Stracham, 1994; Bentley, 1996; Goffeau *et al.*, 1996; Jordan & Collins, 1996; Rowen, 1997).

As seqüências codificadoras podem ser únicas (em genomas haplóides) ou repetitivas, compondo o que se denomina famílias multigênicas. Entre as famílias

multigênicas, por exemplo, encontram-se as amilases e as globinas. A informação genética nas células humanas está organizada em dois tipos de genoma: o genoma nuclear e o genoma mitocondrial (Frarah, 1997) Figura 1.

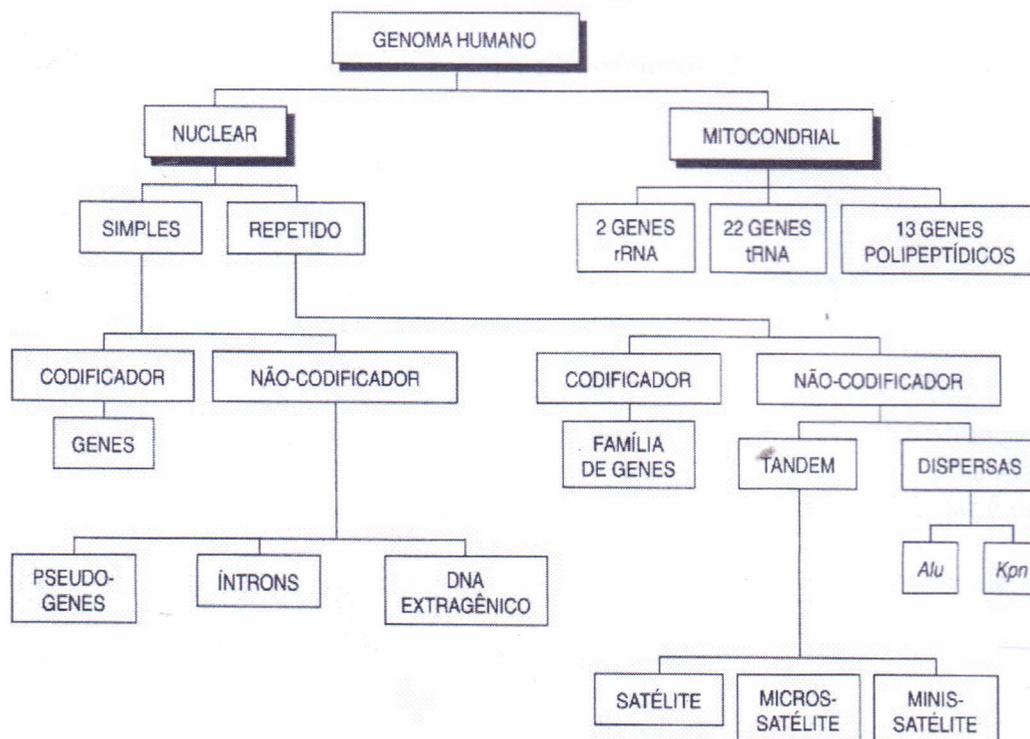


FIGURA 1: Genoma humano: nuclear e mitocondrial (Frarah, 1997).

O genoma nuclear de uma célula haplóide humana consiste de 3×10^9 pares de bases, incluindo cerca de 50.000 a 100.000 genes, distribuídos em 23 cromossomos (O'Brien & Seváneez, 1988; Morton, 1991). Somente 5 % do genoma humano é representado pelo DNA que codifica as proteínas que controlam todos os aspectos de embriogênese, desenvolvimento, crescimento, reprodução e metabolismo (Strachan, 1994) e o DNA restante encontra-se dentro de seqüências codificadoras, constituindo os introns (Bernardi, 1989; Rogers, 1992), ou como pseudogenes, genes que perdem a atividade ao longo da evolução, ou como DNA extragênico, que é composto por seqüências repetitivas

ou dispersas no genoma, tais como as seqüências “in tandem” de microsatélites e os minissatélites (Watson *et al.*, Hunt, 1996; Lewin, 1997).

Apesar da maioria dos genes humanos localizarem-se no núcleo da célula, cada mitocôndria pode apresentar até 10 cópias de um cromossomo circular, com cerca de 16.569 pb e 37 genes que codificam 2 RNA ribossômicos, 22 RNA transportadores e 13 polipeptídeos (Strachan, 1994; Frarah, 1997).

2.2 – Marcadores Moleculares para uso em análise de DNA.

O marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. Um marcador molecular é definido como marcador genético ao ser verificado que segue as leis básicas de herança de Mendel (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Com a evolução das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos procedimentos que permitiram desenvolver marcadores moleculares. Entre os procedimentos mais importantes estão:

- os que envolvem a utilização de enzimas de restrição associadas ao processo de hibridização, que permitem a detecção de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”), Grodzicker *et al.*, 1974) e

- os que envolvem amplificação de DNA “*in vitro*” pelo procedimento de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) - Mullis & Faloona, 1987, Saiki *et al.*, 1988.

2.2. 1 – Marcadores tipo RFLP

Esta técnica baseia-se na detecção de padrões individuais específicos de fragmentos de restrição de DNAs. O DNA do indivíduo é cortado com enzimas de restrição e os produtos separados através de eletroforese em gel de agarose. O DNA é então transferido por "Southern Blotting" para membrana de nylon ou nitrocelulose, imobilizado e os padrões de restrição de *locus* ou *loci* específico(s) são detectados por hibridação, com uma sonda de ácido nucléico (complementar ao *locus* em estudo) marcada radioativamente ou por outro método (Ferreira, 1995).

As sondas utilizadas na metodologia de RFLP são as sondas multilocais e as sondas unilocais. As primeiras sondas são mais informativas, pois permitem analisar várias regiões do genoma. As unilocais possuem sensibilidade maior. As sondas multilocais podem detectar conjuntos de minissatélites hipervariáveis para produzir "fingerprints" de DNA estáveis, que são completamente específicos para indivíduos e podem ser aplicados diretamente em problemas de identificação humana, incluindo teste de paternidade (Jeffreys et al., 1985).

Estes procedimentos, usando tanto sondas unilocais como multilocais, têm sido utilizados em laboratórios para o uso de análise de DNA da medicina legal e forense. O primeiro caso, envolvendo uma disputa imigratória na Grã-Bretanha em 1985, resolveu satisfatoriamente pela impressão digital de DNA (Jeffreys et al., 1985a). Em 1986, o primeiro caso de assassinato foi elucidado e levou a soltura do principal suspeito que foi considerado inocente pela análise do DNA (Gill & Werrett, 1987).

Com a rápida difusão da tipagem de DNA, nos últimos anos tem ocorrido grandes desenvolvimentos na tecnologia e na compreensão da genética de DNA hipervariável, que elucidaram as propriedades biológicas das regiões de DNA altamente

cística, doença de Tay-Sachs e outros, têm sido diagnosticadas por PCR (Decorte *et al.*, 1990).

Uma variante desta técnica, utilizando apenas um iniciador de 10 nucleotídeos e baixa temperatura de anelamento, foi desenvolvida e tem sido muito utilizada em análise de variabilidade genética e mapeamento, seu nome é RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Willians *et al.*, 1990).

Pela simplicidade da técnica de PCR, diferentes procedimentos derivados foram desenvolvidos. Atualmente destaca-se o uso de marcadores moleculares tipo microssatélites, que são marcadores que emergem por PCR de regiões simples repetidas “in tandem”. Esta técnica tem provado ser particularmente útil na medicina forense, porque o DNA pode ser amplificado a partir de quantidade muito pequena de material biológico (Pena, 1993).

2.2.3 – Marcadores híbridos PCR-RFLP

Diversos métodos que combinam as duas técnicas foram desenvolvidos. Os mais importantes são:

- RFLP - PCR, fragmento amplificado por PCR, mesmo RAPD monomórfico, pode ser digerido por enzima de restrição e analisado por eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida. É uma estratégia largamente usada em análise forense (Kasai *et al.*, 1990);
- AFLP – “Amplified Fragment Length Polymorphims”: Este método, denominado Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados, permite a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos nos genomas. Nesta técnica, os DNAs dos indivíduos a serem

analisados são digeridos com duas enzimas de restrição e adaptadores específicos, são ligados aos terminais dos fragmentos de DNA, gerados pela clivagem. Em seguida, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR, utilizando-se iniciadores especificamente desenhados, para reconhecer as seqüências dos adaptadores e então, os fragmentos amplificados são separados e analisados por eletroforese em gel de alta resolução (tipo seqüenciamento). A análise de AFLP tem sido usado sucessivamente em testes de paternidade e em causas criminais em todo mundo (Boerwinkle et al., 1989; Horn et al., 1989; Kasai et al., 1990).

2.3 – Seqüências repetitivas “in tandem”

Uma grande porcentagem dos genomas dos organismos eucariontes é composta de seqüências repetitivas. Várias classes de seqüências repetitivas de DNA têm sido descritas e caracterizadas em diferentes espécies vegetais e animais, apresentando diferenças tanto na composição das repetições como no número. Essas seqüências tornaram-se importantes instrumentos para análise genética, pois permitem a análise simultânea (ou não) de um grande número de *loci* polimórficos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As seqüências repetitivas “in tandem” podem ser principalmente de dois tipos: minissatélites e microssatélites.

O termo satélite refere-se à concentração dessas seqüências repetitivas em uma “banda satélite” distinta da “banda principal” de DNA genômico, quando o DNA total genômico de seres eucariontes é submetido à separação por ultra-centrifugação em gradiente de densidade de cloreto de cério (Lewin, 1990).

Os minissatélites ou VNTRs (Repetição em tandem de número variável) são os *loci* mais polimórficos descobertos no genoma humano e foram os primeiros a serem utilizados em análises forenses, por Jeffreys em 1985, utilizando a técnica de detecção de RFLP. Os minissatélites podem ter as unidades repetitivas de 9 a 100 pb, variando de duas a centenas de repetições em cada *locus*, existindo milhares de *loci* espalhados pelo genoma, sendo que nas regiões teloméricas ocorrem freqüentemente e em “*clusters*” (Tautz, 1984).

Alguns tipos de seqüências simples repetitivas (SSR – “Single Sequence Repeats”) “*in tandem*” foram detectadas na década de 70 por Birnboim & Straus, (1975). Hoje denominadas principalmente de microsatélites, essas seqüências simples repetitivas podem ter unidades repetitivas de 2 a 6 pb, variando de cinco até cerca de cem unidades em cada *locus*, existindo cerca de 10.000 a 100.000 loci por genoma, espalhados principalmente pelas regiões não codificadoras do genoma (Tautz, 1989).

Nos últimos anos, pela estabilidade da reação específica de PCR, os microsatélites têm sido utilizados cada vez mais para análise da variabilidade genética, mapeamento e análise forense.

A detecção de marcadores microsatélites, amplificados por PCR, é feita em eletroforese utilizando-se gel de acrilamida ou agarose de alta resolução, uma vez que é necessário um gel adequado para a separação de segmentos que diferem por poucos pares de bases, dependendo do número de nucleotídeos do elemento repetido no microsatélite.

As vantagens de marcadores microsatélites é a expressão co-dominante e o multialelismo. Esses marcadores possuem o mais elevado conteúdo de informações de polimorfismo e são geralmente distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto.

Os microssatélites foram observados em diversos organismos além de seres humanos (Litt & Luty, 1989). Os locos SSR são somaticamente estáveis, possuem expressão co-dominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados e são altamente multialélicos, numa população onde potencialmente todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados.

Os microssatélites ou STRs (Pequenas repetições em tandem) são loci AmpFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado), que possuem unidades repetidas de 2 – 5 pares de bases (Weber, 1989; Edwards et al., 1992). Isto é um crescimento interessante para o uso de tipagem de DNA usando STR. A vantagem é que eles são fáceis para amplificar alelos de tamanho relativamente pequenos e podem ser separados em alelos distintos usando gel de poliacrilamida (PAGE) ao sistema eletroforético horizontal, para resolver a AmpFLP e alelos STR e para análise é usado um método de coloração com prata, para detecção de produtos amplificados (Budowle et al., 1990, 1991).

Os principais blocos repetitivos encontrados são (GATA)_n, (GACA)_n, (CAC)_n e (GT)_n (Eppelen, 1988; Rogers, 1983; Weber *et al.*, 1989). No genoma eucariótico, a classe de microssatélite mais frequente são repetições do tipo (CA)_n e (GT)_n, designadas como repetições (CA)_n (Hamada & Kakunaga, 1982; Miesfeld *et al.*, 1981; Tautz & Renz, 1984). No genoma humano existem 50-100.000 blocos (CA)_n intercalados, com tamanhos de 15-30 kb, com um espaçamento uniforme de cada 30-60 Kb (Slightom *et al.*, 1980; Braaten *et al.*, 1988; Hamada *et al.*, 1982).

2.4 – Análise de polimorfismo genético

Na natureza, os organismos da mesma espécie usualmente diferem em alguns aspectos quanto a sua aparência. O polimorfismo genético é definido como a ocorrência em uma população de dois ou mais fenótipos alternativos, determinados geneticamente devido à ocorrência de diferentes alelos.

Definimos um *locus* genético como polimórfico quando possuir duas ou mais formas alélicas, onde a mais freqüente não esteja em freqüência acima de 95%. Quando as formas alélicas menos presentes estão abaixo de 5% denominam-se “variantes” alélicas.

O polimorfismo pode ser observado no indivíduo como um todo (fenótipo), através de : múltiplas formas moleculares da mesma enzima, chamada de isozimas ou isoenzimas; substâncias de grupos sanguíneos (polimorfismo bioquímico); características morfológicas dos cromossomos (polimorfismo cromossomal) e quanto às diferenças nas seqüências de nucleotídeos do DNA.

2.5 – Conceito de população

É um grupo de organismos co-específicos que ocupam uma região geográfica mais ou menos bem definida e exibem continuidade reprodutiva de geração a geração; geralmente, presume-se que interações ecológicas e reprodutivas são mais freqüentes entre esses indivíduos que entre eles e membros de outras populações da mesma espécie (Futuyama, 1992). Toda população possui um conjunto gênico (gene pool) ou (pool gênico) que lhe é particular. Esse conjunto pode ser conhecido através de suas freqüências alélicas e freqüências genotípicas (Mather, 1994).

2.6 – Freqüência gênica.

A freqüência gênica ou freqüência alélica é uma estimativa populacional, obtida através de metodologia apropriada e representada o número de vezes que um determinado alelo ocorre em uma população, sempre relativo ao total de alelos de um determinado loco gênico, nessa população.

De acordo com o Princípio do Equilíbrio, constante na Lei de Hardy-Weinberg, as freqüências genotípicas tendem a permanecer constantes de geração a geração, a não ser que alguns fatores específicos venha interferir este equilíbrio.

Objetivos



3 – OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento, a partir de seqüências genômicas humanas, de novos marcadores microssatélite para serem utilizados em análise genética em humanos.

3.2. Objetivos Específicos

1. Identificar seqüências de microssatélites no genoma humano.
2. Desenvolver o processo de amplificação dos microssatélites (PCR) e análise eletroforética.
3. Calcular as freqüências gênicas dos alelos microssatélites.

Materiais e Métodos



4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - **Estratégia:** a estratégia utilizada neste trabalho está mostrada na figura 2.

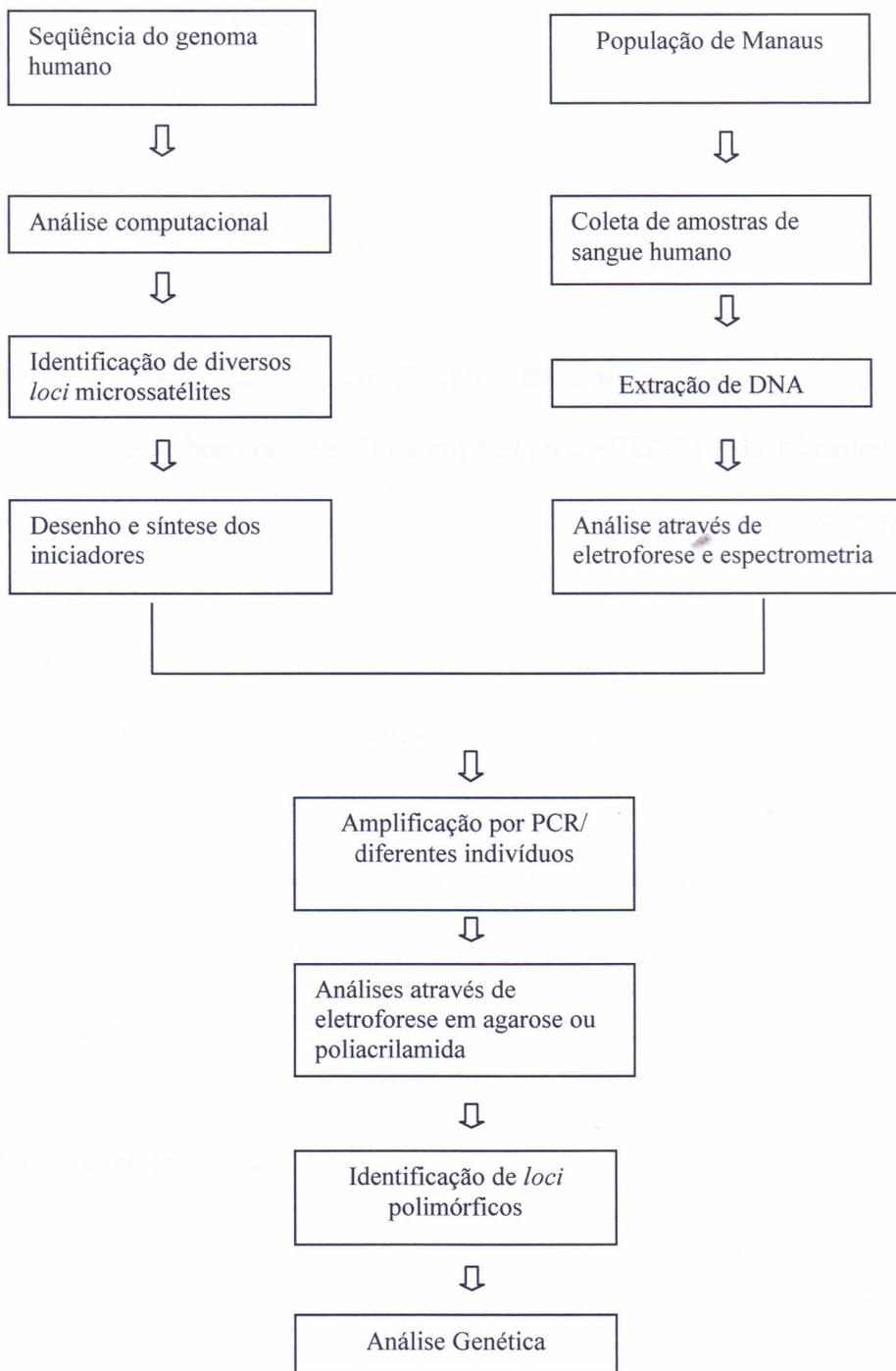


Figura 2: Esquema das principais etapas deste trabalho.

4.2 – Coleta do Material

Para este trabalho foi coletado material biológico (sangue) dos indivíduos participantes desta pesquisa. Elaborou-se um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 1) e um Questionário para obter informações de identificação pessoal (anexo 2), de acordo com a Resolução CNS 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde. Estes documentos e mais o projeto de pesquisa foram submetidos à apreciação dos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas-UFAM e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde, tendo sido aprovada sua execução (anexo 3). Os doadores foram selecionados pela pesquisadora principal, que após entregar uma cópia dos documentos anexos a cada doador voluntário participante deste estudo, os lia e se concordasse com os objetivos da pesquisa, o doador assinava o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e preenchia o questionário autorizando a coleta do sangue. Em seguida eram coletados 3 mL de sangue de cada doador voluntário, utilizando-se seringas e agulhas descartáveis, em tubos vacutainer de 3,5 mL com EDTA. Os tubos eram armazenados à 4 °C para posterior extração do DNA das células sanguíneas.

4.3 – Local da coleta

Foram coletadas 122 amostras de sangue humano de indivíduos de ambos os sexos (masculino e feminino), maiores de 18 anos de idade, naturais da Amazônia ou domiciliados no município de Manaus-AM. Essas amostras foram coletadas no período de 19 a 30.08.2002, em dois setores da Universidade Federal do Amazonas: Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Escola Getúlio Vargas, situado à rua Purinã nº 04 – Praça 14

de Janeiro e no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Centro de Apoio Multidisciplinar, situado à Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, nº 3000, Campus Universitário, Bloco “G”. Após a coleta do sangue, procedeu-se a extração do DNA de todas as amostras no Laboratório de Diagnóstico Molecular da UFAM.

4.4 – Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico humano utilizou-se o “Kit Wizard Genomic DNA Purification” da PROMEGA. Retirando-se 300 µL de sangue do estoque e adicionando-se em um microtubo estéril contendo 900 µL de Solução de Lise “Cell Lysis Solution”, homogeneizou-se a solução e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente (inverteu-se o tubo 2-3 vezes durante a incubação). Centrifugou-se a 13.000 g por 20 segundos. Em seguida retirou-se e descartou-se a maior quantidade possível do sobrenadante sem interferir no sedimento, agitou-se vigorosamente (vortex) até que as células brancas estivessem ressuspendidas. Adicionou-se 300 µL de Solução de Lise de Núcleos “Nuclei Lysis Solution” e ressuspendeu-se. Incubou-se a 37 °C até que os aglomerados estivessem dispersos. Em seguida adicionou-se 1,5 µL de Solução de RNase “RNase Solution”, homogeneizou-se a amostra para o lise do núcleo e incubou-se a 37 °C por 15 minutos.

Adicionou-se 100 µL de Solução de Precipitação de Proteínas “Protein Precipitation Solution”, agitou-se vigorosamente (vortex) por 10-20 segundos. Centrifugou-se a 13.000 g por 3 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para um microtubo limpo, contendo 300 µL de isopropanol à temperatura ambiente, homogeneizou-se suavemente por inversão até que fios brancos de

DNA formassem uma massa visível. Centrifugou-se à 13.000 g por 1 minuto à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 600 µL de etanol 70 % à temperatura ambiente, lavando-se o sedimento (DNA), invertendo suavemente o tubo por várias vezes. Em seguida, centrifugou-se novamente nas mesmas condições, descartou-se o sobrenadante e inverteu-se o tubo sobre papel absorvente limpo para tirar o sobrenadante remanescente e a amostra foi seca, por exposição ao ar estéril do fluxo laminar.

Após a evaporação do etanol, foram adicionados à amostra 100 µL de Solução de Reidratação de DNA, “DNA Rehydration Solution”, homogenizou-se e armazenou-se à 4 – 8 °C, para o uso posterior.

4.5 – Quantificação das Amostras do DNA

4.5.1 – Análise espectrofotométrica

As concentrações e pureza das amostras de DNA foram estimadas através de análise espectrofotométrica no comprimento de onda do ultra-violeta ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$). Considerou-se uma unidade de absorbância à 260 nm equivalente à 50 µg de DNA de fita dupla. A razão entre as leituras espectrofotométrica de 260 e a 280 nm foi considerada para fornecer uma estimativa da pureza do ácido nucleico.

4.5.2 – Análise eletroforética

Outra alternativa usada para estimar a concentração do DNA e sua integridade foi a análise através de eletroforese em géis de agarose a 0,8 %, corados com brometo de etídio a 0,5 µg/mL. Os géis foram fotografados sob luz UV (300 nm), no

sistema IMAGE-MASTER da Amersham-Pharmacia Biotech. Para estimativa da concentração das amostras utilizou-se padrões de concentrações conhecidas.

4.6 – Prospecção Computacional de *loci* microssatélites no Banco de Dados no Genoma Humano

As seqüências de microssatélites humanos foram identificadas diretamente no Gen Bank, www.ncbi.nlm.nih.gov/, utilizando-se o programa BLAST www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. As seqüências prospectadas deveriam conter repetições de 4 nucleotídeos: (AGAT, GATA, TCTG, CAGA, GGCT) em torno de 10 a 15 repetições “*in tandem*”. Após a localização do *locus* microssatélite, as bordas de suas seqüências eram analisadas com o intuito de desenhar pares de iniciadores, para amplificação da região repetitiva. Procurou-se para *loci* diferentes, desenhar iniciadores que amplificassem fragmentos nas faixas de 150-170-, 200-220 e 260-280 pares de nucleotídeos, objetivando no futuro o desenvolvimento de sistemas triplex, para análise dos referidos *loci* microssatélites.

Escolheu-se 15 *loci* microssatélites, localizados em diferentes cromossomos e para amplificá-los, foram sintetizados 15 pares de iniciadores com suas Tms em torno de 60-64 °C, conforme mostra a Tabela 1.

4.7– Amplificação das seqüências genômicas dos microssatélites através da técnica da PCR.

Das amostras de DNA dos doadores voluntários da população de Manaus-AM, 122 foram submetidas à amplificação através da técnica da PCR.

Um sistema típico de PCR continha:

- 10 μL de DNA (estoque = 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) + H_2O

- 15 μL de mix, composto de:

2,2 μL de H_2O

2,5 μL de tampão de PCR 10X (estoque)

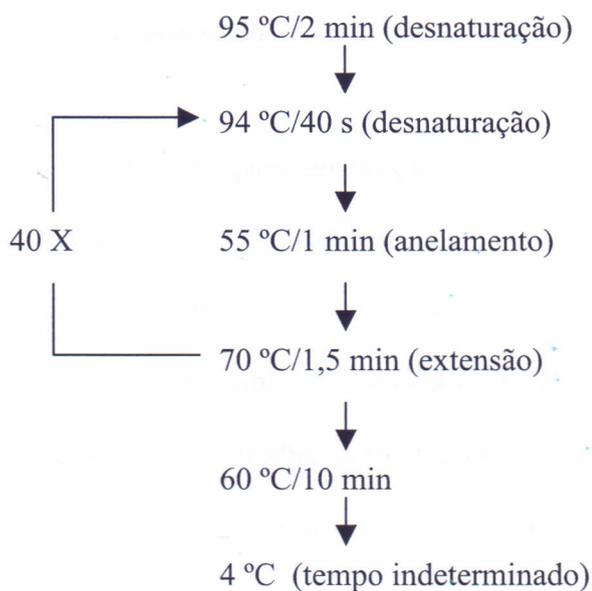
2,5 μL de MgCl_2 20 mM (estoque)

2,5 μL de dNTP 2,5 mM (estoque)

5,0 μL de iniciadores 1 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ (estoque)

0,3 μL de Taq polimerase 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (estoque)

A reação de PCR ocorreu no termociclador Mastercycles Gradient da Eppendorf, utilizando o seguinte programa:



Foram elaborados vários experimentos que visaram melhorar a eficiência da PCR até que fossem escolhidos os valores acima.

4.8 – Análise dos produtos da PCR

4.8.1 - Análise dos produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose

Após o término da PCR, o resultado do produto foi analisado para verificar a eficiência da amplificação, por meio de eletroforese em gel de agarose 2,5 %, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Utilizou-se como marcador de peso molecular o “ladder” de 100 pb da GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES. A eletroforese foi realizada em tampão TEB 1X, com voltagem de 100 Volts, e o DNA visualizado em transluminador de U.V. e fotografado no Sistema Image-Master VDS FTI-500 da Amersham Pharmacia Biotech.

4.8.2 – Análise dos produtos da PCR através de eletroforese em gel de poliacrilamida

4.8.2.1 – Preparação das placas

As placas de vidro de dimensões: 19,5 cm x 33,5 cm e 19,5 cm x 36 cm, foram lavadas com detergente neutro e enxaguadas com água destilada. Após a lavagem, a placa maior foi tratada com 1mL da solução “REPEL”, espalhando-se de forma homogênea, com auxílio de papel toalha. Após 5 minutos do tratamento, a placa foi lavada 3 vezes com água destilada, para retirar o excesso da solução. A placa menor foi tratada com 1 mL da solução “BIND”, esfregando-se rapidamente com papel toalha de forma homogênea; após 5 minutos foi lavada 3 vezes com etanol absoluto, secando-se bastante com papel toalha, para retirar o excesso da solução.

Procurou-se cuidadosamente, não deixar as placas próximas uma da outra durante a preparação. Após as placas estarem secas, foram montadas em forma de sanduíche, colocando os espaçadores (0,4 mm de espessura) nas bordas laterais. Em seguida, foram colocados prendedores para evitar vazamento no momento de verter o gel.

4.8.2.2 – Preparo do gel de poliacrilamida

Para preparar o gel de poliacrilamida, adicionar 60 mL de solução de gel de acrilamida – bis-acrilamida a 4% com 40 μ L de TEMED e 400 μ L de persulfato de amônio (APS) à 10 %. Após o preparo da solução de poliacrilamida, a mesma era vertida entre as placas lentamente, evitando a formação de bolhas. Em seguida era inserido o pente (tipo dente de tubarão), deixando-se o gel polimerizar aproximadamente 1 hora. Após a polimerização do gel, as placas foram montadas na cuba de eletroforese e processou-se a pré-corrida a 40 Watts, durante 30 minutos, para o pré-aquecimento das placas e estabilização do sistema em torno 40 à 50 °C.

4.8.2.3 – Preparo das amostras da PCR para eletroforese

As amostras resultantes da PCR foram preparadas utilizando 2,5 μ L da reação mais 2,5 μ L de tampão de carregamento contendo formamida. De maneira similar foi preparada a escada alélica e o marcador de tamanho dos fragmentos do “ladder” 100 pb da “Life Technologies”. A seguir desnaturou-se as amostras submetendo-as à temperatura de 95 °C por 2 minutos, em seguida foram colocadas imediatamente no gelo, para diminuir a velocidade de renaturação do DNA. Eram aplicados 3,5 μ L de cada preparação (amostra de PCR + tampão) nos pocinhos do gel. A corrida eletroforética

processou-se à 40 W (voltagem inicial 1700 V, corrente inicial 27 mA), durante uma hora e trinta minutos. Após o encerramento da corrida as placas foram separadas e a placa “BIND” a qual estava fixado o gel seguiu para o processo de coloração com nitrato de prata.

4.8.2.4 – Coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata.

Para a coloração do gel com nitrato de prata foram utilizadas duas técnicas de coloração: a primeira seguindo o protocolo proposto por Creste *et. a.*, (2001) e a segunda utilizando-se o kit da Pharmacia Biotech “DNA Silver Staining Kit”, que são descritas a seguir.

Na primeira metodologia, após a eletroforese, as placas foram cuidadosamente separadas e o gel aderido a placa menor foi fixado com 2 L de solução de fixação (etanol 10 % e ácido acético 1 %) e mantido sob lenta agitação durante 10 minutos. Após a fixação, o gel foi lavado sob lenta agitação com 2 L de água milli-Q durante 1 minuto e, em seguida, submetido à solução de oxidação (ácido nítrico 1,5 %) durante 3 minutos. O gel foi então lavado sob lenta agitação com 2 L de água milli-Q durante 1 minuto e imerso em 2 L de solução 0,2 % de AgNO_3 durante 20 minutos sob lenta agitação. Em seguida, foram realizadas duas lavagens de 30 segundos com água milli-Q sob lenta agitação e uma incubação em 1 L de solução de revelação (Na_2CO_3 3 % e formaldeído 0,02 %) sob agitação lenta e constante. Quando começaram a surgir as primeiras bandas no gel, o mesmo foi transferido para nova solução de revelação de igual volume e agitado constantemente. Após obter o padrão de revelação desejado, o gel foi imerso em 2 L de solução bloqueadora (ácido acético glacial 5 %) e mantido 5 minutos sob lenta agitação. Em seguida, o gel foi submetido a uma lavagem final pela imersão em 2 L

de água ultrapura sob agitação durante 1 min. Os géis foram mantidos à temperatura ambiente para secar e após totalmente secos, as imagens dos mesmos foram capturadas utilizando um "scanner".

Na segunda metodologia, utilizou-se um kit da Pharmacia Biotech "DNA Silver Staining kit". Após a eletroforese, as placas foram separadas e o gel aderido à placa menor foi imerso em 500 mL de solução de fixação (100 mL de solução de fixação 5X; 400 mL de etanol absoluto 24 %) e mantido sob lenta agitação durante 30 minutos. Após a fixação, o gel foi imerso em 500 mL de solução de impregnação (100 mL de solução de prata 5X e 400 mL de água milli-Q) e mantido sob agitação por 30 minutos. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada durante um minuto sob agitação. Após a lavagem o gel foi submetido à solução reveladora (100 mL de carbonato de sódio 5X; 500 µL de tiosulfato de sódio; 500 µL de formaldeído e 400 mL de água mili-Q) durante 6 minutos sob agitação. Em seguida o gel foi imerso em solução bloqueadora (100 mL de solução "Stop" 5X; 400 mL de água milli-Q). O gel foi submetido a uma lavagem rápida com água destilada para retirar o excesso da solução bloqueadora.

4.9 – Análise genética.

A análise estatística realizada através do programa Arlequin (Shneide, et. al., 2000), que é um programa utilizado nas análises genética de população. Analisou-se as frequências de heterozigotos observada e esperadas pelo Teste de Markov.

4.10 – Soluções

4.10.1 - Soluções estoque para reação da PCR

- Tampão 10X para PCR

Tris-HCl 200mM pH= 8,4

KCl 500mM

- Solução dNTPs

Mistura com 2,5mM cada

dATP 2,5mM

dGTP 2,5mM

dTTP 2,5mM

dCTP 2,5mM

- Taq. Polimerase

5U/ μ L (CENBIOT/UFRGS)

-Iniciadores

1 pmol/ μ L cada

- MgCl₂ 20 mM

4.10.2 – Soluções estoque para eletroforese

- Tampão TBE 10X (estoque)

Tris-base 108g

Ácido bórico 55g

EDTA (0,5M, pH 8,0) 40 mL

Água destilada-completar para 1000 mL

pH = 8,0 - 8,4

- Tampão de Amostra TBE 5X

TEB 10X 5 mL

Glicerol – 30 % 3 mL
Azul de bromofenol 5 mg
Água Milli-Q-completar volume para 10 mL

- Brometo de etídio 10mg/mL

Brometo de etídio 10 mg
Água Milli-Q - completar volume para 10 mL

4.10.3 – Soluções para gel de agarose 0,8 %

Agarose 0,8g
TEB 10X 10 mL
Água Destilada – completar para 100 mL

4.10.4 – Soluções para gel de poliacrilamida

- Acrilamida/bis-Acrilamida 40 % (solução estoque)

Acrilamida 380 g
Bis-acrilamida 20g
Água Milli-Q -completar para 1L

- Gel de poliacrilamida 4 %

Uréia 420 g
TBE 10X 50 mL
Acrilamida/bis-acrilamida 40 % 100 mL
Água Milli-Q-completar volume para 1 L

- TEMED

- Persulfato de Amônia (APS) 10 %

4.10.5 - Soluções para coloração em prata (Creste *et al.*, 2001).

- Solução de Fixação (Fix/Stop)

Etanol 10 % 100 mL
Ac. Acético (1 %) 10 mL
H₂O Milli-Q - completar para 1 L

- Solução de Oxidação

Ácido Nítrico (absoluto) 15 mL

H₂O Milli-Q 985 mL

- Solução de Impregnação-Nitrato de Prata 0,2 % “Staining Solution”:

Nitrato de Prata 2 g

H₂O Milli-Q 1000 mL

- Solução de Revelação – Carbonato de Sódio 3 % “Developer”

Carbonato de sódio 30 g

H₂O Milli-Q – completar para 1 L

OBS: Na hora do uso adicionar 540 µL de formaldeído 37 %.

- Solução de Bloqueio “Stop”

Ácido acético 5 % 50 mL

H₂O Milli-Q 950 mL

- Tampão de amostra para gel de poliacrilamida

Formamida 98 % 19,6 mL

EDTA 0,5M pH=8.0 400 µL

Azul de Bromofenol 5 mg

4.10.6 - Solução para preparo das Placas

- Solução adesiva “BIND”

Álcool absoluto 994 µL

Ácido Acético Glacial 5 µL

Metacriloxipropiltrimetoxisilane (estoque) 1 µL

- Solução repelente “REPEL”

Solução de silicone especial em heptano “Sigmacote”

4.10.7 - Marcador “Ladder” 100 pb 1µg/µL

Ladder 0,5µg/µL (estoque) 12µL

Água milli-Q 12µL

Resultados e Discussão



5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os marcadores moleculares são úteis em várias áreas da biologia. Vários pesquisadores confirmaram o poder destes marcadores que estão relacionados ao alto grau de polimorfismo e a heterozigosidade (Nakamura. et al., 1987; Chakraborty. et al., 1991)

As aplicações das técnicas de Biologia Molecular possibilitam determinar padrões de DNA característicos de cada indivíduo e seqüências nucleotídicas de DNA particularmente úteis no estudo de polimorfismo genético. Cada vez mais o polimorfismo de DNA tem sido estudado nas populações visando: construção de mapas genéticos de ligação, diagnóstico de doenças, identificação e caracterização de indivíduos.

Com o avanço das técnicas de análise de DNA e o seqüenciamento do genoma humano, bem como o desenvolvimento da bioinformática, foi possível desenvolver este trabalho.

Navegou-se no genoma humano com o programa de identificação de seqüências homólogas. Através do programa BLAST N identificou-se seqüências microsatélites e suas bordas, desenhou-se iniciadores para amplificar especificamente cada locus, extraiu-se DNA de 122 doadores da população de Manaus/AM, analisou-se os produtos da PCR por eletroforese, identificou-se os *loci* polimórficos, selecionou-se um par de iniciadores, otimizou-se as condições da PCR e amplificou-se o DNA de um *locus* de todos indivíduos da amostra, analisou-se por eletroforese em gel de poliacrilamida – uréia e determinou-se as freqüências de cada alelo e a heterozigosidade na população de Manaus.

5.1 – Análise das preparações de DNA por eletroforese.

Os DNAs extraídos dos 122 indivíduos voluntários residentes em Manaus/AM foram identificados numericamente, em algarismo arábico, analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %. O resultado está apresentado na **figura 3**.

Antes da confecção deste gel, diversos ciclos de diluições foram realizados e analisados eletroforéticamente para padronizar as concentrações das diferentes amostras. A análise eletroforética mostra que os DNAs das preparações estão íntegros comparando-se com os padrões de concentração conhecidos, pode-se estimar que as preparações estão na concentração entre 3 – 6 ng/ μ L.



FIGURA 3 : Análise eletroforética das preparações de DNA humano. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 0,8 %. Foram aplicados 5 μ L de cada amostra no gel. P – padrão de DNA de concentração conhecida (5 ng/ μ L), aplicou-se também 5 μ L no gel (25 ng).

5.2 - Busca de *loci* microssatélites e desenho de iniciadores.

A identificação de *loci* microssatélites no genoma humano foi feita utilizando-se o programa BLAST-N, que busca e compara seqüências com homologia. Tanto o Banco de Genes quanto o algoritmo de busca podem ser acessados através da página eletrônica da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> - Austchul at al., 1990 e 1997).

Utilizando o BLAST-N foram realizadas buscas, limitadas ao genoma humano, por *loci* que apresentassem no mínimo 7 ou 8 repetições das seqüências (AGAT, GATA, TCTG, CAGA e GGCT). Em um dos resultados de busca pela seqüência (GATA)₁₃ foram indicadas 4.806 possibilidades de coincidência, com expectativa de ocorrência de acaso quanto à similaridade muito pequena (5×10^{-7}) e identidade de 100 % entre as bases (Figura 4). Uma destas seqüências (destacada em amarelo) foi escolhida para a construção do par de iniciadores ISO5P que possibilitou a amplificação de fragmentos de DNA que incluiu um *locus* de microssatélites. Os iniciadores construídos para a amplificação deste e de outros 14 *loci* de microssatélites estão representados na Tabela 1.

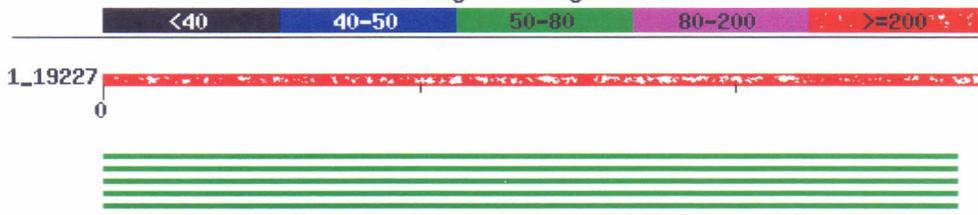
Para esse objetivo, foi utilizado o “software” PRIMER3 (http://www.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Para orientar o desenho dos iniciadores optou-se por três variações de tamanho, com o objetivo de se elaborar sistemas triplex que possibilitariam análises com maior número de *loci* por gel de eletroforese. Os tamanhos foram definidos com as seguintes variações: tamanho pequeno (P) em torno de 150-170 pb; o médio (M) em torno de 200-220 pb e o grande (G) em torno de 260-280 pb.

Distribution of 4811 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show defline and scores. Click to show alignments

Color Key for Alignment Scores



Sequences producing significant alignments:				Score	E	
				(bits)	Value	
gi	24270666	gb	AC034187.5	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24418048	gb	AC018495.5	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24110941	gb	AC087857.3	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24110939	gb	AC021999.5	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24270662	gb	AC087589.3	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24418047	gb	AC066580.4	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24418046	gb	AC090841.2	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24418045	gb	AC018808.5	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	23130734	gb	AC098597.2	Homo sapiens BAC clone RP11-521C...	<u>56</u>	6e-07
gi	24757118	gb	AC073446.16	Homo sapiens chromosome 15, clo...	<u>56</u>	6e-07
gi	24635989	gb	AC021573.10	Homo sapiens chromosome 11, clo...	<u>56</u>	6e-07
gi	7657426	ref	NM_014321.1	Homo sapiens origin recognition...	<u>56</u>	6e-07
gi	24580346	gb	AC010274.6	Homo sapiens chromosome 5 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24496793	gb	AC067817.10	Homo sapiens chromosome 8, clon...	<u>56</u>	6e-07
gi	23463017	gb	AC132153.2	Homo sapiens BAC clone RP11-111G...	<u>56</u>	6e-07
gi	24111074	gb	AC104620.5	Homo sapiens BAC clone RP11-2940...	<u>56</u>	6e-07
gi	24464501	gb	AF315312.2	Homo sapiens chromosome 8 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24462398	gb	AC012435.13	Homo sapiens chromosome 15, clo...	<u>56</u>	6e-07
gi	24462387	gb	AC104451.2	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24462312	gb	AC091975.3	Homo sapiens chromosome 5 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24462301	gb	AC104319.3	Homo sapiens chromosome 8 clone ...	<u>56</u>	6e-07
gi	24431902	gb	AC087276.13	Homo sapiens chromosome 11, clo...	<u>56</u>	6e-07
gi	24431663	gb	AC097015.2	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	<u>56</u>	6e-07

FIGURA 4 : Identificação de microssatélite GATA no genoma humano. Utilizou-se o programa BLAST N para pesquisar as seqüências do genoma humano disponibilizadas para consulta pública.

TABELA 1: Relação dos iniciadores “primers” desenhados e sintetizados

Iniciadores “Primers”	Seqüência Repetida	Seqüência dos “ primers”	Tm (° C)	Frag. pb	Cromossomo
IS01P	(GATA) ₁₄	5' CACTCCACAGAACCAGAACC 3'	65.25	160	3
		5' TGGAGACAGCAGTTCGTGGG 3'	64.49		
IS01M	(GATA) ₁₄	5' GTGAACATCTGCCCTGCATTAG 3'	68.69	220	3
		5' AATTACGCCACCAGCTTTGTTG 3'	65.64		
IS01G	(GATA) ₁₃	5' CAATTCAGAAACCCAAAATC 3'	66.38	280	15
		5' GGGTCTTGTTCTGCCTTCAGAC 3'	65.84		
IS02P	(TCTG) ₁₀	5' GCAGGGATTTGCCATAGGTG 3'	63.91	150	8
		5' CATTTGCAAAGAAACAGGAGAGAG 3'	64.77		
IS02M	(GGCT) ₁₁	5' ATGTCCTATCCAGCCCTTCACC 3'	64.85	200	5
		5' CTCCTTCGAACCTTCCTG 3' → <i>Zocalizada?</i>	63.40		
IS02G	(TCTG) ₁₀	5' TATTGCAGGGATTTGCCATAGG 3'	63.94	260	8
		5' TGGACACTTCTCCCCACAG 3'	68.01		
IS03P	(GATA) ₁₃	5' CTTGTTACAAAAATCAGTGTCTCCAC 3'	64.37	170	18
		5' CAGGTCTCCCAGTACACAGGAC 3'	64.16		
IS03M	(GATA) ₁₅	5' AGAAGGATGAATAGATAGGATAAAGGATG 3'	63.43	220	8
		5' ACCTAATATCCTCGCTTTCCTAAAG 3'	65.64		
IS03G	(AGAT) ₁₀	5' AGGAGTTCAAGACCAGACTGGATG 3'	62.79	260	11
		5' AAGATGTATTAATGAAAAAGTATGCACTG 3'	61.20		
IS04P	(GATA) ₁₃	5' GAGCCAATAGGAGATAGATTGGATG 3'	64.99	160	15
		5' GACGCAGGTTGGAATTTATAC 3'	66.77		
IS04M	(CAGA) ₁₁	5' CATTTGATGCCAAGACCTGTAC 3'	64.57	200	3
		5' TTTGGGCCCAGATGACTTTC 3'	64.45		
IS04G	(TCTG) ₁₁	5' TGCCATGATGGATCTTCTTACCC 3'	64.47	270	4
		5' CCTGTCAGCTGGTCCTTAGAAC 3'	63.86		
IS05P	(GATA) ₁₃	5' CTCTTGTTACAAAAATCAGTGTCTCC 3'	64.37	170	15
		5' CAGGTCTCCCAGTACACAGGAC 3'	64.16		
IS05M	(GATA) ₁₀	5' TTTGGGAGGCTGACGTAGGAG 3'	68.07	200	11
		5' GGCTGAGGATGGATGGAAAC 3'	66.57		
IS05G	(GATA) ₁₅	5' TAGATAGGATAAAGGATGGATGGACG 3'	66.80	270	8
		5' TGGACTCAATGCGACACTACAG 3'	64.32		

5.3 - Análise da capacidade dos iniciadores de amplificar *loci* polimórficos.

Numa primeira etapa, para verificar-se quais os pares de iniciadores amplificavam microssatélites polimórficos, cada par de “primer” foi utilizado para amplificação com DNA de três doadores (19, 31 e 39). O resultado está mostrado na **Figura 5**.

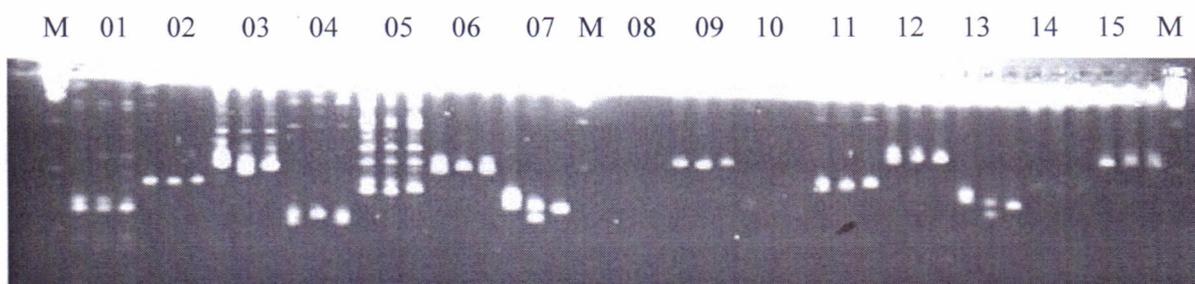


Figura 5: Análise de polimorfismos de diferentes *loci* microssatélites por eletroforese. Os produtos da PCR com 15 pares de iniciadores (**01**=ISO1P, **02**=ISO1M, **03**=ISO1G, **04**=ISO2P, **05**=ISO2M, **06**=ISO2G, **07**=ISO3P, **08**=ISO3M, **09**=ISO3G, **10**=ISO4P, **11**=ISO4M, **12**=ISO4G, **13**=ISO5P, **14**=ISO5M, **15**= ISO5G), foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5 %. Para cada par de iniciador, foi realizada PCR de 3 diferentes indivíduos (19, 31 e 39). Aplicou-se no gel 13 μ L de cada reação da PCR. M - marcador “ladder” 250pb.

Dos 15 pares de iniciadores analisados dois não amplificaram (**08**=ISO10 **14**=ISO5M). Dos 13 iniciadores que amplificaram 8 apresentaram microssatélites com polimorfismo (**03**=ISO1G; **04**=ISO2P; **05**=ISO2M; **06**=ISO2G; **07**=ISO3P; **09**=ISO3G; **10**=ISO4P; **12**=ISO4G; **13**=ISO5P). Dos iniciadores que amplificaram *loci* polimórficos selecionou-se o par ISO5P (F 5' CTCTTGTTACAAAATCAGTGTTCTCC 3' e R 5' CAGGTCTCCCAGTACACAGGAC 3'), para análise genética do *locus* microssatélite na população de Manaus-AM, por apresentar bandas alélicas bem definidas mesmo em gel de agarose.

A região amplificada pelo par de iniciadores ISO5P está localizada no braço pequeno do cromossomo 15, entre as bandas 15p11+2 e 15p11+1 (**Figura 6**) e foi encontrada no clone genômico de número RPN11757E13. A seqüência de bases aminadas deste clone foi registrada no Banco de Genes disponibilizado na página Internet da NCBI (National Center for Biotechnology Information) sob o código 24757118|gb|AC073446.16, os detalhes da seqüência e da localização dos iniciadores ISO5P estão apresentados na **Figura 7**.

A seqüência codificadora da proteína identificada pelo número de acesso gi:27483019 é a única registrada até o momento para o mesmo clone (**Figura 8**). A proteína codificada por esta seqüência faria parte de uma família de auto-antígenos presentes no sistema de Golgi, as golginas. Estes resultados podem ser verificados por consulta ao Banco de Genes mas ainda não foram publicados independentemente. A representação do clone RPN11757E13 em azul, na **Figura 8**, indica que seu sequenciamento está terminado e a escala numérica na mesma figura indica o número de pares de bases seqüenciado nesta região do cromossomo 15.

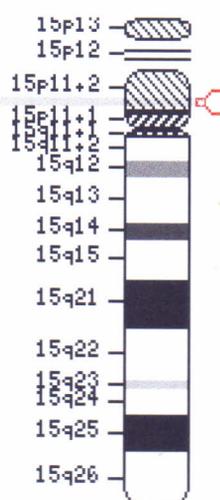
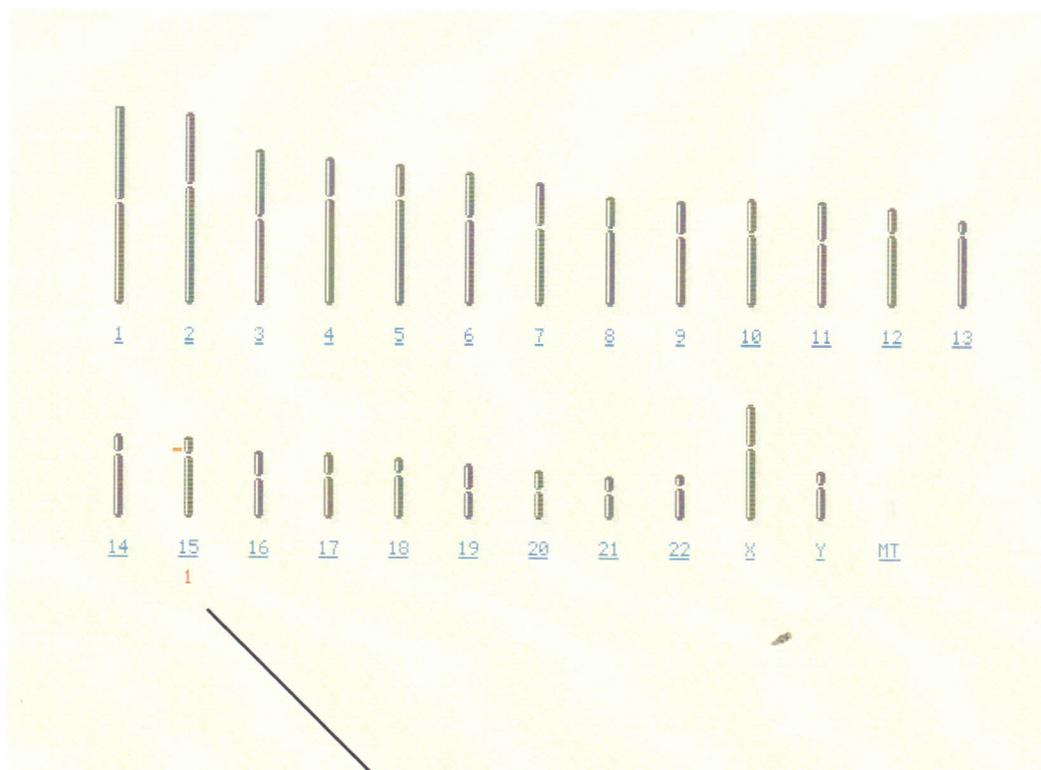


FIGURA 6: Localização da sequência microssatélite escolhida no cromossomo 15. A região amplificada pelo par de iniciadores ISO5P está localizada no braço pequeno do cromossomo de número 15 (traço em vermelho).

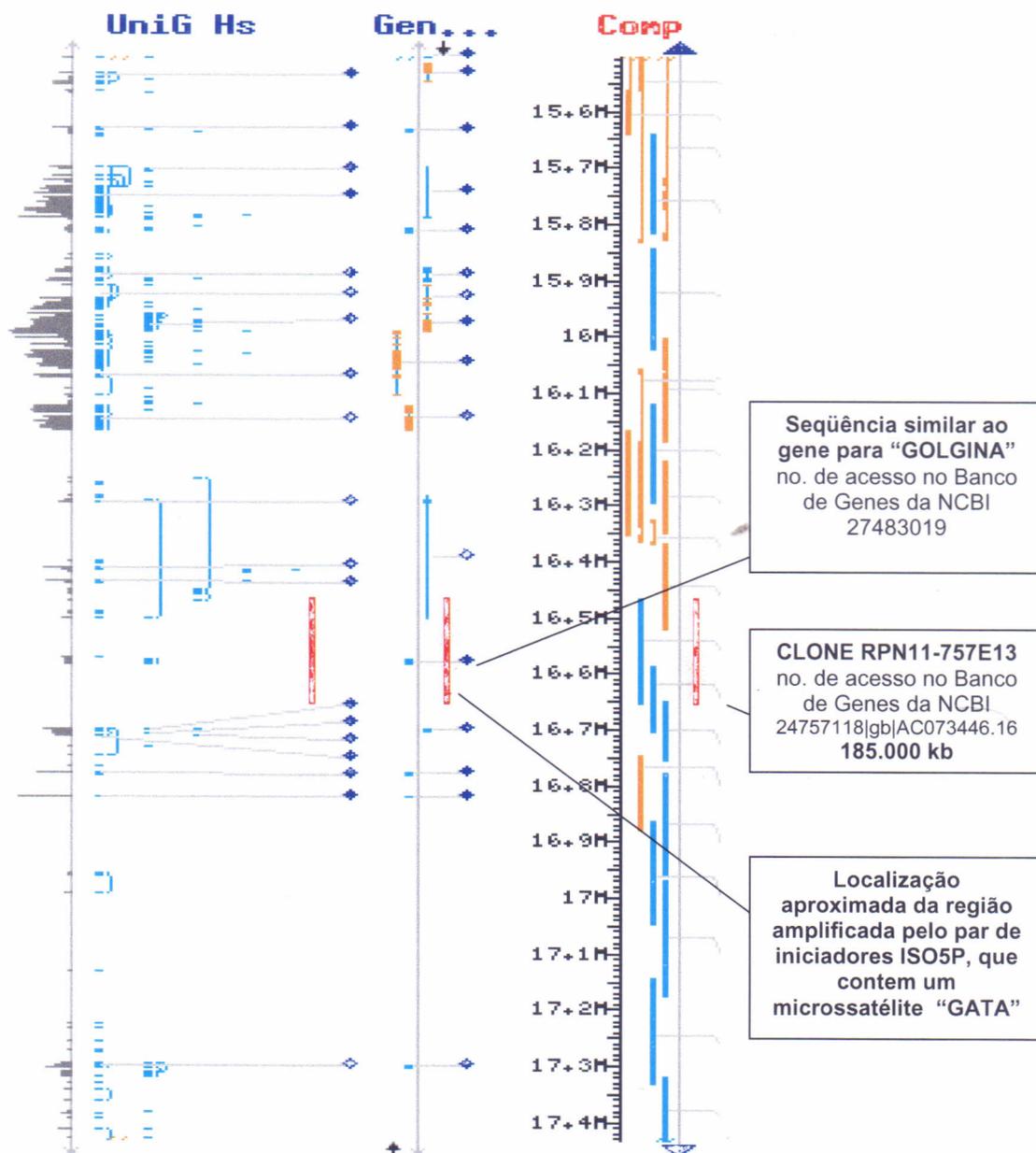


FIGURA 8: Localização em detalhes do microsatélite eleito IS05P parte do cromossomo humano 15. Com indicações da localização da região do *locus* de microsatélite “GATA” amplificável pelo par de iniciadores ISO5P e da ORF mais próxima, que codifica uma proteína similar a um auto-antígeno do Golgi, que faz parte da família das golginas.

5.4 - Padronização das reações da PCR.

Para otimizar as reação de PCR, fez-se necessário o ajuste das concentrações dos seguintes componentes: $MgCl_2$, DNA, iniciadores ISO5P, e Taq Polimerase.

5.4.1 – Escolha da melhor concentração de $MgCl_2$.

O resultado da análise da concentração de $MgCl_2$ na reação de PCR, por meio da eletroforese está mostrada na Figura 9. As melhores concentrações verificadas foram 1,8 mM – 2,1 mM, por isso optou-se pela concentração do $MgCl_2$ 2,0 mM. Nessa concentração seria possível amplificar-se com eficiência apenas o produto esperado da PCR, sem bandas inespecíficas como pode-se verificar em concentrações maiores como 2,4 e 3,0 mM.

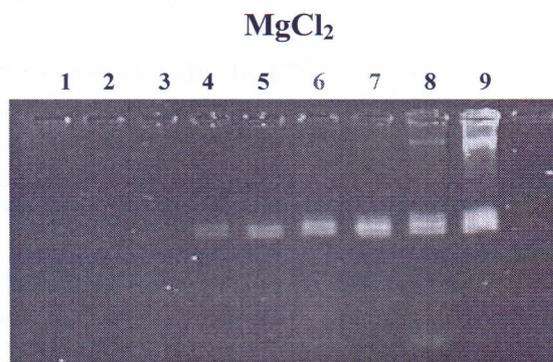


FIGURA 9: Análise da melhor concentração de $MgCl_2$. Os produtos de PCR gerados pelo par de iniciadores ISO5P (13 μ L cada) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5%. As concentrações de $MgCl_2$ nos sistemas de amplificação foram: 1- 0 mM; 2- 0,6 mM; 3- 0,9 mM; 4- 1,2 mM; 5- 1,5 mM; 6- 1,8 mM; 7- 2,1 mM; 8- 2,4 mM; 9- 3,0 mM.

5.4.2 – Escolha da melhor concentração de DNA.

O resultado das reações de PCR utilizando diferentes concentrações de DNA, este apresentado na Figura 10.



FIGURA 10: Análise da concentração do DNA . Os produtos de PCR (13 μ L cada) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5 %. As concentrações do DNA (doador 19) nos sistemas de amplificação foram: 1- 0 ng/ μ L; 2- 0,2 ng/ μ L; 3- 0,4 ng/ μ L; 4- 0,6 ng/ μ L; 5- 0,8 ng/ μ L; 6- 1,0 ng/ μ L; 7- 1,2 ng/ μ L; 8- 1,6 ng/ μ L; 9- 20 ng/ μ L.

Escolheu-se a concentração de 1,0 ng/ μ L para as reações subseqüentes pois nessa condição ocorreu uma amplificação eficiente do fragmento alvo com ocorrência de amplificação inespecíficas relativamente “background” baixa.

5.4.3 – Escolha da melhor concentração dos iniciadores.

O resultado da análise da variação na concentração dos iniciadores na reação de PCR, por meio de eletroforese em gel de agarose está mostrado na Figura 11.



Figura 11: Análise do efeito da concentração do par de iniciadores ISO5P nas reações de PCR. Os produtos da PCR (13 μL cada) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5%. As concentrações dos iniciadores ISO5P nos sistemas de amplificação foram: 1=0 pmoles/ μL ; 2=0,04 pmoles/ μL ; 3=0,08 pmoles/ μL ; 4=0,12 pmoles/ μL ; 5=0,16 pmoles/ μL ; 6=0,20 pmoles/ μL ; 7- 0,24 pmoles/ μL ; 8=0,32 pmoles/ μL ; 9=0,40 pmoles/ μL .

Escolheu-se a concentração dos iniciadores de 0,20 pmoles/ μL por ser uma concentração ainda pequena que produziu amplificação muito eficiente.

5.4.4 – Escolha da melhor concentração da Taq polimerase.

O resultado da análise da utilização de diferentes concentrações da enzima taq polimerase na reação de PCR, por meio de eletroforese, está mostrado na Figura 12.

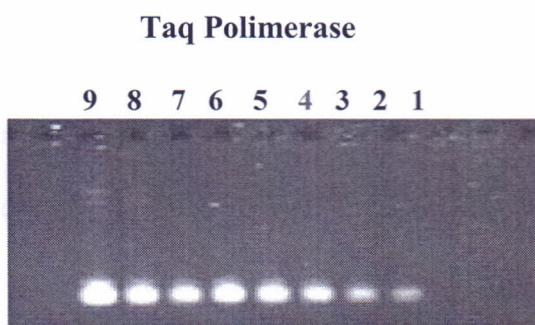


Figura 12: Análise da concentração da Taq Polimerase na reação da PCR. Os produtos da PCR (13 μL cada) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5 %. As concentrações da Taq Polimerase nos sistemas de amplificação foram: 1=0 $\text{U}/\mu\text{L}$; 2=0,02 $\text{U}/\mu\text{L}$; 3=0,04 $\text{U}/\mu\text{L}$; 4=0,06 $\text{U}/\mu\text{L}$; 5=0,08 $\text{U}/\mu\text{L}$; 6=0,10 $\text{U}/\mu\text{L}$; 7=0,12 $\text{U}/\mu\text{L}$; 8=0,16 $\text{U}/\mu\text{L}$; 9=0,20 $\text{U}/\mu\text{L}$.

Por razão de economia escolheu-se a concentração de 0,06 $\text{U}/\mu\text{L}$ por resultar em uma banda de fluorescência considerável. Poder-se-ia aumentar essa concentração em até 0,12 – 0,16 $\text{U}/\mu\text{L}$ e obter-se a banda específica com baixo nível de amplificação inespecíficas.

Em conjunto esses resultados resultaram na escolha das seguintes concentrações: MgCl₂ – 2,0 mM; DNA – 1ng/μL (25 ng por sistema de 25μL); iniciadores – 0,20 pmoles/μL e Taq polimerase – 0,06 U/μL. Esses valores são da mesma ordem de grandeza dos descritos para inúmeras reações de PCR (Sambrook, 1989).

5.5 - Amplificação do locus microssatélite escolhido das amostras de DNA humano.

Para proceder-se a análise do *locus* microssatélite escolhido (iniciadores ISO5P) submeteu-se o DNA de 122 doadores à reação da PCR nas condições eleitas. Os produtos da PCR foram primeiramente analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5 %. O resultado foi a geração de produtos de amplificação para todas amostras Figura 13.

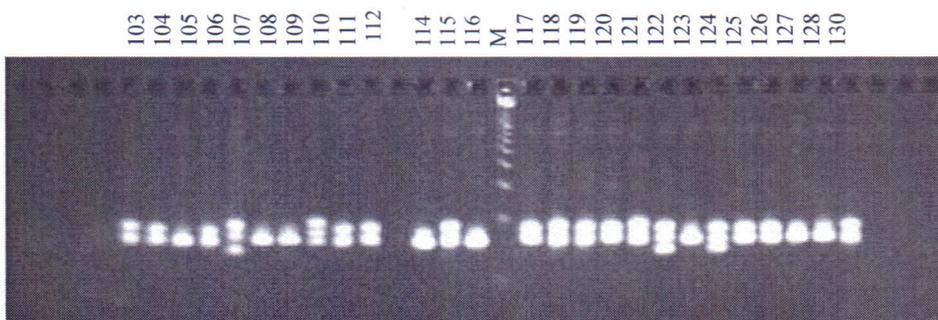
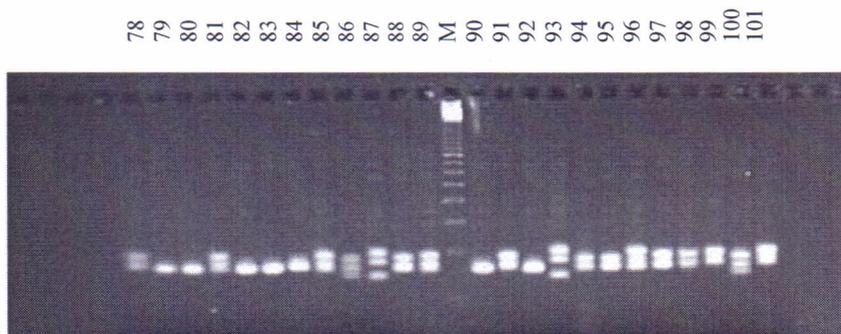
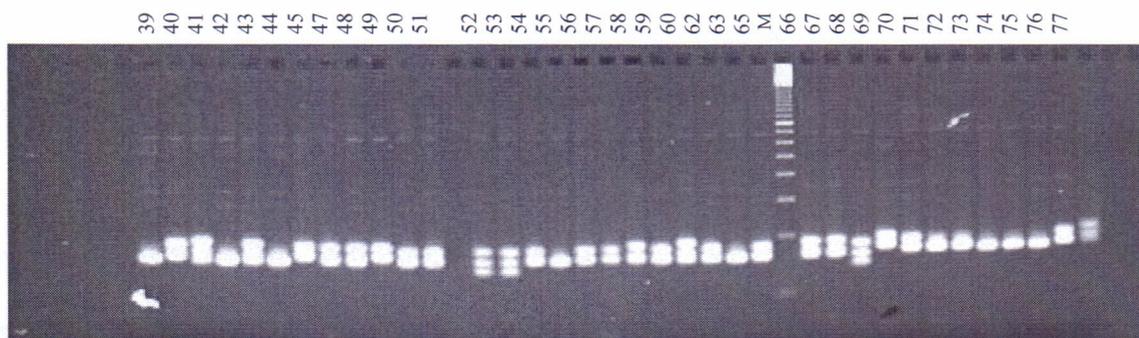
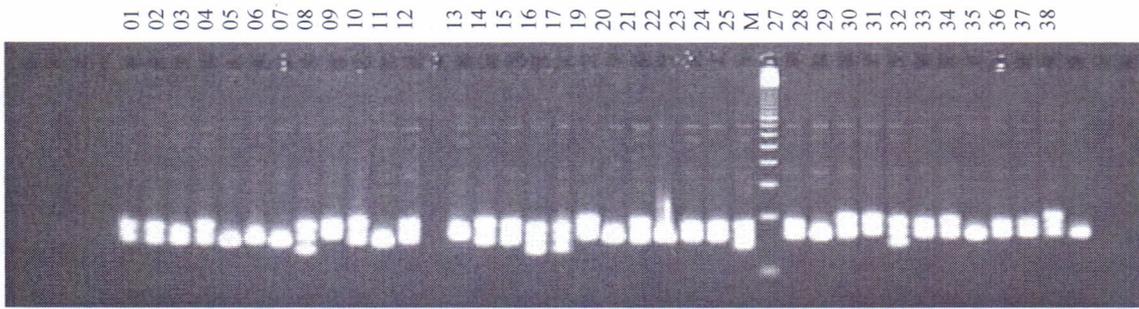


FIGURA 13 : Análise eletroforética dos produtos da PCR. Resultado da amplificação dos iniciadores IS05P por PCR de 122 amostras de DNA humano. A análise processou-se por meio de eletroforese em gel de agarose 2,5 % . As amostras de DNA estão indicadas numericamente e o marcador “ladder” 100 pb pela letra M.

Para melhor separação dos alelos microssatélites os produtos da PCR gerados para 122 doadores voluntários foram analisados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 4 % e coloração com prata. Os resultados estão mostrados nas Figuras 14 e 15.

Identificou-se nesta amostra de população a existência de sete alelos diferentes, cujos tamanhos foram estimados utilizando-se como padrão o marcador múltiplo de 100 pares de bases “*ladder* 100 bp”, da Life Technologies.

Os alelos foram denominados: **a, b, c, d, e, f e g** com os tamanhos respectivamente de: 184, 180, 176, 172, 168, 164 e 148 pb. Curiosamente possíveis alelos de 160, 156 e 152 pb não estavam representados na amostra da população analisada.

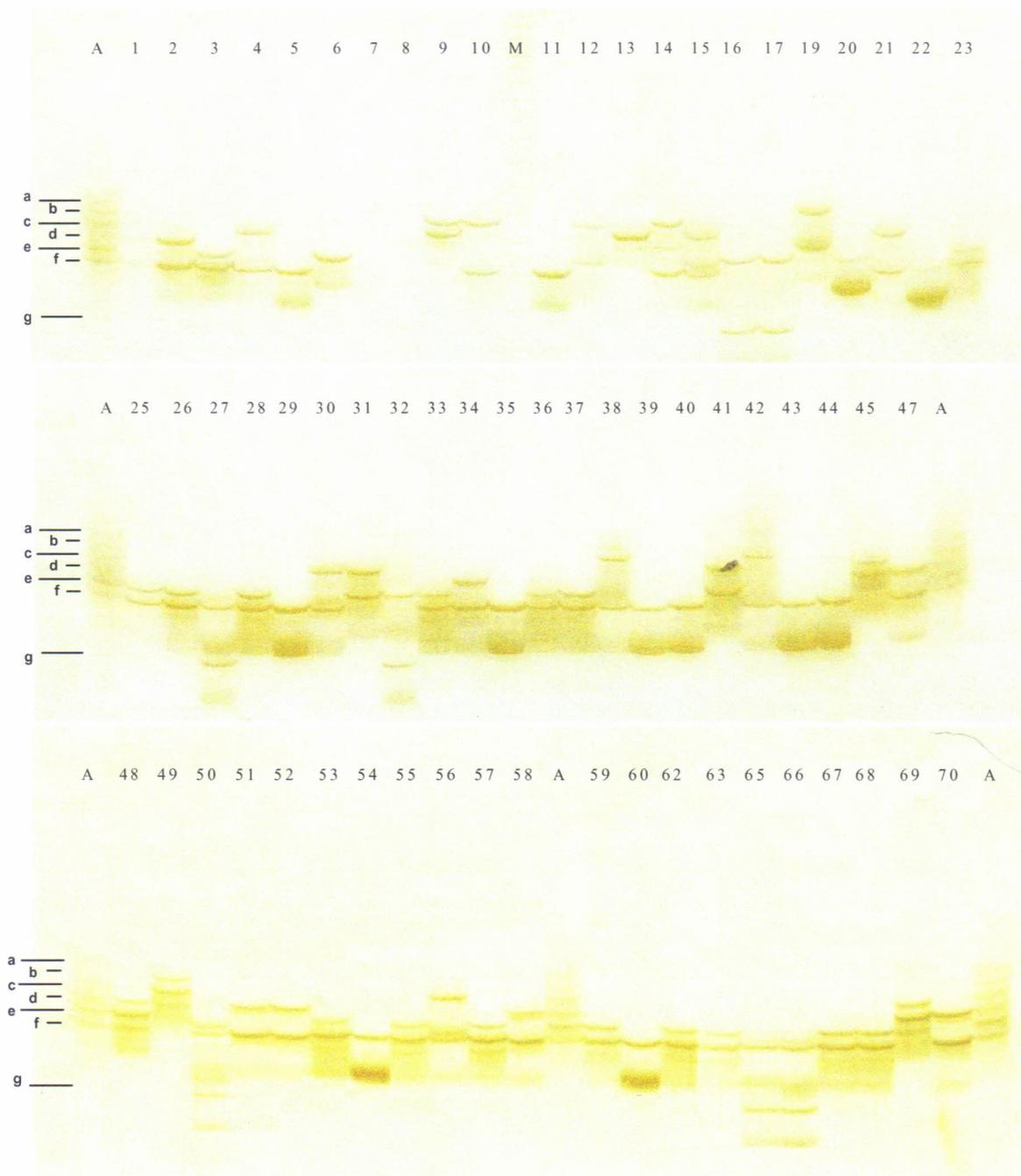


FIGURA 14: Análise eletroforética dos microssátélites. Perfis eletroforéticos dos produtos da amplificação de DNA dos indivíduos utilizando o par de iniciadores ISO5P. Os fragmentos amplificados foram separados em géis desnaturantes de poliacrilamida a 4 %, corados com prata. Os números acima das figuras identificam os indivíduos. (M): *ladder* 100 pb. (A): escada alélica, construída a partir da amplificação do DNA de indivíduos portadores de alelos com peso molecular diferente (a=184, b=180, c=176, d=172, e=168, f=164, g=148).

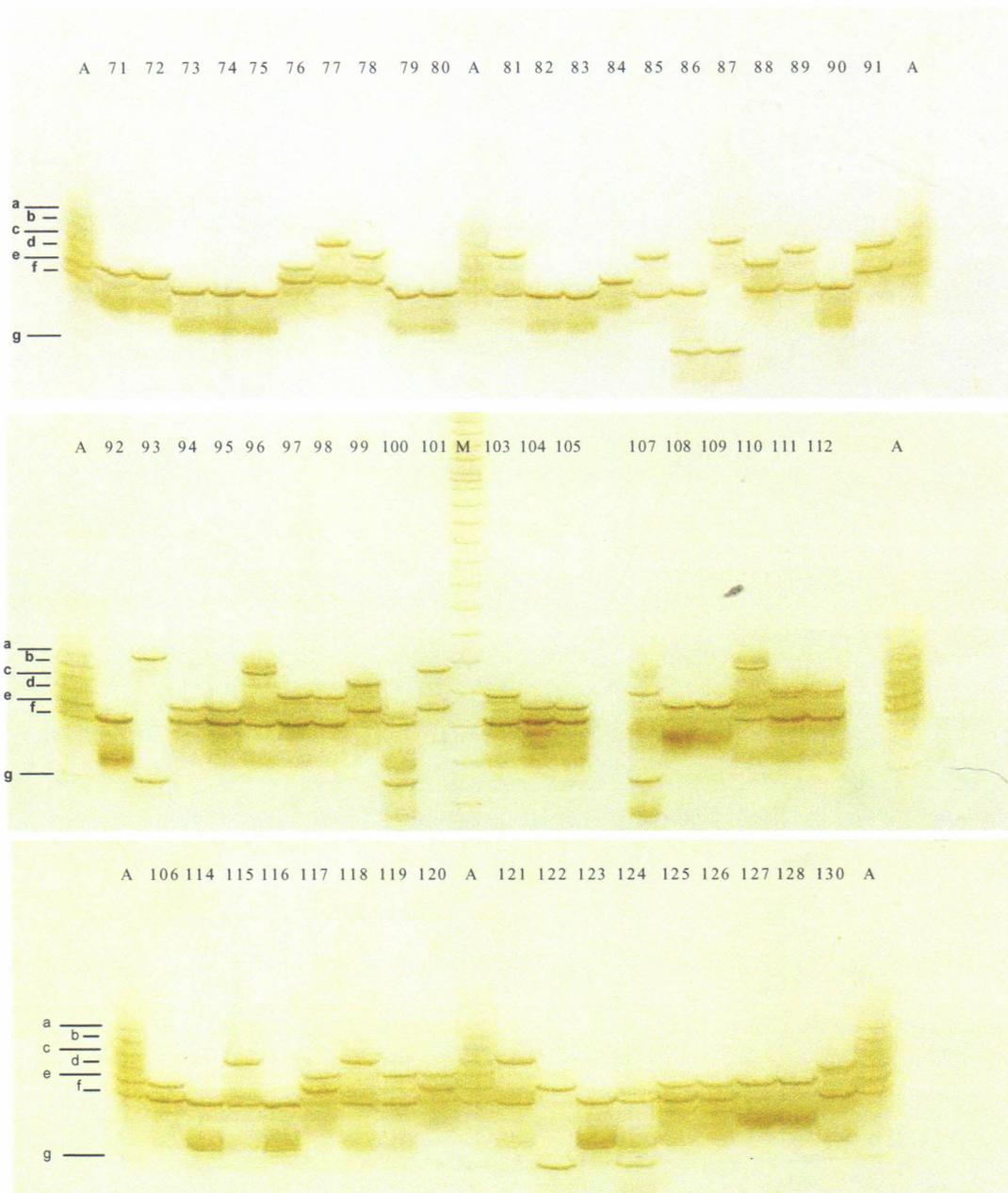


FIGURA 15 : Análise eletroforética dos microssatélites. Perfis eletroforéticos dos produtos da amplificação de DNA dos indivíduos utilizando o par de iniciadores ISO5P. Os fragmentos amplificados foram separados em géis desnaturantes de poliacrilamida a 4 %, corados com prata. Os números acima das figuras identificam os indivíduos. (M): *ladder* 100 pb. (A): escada alélica, construída a partir da amplificação do DNA de indivíduos portadores de alelos com peso molecular diferente (a=184, b=180, c=176, d=172, e=168, f=164, g=148)

5.6 – Análise genética.

Procedeu-se a análise estatística dos resultados obtidos pela amplificação do DNA dos 122 doadores voluntários da população de Manaus/AM, utilizando o programa Arlequin (Shneider, et al., 2000). As frequências, nesta amostra, dos alelos gerados nas reações de PCR utilizando o par de iniciadores ISO5P estão representadas na Tabela 2 e no Gráfico 1. As frequências genotípicas para a mesma amostra estão representadas na Tabela 3 e no Gráfico 2.

Tabela 2: Análise do resultado obtido para os 122 doadores voluntários da população de Manaus.

Alelos	Tamanho do fragmento amplificado	No. de vezes que o alelo foi observado	Frequência observada para o alelo	Número provável de repetições do “núcleo” do microssatélite
a	184	1	0,00410	16
b	180	10	0,04098	15
c	176	23	0,09426	14
d	172	26	0,10656	13
e	168	58	0,23770	12
f	164	111	0,45492	11
-	160	0	0,00000	10
-	156	0	0,00000	9
-	152	0	0,00000	8
g	148	15	0,06148	7
TOTAL		244	1,00000	

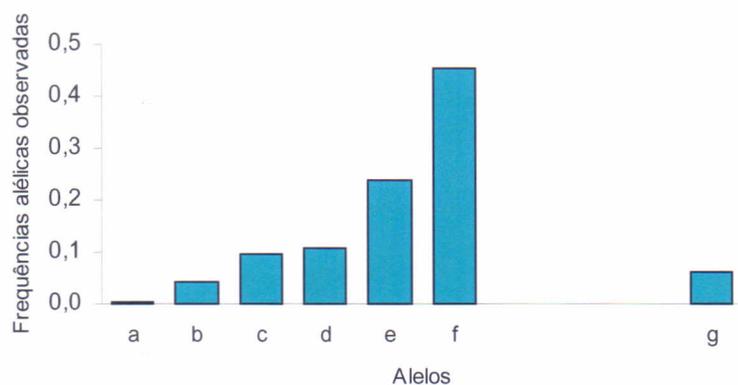


FIGURA 16: Representação gráfica das frequências alélicas observadas na amostra de população de Manaus em reações de PCR realizadas utilizando o par de iniciadores ISO5P

Tabela 3: Frequências genotípicas observadas pela amplificação do DNA dos 122 doadores.

<i>Genótipo</i>	<i>Nº de vezes que o genótipo foi observado</i>	<i>Frequência observada para o genótipo</i>
ag	1	0,00820
bc	1	0,00820
bd	1	0,00820
be	3	0,02459
bf	4	0,03279
bg	1	0,00820
cc	1	0,00820
cd	3	0,02459
ce	5	0,04098
cf	13	0,10656
de	5	0,04098
df	16	0,13115
dg	3	0,02459
ee	9	0,07377
ef	23	0,18852
eg	4	0,03279
ff	24	0,19672
TOTAL	122	1,00000

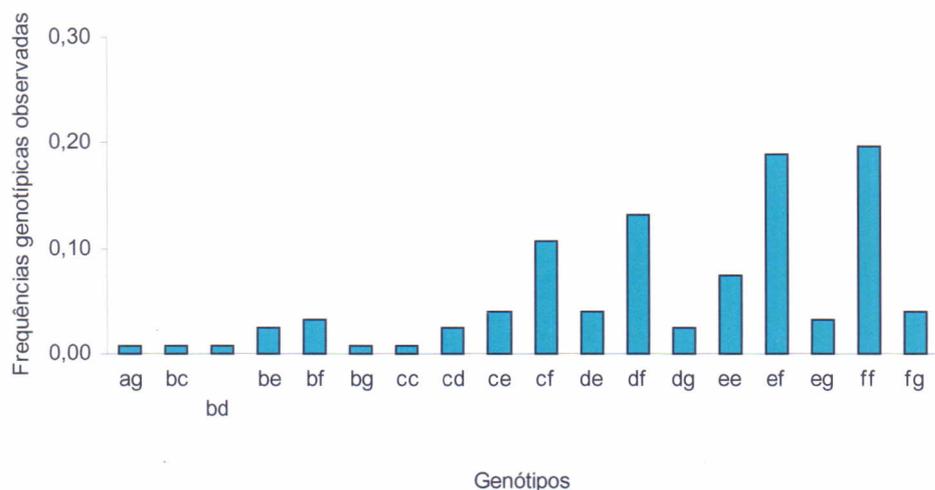


FIGURA 17: Representação gráfica das frequências genotípicas observadas. Representação gráfica das frequências genotípicas observadas em uma amostra de população de Manaus/AM em reações de PCR realizadas utilizando o par de iniciadores ISO5P para amplificar um *locus* de microssatélite no cromossomo 15.

A análise estatística dos resultados obtidos para 122 indivíduos da cidade de Manaus, utilizando o Teste de Markov, indicou que a frequência esperada de genótipos heterozigotos seria 0,71193. A frequência observada de heterozigotos foi 0,72131 e ocorreu um desvio padrão do equilíbrio de 0,00127 (Tabela 4).

Não se observou diferenças entre a frequência de heterozigotos observados e a esperada ($P < 0,05$), indicado que a população amostrada está em equilíbrio para o loco gênico de microssatélite amostrado, segundo o Princípio de Hardy-Weinberg (Tabela 4).

Tabela 4: Análise estatística dos resultados obtidos para 122 doadores voluntários da população de Manaus.

Locus	No. de genótipos analisado	Frequência observada de heterozigotos	Frequência esperada de heterozigotos	Valor de "P"	Desvio padrão
1	122	0,72131	0,71193	0,66928	0,00127

A heteroziguidade observada pela análise dos resultados da amplificação do DNA de amostras, com cerca de 200 indivíduos hispano-americanos, utilizando 12 pares de iniciadores para *loci* microssatélites, comercializados por uma empresa de biotecnologia norte americana, a PROMEGA, é semelhante à que foi observada com a utilização do par de iniciadores ISO5P para amplificar o DNA de doadores voluntários residentes em Manaus (Tabela 5, Gráfico 3).

Freqüências de heterozigotos próximas a 70 % também foram verificadas para um locus denominado D14S299 (*wg1c5*) quando experimentos foram realizados com populações caucasianas (0,812), populações de chineses (0,743) e japoneses (0,726). Apesar da similaridade dos valores verificados, neste caso, para todas estas amostras da população humana, as pequenas diferenças encontradas, neste caso, foram estatisticamente significantes entre estes três grupos populacionais (Yoshimoto et al., 1999).

TABELA 5 : Valor de heteroziguidade de *locus* microssatélites de diferentes populações (PROMEGA GenePrint STR, 7/99)

INICIADORES	POP. CAUCASIANA*	POP. HISPANO-AMERICANA*	POP. DE MANAUS/AM
F13A01	0,76339	0,7973	
F13B	0,75122	0,63134	
FESFPS	0,69953	0,67619	
LPL	0,76961	0,68571	
HPRTB	0,73832	0,70093	
CSF1PO	0,78139	0,69725	
TH01	0,76526	0,75455	
TP0X	0,64651	0,67273	
vWA	0,8216	0,75472	
D16S539	0,72857	0,78261	
D7S820	0,79524	0,81643	
D13S317	0,70952	0,77778	
ISO5P			0,72131
MÉDIA	0,74751	0,72896	

* dados fornecidos pela PROMEGA

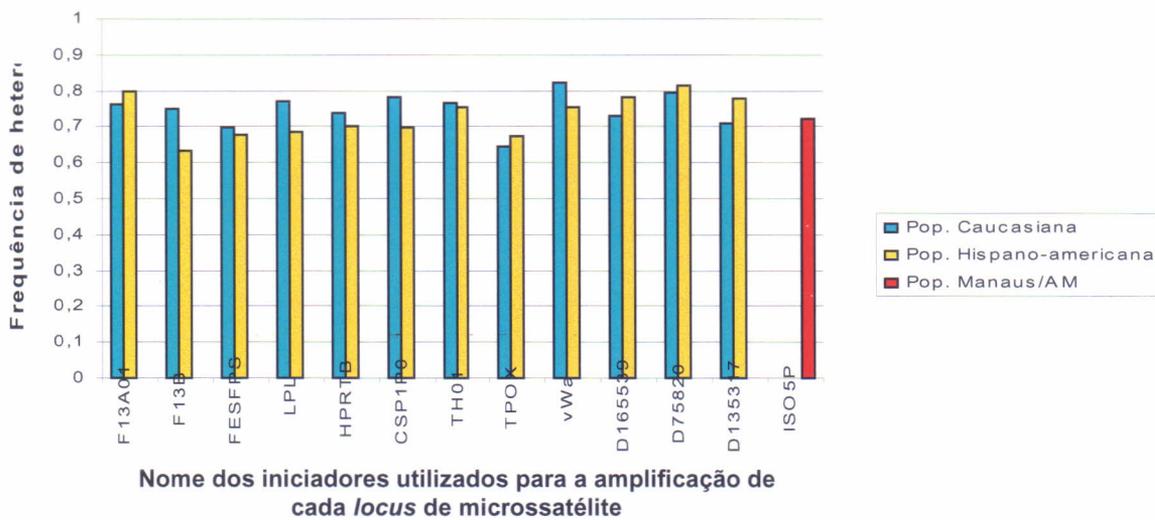
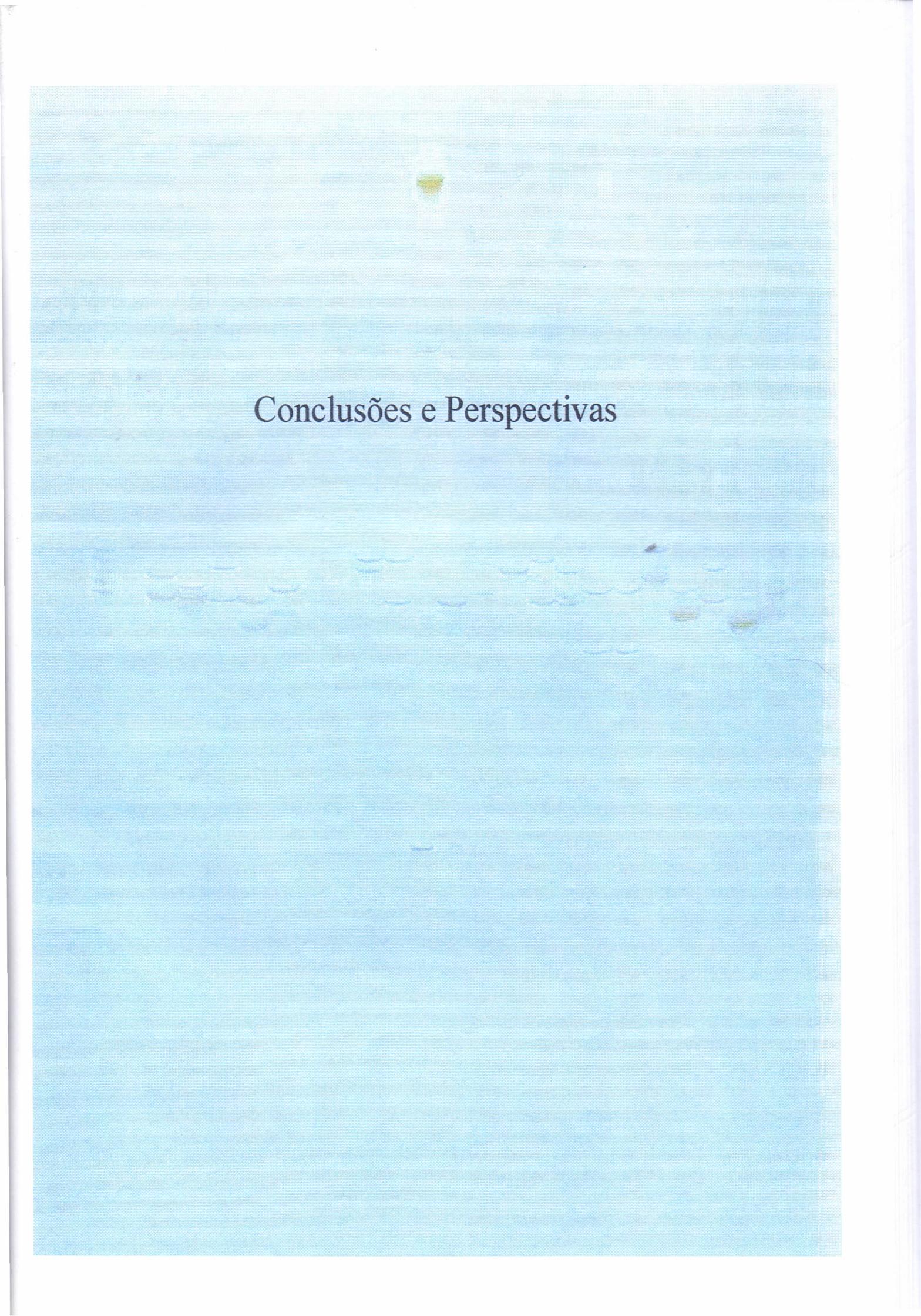


FIGURA 18: Representação gráfica da heterozigosidade observada para *loci* de microssatélite em amostras de populações (Caucasiana, Hispano-americana e de Manaus/AM)

O trabalho apresentado nesta dissertação representa o primeiro estudo de microssatélites humanos no Estado do Amazonas. O número e frequência dos alelos bem como a heterozigosidade, indica que esse *locus* pode ser de utilidade para análise genética, especialmente na área forense e em determinação de paternidade.



Conclusões e Perspectivas

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 - Conclusões

- “Navegar” no Genoma Humano com o programa BLAST N foi um procedimento eficiente para identificar seqüências microssatélites.
- Dos 15 *loci* microssatélites analisados 8 mostraram-se polimórficos.
- O *locus* microssatélite IS05P, estudado apresentou 7 alelos diferentes com heterozigosidade de 0,72131.
- Em relação a esse *locus* a população de Manaus mostrou estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

6.2 - Perspectivas

Serão estudados em detalhes os outros *loci* polimórficos.

Os *loci* microssatélites polimórficos serão utilizados para análise de paternidade e forense na população de Manaus.

Referências Bibliográficas

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKMANN, J.S. & SOLLER, M. 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology*. **8**: 930-932.
- BRENDEL, V; BUCHER, P.; NOURBAKHSI, I.; BLAISDELL, B.E.; KARLIN, S. 1992. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:2002-6.
- BOERWINKLE E.; XIONG W.; FOUREST E.; CHAN L. 1989. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* **86**: 212-216.
- BUDOWLE B; ALLEN R. C. 1990. Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis of DNA fragments. In: Mathew C (ed) *Methods in Molecular Biology-Molecular Biology in Medicine*. Vol. 7. Humana. London.
- BUDOWLE B; CHAKRABORTY R; GIUSTI A. M.; EISENBERG A. J.; ALLEN R. C. 1991. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J. Hum. Genet.* **48**: 137-144.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p.299-306, 2001.
- DECORTE, R.; CUPPENS, H.; MAYNEM, P.; CASSIMAN, J. J. 1990. Rapid Detection of Hypervariable Regions by the Polymerase Chain Reaction Technique. *DNA and cell Biology*. **9 (6)**: 461-469.

- DIETRICH, W.; KATZ, H.; LINCON, S.E.; SHIN, H; FRILDMAN, J; DRACOCOPLI, N & LANDER, E.S. (1992). A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. Rockefeller University, N.Y. Genetics. **131**:423:447.
- EHLM T. & DUBEARE, L. 1989. Detection of ras point mutations by polymerase chain reaction using mutation specific inosine containing oligonucleotide primers. Biochem Biophys. Res. Commun. **160**:441-7.
- FERREIRA, M.A.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores RAPD e PFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 3ª Ed.
- FRARAH, S.B. (1997). DNA segredos e mistérios. São Paulo. SARVIER.
- FUTUYAMA, D. J. 1992. Biologia Evolutiva. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. 2ª Ed. 1997.
- GILL P. W. 1987. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. Forensic Science International. **35**: 145-148.
- GRODZICKER, T. et al., 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutation of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39:439-446.
- HAMADA, H.; PETRINO, M.G. & KAKUNAGA, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **79** ;6465-6469.
- HORN G. T.; RICHARDS B.; KLINGER K. W. 1989. Amplification of highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction: Nuc. Acido Re. **17**: 2140.
- JEFFREYS, A.J.(1987). Highly variable minisatellites and DNA fingerprintings. Biochemical Society Transactions London, **15**: 309-307.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V. & THEIN, S.L. 1985a. Hypervariable "minisatellite regions in human DNA. Nature London **314**:67-73.

- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V. & THEIN, S.L. 1985b. Individual - specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*, **316**:76-79.
- LEWIN, B. 1990. *Genes IV*. Oxford University Press, Oxford.
- LITT, M. & LUTY, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **44**:398-401.
- LIVNENH, O.; VARDI, E.; STRAN, Y.; EDELBAUM, O & SELA, I. 1992. The conversion of a RFLP in a hybrid pepper cultivar. *Euphytica*. **62**:97-102.
- KASAI K.; NAKAMURA Y.; WHITE R. 1990. Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *J. Forensic Sci.* **35**: 1196-1200.
- MATHER, W. B. 1994. *Princípios de Genética Quantitativa*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto – SP.
- MIESFELD, R.; KRYSTAL, M. & ARNHEIM, N. (1981). A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human delta and beta globin genes. *Nuc. Acid. Res.* **9**:5931-5947.
- MORENO. R.F.; KERLAVAGE, A.R.; MCCOMBRE, W.R & VENTER, J.C. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project *Science*. **252**:1651-1656.
- MULLIS, K. & FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.
- PEARSON, W. R. 1997). Identifying distantly related protein sequences. **Comput. Appl. Biosc.** **31**:325-32.
- PENA, S.D.J. Determinação de paternidade absoluta pelo estudo direto do DNA. *Femina*, **17**: 358-362.

- PENA, S.D.J., SANTOS, P.C.; CAMPOS, M.C.N.; MACEDO, A.M. (1993). Paternity testing in brazil by DNA fringerprinting with multilocus probe F10. *Ciência e Cultura*, **45**: 236-240.
- RICHARD, W.H; ROBERT, A.W.; MICHAEL, B. & HERBERT, F.P. Parentage testing Accreditation Requirements Manual. American Association of Blood Banks. Bethesda, MD. 1998.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D.N.; STOEFFEL, S.J.; SHCARF, S.J.; HIGUCHI, G.; HORN, G.T.; MILLIS, K.B. & ERLICH, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**:487-491.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a nd., edition CSHL, Cold Spring Harbor, NY.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. & excoffier, L. 2000. Arlequin Version 2000. A software for population genetic data analysis. Universidade de Geneve, Suíça.
- SCHULER, et al., 1996. A Gene Map of the human genome. *Science*. **274**: 540-546.
- SLIGHTOM, J.L.; BLENCH, A.E.; & SMITHIES, O. (1980). Human fetal G-and A-globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes cell. **21**:627-638.
- SOUTHERN. 1975. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel eletrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- TAUTZ, D. & RENZ, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. *Nucleic. Acids Res.* **12**: 4127-4138.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acid. Res.* **17**:6463-6471.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L.A. & TINGEY, S.V.

1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.* **18**:6531-6535.

WILSON, A. C. & SARICH, V. M. 1969. A molecular time scale for human evolution.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **63**:1088-1093. [17]

YUNIS, J. Y.; SAWYER, J. R. & DUNHAM, K. 1980. The striking resemblance of high

– resolution G-banded chromosomes of man and chimpanzee. *Science* **208**:1145-1148.

[17]

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, convênio UFSCar/UFAM

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Investigador: ISABEL DA MOTA PONTES

Instituição: Universidade do Amazonas/Universidade Federal de São Carlos

Telefone: (92) 644-1295

Título: *“Desenvolvimento de Novos Marcadores Microsatélites para Análise Genética em Humanos”.*

Patrocinador e Executor: Universidade do Amazonas/Universidade Federal de São Carlos.

Colaboração: Fundação Hospital Getúlio Vargas e Centro de Apoio Multidisciplinar/UA

Descrição e objetivo do estudo:

Desenvolver a partir do DNA humano da população de Manaus um Banco de Dados Genéticos (de frequências gênicas) capazes de possibilitar a execução em Manaus do teste de paternidade e outras análises criminalísticas (forense) contribuindo para o bem estar e segurança da população.

Riscos associados ao estudo:

Se referem apenas à retirada de 3 mL de sangue, o maior desconforto será no momento em que a pele for perfurada por uma agulha. Será utilizado material descartável e estéril na coleta da referida amostra de sangue. Todos os procedimentos de que participarei serão realizados em apenas uma ocasião, não haverá necessidade de hospitalização.

Benefícios:

Participando neste estudo, eu não obterei qualquer benefício pessoal adicional, mas estarei contribuindo para o desenvolvimento da pesquisa em genética na nossa região e possibilitando análise de paternidade e criminalística o que contribuirá para o bem estar e segurança da população.

Serei ressarcido por eventuais despesas decorrentes da participação na pesquisa, bem como poderei ser indenizado diante de eventuais danos decorrentes do estudo.

Confidencialidade e avaliação dos registros:

Minha participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão mostrados apenas a representantes da UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS e UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, bem como a autoridades normativas nacionais e internacionais.

Direito à retirada do estudo:

Eu tenho o direito de fazer qualquer pergunta referente aos riscos potenciais ou conhecidos para mim, durante minha participação neste estudo. A qualquer momento poderei solicitar o encerramento de minha participação nos estudos.

Eu serei consultado com antecedência caso outros estudos venham ser realizados com a amostra coletada serei capaz de contactar com **Isabel da Mota Ponte**, cujo o endereço é Av. Gen. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000 – Mini-Campus, Bloco “G”, Laboratório de Tecnologia de DNA; Tele/Fax : (92) 644-1295.

Participação voluntária:

A minha participação neste estudo é voluntária. Se eu recusar a participação neste estudo, não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios a que eu tenha direito.

Eu tenho direito de manter uma cópia assinada deste documento.

Consentimento pós-informação:

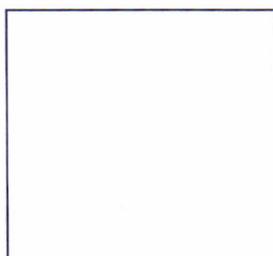
Após ter recebido informações claras sobre o conteúdo deste termo, livremente, expresse meu consentimento, eu concordo com minha participação, como sujeito, no estudo.

ASSINATURA - Doador

DATA ____/____/____

ASSINATURA – Pesquisador Responsável

DATA ____/____/____





UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, convênio UFSCar/UFAM

QUESTIONÁRIO DO PROJETO:

“DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA ANÁLISE GENÉTICA EM HUMANOS”

I – IDENTIFICAÇÃO DO DOADOR

Nº do Processo: _____

1. Nome _____ 2. Sexo () F () M
3. Data nasc. ____/____/____ 4. Idade _____
5. Naturalidade _____ 6. Etnia _____
7. Endereço _____
8. Município _____ 9. Estado _____
10. Tempo em que vive neste local _____ 11. Procedência _____
12. Transfusão de sangue: () sim () não 13. Data ____/____/____
14. Pai: _____ 15. Naturalidade: _____
16. Etnia: _____ 17. Estado: _____
18. Mãe: _____ 19. Naturalidade: _____
20. Etnia: _____ 21. Estado: _____

III – OBSERVAÇÕES:

Data da entrevista: ____/____/____

Assinatura do(a) Entrevistador(a)



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER 1089/2002

Registro CONEP = 3991 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP - 001/2002

Processo nº 25000. 042981/2002-63

Projeto de Pesquisa: "Desenvolvimento de novos marcadores microsatélites para análise genética em humanos".

Pesquisador Responsável: Isabel da Mota Pontes (mestranda)
Dr. Spartaco Astolfi Filho (orientador)

Instituição: Universidade do Amazonas / AM

Área Temática Especial: Genética Humana

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 678/2002, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) o projeto preenche os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado.

Brasília, 22 de julho de 2002


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS