

LUCIELLEN D'AVILA GIACOMEL KOBACHUK

**ESTUDO DE FREQUENCIAS ALÉLICAS DE DEZ LOCOS STRs DO  
CROMOSSOMO X NA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ E SUA  
CONTRIBUIÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA.**

CURITIBA  
2012

LUCIELLEN D'AVILA GIACOMEL KOBACHUK

**ESTUDO DE FREQUENCIAS ALÉLICAS DE DEZ LOCOS STRs DO  
CROMOSSOMO X NA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ E SUA  
CONTRIBUIÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA.**

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria da Graça Bicalho.

Co-Orientador: Perito Criminal Dr. Marcelo Malaghini.

CURITIBA  
2012

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Kobachuk, Luciellen d'Ávila Giacomel

Estudo de frequências alélicas de dez locos STRs do cromossomo X na população do estado do Paraná e sua contribuição na identificação humana. / Luciellen d'Ávila Giacomel Kobachuk. – Curitiba, 2012. 87 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria da Graça Bicalho

Co-orientador: Marcelo Malaghini

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

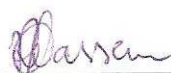
1. Genética da população humana 2. Cromossomo X I. Título II. Bicalho, Maria da Graça III. Malaghini, Marcelo IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20 ed ) 573.21

## PARECER

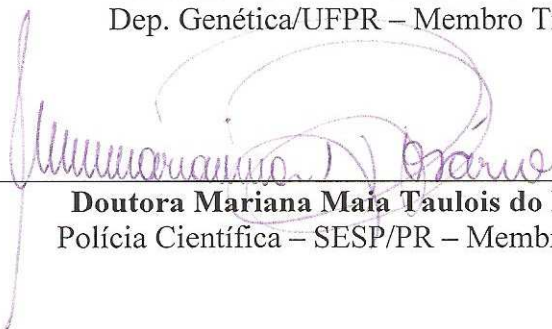
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **LUCIELLEN D'ÁVILA GIACOMEL KOBACHUK**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".  
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 31 de janeiro de 2012



---

**Professora Doutora Roseli Wassem**  
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular



---

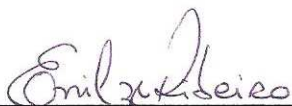
**Doutora Mariana Maia Taulois do Rosário**  
Polícia Científica – SESP/PR – Membro Titular



---

**Professora Doutora Maria da Graça Bicalho**  
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto



---

**Professora Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro**  
Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética



## **DEDICATÓRIA**

Ao meu pai Severino Giacomel e a minha mãe Walkyria de Jesus d'Avila Giacomel por estarem sempre presentes apoiando e incentivando meus sonhos, por me amarem de modo incondicional, dedicando tempo e esforços para instruir-me nos caminhos corretos e serem responsáveis pela pessoa que sou hoje.

Ao meu irmão Leonard d'Avila Giacomel pelo seu sorriso e tranquilidade que me inspiraram e animaram a seguir em frente diante das dificuldades, por seu carinho e amizade que nos fizeram viver momentos muito felizes juntos.

Ao meu marido Leandro Kobachuk por seu amor e compreensão diante de momentos em que me fiz ausente, por ter sonhado os meus sonhos e me animado a não desistir deles.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda sabedoria e amor, que me deu força e inspiração para a realização deste trabalho.

Ao co-orientador e perito criminal Dr. Marcelo Malaghini por ser um profissional de grande competência e ter acreditado neste projeto, dedicando seu tempo, conhecimento e experiência para que ele se tornasse realidade e também pela sugestão deste tema para o desenvolvimento do mestrado.

À professora e orientadora Dra. Maria da Graça Bicalho por ter acreditado neste sonho e dado as condições para que este trabalho fosse realizado.

Aos peritos do Laboratório de Química Legal e Sexologia Forense: Anna Carolina, Camila, Daniela, Jaqueline, Paula e Thiago e às colegas Ezilda e Gisele pela compreensão diante da minha ausência, pelo apoio e incentivo nos momentos desafiadores, pela amizade e conforto, por se preocuparem comigo e ficarem felizes com minhas vitórias.

Ao colega de mestrado e amigo José Samuel da Silva pelos ensinamentos e discussões que me proporcionou na área de estatística, pela paciência e constante disponibilidade.

Ao amigo perito Clineu Uehara por ter feito renascer em mim o desejo de contribuir com a Ciência e ter sido um incentivador para o início deste mestrado.

Às peritas do Laboratório de Genética Molecular Forense, Maria Christina e Marianna e às colegas Carolina e Letícia por terem aberto as portas do laboratório para o desenvolvimento deste trabalho, pela disponibilidade e contribuição na realização das metodologias e, principalmente, pela amizade.

Aos colegas de turma, principalmente, Fabíola, Renata e Nalini pela amizade, momentos de risada e por termos compartilhado as dificuldades, tornando esta caminhada mais fácil.

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade pelo apoio e disponibilidade.

Às pesquisadoras Me. Joyce Aparecida Martins e Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli pela disponibilidade em compartilhar conhecimento científico, mesmo a distância, elucidando diversas dúvidas.

À pesquisadora Dra. Leonor Gusmão pela acessibilidade e por disponibilizar informações científicas que foram de grande importância para a conclusão deste estudo.

Ao Instituto Médico Legal da Polícia Científica do Paraná por ter apoiado este estudo.

Ao Instituto de Criminalística da Polícia Científica do Paraná por ter autorizado a realização desta pesquisa em suas dependências.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná pelos ensinamentos acadêmicos e seriedade na pesquisa.

À FUNPAR (Fundação da Universidade do Paraná) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

À minha grande amiga Walquiria Menna Brusamolin dos Santos por suas orações e sincera amizade em todos os momentos.

Aos amigos e familiares que, mesmo distantes, acreditaram, oraram e torceram pelo sucesso e vitória nesta etapa da minha vida.

*“O êxito em qualquer coisa que empreendamos exige um objetivo definido. Aquele que desejar o verdadeiro êxito na vida deve conservar firmemente em vista o alvo digno de seus esforços!”*

*(Ellen G. White)*



## RESUMO

Estudos sobre polimorfismos de repetições curtas consecutivas (STRs) no cromossomo X estão recebendo a atenção de pesquisadores, principalmente devido à aplicabilidade destes marcadores em investigação de casos complexos de paternidade e por serem capazes de complementar, de forma muito eficiente, a análise dos marcadores autossomos, do cromossomo Y e do DNA mitocondrial. O presente trabalho relata as frequências alélicas de 10 X-STRs (DXS8378, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS9902, DXS6789, DXS7133, DXS7423, GATA172D05 e GATA31E08) em uma amostra de indivíduos não relacionados (401 homens e 399 mulheres) de dez regiões do Estado do Paraná, Brasil. Não foram observadas diferenças significativas para quaisquer locos entre as dez regiões estudadas (Teste Exato de Diferenciação). O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado nas amostras femininas e não foram verificados desvios significativos. A análise do desequilíbrio de ligação não revelou evidências consistentes de associação entre os X-STRs utilizados e a diversidade genética por locos variou de 67% (DXS7133) a 82% (GATA172D05). Elevado poder de discriminação global foi obtido para ambas amostras, feminina (0,99999999995) e masculina (0,9999994) e elevado poder de exclusão foi observado em trios: pai/mãe/filha (99,9997%) e duos: pai/filha (99,99%), evidenciando a aplicabilidade desse decaplex em análises forenses e em testes de paternidade. Estudo comparativo entre as distâncias genéticas revelou diferenças significativas entre a população do Paraná e outras populações da Ásia e África e proximidade da população européia e outras populações brasileiras.

### **Palavras Chaves**

cromossomo X, STRs, identificação humana, genética populacional, Paraná, Brasil

## ABSTRACT

There is an increasing interest in analysis of X-chromosomal short tandem repeats (X-STR) polymorphisms, mainly due to the potential to efficiently complement the analysis of other genetic markers (autosomal, Y-STR or mitochondrial). The present work reports the allele frequencies for ten X-STRs (DXS8378, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS9902, DXS6789, DXS7133, DXS7423, GATA172D05 and GATA31E08) in a sample of unrelated individuals (401 male and 399 female) from ten regions of Paraná in Brazil. No significant differences were observed for any loci between the ten regions analyzed (exact test of population differentiation). Hardy-Weinberg equilibrium was tested in female samples and no significant deviations were found. Linkage disequilibrium analysis did not reveal consistent evidence of association between the X-STRs used. Genetic diversity per locus ranged from 67% (DXS7133) to 82% (GATA172D05). A high overall power of discrimination was obtained for both female (0,99999999995) and male (0,9999994) samples and a high probability of exclusion in father/mother/daughter trios (99,9997%) and father/daughter duos (99,99%), demonstrating the usefulness of this set of markers in forensic and kinship analysis. Genetic comparisons (pairwise genetic distances) revealed significant differences between Paraná and others populations from Asia, Africa and proximity to European and Brazilian populations.

### Keywords

X chromosome, STRs, Human identification, Genetic population data, Paraná, Brazil

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| GRÁFICO 1-O USO DE VÁRIAS TECNOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA<br>DESDE 1990..... | 22 |
|--|----|

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 - DIFERENÇA ENTRE POLIMORFISMOS DE SEQÜÊNCIA E DE COMPRIMENTO.....  | 24 |
| FIGURA 2 - REGIÕES MINISSATÉLITES E MICROSSATÉLITES DO DNA.....  | 25 |
| FIGURA 3 - NOMENCLATURA DE UM MARCADOR STR DO CROMOSSOMO X .....   | 27 |
| FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DE DOIS DIFERENTES LOCOS DE STRS EM DIFERENTES PARES DE CROMOSSOMOS HOMÓLOGOS.....  | 28 |
| FIGURA 5 - HEREDOGRAMA E PERFIS ALÉLICOS OBTIDOS EM UMA INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE COM SUPOSTO PAI FALECIDO, UTILIZANDO HAPLÓTIPOS DE X-STRS..... | 38 |
| FIGURA 6 - IDIOGRAMA DO CROMOSSOMO X, COM OS PRINCIPAIS STRS E A SUBDIVISÃO DOS GRUPOS DE LIGAÇÃO.....   | 39 |
| FIGURA 7 - MAPA DO ESTADO DO PARANÁ COM AS DEZ MESORREGIÕES .  | 71 |
| FIGURA 8 - IDIOGRAMA DO CROMOSSOMO X COM A LOCALIZAÇÃO DOS STRS ANALISADOS NESTE TRABALHO .....  | 75 |
| FIGURA 9 - ELETROFEROGRAMA COM OS 10 LOCOS STRs ESTUDADOS.....   | 77 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABLE 1 - ALLELE FREQUENCY DISTRIBUTION IN PARANÁ, BRAZIL.....   | 48 |
| TABLE 2 - FORENSIC PARAMETERS IN PARANÁ, BRAZIL .....  | 49 |
| TABLE S1 - $p$ VALUE OF THE EXACT TEST FOR POPULATION<br>DIFFERENTIATION.....  | 50 |
| TABLE S2 - GENETIC DISTANCES BETWEEN PARANÁ AND BRAZILIAN<br>POPULATIONS .....                                       | 51 |
| TABLE S3 - GENETIC DISTANCES BETWEEN PARANÁ AND WORLDWIDE<br>POPULATIONS .....                                       | 52 |
| TABELA 1 - NÚMERO DE HABITANTES EM CADA MESORREGIÃO DO ESTADO<br>DO PARANÁ E O NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS ..... | 73 |
| TABELA 2 - SEQÜÊNCIA E MARCADOR FLUORESCENTE DOS <i>PRIMERS</i> DE<br>CADA X-STR UTILIZADO .....                     | 76 |
| TABELA 3 - TAMANHO DOS FRAGMENTOS DOS STRS ESTUDADOS.....  | 78 |
| TABELA 4 - ALELOS E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS AMOSTRAS<br>CONTROLES DE DNA UTILIZADAS PARA CALIBRAÇÃO.....      | 78 |
| TABELA 5 - FREQUENCIAS ALÉLICAS DE POPULAÇÕES MUNDIAIS PARA OS<br>MARCADORES X STRS EM ESTUDO .....                  | 83 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|            |  |
|------------|--|
| cM -       | Centimorgan.   |
| DNA -      | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucléico.  |
| DL -       | Desequilíbrio de Ligação.  |
| $F_{ST}$ - | <i>Fixation Indices</i> – Índice de Fixação.   |
| GHEP-ISFG  | Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense.                           |
| HLA -      | <i>Human Leucocyte Antigen</i> – Antígeno Leucocitário Humano.                                       |
| HO -       | Heterozigose Observada.  |
| HE -       | Heterozigose Esperada.   |
| IBGE -     | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.   |
| LINEs -    | <i>Long Interspersed Nuclear Elements</i> – Elementos Nucleares Intercalares Longos.                 |
| min. -     | Minutos.   |
| mm -       | Milímetro.   |
| mL -       | Mililitro.   |
| Mpb -      | Mega pares de bases.   |
| MtDNA -    | DNA mitocondrial.  |
| pb -       | Pares de bases.  |
| PCR -      | <i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase.                                   |
| $PD_F$ -   | Poder de Discriminação Feminino.   |
| $PD_M$ -   | Poder de Discriminação Masculino.  |
| $PE_T$ -   | Poder de Exclusão em Trios.  |
| $PE_D$ -   | Poder de Exclusão em Duos.   |
| $p$ -HWE - | Valor de $p$ no Equilíbrio de Hardy-Weinberg.  |
| RFLP -     | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição. |
| rpm -      | Rotação por minuto.  |
| seg. -     | Segundos.  |
| SINEs -    | <i>Short Interspersed Nuclear Elements</i> – Elementos Nucleares Intercalares Curtos.                |
| STRs -     | <i>Short Tandem Repeats</i> – Repetições Curtas Consecutivas.  |

- SENASP - Secretaria Nacional de Segurança Pública.
- VNTRs - *Variable Number of Tandem Repeats* – Repetições Consecutivas de Número Variável.
- X-STRs - Repetições curtas consecutivas presentes no cromossomo X.
- °C - Graus Celsius.
- µL - Microlitro.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 17 |
| 1.1 OBJETIVOS.....   | 18 |
| 1.1.1 Objetivo Geral.....  | 18 |
| 1.1.2 Objetivos Específicos.....   | 18 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA.....   | 18 |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 20 |
| 2.1 IDENTIFICAÇÃO HUMANA.....  | 20 |
| 2.2 MARCADORES BIOLÓGICOS NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA.....                                 | 21 |
| 2.3 POLIMORFISMOS NO DNA.....  | 23 |
| 2.4 CARACTERÍSTICAS DO CROMOSSOMO X.....   | 29 |
| 2.5 USO FORENSE DE STRs DO CROMOSSOMO X .....  | 30 |
| 2.6 DESEQUILIBRIO DE LIGAÇÃO NOS X-STRs.....   | 35 |
| 2.7 ESTUDOS POPULACIONAIS COM X-STRs.....  | 40 |
| <b>CAPÍTULO I</b> .....  |    |
| Genetic profile characterization of 10 X-STRs in a sample from Paraná, Brazil<br>..... | 42 |
| Abstract.....  | 42 |
| Introduction .....   | 43 |
| Materials and Methods.....   | 44 |
| <i>DNA samples</i> .....   | 44 |
| <i>STR's genotyping</i> .....  | 44 |
| <i>Statistical analysis</i> .....  | 45 |
| Results and Discussion.....  | 45 |
| <i>Genetic variation</i> .....   | 45 |
| <i>Forensic efficiency parameters</i> .....  | 46 |
| <i>Linkage disequilibrium (LD) analysis</i> .....                                      | 46 |
| <i>Comparisons between Brazilian populations</i> .....                                 | 47 |
| <i>Comparisons with worldwide populations</i> .....                                    | 47 |
| References.....  | 53 |
| <b>3. DISCUSSÃO COMPLEMENTAR</b> .....   | 56 |
| <b>4. CONCLUSÕES</b> .....   | 59 |



|   |    |
|---|----|
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                    | 60 |
| <b>APÊNDICES</b> .....                      | 70 |
| Apêndice I .....                            | 71 |
| <i>Materiais e Métodos</i> .....            | 72 |
| Apêndice II .....                           | 81 |
| <i>Tabela Complementar</i> .....            | 82 |
| Apêndice III .....                          | 87 |
| <i>Aprovação pelo Comitê de Ética</i> ..... | 88 |

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de métodos confiáveis na identificação humana sempre foi uma grande necessidade da sociedade, seja para solucionar questões jurídicas ou para localizar pessoas desaparecidas em contexto de acidentes em massa e desastres naturais. Ao longo dos anos, diferentes técnicas foram implantadas para caracterizar e individualizar as pessoas, entre elas a análise de impressões digitais, exame antropométrico e estudos de marcadores biológicos (polimorfismos dos sistemas ABO, HLA e de outras proteínas séricas). Entretanto, eles apresentavam baixo poder de discriminação, principalmente, em situações envolvendo corpos carbonizados, amostras degradadas e/ou misturadas.

A introdução da análise do DNA como ferramenta de identificação humana revolucionou a Ciência Forense, devido ao seu alto poder de discriminação, o qual permite obter a identificação de um indivíduo e/ou determinar o vínculo biológico entre pessoas com pequena probabilidade de erro.

Na espécie humana a composição genética de cada indivíduo resulta da contribuição de 50% do genoma materno e paterno. Nesta composição do genoma apenas 0,1% varia entre indivíduos, sendo o restante exatamente igual entre todos os indivíduos (KRUGLYA & NICKERSON, 2001). Nas regiões variáveis estão presentes seqüências nucleotídicas utilizadas, pela Genética Forense, como marcadores moleculares para a identificação humana. Esses marcadores estão distribuídos nos cromossomos autossomos e sexuais e são formados por regiões de repetições nucleotídicas sucessivas, ou *in tandem*, de número variável referidas como VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats* ou Repetições Consecutivas de Número Variável) e STRs (*Short Tandem Repeats* ou Repetições Consecutivas Curtas).

Atualmente, na rotina forense, são utilizados STRs presentes nos cromossomos autossomos e Y. Entretanto, a realização de exames de DNA para determinação de vínculo biológico, em situações especiais, tais como, na exumação de corpos, em que pouco material biológico está disponível ou quando o suposto pai é falecido ou ausente, a análise dos marcadores tradicionais pode não solucionar o caso. Nestas situações, faz-se necessário o estudo de outros marcadores, como as regiões polimórficas do cromossomo X (SZIBOR, 2007), as quais são capazes de

complementar a análise dos cromossomos autossomos e do Y de forma muito eficaz.

Muitos STRs do cromossomo X têm sido validados para uso forense. No entanto, mais estudos são necessários para verificar a distribuição da frequência alélica desses marcadores em diferentes populações, as taxas de mutação e o desequilíbrio de ligação, permitindo, assim, a criação de bancos de referência de frequências alélicas (PICO *et al.*, 2008).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Determinar a frequência alélica de 10 STRs do cromossomo X em indivíduos da população brasileira, residentes no Estado do Paraná.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar, na população do Estado do Paraná, a frequência alélica do decaplex de X-STRs validado pelo Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense - GHEP-ISFG (DXS8378, DXS9902, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS6789, DXS7133, GATA172D05, GATA31E08 e DXS7423) (GUSMÃO *et al.*, 2009).
- Através de parâmetros estatísticos, estimar o poder de prova desses marcadores na prática forense.
- Comparar os dados obtidos neste trabalho com os de outras populações do mundo.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Estudos sobre polimorfismos no cromossomo X estão recebendo a atenção de pesquisadores, principalmente devido à aplicabilidade em investigação de casos complexos de paternidade. Embora vários X-STRs tenham sido validados para uso forense, pouco se sabe sobre a variação destes polimorfismos em diferentes

populações do mundo. Mais estudos são necessários para avaliar a distribuição das frequências alélicas nas populações de diferentes continentes e assim ser estabelecido um banco de frequências alélicas referencial para estudos forenses e antropológicos. (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Tendo em vista a ampla aplicação dos marcadores X-STRs, muitos sistemas multiplex baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram validados para uso forense (ZARRABEITIA *et al.*, 2002; ROBINO *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2008). Embora uma grande variedade de marcadores tenha sido estudada, poucos são comuns em diferentes trabalhos. Recentemente um sistema de decaplex foi desenvolvido e validado em um trabalho colaborativo realizado pelo Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense (GHEP-ISFG) (GUSMÃO *et al.*, 2009) o qual apresentou dados de frequências alélicas para quinze populações Ibéricas e Latino-americanas. A população do Estado do Paraná foi incluída neste trabalho, como um estudo piloto, utilizando um número amostral reduzido.

Entre todos os trabalhos de X-STRs publicados sobre a população brasileira, foram analisadas, no total, a frequência alélica de 25 STRs diferentes, sendo estudadas 22 populações urbanas e sete grupos de ameríndios. Entre os dez marcadores X-STRs propostos pelo GHEP-ISFG, seis deles (DXS7132, DXS9898, DXS6789, DXS7133, GATA31E08, DXS7423) foram os mais estudados na população brasileira, sendo relatados em mais de quinze grupos (CAINÉ *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2008b; RIBEIRO *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2008; GUSMÃO *et al.*, 2009; LEITE *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2009; CAINÉ *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2010a; MARTINS *et al.*, 2010b; RIBEIRO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; PENNA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011).

O presente trabalho se justifica pela necessidade de estudos populacionais adicionais no Brasil, utilizando os marcadores padronizados, e irá contribuir para estabelecer um banco de frequências alélicas de X-STRs da população, viabilizando a utilização dessa ferramenta na identificação humana.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Segundo França (2001) a identificação humana é um processo que utiliza um conjunto de caracteres capazes de individualizar uma pessoa, tornando-a única. Como todas as pessoas da sociedade são tratadas com individualidade durante a vida, há a necessidade de essa identidade ser reconhecida após a morte para conforto dos familiares ou para solucionar questões jurídicas (SWEET, 2001). E, mesmo durante a vida, são necessários meios para identificar pessoas envolvidas em crimes e em investigações de paternidade.

Existem diversos métodos de identificação humana, cada um com as suas limitações. A análise das impressões digitais têm sido utilizadas na identificação de pessoas, porém em casos envolvendo corpos carbonizados e esqueletizados essa técnica torna-se inviável. A identificação através de marcadores biológicos (polimorfismos de proteínas, grupos sanguíneos e marcadores genéticos) é mais confiável, porém assim como a datiloscopia, necessita de um registro anterior, uma referência para comparação. Por fim, a análise antropológica fornece informações úteis quanto à estatura, raça, gênero, mas não resulta em identificação individual (GLASS, 2002).

O método de identificação deve cumprir quatro requisitos técnicos indispensáveis: (1) unicidade – os elementos escolhidos para identificação devem permitir a distinção precisa e clara, entre o identificado e os demais; (2) imutabilidade – as características consideradas não devem variar com o passar do tempo; (3) praticabilidade – permitir àqueles que irão colher os dados de identificação, uma tomada segura e rápida, que não cause constrangimento ao identificado e permita um bom grau de segurança e confiabilidade; (4) classificabilidade – deve permitir a comparação entre os dados, de forma sistemática e precisa, de maneira a indicar rapidamente o identificado em uma população (DEL-CAMPO, 2006).

## 2.2 MARCADORES BIOLÓGICOS NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Na Ciência Forense os testes de identificação humana, muitas vezes, utilizam marcadores biológicos. Ao longo do tempo, polimorfismos em proteínas e em seqüências genéticas têm sido identificados e empregados como ferramenta na diferenciação de pessoas.

O uso de amostras biológicas foi introduzido nas análises forenses, no início do século XX, com a utilização dos marcadores eritrocitários ABO (JORDE *et al.*, 2001). Este método foi empregado por várias décadas na identificação de pessoas e em evidências relacionadas a crimes, inclusive investigações de paternidade. Posteriormente, outros sistemas de proteínas marcadoras (transferrina, albumina, ceruloplasmina, haptoglobina, fosfoglicomutase-1, fosfatase ácida, esterase D) passaram a ser utilizados como ferramenta em identificação humana (BUDOWLE *et al.*, 2008).

A introdução de um novo marcador biológico, em 1954, marcou a segunda fase dos métodos de identificação humana. Foi demonstrada a ocorrência de um sistema de histocompatibilidade, definido por antígenos detectados na superfície dos leucócitos, denominado de HLA (do inglês – *Human Leucocyte Antigen* ou Antígeno Leucocitário Humano), sendo codificados por um conjunto gênico localizado no braço curto do cromossomo seis. Essas proteínas apresentam um acentuado poder de discriminação da individualidade biológica, em comparação com os métodos utilizados até então (CALABREZ, 1999).

O uso de marcadores protéicos seja baseado em proteínas séricas, eritrocitárias ou leucocitárias, era, no entanto, inadequado ao emprego na identificação humana, dada sua baixa estabilidade à temperatura ambiente e ao poder discriminatório reduzido. Por conseguinte, a introdução de análises do polimorfismo no DNA marcou uma terceira fase no contexto da identificação humana na área forense, já que este método resolvia os problemas apresentados pelas técnicas anteriores.

O emprego do DNA como ferramenta de identificação humana foi descrito pela primeira vez em 1985, pelo geneticista inglês Alec Jeffreys (JEFFREYS *et al.*, 1985), que identificou, em regiões de íntrons do gene da mioglobina, seqüências

repetidas consecutivamente, cujos números de repetições variavam entre os indivíduos.

O primeiro uso forense da análise do DNA, proposta por Jeffreys, aconteceu em 1986 para solucionar dois casos, muito semelhantes, de estupros seguidos de morte, envolvendo duas jovens que viviam no mesmo bairro, em uma cidade da Inglaterra. O criminoso foi identificado e a partir desta data a análise do DNA começou a ser utilizada rotineiramente em casos forenses. Ao longo dos anos, a técnica foi e está sendo, constantemente, aperfeiçoada para garantir sensibilidade e confiabilidade a esta ferramenta forense (BUTTLER, 2005).

O gráfico 1 apresenta a porcentagem do uso de várias tecnologias de identificação humana, com marcadores biológicos, desde 1990. Fica evidente que os sistemas mais empregados no início dessa década (ABO, HLA e proteínas séricas) entraram em total desuso, sendo praticamente abolidos em 2003. A análise do DNA como marcador da individualidade biológica iniciou-se com a metodologia que analisa Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*), a qual foi totalmente substituída pela técnica de PCR, que representa mais de 90% de utilização, em 2003.

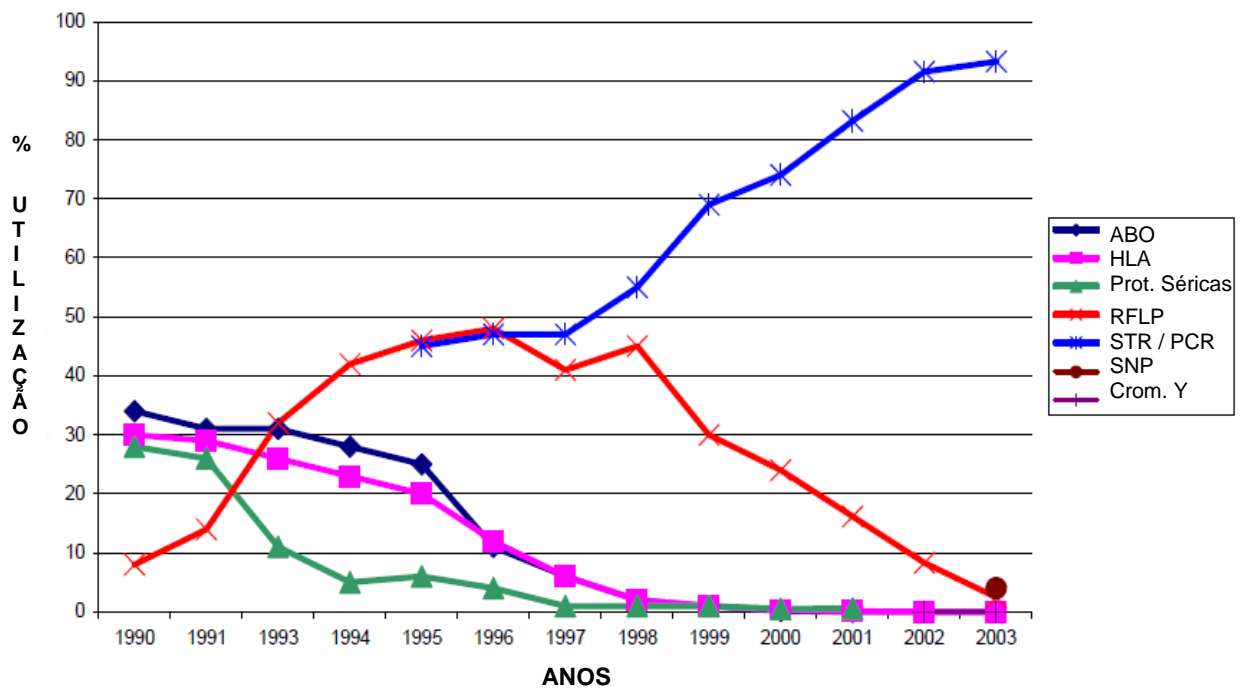


GRÁFICO 1: O USO DE VÁRIAS TECNOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA DESDE 1990.  
 FONTE: Relation Testing Standards Program Unit, 2008.

A história da genética forense no Brasil, como ferramenta utilizada para resolução de casos criminais dentro do Sistema de Segurança Pública, teve início em 1995, com a inauguração do Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil do Distrito Federal. Este laboratório realizou os primeiros treinamentos para peritos de diversos Estados brasileiros, culminado com o surgimento dos laboratórios de genética forense dos Estados do Rio Grande do Sul, de Minas Gerais, do Paraná, de Mato Grosso do Sul, de São Paulo e da Paraíba.

Desde 2002, a Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP), através de seu Plano Nacional de Segurança Pública para aprimoramento técnico-científico e qualificação da perícia criminal, vem financiando a implantação e adequação de laboratórios de genética forense no Brasil, como estratégia de combate à violência instalada.

Atualmente o Brasil possui dezessete laboratórios com infra-estrutura e com profissionais capacitados tecnicamente na utilização do DNA para a resolução de crimes. Esses laboratórios situam-se nos Estados do Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Polícia Federal, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins, todos integrantes de órgãos de segurança e que analisam o DNA dentro dos padrões utilizados internacionalmente. Três laboratórios estão em fase final de implantação, a saber: Acre, Goiás e Mato Grosso (Projeto Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos, 2009).

### 2.3 POLIMORFISMOS NO DNA

Um gene cujos alelos apresentam frequência entre 1% e 99% deve ser classificado como gene polimorfo, os alelos com frequências inferiores a 1% são denominados idiomorfos, enquanto um gene cuja frequência do alelo mais freqüente é superior a 99% deve ser classificado como gene monomorfo. Entretanto, um loco polimórfico pode incluir entre os alelos a ele pertencentes um ou vários alelos idiomorfos. Por exemplo, se os alelos A, B e C de determinado loco tiverem frequências gênicas iguais, respectivamente, a 0,600, 0,395 e 0,005 classificam-se os alelos A e B como polimorfos e o alelo C como idiomorfo. Por sua vez, os



caracteres que resultam de locos que incluem pelo menos dois alelos polimórficos são denominados polimorfismos genéticos ou sistemas genéticos polimórficos (BEIGUELMAN, 1995).

Apenas uma fração de 0,1%, aproximadamente três milhões de nucleotídeos na molécula de DNA humano, difere entre as pessoas e as tornam únicas na população (KRUGLYA & NICKERSON, 2001). São as informações presentes nas regiões hipervariáveis, não codificantes, que a Ciência Forense utiliza para identificar os indivíduos. Os polimorfismos dessas regiões são caracterizados pela possibilidade de um mesmo loco apresentar diferentes tipos de alelos na população. Duas formas de polimorfismos são possíveis em nível de DNA: o de seqüência e o de comprimento, como mostra a figura 1.

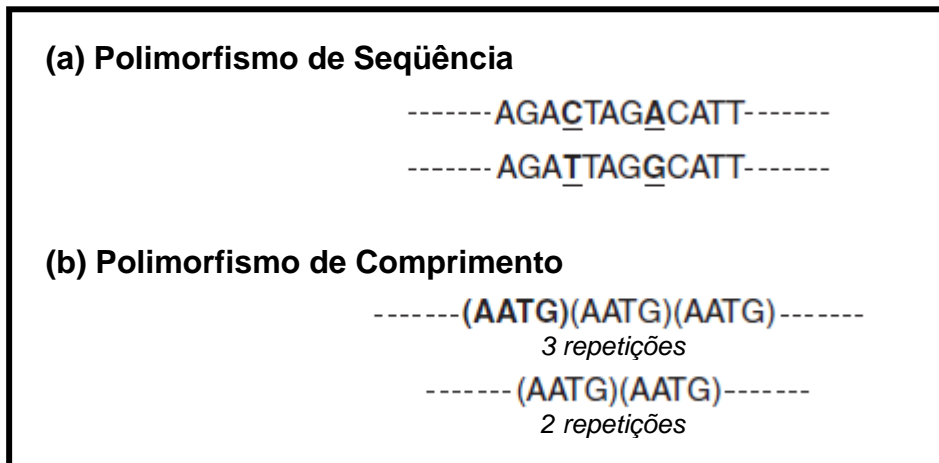


FIGURA 1: DIFERENÇA ENTRE POLIMORFISMOS DE SEQÜÊNCIA E DE COMPRIMENTO.  
 FONTE: BUTTLER, 2005. Adaptado.

O polimorfismo de seqüência é formado por mutações pontuais dispersas pelo genoma, sendo que a diferença entre os indivíduos se dá apenas por um nucleotídeo em cada região analisada. Já o polimorfismo de comprimento, é determinado por seqüências de nucleotídeos, que formam um motivo, que se repete consecutivamente. Na figura 2, por exemplo, o motivo é (AATG). A diferenciação entre indivíduos se dá pela determinação do tamanho do motivo e pelo número de vezes que ele aparece de modo seqüencial (BUTTLER, 2005).

O polimorfismo de comprimento pode ser agrupado em duas classes, dependendo do número de nucleotídeos presentes no motivo que forma a região repetitiva. É denominada de região minissatélite ou Repetições Consecutivas de Número Variável (*Variable Number of Tandem Repeats* - VNTR) se o motivo

apresentar de 7 a 100 pares de bases. Se o motivo apresentar de 1 a 6 pares de bases a região é chamada de minissatélite ou Repetições Curtas Consecutivas (*Short Tandem Repeats* - STR). A figura 2 mostra a diferença entre uma região minissatélite e uma minissatélite.

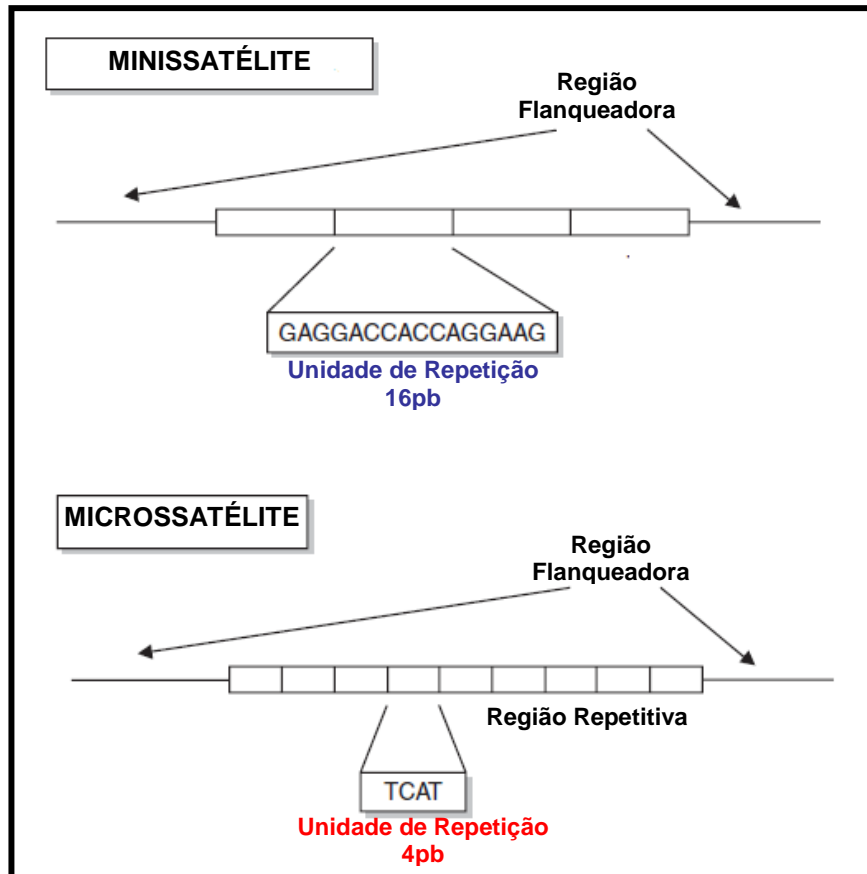


FIGURA 2: REGIÕES MINISSATÉLITES E MICROSSATÉLITES DO DNA.  
 FONTE: BUTLER, 2005. Adaptado.

A primeira técnica utilizada para análise do DNA foi a de Polimorfismos de Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*), a qual permite a análise de regiões minissatélites. As sondas multi-locos RFLP tem elevado poder de discriminação, porém a técnica é trabalhosa, demorada, de difícil automação, necessita de elevadas quantidades de DNA íntegro para a obtenção de bons resultados e, em casos com misturas de amostras, este método torna-se praticamente inviável. Por esta razão, atualmente, poucas análises são realizadas com RFLP e, nestes casos, são utilizadas sondas para um único loco. Como as amostras submetidas à análise forense do DNA, na maioria das vezes, não estão em condições ideais de conservação (DNA degradado), em crimes

sexuais a amostra da vítima e do agressor estão misturadas e geralmente não há grandes quantidades, faz-se necessária uma técnica de análise de alta sensibilidade e especificidade. A PCR apresenta perfeitamente essas características, além de permitir que o resultado seja obtido bem mais rápido que a RFLP. Associada à PCR, a análise das regiões STRs (tamanho entre 100 e 400 pb) torna-se muito mais confiável que a análise de VNTRs (tamanho de 400 a 1000 pb), principalmente quando o DNA está degradado e em pequena quantidade. Além disso, a resolução das análises é obtida mais facilmente em fragmentos menores que 500 pb, por essas razões o uso de STRs é mais vantajoso que o de VNTRs (BUTLER, 2005).

No genoma humano, existem seqüências de STRs compostas por di, tri, tetra, penta e hexa-nucleotídeos, formando a unidade base de repetição. Os STRs penta e hexanucleotídeos são menos freqüentes no genoma e por conseqüência são pouco utilizados na análise forense (BACHER *et al.* 1999). Na Ciência Forense os sistemas STRs baseados na análise de seqüências repetitivas de quatro nucleotídeos são preferidos em relação aos formados por dois ou três nucleotídeos. Durante a reação de PCR pode ocorrer a formação de artefatos de amplificação, tais como as bandas tipo *stutters*, produtos de amplificação com uma unidade de repetição a mais ou a menos que o alelo original, devido ao deslizamento da DNA polimerase durante a etapa de replicação do DNA na PCR. Em eletroferogramas de equipamentos baseados na detecção de fluorescência laser induzida, é habitual, em STRs de tetranucleotídeos, a observação de artefatos de amplificação representando cerca de 15% da área do alelo original. Em STRs formados por di ou trinucleotídeos, a presença deste tipo de artefato tende a representar mais 30% do alelo original, dificultando sua correta genotipagem, especialmente em situações com misturas de amostras ou com DNA degradado. Tal questão é a principal razão pelo amplo uso em genética forense de marcadores STRs de tetranucleotídeos (BUTTLER, 2005).

Nas genotipagens é possível identificar a presença de alelos com algum tipo de variação em sua seqüência em comparação com os alelos comumente observados, esses alelos alterados são nomeados alelos microvariantes (BUTLER, 2005). Por exemplo, um STR cuja unidade repetitiva seja um tetranucleotídeo e apresente o alelo microvariante 31.1 significa que há 30 repetições de core integral (tetranucleotídeo), além de uma 31ª repetição parcial, no caso um nucleotídeo apenas.

A análise de marcadores STRs depende de conhecimento prévio das regiões conservadas que flanqueiam a seqüência com repetições consecutivas, para que oligonucleotídeos iniciadores possam se parear nelas e permitir o seqüenciamento do STR. Novos marcadores STRs são, geralmente, identificados, por dois possíveis procedimentos: (1) busca de seqüências de DNA em bancos de dados, como o GeneBank, por regiões com mais de seis repetições seqüenciais de uma mesma unidade de repetição; (2) métodos de isolamento da biologia molecular (BUTTLER, 2005).

O padrão de nomenclatura dos STRs segue uma ordem pré-estabelecida. A primeira letra do nome do marcador é “D” e significa DNA, em seguida vem um número que representa em que cromossomo o marcador está localizado, no caso de estar em cromossomos sexuais usa-se “X” ou “Y”, o terceiro elemento do nome é a letra “S”, do inglês, *single copy sequence* que significa seqüência de cópia única e por último vem o número do loco em que o marcador foi descrito (BUTTLER, 2005). A figura 3 traz um exemplo da nomenclatura de um marcador STR do cromossomo X.

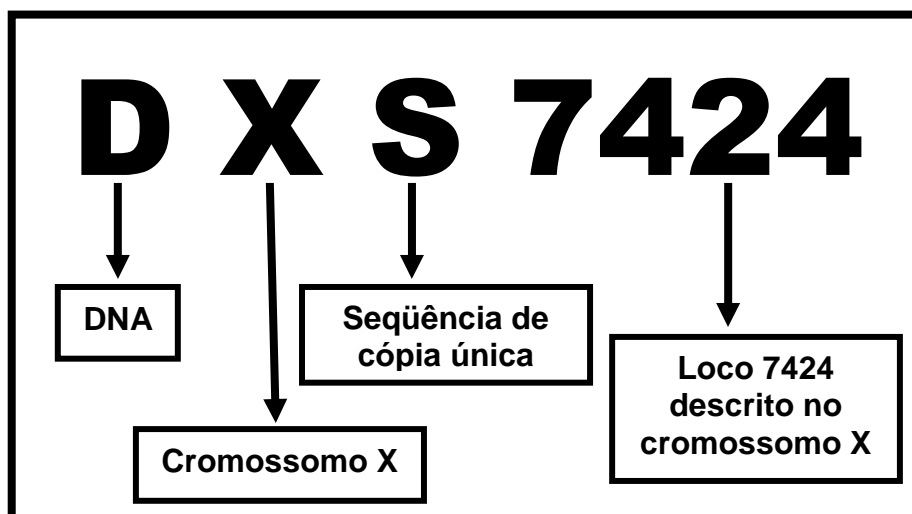


FIGURA 3: NOMENCLATURA DE UM MARCADOR STR DO CROMOSSOMO X.  
 FONTE: BUTLER, 2005. Adaptado.

Além da nomenclatura clássica, alguns STRs são nomeados baseados na seqüência que compõem a unidade de repetição (ex: GATA), ou ainda, quando estão localizados dentro de uma seqüência gênica podem ter a nomenclatura relacionada com o gene. Um exemplo é o STR TH01 que está localizado no íntron 01 do gene da Tirosina Hidroxilase (BUTLER, 2005).

As diferentes variações no número de repetições, da unidade básica de repetição, em um determinado loco, são chamadas de alelos. Se houver sete repetições em um loco, este é chamado de alelo 7, se no cromossomo homólogo houver 10 repetições para o mesmo loco, ele é chamado de alelo 10. Nos indivíduos, há dois alelos para cada loco, com exceção dos cromossomos sexuais no sexo masculino, que apresentam apenas um alelo para cada loco do cromossomo X e do Y (OTTO *et al.*, 2004).

A figura 4 é uma representação esquemática de dois diferentes locos de STRs em diferentes pares de cromossomos homólogos. Os cromossomos com o centrômero branco são de origem paterna, enquanto os centrômeros pretos são de origem materna. Desta forma, este indivíduo recebeu de seu pai o alelo 4 para o loco A e o alelo 3 para o loco B e recebeu de sua mãe o alelo 5 para o loco A e o alelo 6 para o loco B.

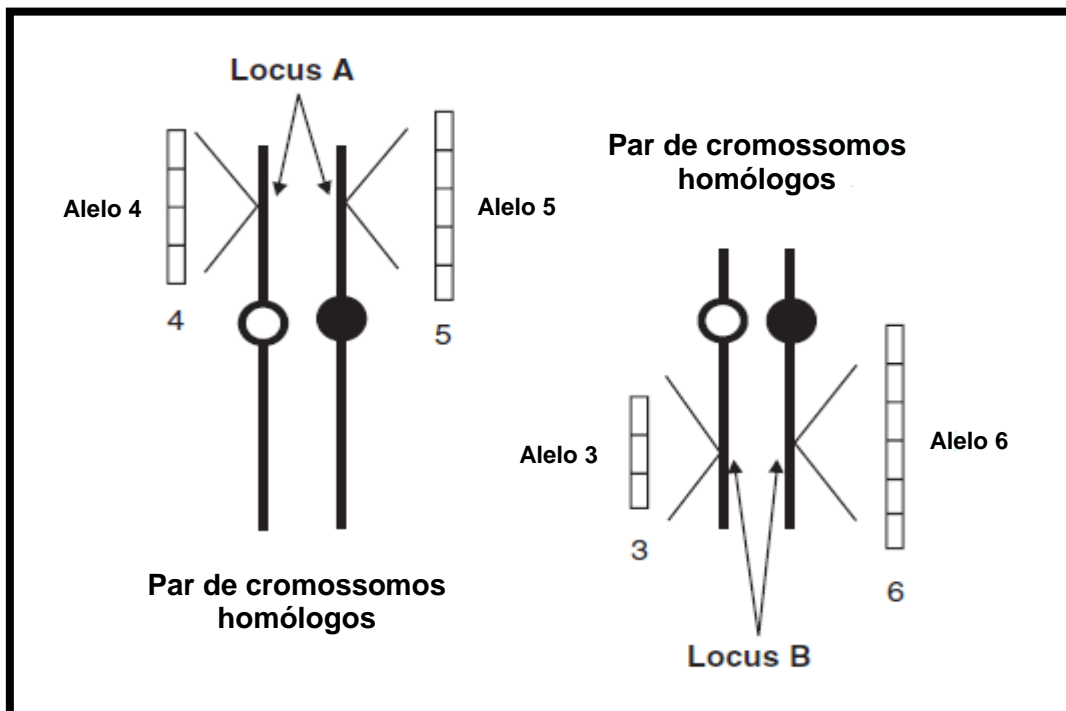


FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DE DOIS DIFERENTES LOCOS DE STRS EM DIFERENTES PARES DE CROMOSSOMOS HOMÓLOGOS.

FONTE: BUTLER, 2005. Adaptado.

Pode ser feita uma analogia entre o sistema de identificação com STRs e o sistema de endereçamento postal, no qual há milhares de indivíduos com o mesmo CEP, algumas centenas com o mesmo endereço de rua, poucos com o mesmo número do edifício, alguns com o mesmo número do apartamento, mas apenas um com o nome e sobrenome correspondentes a este endereço. Da mesma maneira,

analisa-se a variabilidade de diversos locos de STRs, alguns podem ser semelhantes entre dois indivíduos, mas jamais todos, com exceção de gêmeos univitelinos. Dessa forma, é possível correlacionar amostras de DNA presentes em cenas de crime com as de indiciados ou montar genealogias (BUTTLER, 2005).

## 2.4 CARACTERÍSTICAS DO CROMOSSOMO X

As células humanas, exceto os gametas, apresentam o DNA distribuído em 23 pares de cromossomos no núcleo, sendo 22 pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais ou heterocromossomos, XY no homem e XX nas mulheres. Cada par de cromossomos é constituído por um cromossomo de herança materna e outro de herança paterna.

O cromossomo sexual X possui características particulares no genoma humano: as mulheres herdam um cromossomo X do pai e um da mãe, já os homens herdam apenas o materno. Este cromossomo é formado por aproximadamente 155 mega pares de bases e representa cerca de 5% do genoma das células femininas e 2,5% do das células masculinas. Possui uma baixa densidade gênica, foram identificados 1.098 genes, representando 4% do total de genes humanos. A quantidade de regiões repetitivas é elevada, correspondendo a 56% do DNA deste cromossomo, sendo que a média do genoma é de 45%. Dentro dessas regiões repetitivas foram identificados os elementos intercalares curtos (*SINEs – Short Interspersed Nuclear Elements*) em quantidades abaixo da média dos cromossomos e os elementos intercalares longos (*LINEs – Long Interspersed Nuclear Elements*) em quantidades acima da média (MARTINS, 2008a). Além de terem sido registrados 153.146 polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) (ROSS *et al.* 2005).

Indivíduos do sexo feminino têm o dobro de cópias dos genes ligados ao X em relação ao sexo masculino. Com a finalidade de tornar proporcional os produtos gênicos do cromossomo X entre homens e mulheres, um dos cromossomos X da mulher é inativado, aleatoriamente, no início do desenvolvimento e este estado inativo é transmitido para todas as células (CHOW *et al.*, 2005). Na linhagem germinativa o segundo cromossomo X é reativado durante a ovogênese para recombinar-se com o outro cromossomo X feminino (GRIFFITHS *et al.*, 2009). No

homem, o cromossomo X não se recombina ao longo de todo o seu comprimento, sendo tal processo restrito a algumas regiões pseudoautossômicas localizadas nas extremidades dos cromossomos X e Y. Tais regiões são necessárias para a normal segregação dos cromossomos sexuais durante a meiose (ELLIS & GOODFELLOW, 1989).

Os marcadores STRs do cromossomo X, utilizados na identificação humana, estão localizados em regiões não recombinantes entre os cromossomos X e Y. Entretanto, ocorre recombinação entre os cromossomos X na mulher, garantido a variabilidade desses marcadores. Já nos homens isso é inviável devido a hemizigose do cromossomo X nestas regiões (SZIBOR *et al.*, 2007).

Assim, da mesma forma que os autossomos, o cromossomo X se recombina (mulheres) e, similarmente ao cromossomo Y e DNA mitocondrial, tem um modelo que permite determinar diretamente o haplótipo (homens) (SCHAFFNER, 2004).

O cromossomo X apresenta características genéticas distintas em relação aos autossomos, principalmente: (1) menor tamanho populacional efetivo (SCHAFFNER, 2004), (2) taxa de mutação menor. Segundo Schaffner, 2004 todos os cromossomo masculinos possuem maior taxa de mutação que os femininos devido ao elevado número de mitoses nas células masculinas. Como dois cromossomos X estão presentes nas mulheres e apenas um nos homens a taxa de mutação global deste cromossomo é inferior a dos autossomos e (3) maior desequilíbrio de ligação, uma vez que o cromossomo X recombina apenas na meiose feminina (PEREIRA *et al.*, 2007; ZARRABEITIA *et al.*, 2009).

## 2.5 USO FORENSE DE STRs DO CROMOSSOMO X

O potencial genético presente nos marcadores dos cromossomos autossomos, Y e no DNA mitocondrial foi extensivamente explorado em estudos de identificação individual e de diversidade genética nas populações humanas. Entretanto, a contribuição do cromossomo X ainda é pequena, devido ao escasso número de estudos de caracterização dos polimorfismos ligados a este cromossomo, bem como dados populacionais disponíveis para estudos

comparativos (SZIBOR *et al.*, 2006). Tal situação atrasou em muito a utilização desta importante ferramenta genética.

A primeira árvore filogenética de DNA mitocondrial humano foi publicada em 1987 (CANN *et al.*, 1987) e do cromossomo Y em 1989 (LUCOTTE *et al.*, 1989), enquanto que os primeiros estudos detalhados do cromossomo X tiveram que aguardar o advento da tecnologia do seqüenciamento do DNA. Embora tivessem sido descritos STRs do cromossomo X no início da década de noventa, HPRTB (HEARNE *et al.*, 1991; EDWARDS *et al.*, 1992), ARA (EDWARDS *et al.*, 1992) e DX981 (MAHTANI *et al.*, 1993), a intenção de utilizá-los como uma ferramenta em casos de identificação só surgiu mais tarde (SZIBOR, 2007). Em 1998 foi publicado um trabalho sobre a diversidade de sete locos do cromossomo X em humanos (NACHMAN *et al.*, 1998) e, apenas em 1999 as primeiras árvores filogenéticas do cromossomo X foram produzidas (HARRIS & HEY, 1999).

Atualmente, estudos sobre polimorfismos no cromossomo X estão recebendo a atenção de pesquisadores, principalmente devido à aplicabilidade destes em investigação de casos complexos de paternidade. Embora vários X-STRs estejam sendo validados para uso forense, pouco se sabe sobre a variação destes polimorfismos em diferentes populações do mundo. Por esta razão, cada vez mais se tornam necessários estudos para avaliar a distribuição das frequências alélicas em diferentes populações, taxas de mutação e desequilíbrio de ligação, viabilizando a produção de bases de dados úteis para aplicações forenses e estudos antropológicos (BINI *et al.*, 2005; MORENO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2008). A Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG) recomenda que marcadores microssatélites trinucleotídeos, tetranucleotídeos e pentanucleotídeos só sejam utilizados na prática forense caso possuam propriedades genético-populacionais, tais como: estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg, apresentarem alto nível de polimorfismo e possuírem desequilíbrio de ligação conhecido (SZIBOR, 2007).

Os X-STRs são capazes de complementar a análise dos marcadores autossomos e do cromossomo Y de forma muito eficiente, pois estes marcadores se caracterizam por apresentarem, em determinadas situações, maiores valores de poder de exclusão (PE) que os autossomos. Os STRs do cromossomo X possuem maior capacidade de excluir de uma situação de investigação de paternidade,



indivíduos não relacionados à criança testada e, em virtude disso, suficiente poder estatístico é obtido mesmo quando poucos X-STRs são analisados (SZIBOR, 2007).

A maior capacidade de exclusão dos X-STRs se dá pela diferença de alelos existente entre os tradicionais marcadores autossomos e os do cromossomo X para os indivíduos do sexo masculino. Estes apresentam sempre dois alelos para os marcadores autossomos e, apenas um, para os do cromossomo X. Assim, no mecanismo de herança genética, o pai transfere 100% do seu perfil haplotípico do cromossomo X para a filha (exceto em casos de mutação) o que não ocorre com os autossomos, nos quais apenas 50% da informação genética paterna é herdada (MARTINS, 2008a).

Em virtude dessa propriedade do cromossomo X, a maior vantagem da sua aplicação reside nos testes de exclusão de paternidade, nos quais o material biológico do suposto pai não está disponível e o DNA de seus parentes é analisado para a reconstrução do seu perfil genético. Com a análise dos tradicionais STRs autossomos, muitas vezes estes casos permanecem inconclusivos, pois para se ter adequada reconstrução do perfil do suposto pai ausente, vários parentes deste precisam ser genotipados. Isso é comum acontecer no contexto de guerras e migração, quando há necessidade de aproximar familiares e também para identificar cadáveres, vítimas de guerras e de desastres em massa. Marcadores do cromossomo X podem auxiliar na reconstituição de grandes genealogias, baseando-se na transmissão do cromossomo X entre mãe/filho e pai/filha. Entretanto, interrupções aparecem quando há uma relação de parentesco do tipo pai e filho, em que não há a transmissão de um cromossomo X (SZIBOR, 2007).

Casos de paternidade em que o material genético do suposto pai não está disponível podem ser solucionados com informações genotípicas do cromossomo X da suposta avó paterna, pois os alelos paternos podem ser facilmente determinados a partir dela, já que o pai herda apenas um cromossomo X, o materno (ROSS *et al.*, 2005). Assim, quando a suposta avó paterna está presente, tais casos podem ser facilmente solucionados, o que não ocorre com os STRs autossomos, sendo necessária a tipagem de mais parentes do suposto pai. Além disso, se a suposta avó não está presente, seu perfil pode ser facilmente determinado através de suas filhas e, muito mais facilmente, a partir dos irmãos do suposto pai (SZIBOR, 2007).

Testes de paternidade que envolvem trios mãe, filho (a) e suposto pai são na maioria das vezes solucionados apenas com STRs autossomos e não necessitam

de marcadores adicionais. Se o teste de paternidade envolve uma dupla pai e filho, os X-STRs também não são utilizados, já que não há herança paterna do cromossomo X. Entretanto, se a dupla for pai e filha, o uso de X-STRs é interessante, principalmente em se tratando de amostra degradada, originada de exumação de cadáveres, por exemplo. Para duplas mãe e filha os STRs do cromossomo X não têm nenhuma vantagem em relação aos STRs dos autossomos. Entretanto, em duos mãe e filho os X-STRs são mais eficientes que os marcadores autossomos, neste caso a chance de exclusão é igual à obtida com X-STRs na dupla pai e filha. A opção por utilizar microssatélites do cromossomo X deve ser considerada principalmente em casos de cadáveres putrefeitos ou em outras amostras de difícil análise. Nestas situações obtém-se um significativo poder estatístico com a análise de poucos X-STRs (SZIBOR, 2007).

Estudos de irmandade ou meia-irmandade, em indivíduos do sexo feminino, apresentam ótimos resultados com X-STRs. Quando dois indivíduos testados possuem o mesmo pai, o cromossomo X de origem paterna será comum entre ambos. Assim, em uma investigação em que duas irmãs ou meio-irmãs são tipadas, a presença de quatro diferentes alelos em um marcador do cromossomo X permite a exclusão da paternidade comum entre elas, até mesmo se nenhum dos pais biológicos ou seus parentes forem analisados. Turrina *et al.* (2007a) utilizaram apenas 4 X-STRs para auxiliar na resolução de um caso de meio irmãs, no qual a análise de 15 autossomos não foi suficiente.

O cromossomo X também tem grande utilidade em casos de paternidade em que os supostos pais são parentes. Por exemplo, se os supostos pais são pai e filho, no caso de STRs autossomos, estes obrigatoriamente compartilham 50% dos alelos e o exame com um deles pode aparecer com apenas uma inconsistência genética, o que dificulta a diferenciação entre mutação paterna e relativa proximidade do suposto pai com o verdadeiro pai biológico da criança. No caso dos X-STRs, nenhum alelo entre pai e filho é idêntico por descendência, uma vez que estes herdam o cromossomo X de suas mães e ambas são diferentes, o que facilita a resolução desses casos. Já no caso dos supostos pais serem dois irmãos, ambos receberam o cromossomo X da mesma mãe e, portanto há uma chance de 50% destes possuírem alelos idênticos por descendência, da mesma forma como ocorre com os STRs autossomos, sendo ambos os sistemas equivalentes nesta situação (SZIBOR *et al.*,2003).

Em um estudo realizado por Silveira *et al.* (2007), quatro complexos casos de paternidade, compreendendo dois trios (mãe/filha/suposto pai) e duas duplas (filha/suposto pai), obtiveram baixo índice de concordância de paternidade devido à presença de uma suposta mutação paterna, permanecendo inconclusivos. Ao se analisar oito X-STRs, em todos os casos, os haplótipos paternos foram diferentes dos apresentados pelas filhas e os supostos pais foram excluídos como pais biológicos destas crianças. Assim, a aplicação dos X-STRs mostrou ser uma poderosa ferramenta na resolução de casos que apresentaram poucas inconsistências após análise de autossomos.

Caso um estupro ou incesto leve a vítima a engravidar, a gestação pode ser interrompida legalmente por aborto. Os X-STRs podem também ser aplicados nestes casos para determinação de paternidade com feto do sexo feminino. Após 6 a 8 semanas de gestação, quando procede-se o aborto legal, é muito difícil obter o material apenas do feto, recuperando-se, geralmente, uma mistura de material embrionário com sangue e outros tecidos maternos. Neste caso, apenas STRs autossomos e X-STRs podem ser utilizados, por tratar-se de um feto do sexo feminino, e a prova de paternidade recai sobre os alelos do embrião que não são compartilhados com a mãe. Como para os X-STRs o homem apresenta apenas um alelo, a análise destes é melhor que a dos autossomos, já que a probabilidade de se excluir um indivíduo falsamente acusado é maior (SZIBOR *et al.*, 2003).

Schmidtke *et al.* (2004) demonstraram o poder de X-STRs para solucionar um caso de suposto incesto, envolvendo uma jovem gestante, com dois supostos pais para seu bebê, hipótese 1: o próprio pai da moça, hipótese 2: o seu namorado. Não foi possível obter informações do pai da gestante, entretanto a situação foi resolvida coletando-se apenas material da gestante, da sua mãe e da vilosidade coriônica, durante o exame pré-natal. Naturalmente, a jovem possuía todo o genótipo do cromossomo X de seu pai. Caso este homem fosse o pai do bebê nenhum alelo além dos presentes na mãe apareceriam no feto. O resultado mostrou que 12 dos 16 marcadores X-STRs analisados apresentaram um alelo que não foi detectado no genótipo materno. Desta forma, a hipótese de incesto foi rejeitada.

Devido ao elevado número de casos de paternidade ilegítima na sociedade moderna, a identificação de cadáveres por teste de maternidade (mãe e filho(a)) é mais segura que o tradicional teste de paternidade (pai e filho(a)). Para os testes mães-filhas, os X-STRs são equivalentes aos autossomos; no entanto, para mães-

filhos, tais marcadores são extremamente eficientes, já que o filho possui apenas um alelo para cada X-STR e este deve obrigatoriamente estar presente na mãe. A chance de exclusão nesses casos é idêntica a dos testes pai-filha, de acordo com Toni *et al.* (2007). Embora a maternidade possa ser demonstrada por seqüências de DNA mitocondrial, esta técnica é cara e nem sempre oferece o nível de certeza requerido pela Ciência Forense. A tipagem de X-STRs representa uma ferramenta alternativa com boa sensibilidade para estes casos (SZIBOR *et al.*, 2003).

Mutações genômicas são comuns em locos de STRs autossomos (CHEN *et al.*, 2009). Essas mutações decorrem de deslizamento da DNA polimerase durante a replicação, ocorrendo ganho ou perda de números de repetições nos alelos. Sempre que incompatibilidade em um loco é observada é necessária a realização de um teste adicional, utilizando dados de outro marcador de DNA para resolver a incongruência entre os genótipos parentais e da prole. Nestes casos os marcadores mais utilizados em combinação com os STRs autossomos são regiões hipervariáveis do DNA mitocondrial (transmissão materna) e também STRs do cromossomo Y (transmissão paterna). Os marcadores do genoma mitocondrial são utilizados para resolver litígios de maternidade e os do cromossomo Y para resolver litígios de paternidade. Entretanto ambos marcadores possuem baixo poder de discriminação e a análise do DNA mitocondrial é demorada (PARSON *et al.*, 1998). A natureza altamente polimórfica dos STRs do cromossomo X e o simples procedimento analítico tem levado os pesquisadores a estudarem sua utilização para solucionar casos de paternidade e maternidade, quando há mutações nos STRs dos cromossomos autossomos. CHEN *et al.* (2009) demonstraram que a análise de X STRs é uma ferramenta útil nestas situações.

## 2.6 DESEQUILIBRIO DE LIGAÇÃO NOS X-STRs

Durante a meiose, para que haja a formação dos gametas, os cromossomos homólogos são separados e com isso os alelos de um determinado marcador também segregam, para que cada gameta possua metade da informação genética do indivíduo.

Quando os marcadores genéticos não estão em um mesmo cromossomo, estes são ditos não ligados e a segregação dos seus respectivos alelos ocorre de forma independente, de modo que os descendentes apresentam genótipos que respeitam as proporções mendelianas. Entretanto, quando os marcadores estão localizados em um mesmo cromossomo, como os STRs do cromossomo X, a segregação dos alelos pode não ser independente e a proporção genotípica irá depender da taxa de recombinação entre os marcadores (MARTINS, 2008a).

O processo de recombinação ocorre na meiose, entre os cromossomos homólogos pareados. Se dois locos estiverem situados em um mesmo cromossomo, mas separados por uma grande distância, a taxa de recombinação, entre os alelos desses locos, poderá ser tão grande que tudo se passará como uma segregação independente. Entre os locos pertencentes a um mesmo grupo de ligação é possível observar taxas de recombinação que variam desde zero (ligação absoluta), por ausência de permuta cromossômica durante a meiose, até igual ou superior a 50% (segregação independente) (BEIGUELMAN, 2008).

Para o cromossomo X o fenômeno da recombinação é limitado às meioses nos indivíduos femininos, já que nos homens o cromossomo X está em hemizigose (SZIBOR, 2007)

O desequilíbrio de ligação (DL) é um parâmetro estatístico que se refere à associação não randômica de alelos de diferentes locos e estima o desvio da frequência haplotípica em uma dada população em relação à frequência alélica esperada. Para marcadores com elevado desequilíbrio de ligação a frequência dos haplótipos não pode ser estimada pelas frequências alélicas, sendo necessário obter tal dado diretamente da população (SZIBOR, 2007).

Devido à peculiar herança do cromossomo X, na qual apenas 2/3 destes se recombinam a cada geração, DL pode ocorrer entre os STRs muito próximos, sendo necessário que o grau de ligação entre os marcadores sejam avaliados para a posterior utilização destes na prática forense (ROBINO *et al.*, 2006). Como os cromossomos X só podem se recombinar nas meioses das células germinativas femininas, o desequilíbrio de ligação dos X-STRs é maior que o dos STRs autossomos, pois a recombinação dos marcadores ligados se dá mais lentamente ao longo das gerações (BINI *et al.*, 2005).

Szibor *et al.* (2005) demonstraram que o uso de marcadores X-STRs com desequilíbrio de ligação, haplótipos, são úteis em exames de paternidade quando o

suposto pai é falecido, analisando-se o genótipo da mãe da criança e dos supostos pais. Neste trabalho foi relatada a investigação de paternidade da criança Nora, cujo suposto pai era falecido (Fig. 5). Foram utilizados três STRs (DXS6801, DXS6809, DXS6789) previamente estudados e definidos como marcadores ligados (EDELMANN *et al.*, 1999; HERING *et al.*, 2000; EDELMANN *et al.*, 2001a; EDELMANN *et al.*, 2001b; EDELMANN *et al.*, 2003a; EDELMANN *et al.*, 2003b; HERING *et al.*, 2004), os quais foram analisados na Sara (mãe de Nora) e em Jim e Joe (irmãos biológicos do suposto pai). No perfil alélico de Nora observam-se, em vermelho, os alelos recebidos da mãe e, em azul, os alelos herdados obrigatoriamente do pai biológico. Joe e Jim receberam os alelos, em estudo, da mãe deles (suposta avó), a qual também é mãe do suposto pai de Nora. Pode-se observar que os alelos de Jim são iguais ao de Joe para os marcadores DXS6801 e DXS6789, entretanto possuem alelos diferentes para o DXS6809. Isso porque a mãe deles possui dois cromossomos X em homozigose para os locos dos dois primeiros marcadores e heterozigose para o loco do último. No caso do DXS6809, cada um dos filhos recebeu um alelo diferente. Como os X-STRs analisados estão ligados, eles são herdados na forma de haplótipo (em bloco) com grande probabilidade de não ter ocorrido recombinação durante a formação dos gametas femininos. Logo, pode-se deduzir que a composição alélica de Jim representa um cromossomo X materno e a composição de Joe o outro cromossomo X materno. Dessa forma, o suposto pai de Nora possui perfil alélico para esses X-STRs igual ao do Jim ou ao do Joe e o transmitiria para a sua suposta filha. Analisando em Nora os alelos que estão em azul, percebe-se que eles não são iguais nem aos de Joe nem aos de Jim, assim há a exclusão da paternidade.

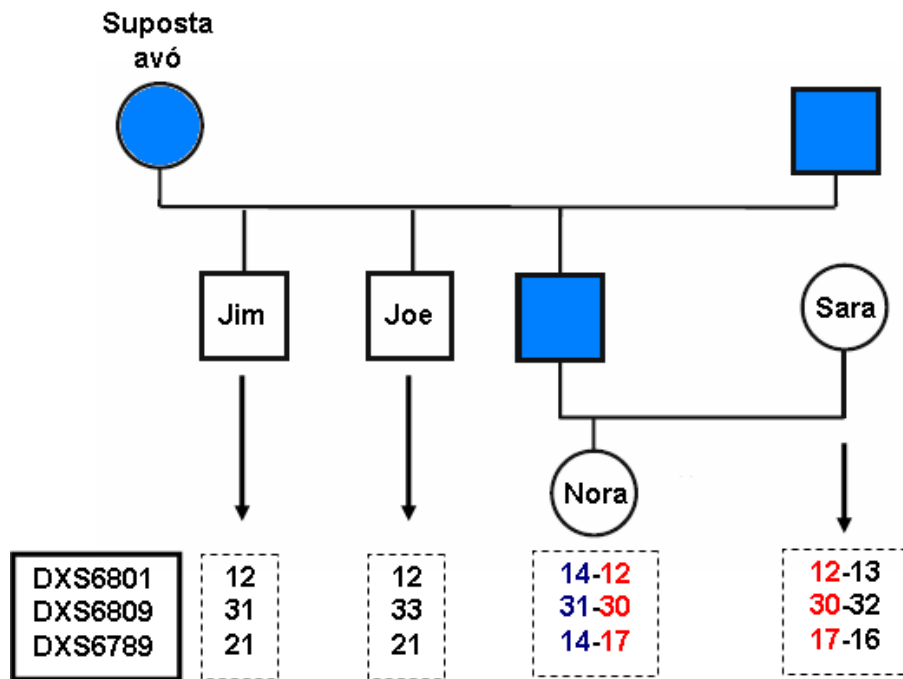


FIGURA 5: HEREDOGRAMA E PERFIS ALÉLICOS OBTIDOS EM UMA INVESTIGAÇÃO DE PATERNIDADE COM SUPOSTO PAI FALECIDO, UTILIZANDO HAPLÓTIPOS DE X-STRS. FONTE: SZIBOR *et al.*, 2005. Adaptado.

Diante dessa característica haplotípica, dois tipos de mapas do cromossomo X têm sido estabelecidos em genética: o mapa físico e o mapa genético. O mapa físico mostra a distância física (em mega pares de base - Mpb) entre os marcadores e é obtido através de um painel de células somáticas híbridas, criadas pela fusão entre uma célula humana de linfoblasto marcada com isótopo radioativo e uma célula de *hamster* não radioativa. O mapa genético, por sua vez, exibe a distância genética (em centimorgan - cM), a qual reflete a taxa de recombinação entre os marcadores, e é obtido pela análise do heredograma. Assim, a distância genética de 1 cM equivale a 1 recombinação esperada por 100 meioses e, geralmente, corresponde a distância física de 1Mb (NAGARAJA, 1998).

Szibor (2007) estabeleceu quatro possíveis grupos de ligação localizados em Xp22.2, Xq12, Xq26 e Xq28 no cromossomo X (Fig. 6). Devido a aspectos práticos, os STRs DXS8378, DXS7132, HPRTB, DXS7423 foram escolhidos para serem os centros desses grupos de ligação. Em tais grupos, marcadores muito próximos podem formar haplótipos que apresentam baixa taxa de recombinação durante a meiose. Para estes marcadores, se confirmada a ligação, o ideal é analisar o haplótipo como um todo em vez de seus constituintes alélicos.

A substituição de X-STRs individuais por haplótipos desses marcadores pode auxiliar na resolução de casos complexos de disputa de paternidade (SZIBOR,

2007). Entretanto, para que eles sejam utilizados apropriadamente são necessários estudos prévios sobre as frequências haplotípicas e o desequilíbrio de ligação na população em análise (SZIBOR *et al.*, 2006).

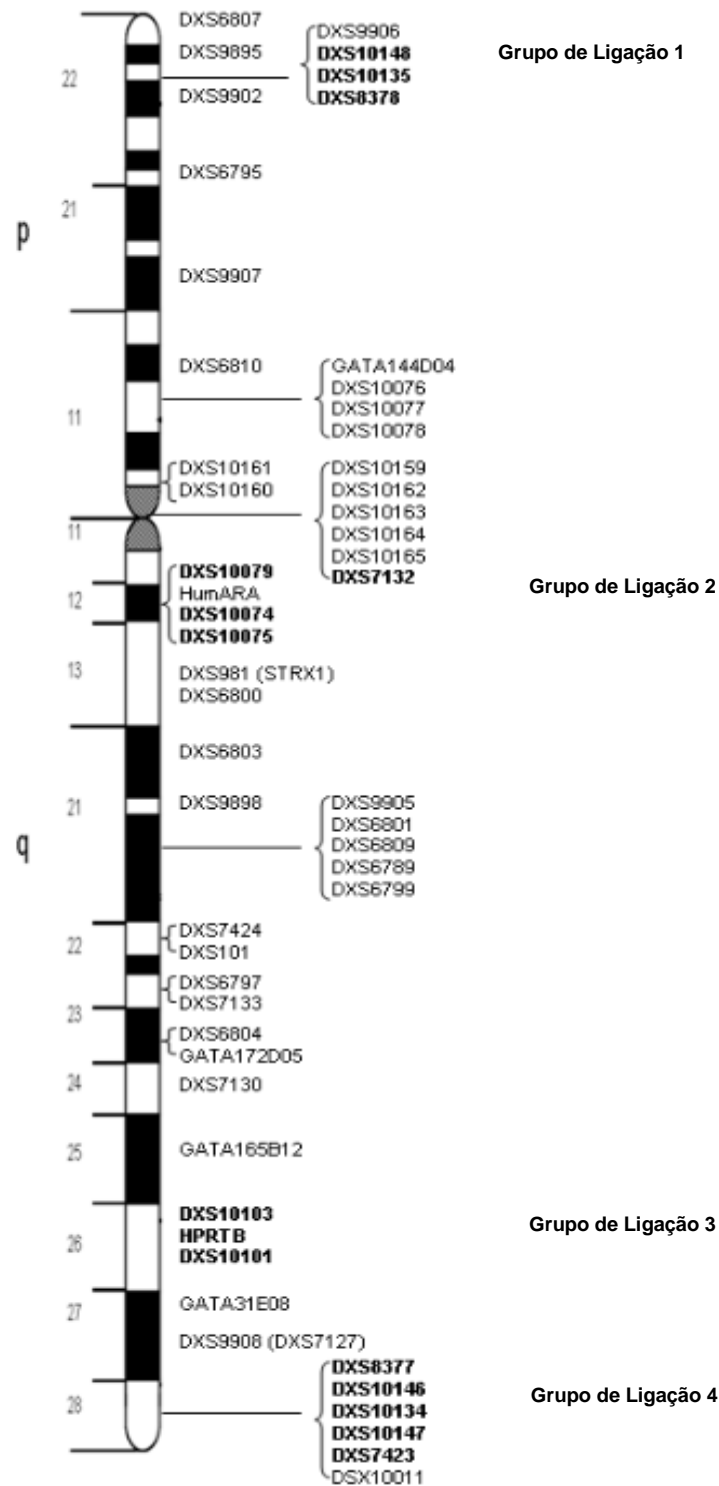


FIGURA 6: IDIOGRAMA DO CROMOSSOMO X, COM OS PRINCIPAIS STRS E A SUBDIVISÃO DOS GRUPOS DE LIGAÇÃO.

FONTE: Idiogram. <Disponível em: [http:// www.chrx-str.org](http://www.chrx-str.org)> Acesso em: 20 jul. 2010.



## 2.7 ESTUDOS POPULACIONAIS COM X-STRs

A distribuição da frequência alélica dos marcadores de DNA difere entre populações geograficamente separadas ou que apresentam origem distinta. Dessa forma, quando se deseja identificar um indivíduo proveniente de determinada população, é necessário o estudo prévio de diferentes marcadores naquela população para saber quais são os alelos presentes e em que frequência, a fim de se definir quais são os melhores marcadores a serem utilizados. (CHAKRABORTY *et al.*, 1999).

Devido ao grande potencial de contribuição dos cromossomos X em análises forenses, alguns marcadores estão sendo propostos para esta finalidade. Entretanto, antes desses locos serem usados como ferramenta forense é necessária a criação de um banco de frequências alélicas de referência (TABBADA *et al.*, 2005).

O potencial dos marcadores genéticos presentes nos autossomos, no cromossomo Y e no DNA mitocondrial tem sido amplamente explorado pela genética populacional e forense. No entanto, falta uma maior contribuição do cromossomo X, uma vez que apenas um número muito limitado de polimorfismos deste cromossomo foi descrito e bem caracterizado, e os dados populacionais existentes são escassos (SZIBOR *et al.* 2006). A maioria dos estudos com X-STRs foi realizada em populações asiáticas (SON *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; SHIN *et al.*, 2004; SHIN *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; ASAMURA *et al.*, 2006a; ASAMURA *et al.*, 2006b; GU *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2007; HOU *et al.*, 2007; SZIBOR, 2007; LIU *et al.*, 2008; TARIQ *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2009; SIM *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011) e europeias (HERING *et al.*, 2001; EDELMANN *et al.*, 2002; ZARRABEITIA *et al.*, 2002; EDELMANN *et al.*, 2003a; WIEGAND *et al.*, 2003; BINI *et al.*, 2005; EDELMANN *et al.*; 2005; SZIBOR *et al.*, 2005; POETSCH *et al.*, 2005; ROBINO *et al.*, 2006; ZARRABEITIA *et al.*, 2006; ALER *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2007; TURRINA *et al.*, 2007a; TURRINA *et al.*, 2007b; ZARRABEITIA *et al.*, 2007; BECKER *et al.*, 2008; FRACASSO *et al.*, 2008; HUNDERTMARK *et al.*, 2008; ZALÁN *et al.*, 2008; HEDMAN *et al.*, 2009.; ZARRABEITIA *et al.*, 2009; EDELMANN *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; LUCZAK *et al.*, 2011) enquanto poucos estudos em populações africanas (GOMES *et al.*, 2009; POETSCH *et al.*, 2009) e latino

americanas (CAINÉ *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2008b; PICO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2008; GUSMÃO *et al.*, 2009; LEITE *et al.*, 2009; MARTINS, J.A., 2009; CAINÉ *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2010a; MARTINS *et al.*, 2010b; RIBEIRO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; PENNA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Embora frequências alélicas para marcadores do cromossomo X de diferentes continentes tenham sido publicadas, existem poucos dados genético-populacionais a nível regional. Pesquisas nesta área são muito importantes por duas razões principais: (1) são necessárias informações para formar um banco de frequências alélicas de referência; (2) embora os locos possam estar relativamente próximos, sem estudos específicos, não é possível afirmar se eles apresentam ou não desequilíbrio de ligação. Esta informação é crítica no estudo forense, pois determina se os cálculos estatísticos serão feitos analisando individualmente cada loco ou em nível de haplótipo (ZARRABEITIA *et al.*, 2007).

O Brasil é caracterizado por cinco séculos de miscigenação entre europeus, africanos e ameríndios (LEITE *et al.*, 2009), apresentando uma população com proporções continentais. Entretanto, apesar do alto polimorfismo populacional poucos estudos foram publicados com dados de STRs do cromossomo X na população brasileira (CAINÉ *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2008b; RIBEIRO *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2008; GUSMÃO *et al.*, 2009; LEITE *et al.*, 2009; MARTINS, J.A., 2009; CAINÉ *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2010a; MARTINS *et al.*, 2010b; RIBEIRO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; PENNA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011).

## CAPÍTULO I

Os resultados e discussão serão apresentados, a seguir, na forma de artigo científico, o qual foi submetido ao periódico *International Journal of Legal Medicine*.

### **Genetic profile characterization of 10 X-STRs in a sample from Paraná, Brazil.**

L.D.G. Kobachuk<sup>a, b</sup>, M. Malaghini<sup>b</sup>, J. S. Silva<sup>a</sup>, L. Gusmão<sup>c</sup>, M.G. Bicalho<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística da Polícia Científica do Paraná, Curitiba (PR), Brasil.

<sup>c</sup> Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal.

### **Abstract**

There is an increasing interest in analysis of X chromosomal short tandem repeat (X-STR) polymorphisms, mainly due to their potential to efficiently complement other genetic markers (autosomal, Y-STR or mitochondrial). The present work reports the allele frequencies for ten X-STRs (DXS8378, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS9902, DXS6789, DXS7133, DXS7423, GATA172D05 and GATA31E08) in a sample of unrelated individuals (401 male and 399 female) from ten regions of Paraná in Brazil. No significant differences were observed for any loci between the ten regions analyzed as indicated by the exact test of population differentiation. Hardy-Weinberg equilibrium was tested in female samples, and no significant deviations were found. The linkage disequilibrium analysis did not reveal consistent evidence of association between the X-STRs used. Genetic diversity per locus ranged from 67% (DXS7133) to 82% (GATA172D05). A high overall power of discrimination was obtained for both female (0,99999999995) and male (0,9999994) samples, and a high probability of exclusion was observed in father/mother/daughter trios (99,9997%) and father/daughter duos (99,99%), demonstrating the usefulness

of this set of markers in forensic and kinship analysis. Genetic comparisons (pairwise genetic distances) revealed significant differences between the Paraná population and other populations from Asia and Africa and proximity to European and other Brazilian populations.

### **Keywords**

X chromosome, STRs, Human identification, Genetic population data, Paraná, Brazil

### **Introduction**

The genetic markers of choice in paternity investigations and forensic genetics are autosomal short tandem repeats (STRs), followed by Y chromosome STRs and mitochondrial DNA (mtDNA) [1]. Recently, interest in X chromosome STRs (X-STRs) has increased mainly because they combine desirable features of uniparental and autosomal genetic markers [2]. In some complex cases, independent of the number of polymorphisms being typed, autosomal markers convey very little information depending on the parentage constellation available for the analysis. This problem can sometimes be solved using markers with different modes of transmission; one option is X-STRs [3]. These markers are particularly interesting in some complex cases of biological relationships when the alleged father is not available, in father/daughter relationships (motherless cases), in father/mother/daughter trios, in maternity cases involving a son, in paternity cases involving blood relatives and in some other identification cases. In such instances, sufficient statistical power has to come from a small number of X-STRs. Due to their high power of exclusion (PE), X chromosome markers may be superior to autosomal markers in such contexts [4]. However, to interpret the results of DNA analysis in a forensic case, X chromosome markers need to be compared with a pertinent reference population [5]. The allele distribution of DNA markers often differs in geographically separated populations [6]. Nevertheless, studies are necessary on allele frequency distributions, mutation rates, and linkage disequilibrium in different populations to establish reference population databases [7].

Several X-STRs multiplex PCR systems have recently been validated for forensic use [6, 8-11]. Although a great variety of markers have been studied, few are common to different works. Recently, a decaplex system was developed and validated that was carried out by the Spanish and Portuguese-Speaking Working Group of the International Society For Forensic Genetics (GHEP-ISFG) working group [3], and data were presented for 15 Iberian and Latin American populations [1]. The present study aimed at the genetic characterization of the 10 X-STRs standardized by the GHEP-ISFG in ten regions of Paraná, Brazil and aimed to obtain significant data from this population.

## **Materials and methods**

### DNA samples

A total of 401 male and 399 female samples from unrelated subjects were selected from paternity cases performed in Laboratório de Genética Molecular Forense of Polícia Científica do Paraná. The samples were obtained by fingertip puncture, after signing of consent. The sample population was comprised of individuals from ten regions of Paraná: northwest (n=52), western central (n=28), north central (n=149), north pioneer (n=45), eastern central (n=51), west (n=92), southwest (n=38), south central (n=43), southeast (n=31), metropolitan (n=248) and 23 black people from all ten regions. The number of individuals selected from each region is proportional to the number of inhabitants, according to the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) census [12]. Genomic DNA was extracted from bloodstains using the Chelex method according to Lareu et al. [13]. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Division of Health Sciences, Federal University of Paraná.

### STR's genotyping

Amplification of the ten X-STR loci (DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA31E08, GATA172D05, DXS7423, DXS6809, DXS7132, DXS9902 and

DXS6789) was performed in a single PCR multiplex reaction using the protocol described by Gusmão et al. [3]. Separation and detection were performed in an ABI310 automated sequencer (Applied Biosystems) using the GS-600 LIZ size standard and POP 4 polymer (Applied Biosystems). Genotyping was performed by comparison with DNA control reference samples (9947A, 9948 and K562) and allelic ladders provided by the GHEP-ISFG collaborative study [3] using GeneMapper v3.1 software (Applied Biosystems).

### Statistical analysis

The allele frequencies, gene diversities, exact test of the Hardy-Weinberg equilibrium for female samples, pairwise exact test of linkage disequilibrium (LD) for male samples, population pairwise genetic distances ( $F_{ST}$ ) and pairwise exact test of population differentiation were calculated using ARLEQUIN software version 3.1 [14]. Because of the presence of intermediate alleles, we used the method based on the number of different alleles ( $F_{ST}$ ) to estimate genetic distances rather than the sum of squared size differences ( $R_{ST}$ ) as in Pereira et al. [15]. Statistics for forensic efficiency evaluation of each locus, namely, the expected probability of exclusion in trios involving daughters ( $PE_T$ ) and in father/daughter duos ( $PE_D$ ) and the power of discrimination in females ( $PD_F$ ) and in males ( $PD_M$ ), were computed according to Desmarais et al. [16].

## **Results and Discussion**

### Genetic variation

The exact test for population differentiation (significance level of 0,05) revealed no significant differences in allele distribution among the ten regions of Paraná analyzed and black people (Supplementary Table S1); therefore, the samples were pooled, and allele frequencies are presented in Table 1. Gene diversity (the same as power of discrimination in males;  $PD_M$  [15]) per locus varied between 67% for DXS7133 and 82% for GATA172D05, with the average diversity for

all markers being 76%. For a significance level of 0,005 (after the Bonferroni correction), no deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium were observed for any of the analyzed loci (Table 2). An allele not previously described was found in DXS6809 locus with a size corresponding to 34.1 repeats.

#### Forensic efficiency parameters

Forensic statistical parameters were calculated for each locus in the Paraná sample and are shown in Table 2. In our study, GATA172D05 was the most informative marker, and DXS7133 was the least informative. Overall, the power of discrimination was 0,99999999995 for females and 0,9999994 for males. The combined probability of exclusion was 0,999997 for trios and 0,99987 for duos. Most markers were more discriminative in Paraná than in other Brazilian [1, 3, 10, 11], Argentinean [17], Spanish [18], Asian [19, 20], Colombian [7], Portuguese [15] and German [21] populations. In contrast, these parameters were equal to or slightly higher in African populations [8] than in the Paraná population. In general, the X-STRs used in this work proved to be highly discriminating and therefore useful for forensic purposes.

#### Linkage disequilibrium (LD) analysis

For a significance level of 0,001 (after the Bonferroni correction for 45 comparisons), a significant  $p$  value was obtained only for GATA172D05-DXS7133 between alleles 13 and 8, respectively. Those loci occupied a physical distance of 4 Mb. However, LD does not depend exclusively on the physical distance between loci, but it may result from random genetic drift, founder effects, recent interethnic admixture, population stratification and sampling effects [1, 11, 22]. Therefore, the linkage disequilibrium that we detected might be spurious or due to sampling effects, corroborating the suggestion by Martins et al. [1]. Furthermore, Ribeiro-Rodrigues et al. [11] suggested that due to heterogeneity of Brazilian populations, recent interethnic admixture may be another likely explanation for the few significant pairwise linkage disequilibria observed.

### Comparisons between Brazilian populations

A pairwise population comparison between Paraná and populations with available data for the same markers studied in our sample [1, 3, 10, 11, 23] was performed at a single locus level ( $F_{ST}$  genetic distance analysis). The results (Supplementary Table S2) showed significant differences ( $p < 0,05$ ) for São Paulo (DXS8378, DXS6789 and DXS7133), Rio de Janeiro (DXS7133), Belo Horizonte (DXS7423 and DXS7133), Mato Grosso (GATA31E08), Santa Catarina (DXS9902 and GATA31E08), Rio Grande do Sul (DXS7423 and DXS9898), Belém (DXS9898, DXS7133, GATA31E08) and Amazonas (DXS7133 and GATA31E08) populations.

### Comparisons with worldwide populations

We had great difficulty comparing our data with those of other populations because only a small subset of previously studied markers was coincident with our 10 X-STRs. The  $F_{ST}$  test was performed on our data and those from populations from China [24], Japan [20], Korea [19], Italy [25], Germany [21], Hungary [26], Spain [18], Portugal [15], Ghana [27], Angola, Mozambique, Uganda [8], Argentina [17] and Colombia [7]. The results (Supplementary Table S3) revealed that Asian populations had the largest distances to Paraná, African populations were intermediate and Spain and Portugal were the closest.

In conclusion, in the Paraná population, the 10 X-STRs standardized by GHEP-ISFG satisfy the recommendations of the International Society for Forensic Genetics. They are in Hardy-Weinberg equilibrium, there are disequilibrium studies and the decaplex is highly informative. Hence, the database for this multiplex system could be used in forensic casework and kinship analysis.

**Acknowledgements** The authors would like to acknowledge the Universidade Federal do Paraná, the Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade and Polícia Científica do Paraná. This work was supported by the Fundação da Universidade Federal (FUNPAR)





**Table 2** Forensic parameters in Paraná, Brazil.

| X-STRs     | HE    | HO    | <i>p</i> -HWE | PE <sub>T</sub> | PE <sub>D</sub> | PD <sub>F</sub> | PD <sub>M</sub> |
|------------|-------|-------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| GATA31E08  | 0.813 | 0.794 | 0.556         | 0.788           | 0.667           | 0.939           | 0.814           |
| GATA172D05 | 0.828 | 0.825 | 0.434         | 0.795           | 0.676           | 0.943           | 0.820           |
| DXS7423    | 0.684 | 0.689 | 0.610         | 0.632           | 0.487           | 0.848           | 0.684           |
| DXS8378    | 0.689 | 0.682 | 0.931         | 0.631           | 0.484           | 0.843           | 0.693           |
| DXS6809    | 0.813 | 0.760 | 0.006         | 0.793           | 0.674           | 0.943           | 0.816           |
| DXS7132    | 0.778 | 0.779 | 0.204         | 0.741           | 0.609           | 0.915           | 0.775           |
| DXS9902    | 0.721 | 0.649 | 0.009         | 0.667           | 0.525           | 0.870           | 0.716           |
| DXS9898    | 0.795 | 0.799 | 0.854         | 0.764           | 0.636           | 0.927           | 0.794           |
| DXS6789    | 0.771 | 0.724 | 0.134         | 0.740           | 0.609           | 0.917           | 0.771           |
| DXS7133    | 0.666 | 0.667 | 0.742         | 0.609           | 0.463           | 0.830           | 0.671           |

*HE*: expected heterozygosity, *HO*: observed heterozygosity, *p*-*HWE*: *p* value for Hardy-Weinberg equilibrium test, *PE<sub>T</sub>*: probability of exclusion in trios involving daughters, *PE<sub>D</sub>*: probability of exclusion in father/daughter duos, *PD<sub>F</sub>*: power of discrimination in females, *PD<sub>M</sub>*: power of discrimination in males.

International Journal of Legal Medicine

GENETIC PROFILE CHARACTERIZATION OF 10 X-STRS IN A SAMPLE FROM PARANÁ, BRAZIL.

<sup>1,2</sup>Luciellen d'Avila Giacomel Kobachuk\*, <sup>2</sup>Marcelo Malaghini, <sup>1</sup>José Samuel da Silva, <sup>3</sup>Leonor Gusmão, <sup>1</sup>Maria da Graça Bicalho.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Genética Molecular Forense, Polícia Científica do Paraná, Curitiba, Brazil. <sup>3</sup>Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal.

**Supplementary Table S1** *p* values of the exact test for population differentiation.

|                        | <b>Western<br/>Central</b> | <b>Eastern<br/>Central</b> | <b>South<br/>Central</b> | <b>Metropolitan</b> | <b>Northwest</b> | <b>North<br/>Central</b> | <b>North<br/>Pioneer</b> | <b>West</b> | <b>Southeast</b> | <b>Southwest</b> |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|------------------|------------------|
| <b>Eastern Central</b> | 1.00000                    | -                          | -                        | -                   | -                | -                        | -                        | -           | -                | -                |
| <b>South Central</b>   | 1.00000                    | 1.00000                    | -                        | -                   | -                | -                        | -                        | -           | -                | -                |
| <b>Metropolitan</b>    | 0.82005                    | 0.64850                    | 0.73390                  | -                   | -                | -                        | -                        | -           | -                | -                |
| <b>Northwest</b>       | 1.00000                    | 1.00000                    | 1.00000                  | 0.76765             | -                | -                        | -                        | -           | -                | -                |
| <b>North Central</b>   | 0.71310                    | 0.65620                    | 0.64125                  | 0.18115             | 0.71635          | -                        | -                        | -           | -                | -                |
| <b>North Pioneer</b>   | 1.00000                    | 1.00000                    | 1.00000                  | 0.70525             | 1.00000          | 0.68870                  | -                        | -           | -                | -                |
| <b>West</b>            | 0.64970                    | 0.53380                    | 0.63915                  | 0.34420             | 0.44185          | 0.26165                  | 0.50605                  | -           | -                | -                |
| <b>Southeast</b>       | 1.00000                    | 1.00000                    | 1.00000                  | 0.77850             | 1.00000          | 0.73275                  | 1.00000                  | 0.58905     | -                | -                |
| <b>Southwest</b>       | 1.00000                    | 1.00000                    | 1.00000                  | 0.73940             | 1.00000          | 0.59245                  | 1.00000                  | 0.55810     | 1.00000          | -                |
| <b>Black People</b>    | 0.45045                    | 0.48685                    | 0.52670                  | 0.65315             | 0.54930          | 0.51790                  | 0.50495                  | 0.40955     | 0.44690          | 0.55815          |

\* Significant *p* value for a level of 0.05.

**Supplementary Table S2** Genetic distances between Paraná and Brazilian populations  
(1<sup>st</sup> row -  $F_{ST}$ ; 2<sup>nd</sup> row -  $p$  value)

|                                | DXS8378         | DXS6809 | DXS6789         | DXS7132 | DXS7133         | DXS7423         | DXS9898         | DXS9902         | GATA172D05 | GATA31E08       |
|--------------------------------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|-----------------|
| <b>São Paulo</b>               | <b>0.00416*</b> | 0.00242 | <b>0.00661*</b> | 0.00113 | <b>0.00588*</b> | 0.00015         | 0.00111         | 0.00039         | 0.00237    | 0.00008         |
| Martins et al., 2010           | <b>0.03604</b>  | 0.99099 | <b>0.00901</b>  | 0.22523 | <b>0.04505</b>  | 0.38739         | 0.18919         | 0.36937         | 0.99099    | 0.32432         |
| <b>Rio de Janeiro</b>          | 0.00153         | 0.00061 | 0.00274         | 0.00086 | <b>0.00853*</b> | 0.00022         | 0.00116         | 0.00190         | 0.00253    | 0.00104         |
| Martins et al., 2010           | 0.14414         | 0.49550 | 0.08108         | 0.28829 | <b>0.00000</b>  | 0.34234         | 0.70270         | 0.87387         | 0.10811    | 0.66667         |
| <b>Vitória</b>                 | 0.00148         | 0.00057 | 0.00148         | 0.00226 | 0.00006         | 0.00115         | 0.00084         | 0.00154         | 0.00038    | 0.00153         |
| Martins et al., 2010           | 0.66667         | 0.54054 | 0.81081         | 0.93694 | 0.33333         | 0.59459         | 0.60360         | 0.70270         | 0.51351    | 0.18018         |
| <b>Belo Horizonte</b>          | 0.00202         | 0.00115 | 0.00215         | 0.00224 | <b>0.00796*</b> | <b>0.09693*</b> | 0.00123         | 0.00171         | 0.00251    | 0.00135         |
| Martins et al., 2010           | 0.79279         | 0.23423 | 0.07207         | 0.10811 | <b>0.02703</b>  | <b>0.00000</b>  | 0.72973         | 0.23423         | 0.08108    | 0.18919         |
| <b>Mato Grosso</b>             | 0.00223         | 0.00092 | 0.00033         | 0.00008 | 0.00105         | 0.00257         | 0.00117         | 0.00030         | 0.00026    | <b>0.00452*</b> |
| Gusmão et al., 2009            | 0.15315         | 0.21622 | 0.27928         | 0.40541 | 0.62162         | 0.13514         | 0.76577         | 0.31532         | 0.26126    | <b>0.01802</b>  |
| <b>Goiás</b>                   |                 |         | 0.00192         | 0.00463 | 0.00312         | 0.00557         | 0.00156         |                 | 0.00168    | 0.00203         |
| Ribeiro-Rodrigues et al., 2011 | –               | –       | 0.20721         | 0.96396 | 0.24324         | 0.13514         | 0.31532         | –               | 0.28829    | 0.73874         |
| <b>Rio Grande do Sul</b>       |                 |         | 0.00102         | 0.00041 | 0.00168         | <b>0.00565*</b> | <b>0.00732*</b> |                 | 0.00166    | 0.00156         |
| Ribeiro-Rodrigues et al., 2011 | –               | –       | 0.79279         | 0.32432 | 0.80180         | <b>0.02703</b>  | <b>0.00901</b>  | –               | 0.89189    | 0.15315         |
| <b>Santa Catarina</b>          | 0.00273         | 0.00004 | 0.00096         | 0.00128 | 0.00040         | 0.00011         | 0.00015         | <b>0.07207*</b> | 0.00239    | <b>0.08752*</b> |
| Cainé et al., 2010             | 0.89189         | 0.41441 | 0.29730         | 0.63964 | 0.45946         | 0.36036         | 0.45946         | <b>0.00000</b>  | 0.11712    | <b>0.00000</b>  |
| <b>Ceará</b>                   |                 |         | 0.00299         | 0.00113 | 0.00207         | 0.00485         | 0.00491         |                 | 0.00101    | 0.00259         |
| Ribeiro-Rodrigues et al., 2011 | –               | –       | 0.14414         | 0.49550 | 0.62162         | 0.09009         | 0.07207         | –               | 0.57658    | 0.15315         |
| <b>Pernambuco</b>              |                 |         | 0.00344         | 0.00655 | 0.00523         | 0.00046         | 0.00400         |                 | 0.00360    | 0.00240         |
| Ribeiro-Rodrigues et al., 2011 | –               | –       | 0.71171         | 0.23423 | 0.66667         | 0.37838         | 0.61261         | –               | 0.70270    | 0.57658         |
| <b>Belém</b>                   |                 |         | 0.00187         | 0.00001 | <b>0.00466*</b> | 0.00058         | <b>0.01639*</b> |                 |            | <b>0.09114*</b> |
| Ribeiro-Rodrigues et al., 2008 | –               | –       | 0.11712         | 0.36036 | <b>0.04505</b>  | 0.45946         | <b>0.00000</b>  | –               | –          | <b>0.00000</b>  |
| <b>Amazonas</b>                |                 |         | 0.00119         | 0.00208 | <b>0.02531*</b> | 0.00147         | 0.00697         |                 | 0.00115    | <b>0.01083*</b> |
| Ribeiro-Rodrigues et al., 2011 | –               | –       | 0.53153         | 0.63063 | <b>0.00000</b>  | 0.51351         | 0.05405         | –               | 0.55856    | <b>0.00000</b>  |

\* Significant  $p$  value for a level of 0.05.

International Journal of Legal Medicine

GENETIC PROFILE CHARACTERIZATION OF 10 X-STRS IN A SAMPLE FROM PARANÁ, BRAZIL.

<sup>1,2</sup>Luciellen d'Avila Giacomel Kobachuk\*, <sup>2</sup>Marcelo Malaghini, <sup>1</sup>José Samuel da Silva, <sup>3</sup>Leonor Gusmão, <sup>1</sup>Maria da Graça Bicalho.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Genética Molecular Forense, Polícia Científica do Paraná, Curitiba, Brazil. <sup>3</sup>Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal.

**Supplementary Table S3** Genetic distances between Paraná and worldwide populations  
(1<sup>st</sup> row -  $F_{ST}$ ; 2<sup>nd</sup> row -  $p$  value)

|  | DXS8378                           | DXS6809                           | DXS6789                           | DXS7132            | DXS7133                           | DXS7423                           | DXS9898                           | DXS9902                           | GATA172D05                        | GATA31E08                         |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>CHINA</b><br>Kang & Li, 2006          | <b>0.33499*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 | <b>0.11582*</b><br><b>0.00000</b> | 0.01106<br>0.02703 | <b>0.05212*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.22511*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 | –                                 | –                                 | –                                 |
| <b>JAPAN</b><br>Asamura et al., 2006     | <b>0.06260*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 | <b>0.08059*</b><br><b>0.00000</b> | –                  | <b>0.11069*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.02978*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 | –                                 | –                                 | <b>0.08214*</b><br><b>0.00000</b> |
| <b>KOREA</b><br>Shin et al., 2005        | <b>0.25367*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 | <b>0.05712*</b><br><b>0.00000</b> | 0.00088<br>0.71171 | –                                 | <b>0.02121*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.05439*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.15130*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.02105*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.08718*</b><br><b>0.00000</b> |
| <b>SPAIN</b><br>Zarrabeitia et al., 2009 | 0.00015<br>0.27928                | 0.00022<br>0.30631                | <b>0.00400*</b><br><b>0.00000</b> | 0.00028<br>0.26126 | <b>0.00446*</b><br><b>0.04505</b> | 0.00147<br>0.13514                | 0.00271<br>0.06306                | 0.00117<br>0.89189                | <b>0.00287*</b><br><b>0.01802</b> | <b>0.00456*</b><br><b>0.00000</b> |
| <b>PORTUGAL</b><br>Pereira et al., 2007  | <b>0.00410*</b><br><b>0.02703</b> | 0.00117<br>0.14414                | <b>0.00403*</b><br><b>0.00901</b> | 0.00203<br>0.08108 | –                                 | 0.00042<br>0.20721                | <b>0.00954*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 | <b>0.00562*</b><br><b>0.00901</b> | –                                 |
| <b>ITALY</b><br>Bini et al., 2005        | –                                 | –                                 | <b>0.00296*</b><br><b>0.00901</b> | –                  | –                                 | <b>0.00577*</b><br><b>0.00901</b> | –                                 | –                                 | –                                 | –                                 |
| <b>GERMANY</b><br>Edelmann et al., 2001  | 0.00020<br>0.45946                | –                                 | <b>0.00301*</b><br><b>0.00901</b> | 0.00272<br>0.06306 | 0.00077<br>0.27027                | <b>0.27116*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.00822*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.08036*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.06388*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 |
| <b>HUNGARY</b><br>Zalán et al., 2007     | 0.00057<br>0.24324                | –                                 | –                                 | 0.00084<br>0.19820 | –                                 | <b>0.00671*</b><br><b>0.00901</b> | –                                 | –                                 | –                                 | –                                 |
| <b>GHANA</b><br>Poetsch et al., 2009     | 0.00357<br>0.05405                | –                                 | –                                 | 0.00024<br>0.37838 | <b>0.13634*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.04421*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.02178*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 | –                                 | –                                 |
| <b>ANGOLA</b><br>Gomes et al., 2007      | 0.01151<br>0.06306                | 0.00228<br>0.27027                | <b>0.05421*</b><br><b>0.00000</b> | 0.00069<br>0.41441 | –                                 | <b>0.03428*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.01041*</b><br><b>0.03604</b> | –                                 | <b>0.08215*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 |
| <b>MOZAMBIQUE</b><br>Gomes et al., 2007  | 0.00378<br>0.73874                | <b>0.02053*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.04536*</b><br><b>0.00000</b> | 0.00428<br>0.12613 | –                                 | <b>0.03620*</b><br><b>0.00000</b> | 0.00216<br>0.21622                | –                                 | <b>0.06220*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 |
| <b>UGANDA</b><br>Gomes et al., 2007      | 0.00339<br>0.20721                | <b>0.01374*</b><br><b>0.03604</b> | <b>0.06250*</b><br><b>0.00000</b> | 0.01703<br>0.05405 | –                                 | <b>0.02901*</b><br><b>0.00901</b> | 0.00853<br>0.15315                | –                                 | <b>0.03344*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 |
| <b>ARGENTINA</b><br>Bobillo et al., 2009 | <b>0.00661*</b><br><b>0.01802</b> | 0.00124<br>0.21622                | 0.00303<br>0.07207                | 0.00172<br>0.15315 | 0.00423<br>0.09910                | 0.00310<br>0.11712                | 0.00317<br>0.09910                | <b>0.09499*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.00832*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.09926*</b><br><b>0.00000</b> |
| <b>COLOMBIA</b><br>Pico et al., 2008     | <b>0.02014*</b><br><b>0.00000</b> | <b>0.00671*</b><br><b>0.00901</b> | <b>0.01372*</b><br><b>0.00000</b> | 0.00058<br>0.18919 | –                                 | 0.00452<br>0.07207                | <b>0.02269*</b><br><b>0.00000</b> | –                                 | <b>0.00490*</b><br><b>0.01802</b> | –                                 |

\* Significant  $p$  value for a level of 0.05.

International Journal of Legal Medicine

GENETIC PROFILE CHARACTERIZATION OF 10 X-STRS IN A SAMPLE FROM PARANÁ, BRAZIL.

<sup>1,2</sup>Luciellen d'Avila Giacomel Kobachuk\*, <sup>2</sup>Marcelo Malaghini, <sup>1</sup>José Samuel da Silva, <sup>3</sup>Leonor Gusmão, <sup>1</sup>Maria da Graça Bicalho.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Genética Molecular Forense, Polícia Científica do Paraná, Curitiba, Brazil. <sup>3</sup>Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal.

## References

- [1]Martins JÁ, Costa JC, Paneto GG, Figueiredo RF, Gusmão L, Sánchez-Diz P, Carracedo A, Cicarelli RMB (2010) Genetic profile characterization of 10 X-STRs in four populations of the southeastern region of Brazil. *Int J Leg Med* 124(5):427–432
- [2]Schaffner SF (2004) The X chromosome in population genetics. *Nat Rev Genet* 5:43–51
- [3]Gusmão L, Sánchez-Diz P, Alves C, Gomes I, Zarrabeitia MT, Abovich M, Atmetlla I, Bobillo C, Bravo L, Builes J, Cainé L, Calvo R, Carvalho E, Carvalho M, Cicarelli R, Catelli L, Corach D, Espinoza M, García O, Malaghini M, Martins J, Pinheiro F, Porto MJ, Raimondi E, Riancho JÁ, Rodríguez A, Rodríguez A, Cardozo AR, Schneider V, Silva S, Tavares C, Toscanini U, Vullo C, Whittle M, Yurrebaso I, Carracedo A, Amorim A (2009) A GEP–ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. *Int J Leg Med* 123:227–234
- [4]Szibor R (2007) X-chromosomal markers: past, present and future. *Forensic Sci Int Genet* 1:93–99
- [5]Zarrabeitia MT, Mijares V, Riancho JA (2007) Forensic efficiency of microsatellites and single nucleotide polymorphisms on the X chromosome. *Int J Leg Med* 121:433–437
- [6]Tabbada KA, Ungria MCA, Faustino LP, Athanasiadou D, Stradmann-Bellinghausen B, Schneider PM (2005) Development of a pentaplex X-chromosomal short tandem repeat typing system and population genetic studies. *Forensic Sci Int* 154: 173–180
- [7]Pico A, Castillo A, Vargas C, Amorim A, Gusmão L (2008) Genetic profile characterization and segregation analysis of 10 X-STRs in a sample from Santander, Colômbia. *Int J Leg Med* 122:347–351
- [8]Gomes I, Alves C, Maxzud K, Pereira R, Prata MJ, Sánchez-Diz P, Carracedo A, Amorim A, Gusmão L (2007) Analysis of 10 X-STRs in three African populations. *Forensic Sci Int Genet* 1:208–211
- [9]Robino C, Giolitti A, Gino S, Torre C (2006) Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 12 X-chromosomal STR loci in a northwestern Italian population sample. *Int J Leg Med* 120:315–318
- [10]Cainé LM, Zarrabeitia MT, Riancho JA, Pinheiro MF (2010) Genetic data of a Brazilian population sample (Santa Catarina) using an X-STR decaplex. *J Forensic Leg Med* 17:272-274
- [11]Ribeiro-Rodrigues EM, Palha TJBF, Bittencourt EA, Ribeiro-dos-Santos A, Santos S (2011) Extensive survey of 12 X-STRs reveals genetic heterogeneity among Brazilian populations. *Int J Leg Med* 125:445–452

- [12]IBGE Censo Demográfico (2000)  
<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=136&z=t&o=3>  
Accessed 11 January 2011
- [13]Lareu MV, Phillips CP, Carracedo A, Lincoln PJ, Syndercombe Court D, Thomson JA (1994) Investigation of the STR locus HUMTH01 using PCR and two electrophoresis formats: UK and Galician Caucasian population surveys and usefulness in paternity investigations. *Forensic Sci Int* 66:41–52
- [14]Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50
- [15]Pereira R, Gomes I, Amorim A, Gusmão L (2007) Genetic diversity of 10 X-chromosome STRs in northern Portugal. *Int J Leg Med* 121:192–197
- [16]Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, Perreault C, Busque L (1998) Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *J Forensic Sci* 43:1046–1049
- [17]Bobillo C, Sala A, Gusmão L, Corach D (2011) Genetic analysis of 10-STRs in Argentinian population. *Forensic Sci Int Genet* 5:e14-e16
- [18]Zarrabeitia MT, Pinheiro F, Pancorbo MM, Cainé L, Cardoso S, Gusmão L, Riancho J (2009) Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations. *Forensic Sci Int Genet* 3:63-66
- [19]Shin SH, Yu JS, Park SW, Min GS, Chung KW (2005) Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. *Forensic Sci Int* 147:35-41
- [20]Asamura H, Sakai H, Kobayashi K, Ota M, Fukushima H (2006) MiniX-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis. *Int J Leg Med* 120:174–181
- [21]Edelmann J, Hering S, Michael M, Lessig R, Deichsel D, Meier-Sundhausen G, Roewer L, Plate I, Szibor R (2001) 16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population. *Forensic Sci Int* 124:215–218
- [22]Chakravarti A (1999) Population genetics: making sense out of a sequence. *Nat Genet* 21:56–60
- [23]Ribeiro-Rodrigues EM, Leite FPN, Hutz MH, Palha TJBF, Santos AKCR, Santos SEB (2008) A multiplex PCR for 11 X chromosome STR markers and population data from a Brazilian Amazon region. *Forensic Sci Int Genet* 2:154–158
- [24]Kang L, Li S (2006) X-chromosome STR polymorphism of Luoba Ethnic Group Living in Tibet (SW China). *Forensic Sci Int* 156:88-90
- [25]Bini C, Ceccardi S, Ferri G, Pelotti S, Alu M, Roncaglia E, Beduschi G, Caenazzo L, Ponzano E, Tasinato P, Turchi C, Buscemi L, Mazzanti M, Tagliabracci A, Toni C, Spinetti I, Domenici R, Presciuttini S (2005) Development of a heptaplex PCR system

to analyse X-chromosome STR loci from five Italian population samples. A collaborative study. *Forensic Sci Int* 153:231–236

[26]Zalán A, Völgyi A, Jung M, Peterman O, Pamjav H (2006) Hungarian population data of four X-linked markers: DXS8378

[27]Poetsch M, El-Mostaqim D, Tschentscher F, Browne ENL, Timmann C, Horstmann RD, Wurmb-Schwark N (2009) Allele frequencies of 11 X-chromosomal loci in a population sample from Ghana. *Int J Legal Med* 123:81–83



### 3. DISCUSSÃO COMPLEMENTAR

A formação da população brasileira, e conseqüentemente do Paraná, é tri-híbrida devido à contribuição dos ameríndios, europeus e africanos. Até o descobrimento do Brasil, o Paraná era habitado por povos indígenas como os tupi-guaranis, caingangues e xoclengues. No século XVI grande parte do território paranaense pertencia à coroa espanhola e foi primeiramente colonizado pelos jesuítas, mais tarde o território passou a fazer parte de Portugal. Os escravos africanos começaram a ser utilizados no século XVIII e em 1798 seu número superava o dos índios. Na segunda metade do século XIX houve grande influxo de imigrantes europeus: italianos, alemães, poloneses e em menores quantidades os ingleses, franceses e suíços. A partir deste momento histórico o número de escravos diminuiu muito (WACHOWICZ, 1995). Diante dos fatos históricos, os dados obtidos neste trabalho e citados no capítulo I estão coerentes com a formação da população paranaense.

A Tabela Suplementar S2, capítulo I, apresentou valores de distância genética ( $F_{ST}$ ) entre a população paranaense e outras populações brasileiras. É importante evidenciar que houve diferença significativa entre as frequências alélicas de diversos locos da população do Estado do Paraná e as dos demais Estados comparados. Isso foi observado inclusive entre aqueles localizados geograficamente próximos ao Paraná, tais como: São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Este fato enaltece a importância de prévios estudos populacionais na região em que se deseja utilizar marcadores STRs para identificação humana.

Durante a discussão dos resultados, no capítulo I, foi mencionado que para interpretação dos dados estatísticos fez-se uso da correção de Bonferroni. Tal correção é utilizada por diversos autores em trabalhos com X-STRs (TABBADA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2007; PICO *et al.*, 2008; GUSMÃO *et al.*, 2009; ZARRABEITIA *et al.*, 2009; CAINÉ *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2010; PENNA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011) por ser um método eficiente para neutralizar o problema de múltiplas comparações realizadas simultaneamente. Essa correção é baseada no princípio de que enquanto um dado valor de alfa pode ser apropriado para cada comparação individual, não o é para o conjunto de todas as comparações. A fim de evitar vários falsos positivos, o valor de alfa deve ser

reduzido para contabilizar o número de comparações que estão sendo executadas. A correção de Bonferroni define o valor de alfa para todo o conjunto de  $n$  comparações, tomando o erro tipo I ( $\alpha$ ) e dividindo pelo número de comparações realizadas (WEISSTEIN, 2011).

Com relação aos parâmetros estatísticos, de interesse forense, apresentados no artigo é importante mencionar que segundo Butler (2005), os marcadores STRs para poderem ser utilizados na identificação humana devem possuir Poder de Discriminação superior a 90% e Heterozigose Observada superior a 70%. Porém, esses valores são para STRs localizados apenas em cromossomos autossomos. O cromossomo X possui distintas características genéticas dos autossomos, o que resulta em um comportamento populacional diferente. Isto é evidente na menor diversidade genética, pois a taxa de mutação em mulheres é menor que nos homens, além de só ocorrer recombinação em mulheres e o tamanho populacional efetivo no cromossomo X ser menor que nos autossomos (LANDER *et al.*, 2001). Desta forma, os parâmetros estatísticos de interesse forense devem ser analisados neste contexto, uma vez que não há valores de referência específicos para os STRs deste cromossomo.

O Poder de Discriminação, citado e discutido no capítulo I, corresponde à probabilidade de se escolher dois indivíduos ao acaso na população e estes apresentarem genótipos diferentes entre si (MARTINS, 2008a). O poder de discriminação é menor em homens, porque esses apresentam apenas um cromossomo X, enquanto as mulheres dois. Já o Poder de Exclusão em Trios ( $PE_T$ ) indica, em um trio mãe, filha e suposto pai, a probabilidade de um indivíduo qualquer da população e não relacionado à criança ser excluído da paternidade. O mesmo raciocínio é válido para o Poder de Exclusão em Duos ( $PE_D$ ), porém nesta situação tem-se apenas o suposto pai e a filha (MARTINS, 2008a).

Os dados de Poderes de Discriminação e Exclusão dos dez X-STRs obtidos neste trabalho foram comparados com os dados de outras populações disponíveis na literatura (EDELDMANN *et al.*, 2001; SHIN *et al.*, 2005; ASAMURA *et al.*, 2006; KANG & LI, 2006; GOMES *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2007; ZALÁN *et al.*, 2007; PICO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008; GUSMÃO *et al.*, 2009; POETSCH *et al.*, 2009; ZARRABEITIA *et al.*, 2009; CAINÉ *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2010; BOBILLO *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011). Todos os valores dos dez locos X-

STRs da população do Estado do Paraná ficaram entre os melhores dados já descritos e o loco DXS9902 obteve o maior valor entre todos os comparados.

Segundo a Sociedade Internacional de Genética Forense, para que um marcador STR possa ser utilizado na prática forense é necessário que ele esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população em que será utilizado. (SZIBOR *et al.*, 2003). Uma população que está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg possui as frequências gênicas inalteradas e as proporções genóticas em um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo. Desta forma, pode-se determinar a proporção dos diferentes genótipos presentes na população a partir das frequências alélicas encontradas. (BEIGUELMAN, 1995). Foi verificado, conforme citado no capítulo I que todos os marcadores estudados na população do Paraná estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Por conseguinte essa pesquisa fornece informações sobre a população do Paraná, com relação ao decaplex de X-STRs apresentados, disponibilizando uma nova ferramenta que poderá ser utilizada na prática forense e em casos civis de paternidade.

Durante este estudo foi identificado um alelo microvariante ainda não descrito na literatura, o alelo microvariante 34.1 do loco DXS6809. Como continuidade deste trabalho será realizado o seqüenciamento deste, a fim de caracterizá-lo a nível molecular e introduzi-lo na literatura.

#### 4. CONCLUSÕES

Após o desenvolvimento deste estudo é possível concluir que:

- Estão disponíveis para uso forense as frequências alélicas da população do Estado do Paraná para o decaplex de X-STRs padronizados pelo GHEP-ISFG (DXS8378, DXS9902, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS6789, DXS7133, GATA172D05, GATA31E08 e DXS7423);
- Na população do Estado do Paraná os dez marcadores estudados respeitam as recomendações da Sociedade Internacional de Genética Forense. Todos estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, há estudos de desequilíbrio de ligação e esses marcadores apresentam elevado Poder de Discriminação e Exclusão. Logo, poderão ser utilizados na prática forense;
- Após comparação dos dados obtidos neste trabalho com os de outras populações mundiais verificou-se que o sistema multiplex aplicado na população do Estado do Paraná ficou entre os melhores apresentados na literatura.

## REFERÊNCIAS

ALER, M.; SÁNCHEZ-DIZ, P.; GOMES, I.; GISBERT, M.; CARRACEDO, A.; AMORIM, A.; GUSMAO, L. Genetic data of 10 X-STRs in Spanish population sample. **Forensic Science International**, v. 173, p. 193-196, 2007.

ASAMURA, H.; SAKAI, H.; KOBAYASHI, K.; OTA, M.; FUKUSHIMA, H. Japanese population data for eight X-STR loci using two new quadruplex systems. **International Journal of Legal Medicine**, v. 120, p. 303-309, 2006a.

ASAMURA, H.; SAKAI, H.; KOBAYASHI, K.; OTA, M.; FUKUSHIMA, H. Mini X-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis. **International Journal of Legal Medicine**, v. 120, p. 174-181, 2006b.

BACHER, J.W.; HENNES, L.F.; GU, T.; TEREBA, A.; MICKA, K.A.; SPRECHER, C.J.; LINS, A.M.; AMIOTT, E.A.; RABBACH, D.R.; TAYLOR, J.A.; HELMS, C.; DONIS-KELLER, H.; SCHUMM, J.W. **Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Identification**. Madison; Wisconsin: Promega Corporation, p. 24-37, 1999.

BECKER, D.; RODIG, H.; AUGUSTIN, C.; EDELMANN, J. GÖTZ, F.; HERING, S; SZIBOR, R.; BRABETZ, W. Population genetic evaluation of eight X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit. **Forensic Science International**, v. 2, p. 69-74, 2008.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. 2ª ed. Ribeirão Preto: Editora SBG, p.95 e 179-180, 1995.

BEIGUELMAN, B. **A interpretação genética da variabilidade humana**. 1ªed. Ribeirão Preto: Editora SBG, p.48-49, 2008.

BINI, C.; CECCARDI, S.; FERRI, G.; PELOTTI, S.; ALÙ, M.; ROCANGLIA, E.; BEDUSCHI, G.; CAENAZZO, L.; PONZANO, E.; *et al.* Development of a heptaplex PCR system to analyse X-chromosome STR loci from five Italian population samples: a collaborative study. **Forensic Science International**, v.153, p.231-236, 2005.

BOBILLO, C.; SALA, A.; GUSMÃO, L.; CORACH, D. Genetic analysis of 10 X-STR in Argentinian population. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, p. 14-16, 2011.

BUDOWLE, B.; DAAL, A.V. Forensically relevant SNP classes. **Biotechniques**, v.44, p.603-610, 2008.

BUTLER, J.M. **Forensic DNA typing**. 2nd ed. San Diego: Academic Press; cap. 1, p.1-13, cap.2, p. 23-30, cap.3, p. 42-45, cap. 5, p. 85-92, cap.12, p. 318-322, 2005.

CAINÉ, L.M.; PONTES, L. ; ABRANTES, D.; LIMA, G.; PINHEIRO, F. Genetic data of four X-chromosomal STRs in a population sample of Santa Catarina; Brazil. **Journal of Forensic Science**, v. 52, p. 502-503, 2007.

CAINÉ, L.M.; ZARRABEITIA, M.T.; RIANCHO, J.A.; PINHEIRO, M.F. Genetic data of a Brazilian population sample (Santa Catarina) using an X-STR decaplex. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 17, p. 272-274, 2010.

CALABREZ, M.C.T. **Influência do calor na análise de DNA extraído de sangue e tecidos humanos: importância para a identificação de corpos carbonizados**. 1999. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

CANN, RL; STONEKING, M.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature**, v. 325, p. 31-36, 1987.

CHAKRABORTY, R.; STIVER, D.N.; SU, B.; ZHONG, Y.; BUDOWLE, B. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1682-1696, 1999.

CHEN, M-Y; PU, C-E. Population data on the X chromosome short tandem repeat loci DXS10011; DXS101; DXS6789; DXS7132; DXS8377 and DXS9895 in Taiwan. **Forensic Science International**, v. 146, p. 65-67, 2004.

CHEN, D-P.; TSENG, C-P.; TSAI, S-H.; WANG, M-C.; LU, S-C.; WU, T-L.; CHANG, P-Y.; SUN, C-F. Use of X-linked short tandem repeats loci to confirm mutations in parentage caseworks. **Clinica Chimica Acta**, v. 408, P. 29-33, 2009.

CHOW, J.C.; YEN, Z.; ZIESCHE, S.M.; BROWN, C.J. Silencing of the mammalian X chromosome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 6, p. 69–92, 2005.

Del-Campo ERA. **Medicina legal**. 2. ed. São Paulo: Saraiva, cap.3, p. 57-99, 2006.

DESMARAIS, D.; ZHONG, Y.; CHAKRABORTY, R.; PERREAULT, C.; BUSQUE, L. Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). **Journal of Forensic Science**, v. 43, p. 1046-1049, 1998.

EDELMANN, J.; SZIBOR, R. Validation of the HumDXS6807 short tandem repeat polymorphism for forensic application. **Electrophoresis**, v. 20, p. 2844-2846, 1999.

EDELMANN, J.; DEISCHEL, D.; MEIER-SUNDHAUSEN, G.; ROEWER, L.; PLATE, I.; SZIBOR, R. 16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population. **Forensic Science International**, v.124, p. 215-218, 2001a.

EDELMANN, J.; SZIBOR, R. A highly polymorphic X-linked STR. **International Journal of Legal Medicine**, v.114, p. 301-304, 2001b.

EDELMANN, J.; HERING, S.; KUHLSCH, E.; SZIBOR, R. Validation of the STR DXS7424 e the linkage situation on the X-chromosome. **Forensic Science International**, v. 125, p. 217-222, 2002.

EDELMANN, J.; DEISCHEL, D.; PLATE, I.; KASER, M.; SZIBOR, R. Validation of the X chromosomal STR DXS6809. **International Journal of Legal Medicine**, v. 117, p. 241-244, 2003a.

EDELMANN, J.; SZIBOR, R. The X-linked STRs DXS7130 and DXS6803. **Forensic Science International**, v.136, p. 73-75, 2003b.

EDELMANN, J.; SZIBOR, R. Validation of the X-linked STR DXS6801. **Forensic Science International**, v. 148, p. 219-220, 2005.

EDELMANN, J.; HERING, S.; AUGUSTIN, C.; KALIS, S.; SZIBOR, R. Validation of six closely linked STRs located in the chromosome X centromere region. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, p. 83-87, 2010.

EDWARDS, A.; HAMMOND, H.A.; JIN, L.; CASKEY, C.T.; CHAKRABORTY, R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics**, v. 12, p. 241-253, 1992.

ELLIS, N.; GOODFELLOW, P.N. The mammalian pseudoautosomal region. **Trends in Genetics**, v.5, p.406-410, 1989.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FRACASSO, T.; SCHURENKAMP, M.; BRINKMANN, B.; HOHOFF, C. An X-STR meiosis study in Kurds and Germans: allele frequencies and mutation rates. **International Journal of Legal Medicine**, v. 122, p. 353-356, 2008.

FRANÇA, G.V. **Medicina Legal**. 6. ed.; Rio de Janeiro; Guanabara-Kogan, cap. 3, p.32-63, 2001.

GAO, S.; QIAO, K.; RAKHA, A.; LAI, J.; LI, S. Allele frequencies for 10 X-STR loci in Nu population of Yunnan, China. **Legal medicine**, v. 9, p. 284-286, 2007.

GLASS, RT. Body identification by forensic dental means. **General Dentistry**, v. 50, p. 34-38, 2002.

GOMES, I.; PRINZ, M.; PEREIRA, R.; MEYERS, C.; MIKULASOVICH, R.S.; AMORIM, A.; CARRACEDO, A.; GUSMÃO, L. Genetic analysis of three US population groups using na X-chromosomal STR decaplex. **International Journal of Legal Medicine**, v.121, p. 198 – 203, 2007.

GOMES, I.; PEREIRA, V.; GOMES, V.; PRATA, M.J.; PINTO, N.; CARRACEDO, A.; AMORIM, A.; GUSMÃO, L. The Karimojong from Uganda: Genetic Characterization using an X-STR decaplex system. **Forensic Science International Gentic**s, v. 3, p. 127-128, 2009.

GOUDET, J.; RAYMOND, M.; DE-MEEUS, T.; ROUSSET, F. Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, v. 144, p. 1933-1940, 1996.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. **Introdução à Genética**. 9. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2009.

GU, S.; LI, S. X-chromosome STRs analysis of Ewenke ethnic population. **Forensic Science International**, v. 158, p. 72-75, 2006.

GUSMÃO, L.; SÁNCHEZ-DIZ, P.; ALVES, C.; GOMES, I.; ZARRABEITIA, M.T.; ABOVICH, M.; ATMETLLA, I.; BOBILLO, C.; *et al.* A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. **International Journal of Legal Medicine**, v. 123, p. 227-234, 2009.

HARRIS, EE. & HEY, J. X chromosome evidence for ancient human histories. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, p. 3320-3324, 1999.

HEARNE, C.M.; TODD, J.A. Tetranucleotide repeat polymorphism at the HPRT locus. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 5450, 1991.

HEDMAN, M.; PALO, J.U.; SAJANTILA, A. X-STR diversity patterns in the Finnish and the Somali population. **Forensic Science International**, v. 3, p. 173-178, 2009.

HERING, S.; SZIBOR, R. Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker DXS9898 for forensic purposes. **Forensic Science International**, v. 45, p. 929-931, 2000.

HERING, S.; KUHLISCH, E.; SZIBOR, R. Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker HumDXS6789 for forensic purposes. **Forensic Science International**, v. 119, p. 42-46, 2001.

HERING, S.; BRUNDIRS, N.; KUHLISCH, E.; EDELMANN, J.; PLATE, I.; BENECKE, M.; VAN, P.H.; MICHAEL, M.; SZIBOR, R. DXS10011: studies on structure; allele distribution in three populations and genetic linkage to further q-telomeric chromosome X markers. **International Journal of Legal Medicine**, v. 118, p. 313-319, 2004.

HOU, Q.F.; YU, B.; LI S.B. Genetic Polymorphisms of nine X-STR loci in four population groups from Inner Mongolia; China. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 5, p. 59-65, 2007.

HUNDERTMARK, T.; HERING, S.; EDELMANN, J.; AUGUSTIN, C.; PLATE, I.; SZIBOR, R. The STR cluster DXS10148-DXS8378-DXS10135 provides a powerful tool for X-chromosomal haplotyping at Xp22. **International Journal of Legal medicine**, v. 122, p. 489-492, 2008.

**IBGE. Censo Demográfico 2000**, <Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=136&z=t&o=3>> Acesso em: 11 jan. 2011.

**IDIOGRAM**. <Disponível em: [http:// www.chrx-str.org](http://www.chrx-str.org)> Acesso em: 20 jul. 2010.



JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. **Nature**, v.314, p.67-73, 1985.

JORDE, L.B.; WATKINS, W.S.; BAMSHAD, M.J. Population genomics: a bridge from evolutionary history to genetic medicine. **Human Molecular Genetics**, v.10, p. 2199-2207, 2001.

KANG, L.; LI, S. X-chromosome STR polymorphism of Luoba ethnic group living in Tibet (SW China). **Forensic Science International**, v. 156, p. 88-89, 2006.

KRUGLYA, L.; NICKERSON, D. Variation in the spice of life. **Nature Genetics**, v.27, p.234-236, 2001.

LANDER, E.S.; LINTON, L.M.; BIRREN, B.; *et al.*. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p.860–921, 2001.

LEE, H.Y.; PARK, M.J.; JEONG, C.K.; LEE, S.Y.; YOO, J-E; CHUNG, U.; CHOI, J.H.; KIM, C.Y.; SHIN, K.J. Genetic characteristics and population study of 14 X-chromosomal STRs in Koreans: evidence for a null allele at DXS9898. **International Journal of Legal Medicine**, v. 118, p. 355-360, 2004.

LEITE, F.P.N.; SANTOS, S.E.B.; RODRIGUEZ, E.M.R.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; DEMARCHI, D.A.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L.; SALZANO; F.M.; HUTZ; M.H. Linkage disequilibrium patterns and genetic structure of Amerindian and Non-Amerindian Brazilian populations revealed by long-range X- STR markers. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 139, p. 404-412, 2009.

LI, H.; TANG, H.; ZHANG, Q.; JIAN, Z.; BAI, J.; CHANG, S. A multiplex PCR for 4 X chromosome STR markers and population data from Beijing Han ethnic group. **Legal Medicine**, v. 11, p. 248-250, 2009.

LIU, Q.; LI, S. Patterns of genetic polymorphisms at the 10 X-chromosome STR loci in Mongol population. **Forensic Science International**, v. 158, p. 76-79, 2006.

LIU, Q.L.; LV, D.J.; WU, X.L.; SUN, H.Y.; WU, X.Y.; LU, H.L. Development of a five ChX STRs loci typing system. **International Journal of Legal Medicine**, v.122, p. 261-265, 2008.

LUCOTTE, G.; GUÉRIN, P.; HALLÉ, L.; LOIRAT, F.; HAZOUT, S. Y Chromosome DNA Polymorphisms in two African Populations. **American Journal of Human Genetics**, v. 45, p.16-20, 1989.

LUCZAK, S.; ROGALLA, U.; MALVARCHUK, B.A.; GRZYBOWSKI, T. Diversity of 15 human X chromosome microsatellite loci in Polish population. **Forensic Science International**, v.3, p. 71-77, 2011.

MAHTANI, M.M.; WILLARD, H.F. A polymorphic X-linked tetranucleotide repeat locus displaying a high rate of new mutation: implications for mechanisms of mutation at short tandem repeat loci. **American Journal of Human Genetics**, v. 2, p. 431-437, 1993.

MARTINS, J.A. **Estudo de frequências alélicas de STRs do cromossomo X na população brasileira de Araraquara, SP.** 122f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araraquara, 2008a.

MARTINS, J.A.; SILVA, R.H.A.; FRESCHI, A.; PANETO, G.G.; OLIVEIRA, R.N.; CICARELLI, R.M.B. Population genetic data of Five X-chromosomal loci in Bauru (São Paulo; Brazil). **Forensic Science International**, v. 1, p. 155-156, 2008b.

MARTINS, J.A.; COSTA, J.C.; PANETO, G.G.; GUSMÃO, L.; SÁNCHEZ-DIZ, P.; CARRACEDO, A.; CICARELLI, R.M.B. Genetic data of 10 X-chromosomal loci in Vitoria population (Espírito Santo State; Brazil). **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 2, p. 394-395, 2009.

MARTINS, J.A.; SILVA, R.H.A.; FRESCHI, A.; PANETO, G.G.; OLIVEIRA, R.N.; CICARELLI, R.M.B. X-chromosome genetic variation in São Paulo State (Brazil) population. **Annals of Human Biology**, v. 37, p. 598-603, 2010a.

MARTINS, J.A.; COSTA, J.C.; PANETO, G.G.; FIGUEIREDO, R.F.; GUSMÃO, L.; SÁNCHEZ-DIZ, P.; CARRACEDO, A.; CICARELLI, R.M.B. Genetic profile characterization of 10 X-STRs in four populations of the southeastern region of Brazil. **International Journal of Legal Medicine**, DOI 10.1007/s00414-010-0478-9 2010b.

MORENO, M.A.; BUILES, J.J.; JARAMILLO, P.; ESPINAL, C.; AGUIRRE, D.; PANCORBO, M.M.; GUSMÃO, L.; BRAVO, M.L.J. Validation of five X – chromosomal STRs DXS6800; DXS6807; DXS6798; DXS8377; and DXS7423 in an Antioquin population sample. **Progress in Forensic Genetics, 11. International Congress Series 1288.** Elsevier, Amsterdam, p. 295-297, 2006.

NACHMAN, M.W.; BAUER, V.L.; CROWELL, S.L.; AQUADRO, C.F. DNA variability and recombination rates at X-linked loci in humans. **Genetics**, v. 150, p. 1133-1141, 1998.

NAGARAJA, R.; MACMILLAN, S.; JONES C.; MASISI, M.; PENGUE, G.; PORTA, G.; MIAO, S.; CASAMASSINI, A.; D'URSO, M.; BROWNSTEIN, B. Integrated YAC/STS physical and genetic map of 22.5 Mb of human Xq24–q26 at 56-kb inter-STS resolution. **Genomics**, v.52, p.247–266, 1998.

**NCBI MAP VIEWER.** <Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=X>> Acesso em: 11 Ago. 2010.

OTTO PG, OTTO PA, FROTA-PESSOA, O. **Genética Humana e Clínica.** 2. Ed. São Paulo, ROCA, 2004.

PARSON, W.; PARSONS, T.J.; SCHEITHANER, R.; HOLLAND, M.M. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. **International Journal of Legal Medicine**, v. 11, p. 124-132, 1998.

PENNA, L.S.; SILVA, F.G.; SALIM, P.H.; EWALD, G.; JOBIM, M.; MAGALHÃES, J.A.A.; JOBIM, L.F. Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 14 X-chromosomal STR loci in a southern Brazilian population sample. **International Journal of Legal Medicine**, 2011.

PEREIRA, R.; GOMES, I.; AMORIM, A.; GUSMÃO, L. Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in northern Portugal. **International Journal of Legal Medicine**, v. 121, p. 192-197, 2007.

PICO, A.; CASTILLO, A.; VARGAS, C.; AMORIM, A.; GUSMÃO, L. Genetic profile characterization and segregation analysis of 10 X-STRs in a sample from Santander; Colombia. **International Journal of Legal Medicine**, v.122, p. 347-351, 2008.

POETSCH, M.; PETERSMANN, H.; REPENNING, A.; LIGNITZ, E. Development of two pentaplex systems with X-chromosomal STR loci and their allele frequencies in a northeast German population. **Forensic Science International**, v. 155, p. 71-76, 2005.

POETSCH, M.; EL-MOSTAQIM, D.; TSCHENTSCHER, F.; BROWNE, E.N.; TIMMANN, C.; HORSTMANN, R.D.; VON WURMB-SCHWARK, N. Allele frequencies of 11 X-chromosomal loci in a population sample from Ghana. **International Journal of Legal Medicine**, v. 123, p. 81-83, 2009.

**Projeto Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos.** A Implantação do CODIS (*Combined DNA Index System*) no Brasil, 2009.

RELATION TESTING STANDARDS PROGRAM UNIT. **Annual Report Summary for Testing in 2008.**

REYNOLDS, J.; WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, v. 105, p. 767-779, 1983.

RIBEIRO, E.M.; LEITE, F.P.N.; HUTZ, M.H.; PALHA, T.J.B.F.; SANTOS, A.K.C.R.; SANTOS, S.E.B. A multiplex PCR for 11 X chromosome STR markers and population data from a Brazilian Amazon Region. **Forensic Science International: Genetics**, v. 2, p. 154-158, 2008.

RIBEIRO, E.M.; PALHA, T.J.B.F.; SANTOS, A.K.C.R.; SANTOS, S.E.B. Genetic data of twelve X-STRs in Japanese immigrant population resident in Brazil. **Forensic Science International: Genetics**, v. 4, p. e57-e58, 2010.

RIBEIRO, E.M.; PALHA, T.J.B.F.; BITTENCOURT, E.A.; RIBEIRO, A.S.; SANTOS, S. Extensive survey of 12 X-STRs reveals genetic heterogeneity among Brazilian populations. **International Journal of Legal Medicine**, v.3, p. 445-52, 2011.

ROBINO, C.; GIOLITTI, A.; GINO, S.; TORRE, C. Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 12 X-chromosomal STR loci in a northwestern Italian population sample. **International Journal of Legal Medicine**, v.120, p.315-318, 2006.

ROSS, M.T.; GRAFHAN, D.V.; COFFEY, A.J.; SCHERER, S.; MCLAY, K.; MUZNY, D.; *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. **Nature**, v. 434, p. 325-327, 2005.

SCHAFFNER, S.F. The X chromosome in population genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 43-51, 2004.

SCHMIDTKE, J.; KUHNAL, K.; WAND, D.; EDELMANN, J.; SZIBOR, R.; KRAWCZAK, M. Prenatal exclusion without involving the putative fathers of an incestuous father-daughter parenthood. **Prenatal Diagnosis**, v. 24, p. 662-664, 2004.

SHIN, K-J; KWON, B-K; LEE, S-S. YOO, J-E; PARK, M.J.; CHUNG, U.; LEE, H.Y.; HAN, G.R.; CHOI, J.H.; KIM, C.Y. Five highly informative X-chromosomal STRs in Koreans. **International Journal of Legal Medicine**, v. 118, p. 37-40, 2004.

SHIN, S.H.; YU, J.S.; PARK, S.W.; MIN, G.S.; CHUNG, K.W. Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. **Forensic Science International**, v.147, p. 35-41, 2005.

SILVA, F.; PEREIRA, R.; GUSMÃO, L.; SANTOS, C.; AMORIM, A.; PRATA, M.J.; BETTENCOURT, C.; LOURENÇO, P.; LIMA, M. Genetic profiling of the Azores Islands (Portugal): data from 10 X-chromosome STRs. **American Journal of Human Genetics**, v. 22, p.221-223, 2010.

SILVA, I.H.F.; BARBOSA, A.G.; AZEVEDO, D.A.; SÁNCHEZ-DIZ, P.; GUSMÃO, L.; TAVARES, C.C.; CARVALHO, E.F.; SILVA, L.A.F. Na X-chromosome pentaplex in two linkage group: Haplotype data in Alagoas and Rio de Janeiro populations from Brazil. **Forensic Science International: Genetic**, v. 4, p. e95-e100, 2010.

SILVEIRA, D.; SILVA, F.F.; JESUS, P.R.; WHITTLE, M.R. Use of X-linked short tandem repeat loci in routine parentage casework. **Transfusion**, v.47, p.1050-1053, 2007.

SIM, J.E.; LEE, H.Y.; YANG, W.I.; SHIN, K-J. Population genetic study of four closely-linked X-STR trios in Koreans. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 333-337, 2010.

SON, J.Y.; LEE, Y.S.; CHOUNG, C.M.; LEE, S.D. Polymorphism of nine X chromosomal STR loci in Koreans. **International Journal of Legal Medicine**, v. 116, p. 317-321, 2002.

SWEET, D. Why a dentist for identification?. **Dental Clinics of North America**, v.45, p.237-251, 2001.

SZIBOR, R.; KRAWCZAK, M.; HERING, S.; EDELMANN, J.; KUHLISCH, E., KRAUSE, D. Use of X-linked markers for forensic purposes. **International Journal of Legal Medicine**, v.117, p. 67-74, 2003.

SZIBOR, R.; HERING, S.; KUHLSCH, E.; PLATE, I.; DEMBERGER, S.; KRAWCZAK, M.; EDELMANN, J. Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. **International Journal of Legal Medicine**, v. 119, p. 363-369, 2005.

SZIBOR, R.; HERING, S.; EDELMANN, J. A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online. **International Journal of Legal Medicine**, v. 120, p. 252-254, 2006.

SZIBOR, R. X-Chromosomal markers: Past; present and future. **Forensic Science International Genetics**, v.1, p. 93-99, 2007.

TABBADA, K.A.; DE UNGRIA, M.C.; FAUSTINO, L.P.; ATHANASIADOU, D.; TRADMANN-BELLINGHAUSEN, B.; SCHNEIDER, P.M. Development of a entaplex X-chromosomal short tandem repeat typing system and population genetic studies. **Forensic Science International**, v.154, p.173-180, 2005.

TANG, W.M.; TO, K.Y. Four X-chromosomal STRs and their allele frequencies in a Chine population. **Forensic Science International**, v. 162, p. 64-65, 2006.

TARIQ, M.A.; ULLAH, O.; RIAZUDDIN, S. Allele frequency distribution of 13 X-chromosomal STR loci in Pakistani population. **International Journal of Legal Medicine**, v. 122, p. 525-528, 2008.

TAVARES, C.C.; GUSMÃO, L.; DOMINGUES, C.; DOMINGUES, P.; SILVA, D.A.; AQUINO, J.; PEIXE, C.; AMORIM, A.; CARVALHO, E.F. Population data for six X-chromosome STR loci in a Rio de Janeiro (Brazil) sample: Usefulness in forensic casework. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 1, p. 164-166, 2008.

TONI, C.; DOMENICI, R.; PRESCIUTTINI, S. Genotype probabilities of pairs of individuals for X-chromosome markers. **Transfusion**, v.47, p.1276-1280, 2007.

TURRINA, S.; ATZEI, R.; DE LEO, D. Polymorphism of four X-chromosomal STRs: DXS7423; DXS7424; DXS8378 and DXS6809 in a North Italian population sample and their use in kinship testing. **Forensic Science International**, v.168, p.241-243, 2007a.

TURRINA, S. ATZEI, R.; FILLIPPINI, G.; DE LEO, D. Development and forensic validation of a new multiplex PCR assay with 12 X-chromosomal short tandem repeats. **Forensic Science International: Genetics**, v. 1, p. 201-204, 2007b.

WEISSTEIN, E.W. Bonferroni Correction. MathWorld - **A Wolfram Web Resource**. Disponível em: < <http://mathworld.wolfram.com/BonferroniCorrection.html> > Acesso em: 15 set. 2011.

WIEGAND, P.; BERGER, B.; EDELMANN, J.; PARSON, W. Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs. **International Journal of Legal Medicine**, v. 117, p. 62-65, 2003.

WACHOWICZ, R. C. **História do Paraná**. Curitiba: Gráfica Vicentina, 1995.

YU, B.; ZHANG, H.; LI, S. X-chromosome STRs polymorphisms of Han ethnic group from Northwest China. **Forensic International Science**, v. 153, p. 269-271, 2005.

ZALÁN, A.; VÖLGY, A.; JUNG, M.; PATERMAN, O.; PAMJAV, H. Hungarian population data of four X-linked markers: DXS8378, DXS7132, HPRTB, and DXS7423. **International Journal of Legal Medicine**, v. 121, p. 74-73, 2007.

ZALÁN, A.; VÖLGYI, A.; BRABETZ, W.; SCHLEINITZ, D.; PAMJAV, H. Hungarian population data of eight X-linked markers in four linkage groups. **Forensic Science International**, v. 175, p. 73-78, 2008.

ZARRABEITIA, M.T.; AMIGO, T.; SAÑUDO, C.; ZARRABEITIA, A.; GONZÁLES-LAMUÑO, D.; RIANCHO, J.A. A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome. **Forensic Science International**, v. 129, p. 85-89, 2002.

ZARRABEITIA, M.T.; ALONSO, A.; MARTIN, J.; GONZALEZ-GAY, M.A.; MARTIN-ESCUADERO, J.C.; DE PANCORBO, M.M.; SANZ, P.; RUIZ-CABELLO, F.; RIANCHO, J.A. Study of six X-linked tetranucleotide microsatellites: population data from five Spanish regions. **International Journal of Legal Medicine**, v.120, p.147-150, 2006.

ZARRABEITIA, M.T.; MIJARES, V.; RIANCHO, J.A. Forensic efficiency of microsatellites and single nucleotide polymorphisms on the X chromosome. **International Journal of Legal Medicine**, v. 121, p. 433-437, 2007.

ZARRABEITIA, M.T.; PINHEIRO, F.; PANCORBO, M.M.; CAINÉ, L.; CARDOSO, S.; GUSMÃO, L.; RIANCHO, J.A. Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations. **Forensic Science International: Genetics**, v. 3, p. 63-66, 2009.

ZHANG, S.; ZHAO, S.; ZHU, R.; LI, C. Genetic polymorphisms of 12 X-STR for forensic purposes in Shanghai Han population from China. **Molecular Biology Reports**, 2011.

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE I**



## MATERIAIS E MÉTODOS

### ASPECTOS ÉTICOS

O projeto intitulado “Estudo de Frequências Alélicas de Dez Locus STR do Cromossomo X na População do Estado do Paraná e sua Contribuição na Identificação Humana” foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e foi aprovado em: quatro de março de dois mil e onze, sob registro CEP/SD 1041.165.10.11 e CAAE: 5869.0.000.091-10.

### CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram analisadas amostras sanguíneas provenientes de 800 indivíduos adultos, saudáveis, não relacionados, de cor de pele negra e não negra, todos residentes no Estado do Paraná. As amostras são decorrentes da casuística do Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística do Estado do Paraná, as quais foram obtidas por punção datilar, após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Elas estão arquivadas como contraprovas e seu conteúdo hematológico agregado em cartão absorvente FTA® *Classic* (Whatman-Bioscience).

A amostragem foi determinada proporcionalmente ao número de habitantes residentes em cada uma das dez mesorregiões do Estado do Paraná. Da mesma forma, o número de indivíduos, negros e não negros analisados foi proporcional ao número de habitantes das respectivas raças.

Segundo estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) do ano 2000, a população paranaense é formada por 9.564.643 habitantes, sendo 77,24% brancos; 2,84% negros; 18,25% pardos; 0,92% amarelos; 0,33% indígenas e 0,41% sem declaração. A determinação da raça foi realizada por auto-classificação, tanto nos dados do IBGE como nos do Instituto de Criminalística.

Neste trabalho, optou-se por trabalhar com a subdivisão de indivíduos negros e não negros. Desta forma, foram analisados 777 indivíduos não negros e 23 negros. Os indivíduos não negros foram selecionados de modo proporcional ao

número de habitantes de cada mesorregião, já os negros foram selecionados aleatoriamente de várias partes do Estado. Com relação ao sexo foram analisados 401 homens e 399 mulheres. A tabela 1 apresenta o número de indivíduos residentes em cada mesorregião do Estado do Paraná e o número de indivíduo analisados neste trabalho. A figura 7 mostra o mapa do Estado do Paraná com as dez mesorregiões.

| Mesorregião      | Habitantes | Número amostral |
|------------------|------------|-----------------|
| Noroeste         | 641084     | 52              |
| Centro Ocidental | 346686     | 28              |
| Norte Central    | 1829191    | 149             |
| Norte Pioneiro   | 548190     | 45              |
| Centro Oriental  | 623356     | 51              |
| Oeste            | 1138626    | 92              |
| Sudoeste         | 472626     | 38              |
| Centro-Sul       | 533799     | 43              |
| Sudeste          | 377612     | 31              |
| Metropolitana    | 3053473    | 248             |

TABELA 1: NÚMERO DE HABITANTES EM CADA MESORREGIÃO DO ESTADO DO PARANÁ E O NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS.  
FONTE: IBGE, 2000.



FIGURA 7: MAPA DO ESTADO DO PARANÁ COM AS DEZ MESORREGIÕES.  
FONTE: IBGE, 2000.

## EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA, a partir do cartão FTA®, baseia-se, primeiramente, na purificação, removendo, em lavagens com solvente, os grupos hemes e inibidores da PCR e posterior extração do DNA das fibras de celulose, utilizando a resina Chelex® (Bio-Rad). Esta resina de troca iônica é formada por copolímeros de estireno divinilbenzeno, contendo íons de iminodiacetato que atuam como quelantes de metais polivalentes, como magnésio. Na ausência de magnésio as nucleases são inativadas e a molécula de DNA não é degradada. A resina Chelex® liga-se à maioria dos interferentes, deixando o DNA livre e íntegro para futuros procedimentos (BUTTLER, 2005).

A extração do DNA das amostras deste estudo foi realizada conforme protocolo do Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística do Paraná: 3 discos de 2,0mm da mancha de sangue retirados do cartão FTA®, utilizando-se Harris Micro-Punch®, foram colocados em tubo de 1,5mL e foi adicionado 200µL de Reagente de Purificação FTA®. Após 5 segundos de agitação mecânica (vortex) o tubo foi mantido em repouso por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 500µL de água ultrapura, após 5 segundos de agitação mecânica o tubo foi centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. Novamente, o sobrenadante foi retirado e desprezado, restando no tubo apenas os círculos do cartão FTA®. Ao tubo foram adicionados 200 µL de resina Chelex® 5% e foi homogeneizado sob agitação mecânica por 10 segundos. O tubo foi incubado a 56°C por 30 minutos e homogeneizado no vortex por 10 segundos. Posteriormente, o tubo foi incubado a 105°C por 10 minutos e homogeneizado no vortex por 10 segundos. Após, o tubo foi centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos e no sobrenadante estava o DNA extraído, o qual foi utilizado para a reação de amplificação.

## REAÇÃO DE PCR

Foi realizada a amplificação de 10 STRs do cromossomo X, todos tetranucleotídeos, DXS8378, DXS9902, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS6789, DXS7133, GATA172D05, GATA31E08 e DXS7423. A localização de tais marcadores no cromossomo X pode ser visualizada na figura 8.

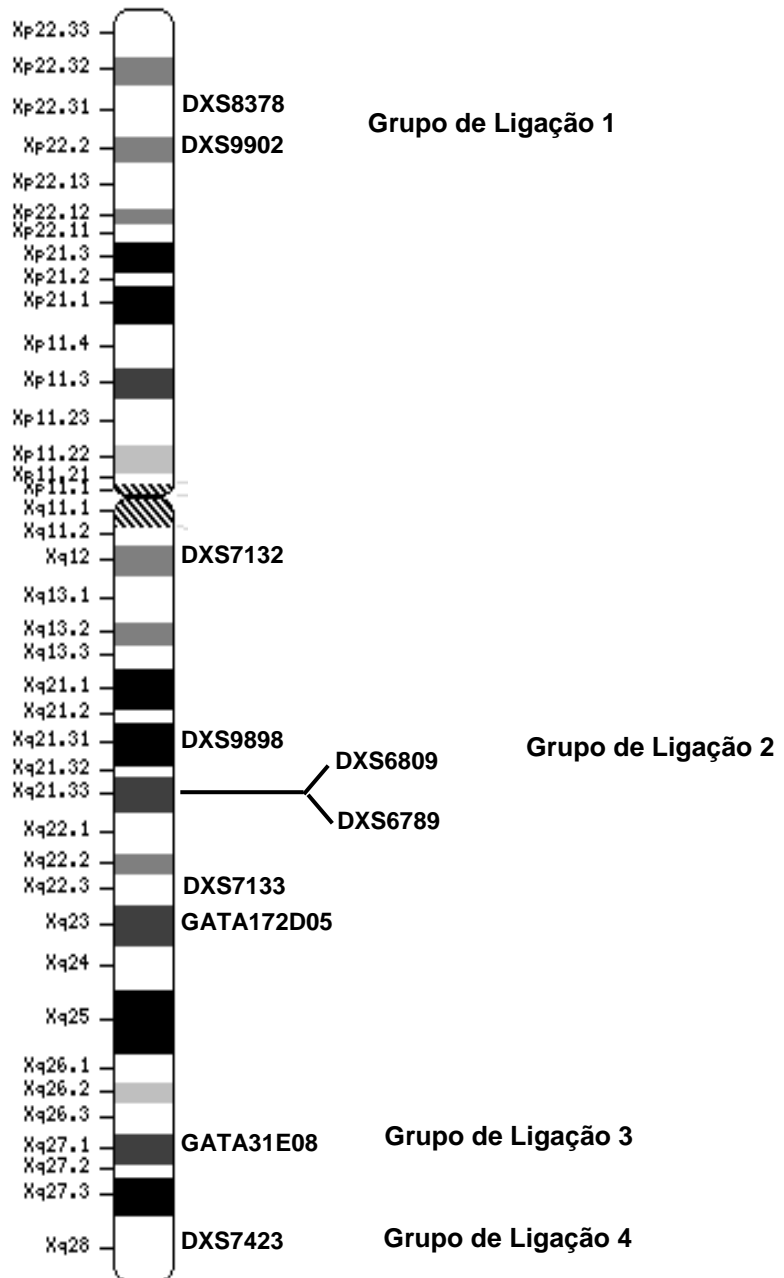


FIGURA 8: IDIOGRAMA DO CROMOSSOMO X COM A LOCALIZAÇÃO DOS STRS ANALISADOS NESTE TRABALHO.

FONTE: NCBI MAP VIEWER. <Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=X>> Acesso em: 11 Ago. 2010. Adaptado.

Informações referentes às seqüências sense e anti-sense dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dos marcadores utilizados na reação de amplificação, bem como os fluoróforos associados a estes e as referências de onde estas seqüências foram localizadas, estão apresentados na Tabela 2, a seguir.

| STR               | Marcador Fluorescente | Sequência Sense 5'-3'  | Anti-Sense 5'-3'           | Ref.           |
|-------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|----------------|
| <b>DXS8378</b>    | 6 FAM                 | TTAGGCAACCCGGTGGTCC    | ACAAGAACGA AACTCCAAC TC    | EDELMANN, 2002 |
| <b>DXS9902</b>    | NED                   | CTGGGTGAAGAGAAGCAGGA   | GGCAA TACACA TTCA TATCAGGA | GUSMÃO, 2009   |
| <b>DXS7132</b>    | NED                   | TCCCCTCTCATCTATCTGACTG | CACTCCTGGTGCCAAACTCT       | GOMES, 2007    |
| <b>DXS9898</b>    | 6 FAM                 | CGAGCACACCTACA AAAGCTG | TAGGCTCACCTCACTGAGCA       | GOMES, 2007    |
| <b>DXS6809</b>    | VIC                   | TCCATCTTTCTCTGAACCTTCC | TGCTTTAGGCTGATGTGAGG       | GOMES, 2007    |
| <b>DXS6789</b>    | NED                   | CTTCATTATGTGCTGGGGTAAA | ACCTCGTGATCATGTAAGTTGG     | GOMES, 2007    |
| <b>DXS7133</b>    | 6 FAM                 | CACTTCCAA AAGGGGAAAAA  | ACTTGTACTTGGTGGGAGGAA      | GUSMÃO, 2009   |
| <b>GATA172D05</b> | VIC                   | TAGTGGTGATGGTTGCACAG   | ATAATTGAAAGCCCGGATTC       | EDELMANN, 2002 |
| <b>GATA31E08</b>  | 6 FAM                 | GCAAGGGGAGAAGGCTAGAA   | TCAGCTGACAGAGCACAGAGA      | GUSMÃO, 2009   |
| <b>DXS7423</b>    | VIC                   | GTCTTCCTGT CATCTCCCAAC | TAGCTTAGCGCCTGGCACATA      | EDELMANN, 2002 |

TABELA 2: SEQUÊNCIA E MARCADOR FLUORESCENTE DOS *PRIMERS* DE CADA X-STR UTILIZADO.

FONTES: GUSMÃO *et al.*, 2009.

A amplificação do DNA extraído dos cartões de FTA foi realizada pelo método de PCR multiplex, utilizando microtubos de 0,2mL. O volume final da reação foi de 10µL, sendo composto por 5µL do 2x Quiagen Multiplex PCR Master Mix®, 1 µL da mistura de *primers* (10x), 4µL de DNA extraído (0,5 a 5ng).

A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems), nas seguintes condições:

- Desnaturação inicial – 95°C por 15 min.
- 10 ciclos - 94°C por 30 seg., 60°C por 90 seg., 72 °C por 60 seg.
- 20 ciclos - 94°C por 30 seg., 58°C por 90 seg., 72 °C por 60 seg.
- Extensão final - 60°C por 60 min.

## DETECÇÃO E ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR

Para obtenção dos perfis alélicos, alíquotas de 2µL do produto de PCR foram misturadas com 10µL de formamida e 0,2µL de Size Standard (Gene Scan™ – 600 Liz®) e a visualização foi realizada por eletroforese capilar em seqüenciador automático de DNA ABI 310 (Applied Biosystems), utilizando polímero POP4

(Applied Biosystems). A análise dos fragmentos detectados foi realizada por meio do software Gene-Mapper ID Version 3.2 (Applied Biosystems) e baseado nos dados do eletroferograma. Na figura 9 é apresentado um eletroferograma, evidenciando os alelos identificados de cada loco STR estudado.

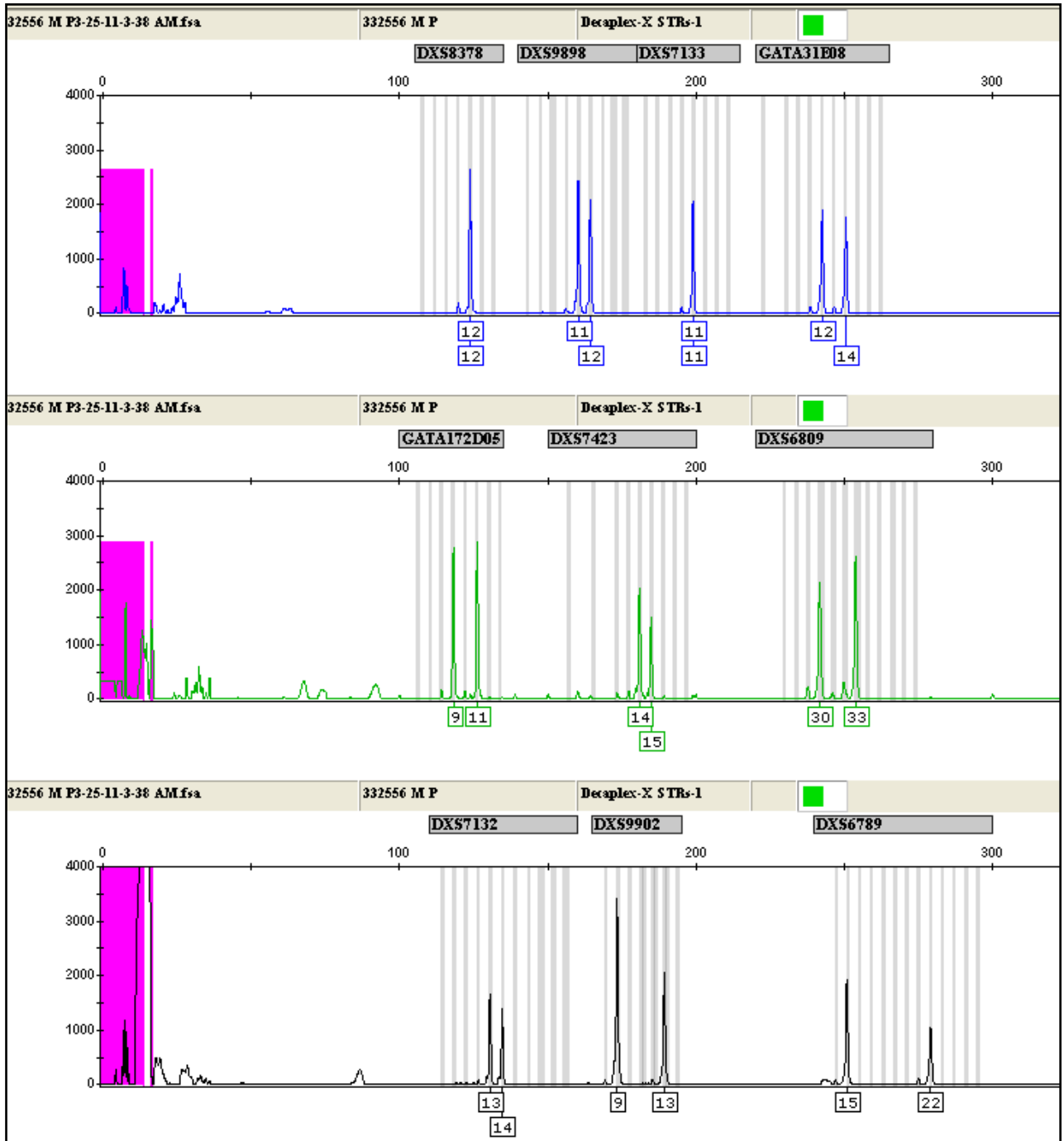


FIGURA 9: ELETROFEROGRAMA COM OS 10 LOCOS STRs ESTUDADOS.

O tamanho dos fragmentos dos STRs analisados está apresentado na tabela 3. Os *primers* dos marcadores com tamanhos de fragmentos semelhantes foram marcados com fluoróforos diferentes, permitindo assim uma reação multiplex.

| <b>STR</b>        | <b>Tamanho dos Fragmentos (pb)</b> |
|-------------------|------------------------------------|
| <b>DXS8378</b>    | 106 - 130                          |
| <b>DXS9902</b>    | 166 - 190                          |
| <b>DXS7132</b>    | 112 - 155                          |
| <b>DXS9898</b>    | 139 - 173                          |
| <b>DXS6809</b>    | 228- 272                           |
| <b>DXS6789</b>    | 245 - 293                          |
| <b>DXS7133</b>    | 180 - 208                          |
| <b>GATA172D05</b> | 104 - 132                          |
| <b>GATA31E08</b>  | 221 - 260                          |
| <b>DXS7423</b>    | 153 - 193                          |

TABELA 3: TAMANHO DOS FRAGMENTOS DOS STRS ESTUDADOS.

Foram utilizadas amostras de DNA referência da Applied Biosystems (9947A e 9948) e da Promega (K562) para calibrar a genotipagem dos alelos. Os valores desses controles e suas respectivas referências bibliográficas estão apresentados na tabela 4, a seguir.

| <b>STR</b>        | <b>9947A</b> | <b>9948</b> | <b>K562</b> | <b>Ref.</b>  |
|-------------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>DXS8378</b>    | 10/11        | 11          | 10          | SZIBOR, 2003 |
| <b>DXS9902</b>    | 12           | 13          | 12/13       | GUSMÃO, 2009 |
| <b>DXS7132</b>    | 12           | 13          | 13          | SZIBOR, 2003 |
| <b>DXS9898</b>    | 12/15        | 13          | 12          | SHIN, 2005   |
| <b>DXS6809</b>    | 31/34        | 31          | 34          | SZIBOR, 2003 |
| <b>DXS6789</b>    | 21/22        | 20          | 21          | SZIBOR, 2003 |
| <b>DXS7133</b>    | 9/10         | 11          | 10          | SZIBOR, 2003 |
| <b>GATA172D05</b> | 10           | 6           | 12          | SZIBOR, 2003 |
| <b>GATA31E08</b>  | 13           | 12          | 13          | GUSMÃO, 2009 |
| <b>DXS7423</b>    | 14/15        | 14          | 17          | SZIBOR, 2003 |

TABELA 4: ALELOS E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS AMOSTRAS CONTROLES DE DNA UTILIZADAS PARA CALIBRAÇÃO.  
 FONTE: GUSMÃO *et al.*, 2009.

Uma escala alélica para cada loco STR foi construída com base em dados fornecidos por Gusmão *et al.* (2009), a qual foi calibrada para a situação laboratorial, do desenvolvimento deste trabalho, com os controles acima descritos.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As frequências alélicas foram calculadas para a população masculina e feminina em conjunto, através do método de frequência relativa, utilizando a fórmula abaixo:

$$p = \frac{X^A Y + X^A X^a + 2X^A X^A}{M + 2F}$$

Onde: “*p*” refere-se à frequência do alelo A; “ $X^A Y$ ” a soma do número de homens com o alelo A; “ $X^A X^a$ ” a soma do número de mulheres com o genótipo heterozigoto contendo o alelo A; “ $X^A X^A$ ” o dobro do número de mulheres com o genótipo homozigoto para o alelo A; “ $M+2F$ ” o número total de cromossomos X analisados.

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, usando as amostras femininas; a análise de desequilíbrio de ligação, usando as amostras masculinas; o teste exato de diferenciação entre subpopulações, usando amostras femininas e masculinas e o cálculo de Heterozigose observada e esperada, usando as amostras femininas foram todos realizados com o programa Arlequin 3.0 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Este mesmo programa foi utilizado para estimar as distâncias genéticas entre populações, baseada no índice de fixação ( $F_{ST}$ ), pelo método de Reynolds *et al.* (1983).

Os cálculos estatísticos utilizados para avaliar a eficiência forense dos marcadores estão citados abaixo (DESMARAIS *et al.*, 1998). Sendo que “ $\sum f_i$ ” refere-se ao somatório das frequências alélicas do loco em estudo.

- Poder de Discriminação (PD)

Em mulheres:  $PD_M = 1 - 2(\sum f_i^2) + \sum f_i^4$

Em homens:  $PD_H = 1 - \sum f_i^2$



- Poder de Exclusão (PE) – Também chamado de Chance Média de Exclusão (MEC) por alguns autores.

Para trios envolvendo filhas:  $PE_T = 1 - \Sigma ff^2 + \Sigma ff^4 - (\Sigma ff^2)^2$

Para duos pai e filha:  $PE_D = 1 - 2\Sigma ff^2 + \Sigma ff^3$

**APÊNDICE II**

## TABELA COMPLEMENTAR

Foram localizadas na literatura frequências alélicas de outras populações, as quais estão apresentadas na Tabela 5. Esses dados foram comparados com os obtidos neste estudo. Não são todas as populações que possuem dados para os dez marcadores estudados no Estado do Paraná, por conseguinte algumas comparações não puderam ser realizadas.

A partir dos valores das frequências absolutas, das populações apresentadas na tabela 5, foi possível verificar para cada loco a distância genética ( $F_{ST}$ ) entre a população paranaense e as demais. Este resultado foi apresentado nas tabelas suplementares S1 e S2, no capítulo I.

| (n)              | CHINA<br>Kang & Li, 2006 | JAPÃO<br>Asamura <i>et al.</i> , 2006 | CORÉIA<br>Shin <i>et al.</i> , 2005 | ESPANHA<br>Zarrabeitia <i>et al.</i> , 2009 | PORTUGAL<br>Pereira <i>et al.</i> , 2007 | ITÁLIA<br>Bini <i>et al.</i> , 2005 | ALEMANHA<br>Edelmann <i>et al.</i> , 2001<br>286 a<br>565 | HUNGRIA<br>Zalán <i>et al.</i> , 2007 | GANÁ<br>Poetsch <i>et al.</i> , 2009 | ANGOLA<br>Gomes <i>et al.</i> , 2007 | MOÇAMBIQUE<br>Gomes <i>et al.</i> , 2007 | UGANDA<br>Gomes <i>et al.</i> , 2007 | ARGENTINA<br>Bobillo <i>et al.</i> , 2011 | COLOMBIA<br>Pico <i>et al.</i> , 2008 | BRASIL<br>(São Paulo)<br>Martins <i>et al.</i> , 2010 | BRASIL<br>(Rio de Janeiro)<br>Martins <i>et al.</i> , 2010 | BRASIL<br>(Vitória)<br>Martins <i>et al.</i> , 2010 | BRASIL<br>(Belo Horizonte)<br>Martins <i>et al.</i> , 2010 | BRASIL<br>(Mato Grosso)<br>Gusmão <i>et al.</i> , 2009 | BRASIL<br>(Goiás)<br>Ribeiro <i>et al.</i> , 2011 | BRASIL<br>(Rio Grande do Sul)<br>Ribeiro <i>et al.</i> , 2011 | BRASIL<br>(Santa Catarina)<br>Cainé <i>et al.</i> , 2010 | BRASIL<br>(Ceará)<br>Ribeiro <i>et al.</i> , 2011 | BRASIL<br>(Pernambuco)<br>Ribeiro <i>et al.</i> , 2011 | BRASIL<br>(Belém)<br>Ribeiro <i>et al.</i> , 2008 | BRASIL<br>(Amazonas)<br>Ribeiro <i>et al.</i> , 2011 |       |
|------------------|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---|--|-------------------------------------|---|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---|---------------------------------------|---|--|---|--|--|---|---|--|---|--|---|--|-------|
| <b>GATA31E08</b> |                          |                                       |                                     |   |  |                                     |   |                                       |                                      |                                      |  |                                      |   |                                       |   |  |   |  |  |   |   |  |   |  |   |  |       |
| Alelo 5          | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | -   | -                                     | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -   | -  | 0,002   | -  |       |
| Alelo 6          | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | -   | -                                     | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | 0,026  | -     |
| Alelo 7          | -                        | 0,111                                 | 0,078                               | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | 0,157                                     | -                                     | 0,002   | 0,007  | 0,007   | 0,012  | 0,007  | 0,007   | 0,005   | 0,167  | 0,005   | 0,012  | 0,142   | -  | -     |
| Alelo 8          | -                        | 0,028                                 | 0,036                               | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | 0,013                                     | -                                     | 0,005   | 0,012  | 0,005   | 0,008  | -  | 0,007   | 0,037   | 0,023  | 0,005   | 0,024  | 0,056   | -  | -     |
| Alelo 9          | -                        | 0,176                                 | 0,185                               | 0,204                                       | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | 0,217                                     | -                                     | 0,135   | 0,163  | 0,183   | 0,201  | 0,130  | 0,200   | 0,117   | 0,152  | 0,204   | 0,220  | 0,204   | 0,128  | 0,128 |
| Alelo 10         | -                        | 0,251                                 | 0,273                               | 0,033                                       | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | 0,317                                     | -                                     | 0,036   | 0,081  | 0,054   | 0,077  | 0,067  | 0,040   | 0,092   | 0,280  | 0,056   | 0,110  | 0,297   | 0,040  | -     |
| Alelo 11         | -                        | 0,318                                 | 0,328                               | 0,148                                       | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | 0,227                                     | -                                     | 0,172   | 0,145  | 0,119   | 0,116  | 0,167  | 0,133   | 0,202   | 0,265  | 0,102   | 0,171  | 0,191   | 0,152  | -     |
| Alelo 12         | -                        | 0,106                                 | 0,087                               | 0,182                                       | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | 0,053                                     | -                                     | 0,271   | 0,249  | 0,277   | 0,224  | 0,320  | 0,273   | 0,226   | 0,101  | 0,260   | 0,244  | 0,075   | 0,376  | -     |
| Alelo 13         | -                        | -                                     | 0,010                               | 0,302                                       | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | 0,017                                     | -                                     | 0,263   | 0,229  | 0,230   | 0,263  | 0,207  | 0,233   | 0,219   | 0,012  | 0,209   | 0,171  | 0,006   | 0,200  | -     |
| Alelo 14         | -                        | -                                     | -                                   | 0,118                                       | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | -   | -                                     | 0,104   | 0,101  | 0,114   | 0,082  | 0,087  | 0,100   | 0,095   | -  | 0,138   | 0,049  | 0,002   | 0,080  | -     |
| Alelo 15         | -                        | -                                     | -                                   | 0,010                                       | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | -   | -                                     | 0,012   | 0,012  | 0,012   | 0,017  | 0,013  | 0,007   | 0,008   | -  | 0,020   | -  | -   | 0,024  | -     |
| Alelo 16         | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | -   | -                                     | -   | -  | -   | -  | 0,003  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -     |
| <b>DXS6809</b>   |                          |                                       |                                     |   |  |                                     |   |                                       |                                      |                                      |  |                                      |   |                                       |   |  |   |  |  |   |   |  |   |  |   |  |       |
| Alelo 21         | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | -   | -                                     | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | 0,004  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 27         | -                        | -                                     | -                                   | 0,004                                       | 0,009                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | 0,020                                | 0,003                                     | -                                     | 0,002   | -  | -   | 0,006  | -  | -   | -   | 0,016  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 28         | -                        | -                                     | -                                   | 0,009                                       | 0,020                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | 0,041                                | 0,071                                    | 0,020                                | 0,003                                     | 0,012                                 | 0,007   | 0,005  | 0,020   | 0,014  | 0,007  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 29         | -                        | -                                     | -                                   | 0,008                                       | 0,020                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | 0,054                                | 0,027                                    | 0,020                                | 0,013                                     | 0,006                                 | 0,015   | 0,032  | 0,032   | 0,051  | 0,007  | -   | -   | 0,016  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 30         | -                        | -                                     | -                                   | 0,041                                       | 0,049                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | 0,122                                | 0,063                                    | 0,078                                | 0,043                                     | 0,037                                 | 0,053   | 0,052  | 0,072   | 0,031  | 0,053  | -   | -   | 0,043  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 30,1       | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | 0,027                                    | -                                    | -   | -                                     | 0,003   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 31         | -                        | -                                     | -                                   | 0,147                                       | 0,202                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | 0,149                                | 0,071                                    | 0,294                                | 0,113                                     | 0,092                                 | 0,157   | 0,150  | 0,151   | 0,127  | 0,133  | -   | -   | 0,148  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 31,1       | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | 0,009                                    | -                                    | -   | -                                     | 0,005   | 0,005  | 0,007   | -  | -  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 32         | -                        | -                                     | -                                   | 0,174                                       | 0,176                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | 0,081                                | 0,107                                    | 0,177                                | 0,190                                     | 0,174                                 | 0,138   | 0,143  | 0,126   | 0,164  | 0,157  | -   | -   | 0,117  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 32,1       | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | 0,009                                    | -                                    | -   | -                                     | 0,002   | -  | -   | 0,006  | -  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 33         | -                        | -                                     | -                                   | 0,308                                       | 0,271                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | 0,243                                | 0,161                                    | 0,216                                | 0,317                                     | 0,329                                 | 0,304   | 0,259  | 0,291   | 0,266  | 0,277  | -   | -   | 0,362  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 33,1       | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | 0,009                                    | -                                    | -   | -                                     | 0,003   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 34         | -                        | -                                     | -                                   | 0,214                                       | 0,159                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | 0,189                                | 0,223                                    | 0,098                                | 0,180                                     | 0,271                                 | 0,193   | 0,197  | 0,161   | 0,215  | 0,233  | -   | -   | 0,179  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 35         | -                        | -                                     | -                                   | 0,069                                       | 0,072                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | 0,108                                | 0,152                                    | 0,020                                | 0,097                                     | 0,046                                 | 0,073   | 0,099  | 0,101   | 0,077  | 0,100  | -   | -   | 0,093  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 35,1       | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | -   | -                                     | 0,003   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 36         | -                        | -                                     | -                                   | 0,020                                       | 0,020                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | 0,014                                | 0,036                                    | 0,020                                | 0,033                                     | 0,021                                 | 0,036   | 0,032  | 0,037   | 0,023  | 0,020  | -   | -   | 0,016  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 36,1       | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | 0,018                                    | -                                    | -   | -                                     | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 37         | -                        | -                                     | -                                   | 0,006                                       | 0,003                                    | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | 0,0180                                   | 0,039                                | 0,003                                     | 0,012                                 | 0,007   | 0,012  | 0,003   | 0,020  | 0,010  | -   | -   | 0,008  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 38         | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | 0,003                                     | -                                     | 0,007   | 0,003  | -   | -  | 0,003  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -     |
| Alelo 39         | -                        | -                                     | -                                   | -   | -  | -                                   | -   | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                                    | -   | -                                     | 0,005   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -   | -  | -   | -  | -     |

TABELA 5: FREQUENCIAS ALELICAS DE POPULAÇÕES MUNDIAIS PARA OS MARCADORES X STRS EM ESTUDO.

| <b>DXS7423</b> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| Alelo 8        | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,027 | -     | -     | -     | -     | 0,005 | 0,007 | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     |       |   |
| Alelo 9        | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,001 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |       |   |
| Alelo 10       | -     | -     | -     | -     | 0,003 | -     | 0,107 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,002 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |       |   |
| Alelo 11       | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,320 | -     | -     | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |       |   |
| Alelo 12       | -     | 0,004 | 0,001 | -     | -     | 0,002 | 0,345 | 0,002 | -     | 0,027 | 0,009 | 0,020 | -     | -     | -     | 0,005 | 0,005 | 0,006 | 0,003 | 0,020 | 0,022 | -     | -     | -     | 0,002 | 0,016 |   |
| Alelo 13       | 0,293 | -     | -     | 0,077 | 0,061 | 0,069 | 0,179 | 0,135 | 0,132 | 0,122 | 0,063 | 0,059 | 0,037 | 0,043 | 0,056 | 0,071 | 0,049 | 0,595 | 0,060 | 0,047 | 0,122 | 0,086 | 0,087 | 0,037 | 0,047 | 0,032 |   |
| Alelo 14       | 0,649 | 0,285 | 0,356 | 0,281 | 0,357 | 0,358 | 0,039 | 0,342 | 0,499 | 0,473 | 0,518 | 0,451 | 0,253 | 0,290 | 0,331 | 0,360 | 0,353 | 0,385 | 0,337 | 0,393 | 0,348 | 0,323 | 0,398 | 0,415 | 0,326 | 0,304 |   |
| Alelo 15       | 0,013 | 0,622 | 0,577 | 0,448 | 0,415 | 0,370 | 0,009 | 0,368 | 0,280 | 0,284 | 0,321 | 0,255 | 0,470 | 0,454 | 0,486 | 0,399 | 0,432 | 0,368 | 0,370 | 0,353 | 0,366 | 0,393 | 0,367 | 0,402 | 0,474 | 0,472 |   |
| Alelo 16       | -     | 0,089 | 0,064 | 0,166 | 0,141 | 0,177 | -     | 0,131 | 0,087 | 0,068 | 0,080 | 0,177 | 0,127 | 0,079 | 0,092 | 0,116 | 0,126 | 0,119 | 0,157 | 0,160 | 0,124 | 0,163 | 0,102 | 0,110 | 0,099 | 0,080 |   |
| Alelo 17       | -     | -     | 0,002 | 0,023 | 0,023 | 0,023 | -     | 0,018 | 0,003 | -     | 0,009 | 0,039 | 0,107 | 0,134 | 0,029 | 0,042 | 0,035 | 0,062 | 0,070 | 0,027 | 0,017 | 0,035 | 0,046 | 0,037 | 0,052 | 0,080 |   |
| Alelo 18       | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,016 |   |
| Alelo 19       | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | 0,002 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| <b>DXS8378</b> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |
| Alelo 8        | -     | -     | 0,006 | -     | -     | -     | 0,002 | -     | -     | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 9        | -     | 0,015 | 0,573 | 0,043 | 0,014 | -     | 0,046 | 0,024 | 0,006 | -     | 0,009 | -     | 0,017 | -     | 0,012 | 0,010 | 0,005 | 0,003 | 0,010 | -     | -     | 0,012 | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 10       | -     | 0,562 | 0,281 | 0,298 | 0,280 | -     | 0,312 | 0,315 | 0,247 | 0,189 | 0,295 | 0,216 | 0,413 | 0,482 | 0,399 | 0,313 | 0,306 | 0,351 | 0,387 | -     | -     | 0,311 | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 11       | -     | 0,285 | 0,123 | 0,324 | 0,306 | -     | 0,332 | 0,366 | 0,378 | 0,378 | 0,348 | 0,412 | 0,313 | 0,281 | 0,333 | 0,394 | 0,370 | 0,329 | 0,293 | -     | -     | 0,335 | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 12       | -     | 0,113 | 0,017 | 0,293 | 0,369 | -     | 0,277 | 0,251 | 0,319 | 0,324 | 0,321 | 0,333 | 0,227 | 0,232 | 0,237 | 0,249 | 0,289 | 0,292 | 0,273 | -     | -     | 0,315 | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 13       | -     | 0,025 | -     | 0,041 | 0,028 | -     | 0,029 | 0,031 | 0,036 | 0,108 | 0,027 | 0,039 | 0,023 | 0,003 | 0,019 | 0,032 | 0,027 | 0,020 | 0,027 | -     | -     | 0,023 | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 14       | -     | -     | -     | 0,001 | 0,003 | -     | 0,002 | 0,011 | 0,014 | -     | -     | -     | 0,003 | 0,003 | -     | 0,003 | 0,003 | 0,006 | 0,010 | -     | -     | 0,004 | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 15       | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,002 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 17       | 0,007 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 18       | 0,552 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 19       | 0,247 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 20       | 0,175 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 21       | 0,020 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| <b>DXS7133</b> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |
| Alelo 6        | -     | 0,002 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo7         | 0,035 | 0,002 | -     | 0,006 | -     | -     | 0,003 | -     | 0,006 | -     | -     | -     | 0,003 | -     | 0,007 | 0,005 | 0,003 | -     | -     | -     | 0,005 | 0,004 | 0,005 | -     | -     | -     |   |
| Alelo 8        | 0,014 | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | 0,011 | -     | -     | -     | -     | -     | 0,010 | 0,003 | 0,005 | 0,006 | -     | -     | 0,003 | 0,040 | 0,015 | -     | -     | -     |   |
| Alelo 9        | 0,601 | 0,675 | -     | 0,485 | -     | -     | 0,473 | -     | 0,028 | -     | -     | -     | 0,473 | -     | 0,500 | 0,310 | 0,367 | 0,325 | 0,390 | 0,347 | 0,418 | 0,451 | 0,367 | 0,366 | 0,461 | 0,576 |   |
| Alelo 10       | 0,203 | 0,253 | -     | 0,159 | -     | -     | 0,142 | -     | 0,247 | -     | -     | -     | 0,207 | -     | 0,141 | 0,207 | 0,175 | 0,168 | 0,193 | 0,160 | 0,184 | 0,132 | 0,174 | 0,171 | 0,187 | 0,176 |   |
| Alelo 11       | 0,140 | 0,064 | -     | 0,294 | -     | -     | 0,337 | -     | 0,569 | -     | -     | -     | 0,277 | -     | 0,291 | 0,389 | 0,377 | 0,424 | 0,343 | 0,427 | 0,321 | 0,350 | 0,362 | 0,378 | 0,268 | 0,216 |   |
| Alelo 12       | -     | 0,004 | -     | 0,039 | -     | -     | 0,040 | -     | 0,101 | -     | -     | -     | 0,027 | -     | 0,029 | 0,059 | 0,047 | 0,046 | 0,047 | 0,033 | 0,050 | 0,043 | 0,051 | 0,061 | 0,056 | 0,032 |   |
| Alelo 13       | 0,007 | -     | -     | 0,006 | -     | -     | 0,005 | -     | 0,025 | -     | -     | -     | 0,010 | -     | 0,010 | 0,017 | 0,015 | 0,017 | 0,023 | 0,027 | 0,012 | 0,012 | 0,010 | 0,024 | 0,021 | -     |   |
| Alelo 14       | -     | -     | -     | 0,008 | -     | -     | -     | -     | 0,014 | -     | -     | -     | 0,003 | -     | 0,012 | 0,010 | 0,008 | 0,014 | 0,003 | 0,007 | 0,008 | 0,004 | 0,015 | -     | 0,004 | -     |   |
| Alelo 15       | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,005 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,002 | - |

CONTINUAÇÃO DA TABELA 5

| <b>GATA172D05</b> |       |       |       |       |       |       |       |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Alelo 5           | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,142 | - | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |       |
| Alelo 6           | -     | -     | 0,065 | 0,187 | 0,202 | -     | 0,003 | - | - | 0,284 | 0,250 | 0,294 | 0,120 | 0,110 | 0,147 | 0,190 | 0,148 | 0,153 | 0,150 | 0,193 | 0,132 | 0,125 | 0,143 | 0,159 | -     | 0,144 |
| Alelo 7           | -     | -     | 0,004 | -     | 0,003 | -     | 0,173 | - | - | 0,054 | 0,089 | 0,078 | 0,010 | 0,003 | 0,017 | 0,022 | 0,027 | 0,037 | 0,027 | 0,027 | 0,025 | -     | 0,036 | 0,024 | -     | 0,032 |
| Alelo 8           | -     | -     | 0,138 | 0,192 | 0,167 | -     | 0,060 | - | - | 0,095 | 0,179 | 0,196 | 0,140 | 0,177 | 0,155 | 0,172 | 0,153 | 0,125 | 0,143 | 0,147 | 0,142 | 0,179 | 0,148 | 0,134 | -     | 0,184 |
| Alelo 9           | -     | -     | 0,100 | 0,060 | 0,038 | -     | 0,273 | - | - | 0,405 | 0,330 | 0,216 | 0,030 | 0,064 | 0,126 | 0,158 | 0,141 | 0,184 | 0,143 | 0,173 | 0,117 | 0,058 | 0,179 | 0,195 | -     | 0,104 |
| Alelo 10          | -     | -     | 0,430 | 0,246 | 0,320 | -     | 0,237 | - | - | 0,135 | 0,098 | 0,118 | 0,290 | 0,329 | 0,273 | 0,269 | 0,296 | 0,207 | 0,287 | 0,260 | 0,284 | 0,315 | 0,230 | 0,232 | -     | 0,296 |
| Alelo 11          | -     | -     | 0,208 | 0,216 | 0,199 | -     | 0,109 | - | - | 0,027 | 0,054 | 0,098 | 0,290 | 0,180 | 0,213 | 0,160 | 0,161 | 0,195 | 0,150 | 0,140 | 0,197 | 0,198 | 0,194 | 0,159 | -     | 0,136 |
| Alelo 12          | -     | -     | 0,054 | 0,098 | 0,072 | -     | 0,003 | - | - | -     | -     | -     | 0,120 | 0,123 | 0,070 | 0,027 | 0,072 | 0,097 | 0,093 | 0,040 | 0,087 | 0,113 | 0,071 | 0,098 | -     | 0,088 |
| Alelo 13          | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | -     | -     | -     | 0,006 | -     | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,007 | 0,020 | 0,015 | 0,004 | -     | -     | 0,016 |
| Alelo 14          | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,003 | 0,008 | -     | -     | -     | -     |
| <b>DXS9902</b>    |       |       |       |       |       |       |       |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Alelo 7           | -     | -     | 0,012 | -     | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,004 | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 8           | -     | -     | 0,002 | -     | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | 0,003 | -     | 0,002 | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 9           | -     | -     | 0,012 | 0,004 | -     | -     | 0,048 | - | - | -     | -     | 0,020 | -     | 0,007 | 0,025 | 0,022 | 0,017 | 0,020 | -     | -     | 0,043 | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 10          | -     | -     | 0,453 | 0,035 | -     | -     | 0,314 | - | - | -     | -     | 0,313 | -     | 0,031 | 0,044 | 0,022 | 0,040 | 0,043 | -     | -     | 0,307 | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 11          | -     | -     | 0,334 | 0,360 | -     | -     | 0,364 | - | - | -     | -     | 0,423 | -     | 0,384 | 0,325 | 0,346 | 0,323 | 0,343 | -     | -     | 0,362 | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 11,1        | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | 0,027 | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 12          | -     | -     | 0,179 | 0,360 | -     | -     | 0,265 | - | - | -     | -     | 0,200 | -     | 0,329 | 0,372 | 0,368 | 0,340 | 0,338 | -     | -     | 0,237 | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 12,1        | -     | -     | -     | 0,021 | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | -     | -     | 0,007 | 0,007 | 0,015 | 0,006 | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 13          | -     | -     | 0,007 | 0,207 | -     | -     | 0,009 | - | - | -     | -     | 0,013 | -     | 0,230 | 0,204 | 0,220 | 0,261 | 0,240 | -     | -     | 0,043 | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 13,1        | -     | -     | -     | 0,005 | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | -     | -     | 0,005 | 0,005 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 14          | -     | -     | -     | 0,009 | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | -     | -     | 0,005 | 0,015 | 0,005 | 0,009 | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 15          | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,003 | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Alelo 16          | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,003 | 0,007 | -     | -     | 0,004 | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b>DXS6789</b>    |       |       |       |       |       |       |       |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Alelo 13          | -     | -     | 0,004 | -     | -     | -     | -     | - | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,007 | 0,003 | -     | -     | -     | 0,002 | -     |
| Alelo 14          | -     | 0,006 | 0,001 | 0,001 | -     | 0,006 | 0,002 | - | - | 0,014 | 0,009 | -     | -     | -     | 0,012 | 0,007 | 0,007 | 0,003 | 0,007 | 0,007 | 0,003 | 0,004 | -     | -     | 0,011 | 0,008 |
| Alelo 15          | 0,006 | 0,134 | 0,151 | 0,038 | 0,052 | 0,067 | 0,036 | - | - | 0,176 | 0,179 | 0,294 | 0,017 | 0,037 | 0,082 | 0,103 | 0,101 | 0,122 | 0,093 | 0,100 | 0,075 | 0,070 | 0,077 | 0,110 | 0,064 | 0,048 |
| Alelo 16          | 0,138 | 0,327 | 0,282 | 0,014 | 0,023 | 0,019 | 0,014 | - | - | 0,176 | 0,125 | 0,078 | 0,097 | 0,125 | 0,138 | 0,062 | 0,057 | 0,068 | 0,077 | 0,073 | 0,035 | 0,039 | 0,092 | 0,024 | 0,073 | 0,080 |
| Alelo 17          | 0,288 | 0,047 | 0,041 | 0,005 | -     | 0,005 | 0,001 | - | - | -     | 0,009 | 0,059 | 0,003 | 0,006 | 0,010 | 0,003 | 0,003 | 0,006 | 0,007 | 0,007 | -     | 0,004 | -     | 0,012 | 0,011 | -     |
| Alelo 18          | -     | -     | -     | 0,001 | -     | 0,002 | 0,002 | - | - | 0,014 | -     | 0,020 | -     | 0,003 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,008 | 0,003 | 0,007 | -     | 0,008 | -     | 0,012 | 0,002 | -     |
| Alelo 19          | 0,006 | 0,021 | 0,038 | 0,021 | 0,020 | 0,023 | 0,030 | - | - | 0,081 | 0,134 | 0,157 | 0,023 | 0,052 | 0,036 | 0,049 | 0,059 | 0,043 | 0,060 | 0,067 | 0,035 | 0,008 | 0,051 | 0,049 | 0,053 | 0,064 |
| Alelo 20          | 0,038 | 0,130 | 0,185 | 0,380 | 0,435 | 0,421 | 0,374 | - | - | 0,095 | 0,152 | 0,177 | 0,420 | 0,476 | 0,302 | 0,291 | 0,341 | 0,311 | 0,360 | 0,287 | 0,346 | 0,346 | 0,270 | 0,427 | 0,411 | 0,424 |
| Alelo 21          | 0,250 | 0,234 | 0,200 | 0,308 | 0,231 | 0,227 | 0,286 | - | - | 0,230 | 0,152 | 0,137 | 0,250 | 0,177 | 0,201 | 0,244 | 0,249 | 0,221 | 0,203 | 0,213 | 0,279 | 0,253 | 0,286 | 0,244 | 0,254 | 0,256 |
| Alelo 22          | 0,206 | 0,068 | 0,075 | 0,128 | 0,135 | 0,165 | 0,174 | - | - | 0,162 | 0,143 | 0,059 | 0,117 | 0,095 | 0,167 | 0,177 | 0,131 | 0,130 | 0,120 | 0,140 | 0,154 | 0,202 | 0,158 | 0,098 | 0,077 | 0,096 |
| Alelo 23          | 0,069 | 0,025 | 0,016 | 0,075 | 0,084 | 0,059 | 0,064 | - | - | 0,027 | 0,098 | 0,020 | 0,057 | 0,024 | 0,036 | 0,049 | 0,042 | 0,077 | 0,063 | 0,093 | 0,057 | 0,047 | 0,051 | 0,024 | 0,034 | 0,008 |
| Alelo 24          | -     | 0,008 | 0,005 | 0,023 | 0,014 | 0,005 | 0,016 | - | - | 0,027 | -     | -     | 0,010 | 0,003 | 0,012 | 0,007 | 0,005 | 0,011 | 0,007 | -     | 0,015 | 0,004 | 0,015 | -     | 0,006 | 0,008 |
| Alelo 25          | -     | -     | 0,001 | 0,006 | 0,003 | -     | 0,001 | - | - | -     | -     | -     | 0,007 | 0,003 | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | 0,004 | -     | -     | 0,002 | 0,008 |
| Alelo 26          | -     | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | - | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |

CONTINUAÇÃO DA TABELA 5

| <b>DXS7132</b> |       |   |       |       |       |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |
|----------------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| Alelo 6        | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | 0,002 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 9        | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | -     | -     | 0,014 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | - |
| Alelo 10       | 0,049 | - | 0,001 | -     | -     | - | -     | -     | 0,017 | -     | -     | -     | -     | -     | 0,005 | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | - |
| Alelo 11       | 0,056 | - | 0,008 | 0,015 | 0,020 | - | 0,012 | 0,002 | 0,028 | 0,014 | 0,009 | 0,020 | 0,010 | 0,006 | 0,019 | 0,007 | 0,022 | 0,017 | 0,007 | -     | 0,003 | 0,016 | 0,020 | 0,012 | 0,011 | 0,008 |   |
| Alelo 12       | 0,173 | - | 0,114 | 0,125 | 0,101 | - | 0,089 | 0,122 | 0,101 | 0,081 | 0,089 | 0,020 | 0,070 | 0,067 | 0,104 | 0,089 | 0,101 | 0,085 | 0,100 | 0,120 | 0,085 | 0,078 | 0,097 | 0,024 | 0,075 | 0,064 |   |
| Alelo 13       | 0,290 | - | 0,236 | 0,292 | 0,291 | - | 0,266 | 0,262 | 0,266 | 0,230 | 0,188 | 0,392 | 0,293 | 0,232 | 0,223 | 0,251 | 0,264 | 0,241 | 0,220 | 0,240 | 0,271 | 0,292 | 0,225 | 0,378 | 0,236 | 0,264 |   |
| Alelo 14       | 0,265 | - | 0,328 | 0,306 | 0,355 | - | 0,379 | 0,359 | 0,350 | 0,392 | 0,393 | 0,216 | 0,280 | 0,323 | 0,328 | 0,377 | 0,301 | 0,385 | 0,343 | 0,320 | 0,346 | 0,307 | 0,291 | 0,293 | 0,307 | 0,328 |   |
| Alelo 14,3     | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 15       | 0,099 | - | 0,225 | 0,203 | 0,202 | - | 0,211 | 0,193 | 0,188 | 0,230 | 0,250 | 0,177 | 0,213 | 0,195 | 0,260 | 0,195 | 0,220 | 0,213 | 0,223 | 0,220 | 0,236 | 0,226 | 0,240 | 0,195 | 0,249 | 0,168 |   |
| Alelo 15,3     | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,002 | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 16       | 0,056 | - | 0,070 | 0,053 | 0,029 | - | 0,036 | 0,051 | 0,039 | 0,041 | 0,054 | 0,177 | 0,057 | 0,082 | 0,039 | 0,052 | 0,052 | 0,043 | 0,053 | 0,067 | 0,037 | 0,054 | 0,056 | 0,049 | 0,079 | 0,088 |   |
| Alelo 16,3     | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,007 | 0,020 | 0,017 | 0,006 | 0,013 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 17       | -     | - | 0,015 | 0,006 | 0,003 | - | 0,007 | 0,007 | 0,006 | -     | 0,018 | -     | 0,070 | 0,070 | 0,010 | -     | 0,017 | 0,011 | 0,027 | 0,013 | 0,020 | 0,023 | 0,041 | 0,024 | 0,030 | 0,048 |   |
| Alelo 17,3     | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,002 | 0,005 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 18       | -     | - | 0,001 | -     | -     | - | -     | -     | 0,006 | -     | -     | -     | 0,007 | 0,015 | -     | -     | 0,003 | -     | 0,010 | 0,013 | 0,003 | 0,004 | 0,026 | 0,024 | 0,013 | 0,024 |   |
| Alelo 18,3     | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,003 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 19       | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | 0,002 | -     | -     | -     | -     | -     | 0,009 | -     | -     | -     | -     | -     | 0,007 | -     | -     | 0,005 | -     | -     | 0,008 |   |
| <b>DXS9898</b> |       |   |       |       |       |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |
| Alelo 7        | -     | - | -     | 0,001 | -     | - | -     | -     | 0,008 | 0,014 | 0,018 | 0,039 | -     | 0,003 | 0,002 | 0,003 | 0,005 | 0,009 | 0,003 | 0,013 | 0,087 | -     | 0,087 | -     | 0,002 | -     |   |
| Alelo 8        | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,013 | -     |   |
| Alelo 8,3      | -     | - | 0,038 | 0,227 | 0,265 | - | 0,259 | -     | 0,076 | 0,095 | 0,125 | 0,098 | 0,150 | 0,110 | 0,131 | 0,180 | 0,205 | 0,173 | 0,167 | 0,113 | 0,129 | 0,191 | 0,138 | 0,195 | 0,032 | 0,152 |   |
| Alelo 9        | -     | - | -     | 0,010 | -     | - | -     | -     | -     | 0,014 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,003 | -     | 0,003 | -     | 0,005 | 0,019 | -     | -     | 0,038 | -     |   |
| Alelo 10       | -     | - | 0,003 | 0,006 | 0,012 | - | 0,007 | -     | 0,137 | 0,122 | 0,125 | 0,098 | 0,003 | 0,012 | 0,027 | 0,039 | 0,035 | 0,045 | 0,013 | 0,020 | 0,050 | 0,008 | 0,051 | 0,085 | 0,030 | 0,016 |   |
| Alelo 11       | -     | - | 0,059 | 0,186 | 0,225 | - | 0,219 | -     | 0,177 | 0,162 | 0,143 | 0,255 | 0,120 | 0,073 | 0,191 | 0,197 | 0,185 | 0,187 | 0,150 | 0,147 | 0,214 | 0,171 | 0,153 | 0,159 | 0,139 | 0,088 |   |
| Alelo 12       | -     | - | 0,527 | 0,319 | 0,285 | - | 0,293 | -     | 0,401 | 0,378 | 0,304 | 0,235 | 0,367 | 0,329 | 0,343 | 0,261 | 0,279 | 0,312 | 0,307 | 0,367 | 0,294 | 0,346 | 0,306 | 0,232 | 0,327 | 0,352 |   |
| Alelo 13       | -     | - | 0,279 | 0,184 | 0,153 | - | 0,164 | -     | 0,151 | 0,149 | 0,214 | 0,157 | 0,257 | 0,393 | 0,208 | 0,232 | 0,198 | 0,213 | 0,243 | 0,233 | 0,174 | 0,222 | 0,158 | 0,207 | 0,285 | 0,328 |   |
| Alelo 13,3     | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,002 | 0,007 | 0,007 | 0,006 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |   |
| Alelo 14       | -     | - | 0,076 | 0,059 | 0,055 | - | 0,053 | -     | 0,042 | 0,054 | 0,071 | 0,118 | 0,100 | 0,076 | 0,085 | 0,076 | 0,062 | 0,045 | 0,097 | 0,073 | 0,045 | 0,043 | 0,097 | 0,110 | 0,120 | 0,064 |   |
| Alelo 15       | -     | - | 0,019 | 0,008 | 0,006 | - | 0,005 | -     | 0,003 | 0,014 | -     | -     | 0,003 | 0,003 | 0,012 | 0,005 | 0,022 | 0,012 | 0,017 | 0,027 | 0,003 | -     | 0,010 | 0,012 | 0,011 | -     |   |
| Alelo 16       | -     | - | -     | -     | -     | - | -     | -     | 0,006 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 0,007 | -     | -     | -     | -     | 0,002 | -     |   |

CONTINUAÇÃO DA TABELA 5

**APÉNDICE III**



Curitiba, 04 de março de 2011

Ilmo (a) Sr. (a)  
Luciellen Davila Giacomel

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Estudo de frequências alélicas de dez locos STR do cromossomo X na população do Estado do Paraná e sua contribuição na identificação humana**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 01 de dezembro de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 15 de dezembro de 2011.

Registro CEP/SD: 1041.165.10.11

CAAE: 5869.0.000.091-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do 1º relatório parcial: 05/09/2011.

Atenciosamente

  
**Profª. Drª. Cláudia Seely Rocco**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde  
**Profª. Drª. Cláudia Seely Rocco**  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa - SD/UFPR