



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM GENÉTICA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE 12 LOCI STRs DO
CROMOSSOMO X NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Goiânia

2018

NAYARA LOPES DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE 12 LOCI STRs DO
CROMOSSOMO X NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação
Mestrado em Genética - Mgene, Pontifícia Universidade
Católica de Goiás - PUC Goiás, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Genética.

Orientador(a): Profa. Dra. Thaís Cidália Vieira

Co-Orientador: Prof. Aparecido Divino da Cruz, PhD

Goiânia

2018

S729d

Souza, Nayara Lopes de

Diversidade genética de 12 LOCI X-STRs na população brasileira[recurso eletrônico]/ Nayara Lopes de Souza.-- 2018.

58 f.; il.

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética, Goiânia, 2018

Inclui referências f.51-56

1. Genética da população humana. 2. Cromossomos. 3. Frequência do gene. 4. Marcadores genéticos. I.Vieira, Thaís Cidália. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 575.17(043)

ATA COMPLEMENTAR N° 140/2018

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DISCENTE: NAYARA LOPES DE SOUZA

DEFENDIDA EM 13 de março de 2018 e aprovada COM CONCEITO... A

O título foi alterado () não (X) sim

Caracterização Genética de 12 locos STRs do cromossomo X
na População Brasileira

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Maria Cidália Vieira Gigonza
PUC Goiás (Presidente)


Prof. Dr. Marc Alexandre Duarte Gigonza
PUC Goiás


Prof. Dr. Ricardo Goulart Rodovalho
Laboratório Biocroma

Agradecimentos

Agradeço a Deus que em todos os momentos está comigo, sempre me aparando e protegendo das dificuldades durante essa grande caminhada chamada “vida”.

Dedico este trabalho “in memoriam” ao meu pai Márcio Lopes ao meu avô materno José Félix e a minha avó paterna Inácia Lopes e aproveito também para agradecê-los, estejam onde estiverem;

A minha orientadora Dra. Thaís Cidália Vieira, pelo pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivo na escolha do tema, pela oportunidade que me proporcionou durante o mestrado, e por ser uma pessoa de boa vontade com o próximo e de uma humildade sem tamanho. Além de uma grande professora, e profissional, há qual me espelho;

Ao meu querido Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, por me proporcionar momentos de conversa, aprendizado, além de tanto carinho. Espero um dia ter um pouco da sua humildade e do grande coração que carrega consigo. Eu o levarei comigo “para toda a eternidade”;

Agradeço a todo pessoal do laboratório Biocroma, ao qual tive a grande oportunidade de conhecer. Luana, Poliana, e Gilberto, obrigada por serem tão receptivos e sempre dispostos para comigo. Em especial ao Dr. Ricardo Goulart Rodovalho, pelo grande auxílio desde o estágio que me foi proporcionado, momento em aprendi muito, e a grande força com a construção do meu trabalho. Obrigado pela paciência em tirar um pouco do seu tempo para me explicar todas minhas dúvidas;

Ao Professor Dr. Marc Alexandre Duarte Gigonzac pelas contribuições e por todo o apoio técnico passado quando o procurei;

À minha mãe Doralice Oliveira de Souza, pela determinação e luta na minha formação sempre me incentivando mesmo com tantas dificuldades do dia a dia;

Aos meus familiares pela confiança e o amor sempre a mim depositados;

Ao meu noivo Rodrigo Santana Pires, que sempre me incentivou e acreditou na minha capacidade. Obrigada por toda ajuda e esforços dedicados a mim. Obrigado por ter me dado “a sorte de um amor tranquilo”;

Ao meu sogro Sr. Fausto Alves Pires e a minha sogra Dn^a Julia Santana Queiroz que não mediram esforços quando precisei, sem a boa vontade deles talvez não conseguiria concluir meu mestrado. Gratidão e reconhecimento é um sentimento pelo qual levarei para sempre comigo.

Aos amigos e professores do Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR). Obrigado por tudo que fizeram por mim, vocês foram essenciais na construção do meu trabalho;

Aos meus amigos e colegas, por todo o apoio. Quero agradecer em especial as minhas amigas Lilian de Sousa Teodoro, Lorrynne Guimarães Oliveira e a Samara Socorro da Silva Pereira pela amizade, pelos momentos de descontração, aprendizado tanto na carreira profissional, como na vida pessoal. Obrigado por me alegrar nos momentos em que me deparava triste e em momentos de desespero. Vocês sempre estavam lá para me acalmar.

Estendo meus agradecimentos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo fomento, que foi muito importante para minha formação.

“Onde a palavra falha o DNA fala.”

(Autora: Ana Paula Medeiros de Oliveira)

Sumário

| | |
|---|------|
| Lista de Tabelas, figuras e anexos..... | ix |
| Siglas e abreviaturas..... | xi |
| Resumo..... | xiii |
| Abstract..... | xiv |
| 1. Introdução..... | 15 |
| 2. Referencial Teórico..... | 17 |
| 2.1 Cromossomo X..... | 17 |
| 2.2 Polimorfismo Humano..... | 18 |
| 2.3 Marcadores Microssatélites ou STRs (Short Tandem Repeat)..... | 21 |
| 2.4 STRs do Cromossomo X..... | 24 |
| 2.5 Populações Humanas..... | 27 |
| 2.6 Bancos de Dados..... | 28 |
| 3. Objetivos..... | 30 |
| 4. Materiais e Métodos..... | 31 |
| 4.1 Delineamento do Estudo..... | 31 |
| 4.2 Grupo Amostral..... | 31 |
| 4.3 Coleta da amostra e Extração de DNA..... | 32 |
| 4.4 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase..... | 32 |
| 4.5 Genotipagem e Análise dos Fragmentos..... | 33 |
| 4.6 Análise Estatística..... | 34 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 35 |
| 6. Conclusão..... | 51 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 7. Referências Bibliográficas..... | 52 |
| 8. Anexos..... | 58 |

Lista de Tabelas e Figuras

Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Componentes e quantidade de reagentes utilizados na PCR..... | 32 |
| Tabela 2. Ciclagens utilizadas no termociclador durante a PCR..... | 33 |
| Tabela 3. Reagentes e concentrações utilizados na genotipagem..... | 33 |
| Tabela 4. Parâmetros utilizados na configuração do sequenciador 3500 para configuração e genotipagem das amostras. | 33 |
| Tabela 5. Alelos mais frequentes para cada marcador STRs do cromossomo X e suas frequências - Mulheres | 36 |
| Tabela 6. Alelos mais frequentes para cada marcador STRs do cromossomo X e suas frequências- Homens | 36 |
| Tabela 7. Frequência Alélica de loci Argus X-STR em Mulheres. | 38 |
| Tabela 8. Frequência Alélica de loci Argus X-STR em Homens | 43 |

Quadros

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Principais casos em que pode-se aplicar o uso de marcador do cromossomo X. Adaptado de Butler, 2012..... | 25 |
|---|----|

Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Regiões Pseudoautosômicas..... | 18 |
| Figura 2. Esquema da localização do microssatélite..... | 19 |
| Figura 3. Polimorfismo de Regiões Microssatélite. | 20 |
| Figura 4. Ilustração da formação do polimorfismo por slippage da DNA polimerase..... | 21 |
| Figura 5. Ilustração do tamanho da unidade de repetição | 23 |
| Figura 6. Ideograma do cromossomo X..... | 23 |
| Figura 7. Nomenclatura de um Marcador STR..... | 25 |
| Figura 8. Mapa do Brasil indicando as 5 Regiões do País. | 31 |

Gráficos

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Quantidade de Alelos apresentado por locus em Mulheres..... | 47 |
| Gráfico 2. Quantidade de Alelos apresentado por locus em Homens..... | 48 |

Gráfico 3. Alelos mais frequentes em diferentes populações..... 49

Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

® - Marca Registrada

°C - Graus Celsius.

μ L - Microlitros

CODIS - Sistema Combinado de Índices de DNA (do inglês, Combined DNA Index System)

DIPs - Polimorfismo de Inserção e Deleção (do inglês, deletion/insertion polymorphisms, ou Indels)

DL - Desequilíbrio de Ligação

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

He - Heterozigosidade Esperada

HLA - Antígeno Leucocitário Humano (do inglês, Human Leucocyte Antigen)

Ho - Heterozigosidade Observada

ISFG - Sociedade Internacional de Genética Forense (do inglês, International Society for Forensic Genetics)

Mb - Megabase

PAR1 - Região Pseudoautosômica 1 (do inglês, Pseudoautosomal Region 1)

PAR2 - Região Pseudoautosômica 2 (do inglês, Pseudoautosomal Region 2)

Pb - Pares de Bases

PCR - Reação em Cadeia da polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction)

PD - Poder de Discriminação (do inglês, Power of Discrimination)

PE - Poder de Exclusão (do inglês, Power of Exclusion)

PIC - Conteúdo de Informação Polimórfica (do inglês, Polymorphism Information Content)

RIBPG - Rede Integrada de Banco de Perfis Genéticos

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês, Single Nucleotide Polymorphism)

STR - Sequências com repetições curtas em Tandem (do inglês, Short Tandem Repeat)

USA - Estados Unidos da América (do inglês, United States of America)

VNTR - Sequência em número variável de repetições em tandem (do inglês, Variable Number of Tandem Repeats)

X-STRs - Sequências com Repetições Curtas em Tandem presentes no cromossomo X (do inglês, Short Tandem Repeat)

Resumo

A construção de banco de dados com frequências alélicas e genotípicas de marcadores STRs tem um impacto significativo nos processos de identificação humana de diferentes populações. O Brasil já possui banco de dados de frequências alélicas e genotípicas dos marcadores dos cromossomos autossômicos e marcadores do cromossomo Y. No entanto, existem poucos estudos de frequências alélicas e genotípicas para os marcadores do cromossomo X. Estes marcadores possuem um alto poder de discriminação e apresentam alta taxa de resolutividade em situações forenses, e análises de vínculo genético. O objetivo deste estudo foi estimar, em uma amostra populacional brasileira, frequências alélicas e genotípicas, observadas em 12 marcadores STR do cromossomo X visando a consolidação de um banco de dados populacional com aplicações em investigação de vínculo genético. Para isso, foram analisados 1.190 perfis genéticos de indivíduos não relacionados geneticamente e submetidos a testes de investigações de vínculo genético, provenientes de todas as regiões do Brasil. As amostras foram genotipadas utilizando o sistema Investigator® Argus X-12 (Qiagen, Germany). A eletroforese capilar foi realizada no analisador genético ABI 3500. As frequências alélicas e genotípicas foram analisadas com auxílio do software Genetix 4.05.2 e Alerquin®, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi analisado através do software GenePop 4.1.3. As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas para os 12 marcadores STRs do cromossomo X, o alelo 15 do locus DXS7423 foi o mais frequente, apresentando valor correspondente a 0,40 no sexo feminino e 0,44 no sexo masculino. No entanto, diversos alelos em todos os marcadores apresentaram frequências inferiores a 0,01, sendo considerados raros na população. Não foi observado desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg no conjunto de marcadores quando analisados simultaneamente. O locus DXS10135 apresentou uma heterozigosidade esperada maior em relação aos outros loci para os indivíduos do sexo feminino, com frequência 0,9445. A heterozigosidade observada também apresentou variação quanto aos valores encontrados, de 0,9160 a 0,6803. Sendo assim, o sistema Argus X-12 apresentou-se informativo na população brasileira, sendo, portanto, uma ferramenta útil na prática forense, particularmente em casos inconclusivos e em casos de parentesco envolvendo alta complexidade.

Palavras Chave: Frequência Alélica. Marcadores X-STR, Argus X 12, Microssatélites.

Abstract

Database construction with allelic and genotypic frequencies of STRs has a significant impact on the processes of human identification of different populations. Brazil already has a database of allelic and genotype frequencies of the markers of the autosomal chromosomes and markers of the Y chromosome. However, there are few studies of allelic and genotype frequencies for markers of the X chromosome. These markers have a high discrimination power and have a high rate of resolution in forensic situations, and genetic linkage analysis. The objective of this study was to estimate, in a Brazilian population, allelic and genotypic frequencies, observed in 12 STR markers of the X chromosome, aiming the consolidation of a population database with applications in genetic linkage research. For this, 1,190 genetic profiles of individuals not genetically related and submitted to genetic linkage tests from all regions of Brazil were analyzed. The samples were genotyped using the Investigator® Argus X-12 system (Qiagen, Germany). Capillary electrophoresis was performed on ABI 3500 gene analyzer. Allele frequencies were analyzed using Genetix 4.05.2 and Alerquin® software and Hardy-Weinberg equilibrium was analyzed using GenePop 4.1.3 and Alerquin® software. Allele and genotype frequencies were obtained for the 12 STRs of the X chromosome, the 15 allele of the DXS7423 locus was the most frequent, presenting a value corresponding to 0.40 in the female sex and 0.44 in the male sex. However, several alleles in all markers presented frequencies lower than 0.01, being considered rare in the population. No Deviation of Hardy-Weinberg Equilibrium was observed in the marker set when analyzed simultaneously. The DXS10135 locus had a higher expected heterozygosity than the other loci for females, with a frequency of 0.9445. The observed heterozygosity also presented variation regarding the values found, from 0.9160 to 0.6803. Thus, the Argus X-12 system was informative in the Brazilian population and, therefore, a useful tool in forensic practice, particularly in inconclusive cases and in cases of kinship involving high complexity.

Keywords: Allele Frequency, Markers X-STR, Argus X 12, Microsatellites.

1 Introdução

Após a descoberta da herança genética sugerida por Mendel, a identificação humana foi realizada por anos pelos sistemas de grupos sanguíneos ABO, Rh, MN. Além destes sistemas, a análise de paternidade contava também com o sistema HLA, que juntos representaram por muito tempo os padrões de análise na genética forense (DIAS, 2013).

Com o grande advento da ciência e da tecnologia na área forense, o processo de identificação humana teve seu pico em meados dos anos 80, quando a molécula de DNA passou a ser o principal instrumento de auxílio para testes de vínculo genético e a investigação criminal (BENECKE, 1997; BONACCORSO, 2010). A utilização do DNA nos testes de vínculo genético apresentou uma alta confiabilidade, sendo desde então aceito como provas legais na resolução de casos judiciais, como na inclusão e exclusão de testes de paternidade e na investigação criminal (PARDINI et al. 2001).

O primeiro relato descrito na resolução de casos forenses foi solucionado por Alec Jeffreys, em 1984, onde a polícia sugeriu a aplicação de impressão digital de DNA na identificação forense, envolvendo caso de imigração. Logo depois, foi também fundamental na resolução de dois assassinatos, na cidade de Leicester, Inglaterra. Diante disso, Alec Jeffreys percebeu as unidades repetitivas individuais dentro de um minissatélite, revelando assim um alto grau de variabilidade genética nessas regiões (JOBBLING, 2013).

Posteriormente, entre 1985-1995 Kary Mullis, concebeu uma técnica inovadora que revolucionaria a biologia molecular, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). (BUTLER, 2015). Por conseguinte, foram descobertas novas sequências repetitivas semelhantes às regiões VNTR, porém, de tamanhos menores e com repetições mais curtas, sendo assim denominadas de regiões microssatélites ou STRs (repetições curtas em tandem) (JOBBLING; GILL, 2004). A partir disso, a utilização dos microssatélites como marcadores moleculares juntamente com a técnica de PCR tornou-se rotina em testes de paternidade e vínculo genético, possibilitando assim a construção de bancos de dados genéticos com frequências alélicas e genotípicas auxiliando e agilizando o trabalho do técnico investigador.

O Brasil já possui banco de dados de frequências alélicas e genotípicas dos marcadores dos cromossomos autossômicos e marcadores do cromossomo Y e X. Dessa

forma, seguindo as recomendações da ISFG (Sociedade Internacional de Genética Forense), diversos pesquisadores como na população de Alagoas (FERREIRA DA SILVA et al. 2002), Mato Grosso do Sul (SILVA et al. 2004), Rio de Janeiro (SILVA et al. 2004), Rio Grande do Sul (LEITE et al. 2006), São Paulo (SÃO-BENTO et al. 2008) e Goiás (VIEIRA, 2013) iniciaram construção do banco de dados para marcadores autossômicos e sexuais. No entanto, existem poucos estudos de frequências alélicas e genotípicas para os marcadores do Cromossomo X. Estes marcadores possuem um alto poder de discriminação em alguns casos forenses, sendo úteis como marcadores adicionais. As frequências alélicas dos marcadores do cromossomo X encontradas são isoladas, como nos trabalhos apresentados por Kobachuk (2012) do Estado do Paraná, Filho (2010) do Distrito Federal, Silva (2008) de Alagoas, e Silva (2007) de São Paulo. Sendo assim, a construção de um banco de dados para as frequências dos marcadores do cromossomo X compreendendo a população brasileira contribuirá para a consolidação do banco de dados populacional, sobretudo contribuindo para que os processos de investigação de vínculo genético e identificação humana sejam mais fidedignos, destacando a aplicação dos STRs presentes no cromossomo X como marcadores adicionais nos testes de vínculo genético dessa população.

2 Referencial Teórico

2.1 Cromossomo X

O cromossomo X possui característica única no genoma humano. Indivíduos do sexo feminino apresentam em homozigose em relação a herança do cromossomos X, já os indivíduos do sexo masculino em hemizigose, com apenas uma cópia do cromossomo X herdado. (GRIFFITHS et al. 2015).

Os indivíduos do sexo feminino possui um dos cromossomos X herdados inativado (CHOW et al. 2005; BUTLER 2012). Segundo Stabellini (2008); e Bulter (2012), essa inativação é para compensar o desequilíbrio da dosagem gênica entre os indivíduos do sexo feminino e masculino, sendo resultado do silenciamento durante os processos de divisão mitótica somática. Mesmo com a inativação, o cromossomo ainda continua a expressar alguns genes (CHOW et al. 2005). De acordo com Maluf et al. (2011) 25% dos genes presentes no cromossomo X podem escapar da inativação devido a sua localização, a maioria dos genes estão localizados no braço curto do cromossomo X, sendo assim, estão fora da região onde ocorre recombinação genética.

Segundo Ohno (1967), os cromossomos sexuais evoluíram a partir de um par de cromossomos autossômicos homólogos. Existem regiões nos cromossomos sexuais denominadas de pseudoautossômicas (MALUF et al. 2011). Essas regiões são assim denominadas por herdarem essas regiões de forma autossômica (MANGS; MORRIS, 2007). São nessas regiões pseudoautossômicas que ocorre a troca de material genético (recombinação genética ou crossing-over) entre os cromossomos sexuais (X e Y). Essas regiões encontram-se localizadas nas extremidades desses cromossomos, identificadas como PAR1 e PAR2 (do inglês, Pseudoautosomal Region). Ellis; Goodfellow (1989); Mangs; Morris (2007), afirmam que PAR1 encontra-se localizada na extremidade do braço curto de ambos os cromossomos sexuais. Já PAR2 também na extremidade, só que no braço longo dos cromossomos X e Y (FREIJE et al. 1992; MANGS; MORRIS, 2007; MALUF et al. 2011), como apresentado na figura 1.

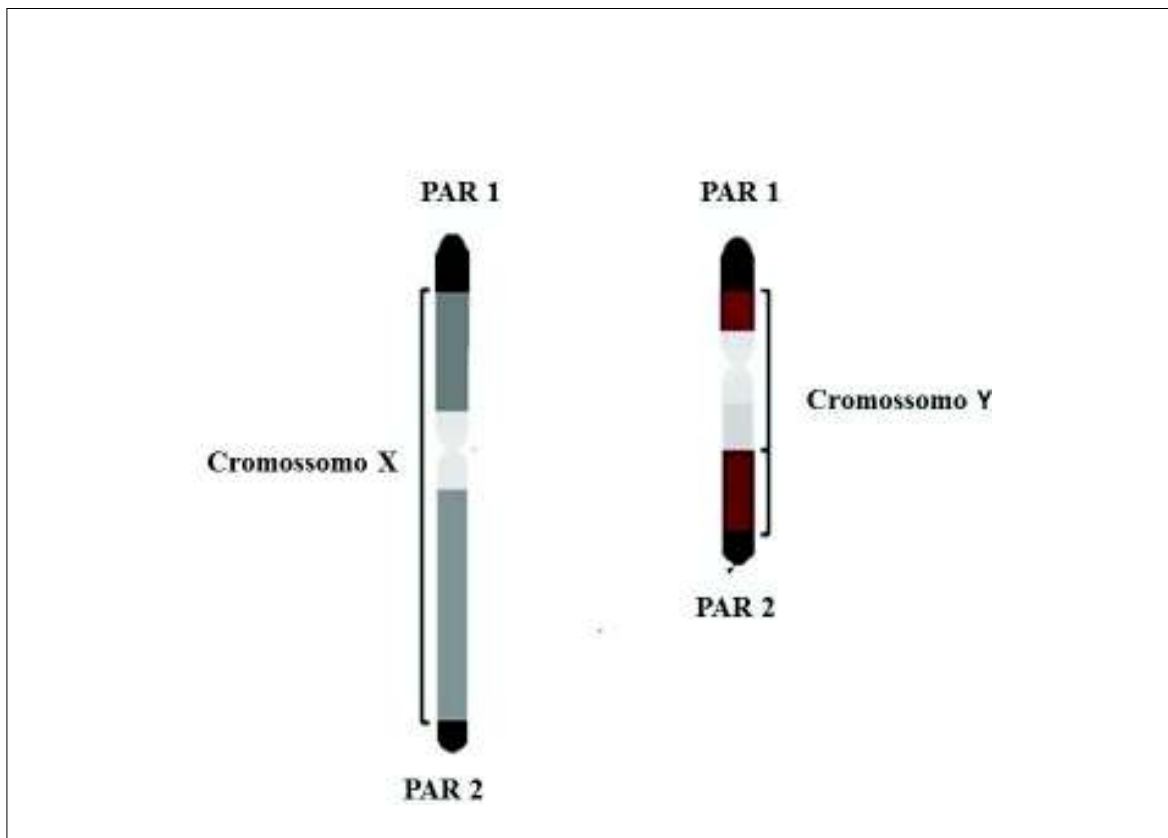


Figura 1. Regiões Pseudoautosômicas. Fonte: Adaptada de Jorge et al. (2008).

O cromossomo X possui um tamanho de aproximadamente 153 Mb e contém cerca de 1100 genes identificados (BUTLER, 2012). Este cromossomo é considerado um dos maiores dentre os cromossomos humanos, mas em questão de densidade de genes é considerado menor em relação aos autossômicos. Essa menor densidade de genes é acompanhada por um excesso de regiões repetitivas, ricas em genes com guanina e citosina (CHOW et al. 2005).

2.2 Polimorfismo Humano

Para Butler (2012), 99,7% do genoma humano é igual para todos os indivíduos, sendo que 0,3% dessas regiões é a porção que difere uma pessoa da outra a nível genético. Essas regiões são encontradas por todo genoma em forma repetitiva, tipicamente localizada em regiões intergênicas, e podem ser utilizadas como marcadores genéticos. Por estarem presentes em regiões intergênicas, as variações na sequência de DNA normalmente não altera o equilíbrio gênico dos indivíduos, portanto, as células mantem suas funções vitais normais (BUTLER 2012).

Segundo Bennet (2000), as regiões repetitivas encontram-se localizadas no DNA extragênico e representa 15% dessa classe de DNA, sendo dividida em satélite, minissatélites e microssatélites, como apresentado na figura 2.

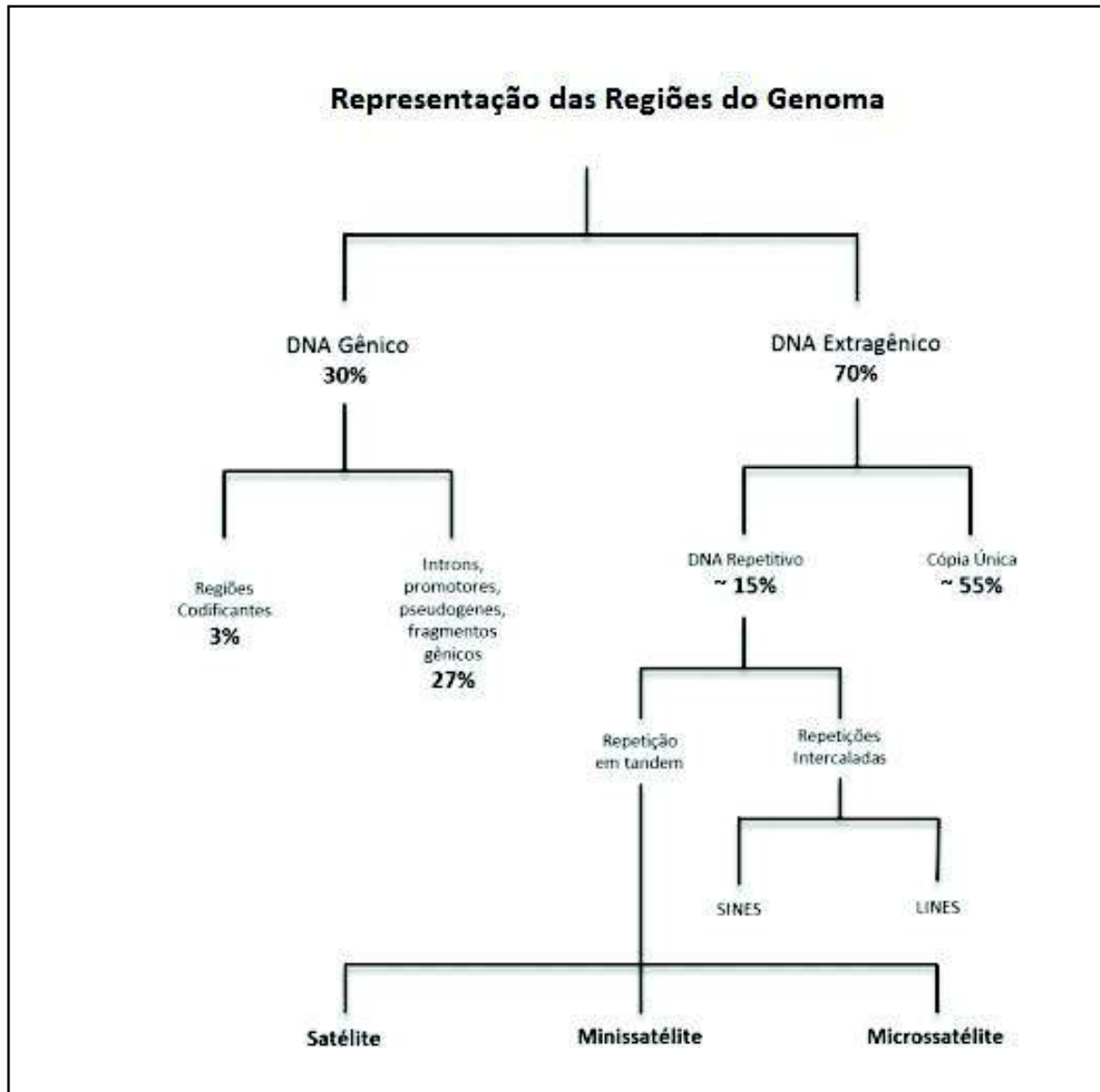


Figura 2. Esquema da organização do genoma humano. Fonte: Adaptado de Rodovalho, 2017.

Apesar do genoma humano apresentar um tamanho observado de três bilhões de nucleotídeos, apenas 0,1% apresenta variação na sequência, denominada de polimorfismo (LI et al. 2009). Para que um loco seja polimórfico, ele deve apresentar uma frequência genotípica maior ou igual a 1% em uma população (DECANINE, 2016).

Existem diferentes tipo de polimorfismo de DNA, e eles são classificados quanto a sua localização e sua natureza molecular (PENA, 2000). O polimorfismo é dividido em dois grupos, sendo ele o polimorfismo de comprimento e o de sequência (BESSELINK,

2003). O polimorfismo de sequência são alterações que ocorrem em um único par de bases, conhecidos como SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo Único), já o polimorfismo de comprimento é assim denominado por apresentarem tamanhos e tipos variáveis. (BESSELINK, 2003). O segundo polimorfismo é o marcador mais utilizado na prática forense, como por exemplo, as sequências STR (do inglês, Short Tandem Repeat). Os STRs apresentam um alto grau de polimorfismo e quantidade diminuta de pares de bases (GRIFFITHS et al. 2015; MACHADO et al. 2017).

As regiões microssatélites são altamente polimórficas. Este polimorfismo é explicado pela quantidade de repetições de pares de bases presente nestas regiões, como apresentado na Figura 3(FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

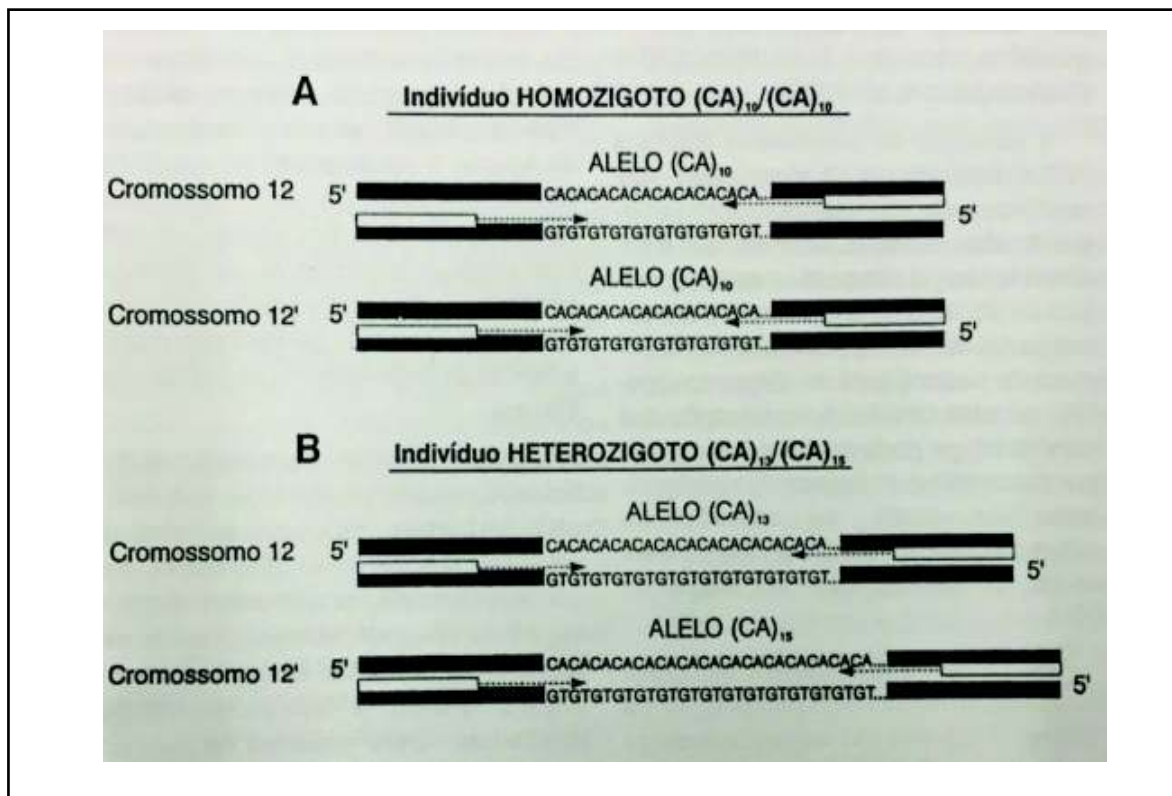


Figura 3. Ilustração representando o polimorfismo de regiões microssatélite. A: Indivíduo homozigoto para esse loco dinucleotídeo (CA) repetido 10 vezes consecutivo (Alelo 10). B: Indivíduo heterozigoto para esse loco, dinucleotídeo (CA) sendo um repetido 13 vezes e outro 15 vezes consecutivo. Fonte: Adaptado de Ferreira; Grattapaglia, 1998.

Sequências com um alto grau de polimorfismo reduz a possibilidade que haja indivíduos com sequências iguais, sendo assim, apresentam um elevado poder de discriminação (BUTLER, 2005).

O polimorfismo é gerado por eventos de mutações, que alteram as sequências de DNA (GRIFFITHS et al. 2015). Nos locis STRs os polimorfismos são altamente propensos a mutações que são formados pelo “deslizamento” do inglês *slippage* da DNA polimerase que ocorre no momento da replicação do DNA, e está associada com um mecanismo de reparo falho (ELLEGREN, 2004). Esse processo de *slippage* da DNA polimerase ocorre quando a enzima se dissocia do DNA durante uma pausa na replicação. A fita que está sendo sintetizada é separada da fita molde, onde a fita a ser sintetizada se liga a outra sequência, podendo ser no sentido 3' => 5' ou no sentido 5' => 3', processo conhecido com erro de pareamento (VIGUERA et al. 2001).

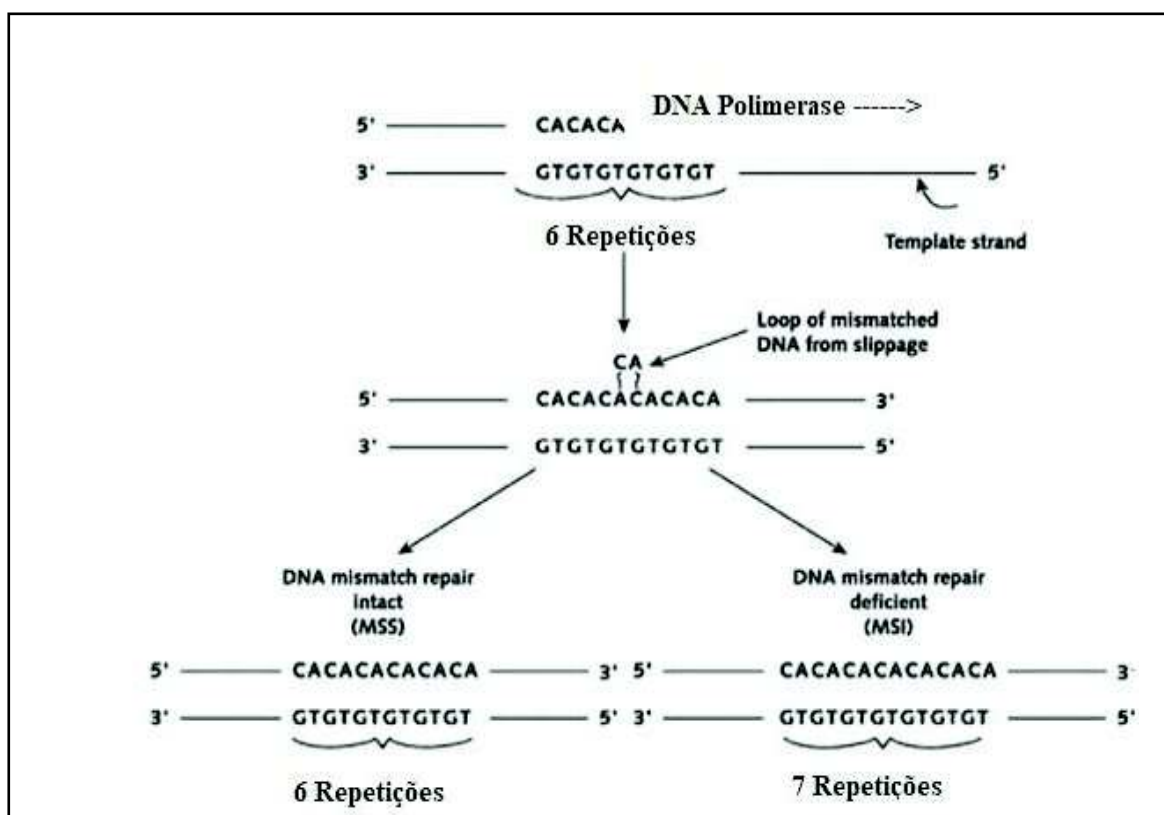


Figura 4. Ilustração da formação do polimorfismo por *slippage* da DNA polimerase. Fonte: Adaptado de Vieira, 2013.

2.3 Marcadores Microsatélites ou STRs (Short Tandem Repeats)

Os marcadores genéticos são loci que apresentam características detectáveis que diferenciam os indivíduos de determinada população, demonstrando a variabilidade genética presente (MENEZES et al. 2006). Os marcadores genéticos são subdivididos em 3 grupos,

sendo os marcadores morfológicos, marcadores citogenéticos e os marcadores moleculares, que inclui os marcadores bioquímicos (isoenzimas e aloenzimas) e aqueles baseados em ácidos nucleicos (MARKERT; MOLLER, 1959; COE et al. 1988; RICK; YODER, 1988; PATERSON et al. 1991; PINTO-MAGLIO et al. 2000).

Os marcadores moleculares são utilizados na análise da variabilidade genética existente intraespecífica e interespecífico (BERED et al. 1997). Os marcadores moleculares mais utilizados na genética de populações são do tipo Indels (inserção e deleção), SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo Único) (MILLS et al. 2015) e STRs (JOBIM et al. 2006). Embora existam vários conjuntos de reagentes comerciais como os marcadores bialélicos (DIPs, SNPs e STRs) disponíveis para prática forense, recentes estudos trazem a importância da escolha para a rotina de um laboratório. Além das questões técnicas, como a utilidade do sistema e a relação genética a ser testada, é importante ter conhecimento quanto as características do marcador, a singularidade da população, a diversidade alélica e as taxas de mutação (TILLMAR; MOSTAD, 2014).

Os autores supracitados testaram três conjuntos de marcadores diferentes a fim de apresentar qual melhor marcador para resolução de casos inconclusivos de investigação de paternidade pela análise do DNA. Entre os três conjuntos testados, o marcador STR foi claramente o mais eficiente na resolução de inconsistências.

O STRs podendo também ser chamadas de microssatélites (GOÉS, 2005), são amplamente distribuídos ao longo do genoma, e os estudos estão cada vez mais aprofundados devido a grande importância deste marcador na prática forense e na investigação humana (SHIN et al. 2005) . Em relação a quantidade de repetição, existe uma grande divergência entre os pesquisadores. Góes (2005) relata que as sequências STRs são repetições de 2 a 6 pares de bases, enquanto para Butler (2012) são de 2 a 7 pb, Carlson (2015), afirma que essas regiões microssatélites possuem de 2 a 10 pb repetidas em tandem. Contudo, Butler (2001) afirma que essas sequências possuem um tamanho que pode variar de ~100-400 pb. As regiões STRs também são caracterizadas pelo tamanho da unidade de repetição, sendo que dois nucleotídeos repetidos consecutivamente são denominados de dinucleotídeos, e assim sucessivamente, trinucleotídeos, tertanucleotídeos, pentanucleotídeo, até o hexanucleotídeos conforme ilustrado na figura 5 (BUTLER, 2012).

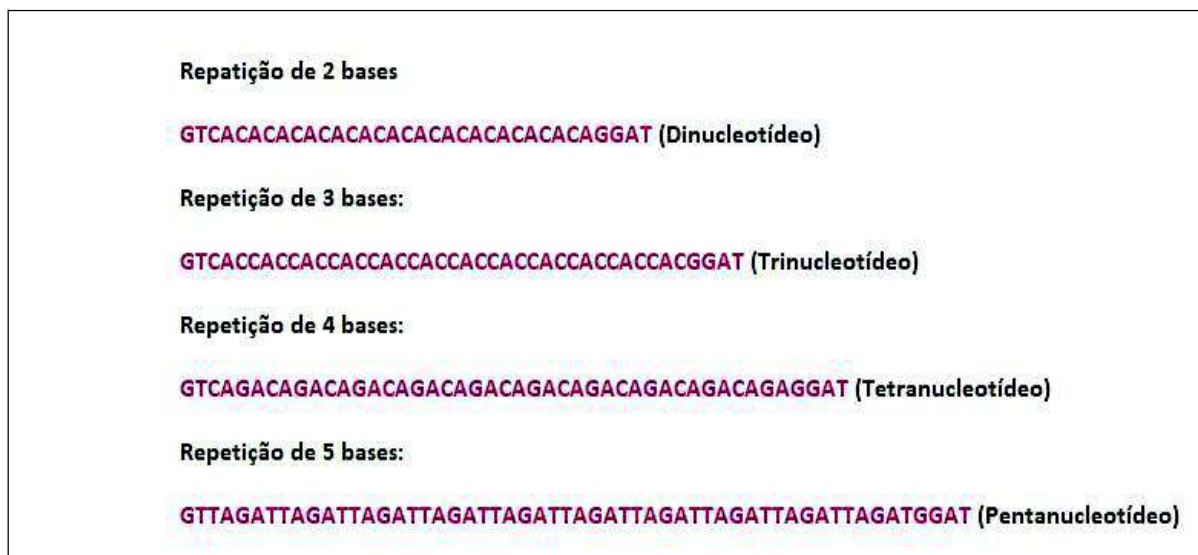


Figura 5. Ilustração do tamanho da unidade de repetição.

De acordo com Góes (2005) essas regiões STR por menores que sejam, podem ser analisadas após a amplificação pela técnica de PCR, este aspecto do STR permite genotipar amostras degradadas e em pequenas quantidades.

A nomenclatura dos marcadores é fator muito importante, pois desta forma pode-se saber de qual cromossomo está falando e onde ele está localizado. Devido a essa importância, a nomenclatura dos marcadores STR, foi padronizada, onde a primeira (“D”) significa que está presente no DNA. Por conseguinte, vem a identificação do cromossomo, os cromossomos alossômicos são identificados por X e Y, e os autossômicos pelo número de um a vinte e dois que representa onde está localizado no marcador. A letra “S” refere-se ao fato de o marcador de DNA ser uma cópia de sequência única. Consecutivamente, o último número do marcador refere-se a ordem que o marcador foi descoberto, a localização da sequência. Conforme ilustrado na figura 6 (BUTLER, 2005).

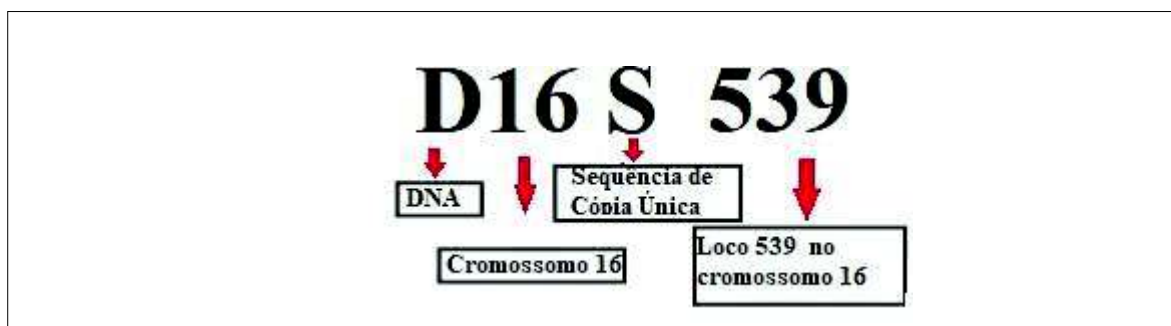


Figura 6. Nomenclatura de um marcador STR. Fonte: Adaptada de Butler, 2005.

2.4 Sequências STRs presentes no cromossomo X

As sequências STRs presentes no cromossomo X foram estudadas por Reinhard Szibor e colaboradores no Instituto de Medicina Legal de Magdeburg, na Alemanha, onde passaram a inseri-los como marcadores na prática forense, e conseqüentemente criaram um banco de dados do cromossomo X (<http://www.chrx-str.org/>) com todos os dados dos marcadores do cromossomo em estudo (BUTLER, 2012; SZIBOR, 2007).

Os marcadores do cromossomo X tem sido uma ferramenta de grande utilidade na prática forense e investigações de vínculo genético (ZARRABEITIA et al. 2009), porém, os marcadores STRs mais explorados são os autossômicos e do cromossomo Y (TOMAS et al. 2015). Estes marcadores na maioria dos casos são suficientes para obtenção de uma conclusão. No entanto, algumas situações complexas de identificação humana podem requerer a utilização dos marcadores do cromossomo X (SZIBOR, 2007). Estes podem ser utilizados como marcadores adicionais em análises genéticas juntamente com os autossômicos e do cromossomo Y de uma forma eficaz, principalmente em casos complexos de paternidade (GAO et al. 2007, ROBINO et al. 2006). A utilização dos marcadores do cromossomo X pode ser mais importante em alguns casos de vínculo genético, onde podem apresentar-se mais informativos para complementação da análise e aumentar o poder de discriminação do que os marcadores autossômicos (KLING et al. 2015). Como em investigação de paternidade em DUO, onde somente o suposto pai/mãe e o suposto filho em questão está presente, os marcadores do cromossomo X são adequados apenas quando se trata de casos envolvendo uma criança do sexo feminino (EDELDMANN et al. 2001.; GOMES et al. 2007; SZIBOR, 2007; BUTLER, 2012).

O principal motivo por essa utilização é pelo fato do cromossomo X dos pais serem inteiramente transmitido a prole do sexo feminino. Sendo assim, todas as mulheres herdaram o perfil genético completo do cromossomo X paternal (ZARRABEITIA et al. 2009; GAO et al. 2007). Butler (2012); Szibor (2007), ainda citam a utilização dos marcadores do cromossomo X em resolução de casos de pessoas desaparecidas e identificação de vítimas em acidentes catastróficos, além de casos como descritos no 1.

Quadro 1. Situações possíveis do uso de marcadores do cromossomo X. Fonte: Adaptado de Butler, 2012.

1. Casos completos de parentesco envolvendo pelo menos uma mulher;
2. Paternidade contestada a uma filha (especialmente em casos sem mãe);
3. Teste de meia-irmã onde o pai é o parente comum;
4. Comparações entre avós e netos;
5. Teste de paternidade em casos de incesto

A aplicação de marcadores genéticos para os fins forenses requer conhecimento sobre a posição do mapa cromossômico. Os marcadores intimamente ligados precisam ser verificados quanto ao desequilíbrio de ligação (EDELMANN et al. 2001), pois eles não segregam de forma independente. Por esse evento o cromossomo X é dividido em 4 grupos de ligação, como apresentado na figura 7 (SZIBOR, 2007).

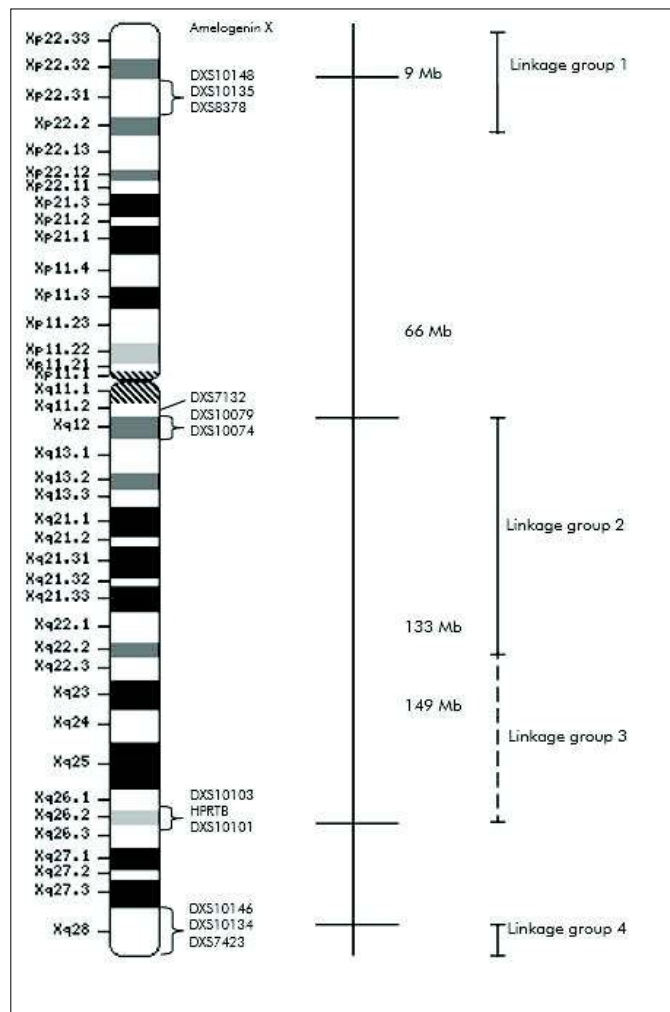


Figura 7. Ideograma do cromossomo X mostrando os grupos de ligação e suas representativas posições.
Fonte: Investigator Argus X-12 Handbook Qiagen 2013.

O desequilíbrio de ligação (DL) acontece quando a associação dos alelos de dois loci adjacentes não são distribuídos aleatoriamente (WEISS; CLARK, 2002). A ligação é um fenômeno em que os alelos adjacentes encontrados no mesmo segmento cromossômico são transmitidos juntos na meiose com uma frequência maior do que seria esperado ao acaso. Esses alelos ligados são transmitidos em blocos e são denominados de haplótipos (HARTL; CLARK, 1997).

Estudos do desequilíbrio de ligação podem fornecer informação a cerca da origem e história das populações humanas. Como exemplo o autor cita sobre o níveis de DL, que são muitos mais elevados em países não-africanos do que em populações africanas, o que pode indicar um gargalo populacional associado a origem da população não-africana. Em especial, o DL entre os marcadores do cromossomo X podem fornecer informações muito eficientes na revelação étnica (SZIBOR, 2007).

Quanto a taxa de recombinação em lócus Hartl; Clark (1997), afirmam, os lócus distantes entre si podem apresentar taxas mais altas comparadas a lócus mais próximos. Por outro lado, Andrade (2013), expõe que a taxa de recombinação é um fator que pode alterar o DL, e se nenhum outro fator além da recombinação estiver agindo na população, o desequilíbrio tenderá a zero. De acordo com o autor supracitado além da taxa de recombinação, o decaimento do DL também pode ser afetado por diversos eventos como: miscigenação, deriva genética, efeito fundador, gargalo populacional, mutação e seleção.

Seguindo com os fatores que podem alterar o DL, a mutação também é um evento muito importante em testes de identificação humana. Segundo Mortera (2016), a mutação em um alelo pode ocultar uma paternidade. De acordo com os estudos de Akhteruzzaman et al. (2012) as taxas de mutação nos loci STR são em média de 1 a 5 a cada 1000 transferências alélicas. Os estudos provam que as mutações são dados que não devem ser ignorados nos testes de vínculo genético, uma vez que a mutação pode ocasionar no aparecimento de novos alelos, diferentes dos herdados biologicamente. A recomendação é a elevação do número de marcadores para evitar falsas exclusões de parentescos (SUN et al. 2016; AKHTERUZZAMAN et al. 2012).

Relatos de inconsistência nos perfis genéticos de pais e supostos filhos em teste simples como Duo (Suposto pai/mãe e suposto filho) e Trio (Suposto pai, mãe e suposto filho) estão cada vez mais frequentes. Akhteruzzaman et al. (2012), citam alguns fatores que podem estar levando a estas frequentes inconsistências, como mutação na linhagem germinativa paterna ou materna, mutação no sítio de anelamento do primer, alelo nulo, entre outros fatores. As mutações na linhagem germinativa paterna foi observada por Sun et al. (2016); Vieira et al. (2013), que a produção de espermatozoides são maiores ao longo da vida do que dos óvulos, no entanto, essa maior produção e a rapidez com que os espermatozoides são produzidos durante a espermatogênese pode levar a maior observação de mutações. Mais uma vez, a utilização dos marcadores adicionais como marcadores do cromossomo X e Y são recomendados para esses casos quando há esses tipos de inconsistências (AKHTERUZZAMAN et al. 2012).

Outros fatores também podem alterar o desequilíbrio de ligação (DL), como idade populacional, tamanho e taxa de crescimento da população, migração e endocruzamento (ANDRADE, 2013).

2.5 Populações Humanas

O Brasil foi um dos últimos países a ser colonizado no processo de colonização (NEVES; PILÓ, 2008). De acordo com o IBGE, a população brasileira é formada por 190.732.694 indivíduos, de diferentes etnias, que variam de acordo com a região onde vivem (CENSO, 2010).

Pena (2000); Ferreira et al. (2006), afirmam que a população brasileira é a população mais heterogênea. De acordo com os autores, a população consiste da mistura de componentes genéticos de Europeus, Ameríndios e Africanos. A colonização do Brasil envolveu principalmente homens europeus, onde estes se relacionaram com ameríndias e africanas. Isso explica os estudos de Ferreira (2012), que relatam a composição genética brasileira, em que a maioria das linhagens de origem paterna dos brasileiros brancos é 90% de origem europeia, enquanto que a linhagem materna é de origem ameríndia e africana, correspondendo a 60% dessa composição genética.

A formação da população brasileira com diferentes grupos étnicos contribuiu muito para a diversidade fenotípica, bastante heterogênea atualmente (RODENBUSH, 2009), e a

miscigenação talvez seja um dos fatores mais importantes no contexto da população brasileira nos estudos de vínculo genético.

2.6 Banco de Dados

Segundo Feitosa (2013) os bancos de dados são definidos como um conjunto de dados organizados de forma que possam armazenar novas informações, encontrar dados já computados, atualizar ou excluir os indesejáveis.

Os bancos de dados genéticos armazenam evidências encontradas tanto do suspeito ou do criminoso. Essas evidências são comumente encontradas em cenas de crimes a nível biológico, como sêmem, fios de cabelo, manchas de sangue, etc (KAMARUMA, 2013).

A utilização de materiais genéticos na investigação criminal tornou-se uma importante ferramenta na resolução de casos criminais, identificação de pessoas desaparecidas e restos mortais de vítimas. A criação dos bancos de dados de DNA contribuiu com a solução desses casos devido ao arquivamento de perfis genéticos em computadores e a possível comparação de perfis já arquivados com os encontrados (KAWAMURA, 2013).

A primeira utilização de um banco de dados de DNA foi no Reino Unido com a criação do seu próprio banco de DNA Jobling (2004), após um estupro ocorrido na Inglaterra. Kawamura (2013) relata que foram feitas análises do perfil genético de todos os homens da cidade com idade entre 16 e 34 anos a fim de encontrar o verdadeiro assassino. Dois anos depois o caso foi resolvido, inocentando o primeiro suspeito e identificando o verdadeiro criminoso, sendo julgado e condenado à prisão perpétua.

Em 1994, o primeiro banco de dados de perfis genético foi criado nos Estado Unidos denominado de CODIS (do inglês, Combined DNA Index System). O banco dispõe de perfis genéticos disponíveis para comparações de perfis de criminosos para todos os laboratórios americanos (Federais, estaduais e locais) (FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION, 2018).

O Brasil possui um banco de dados, criado em 2009 e nomeado de Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG). O RIBPG é composto por 15 laboratórios estaduais e um federal. Essa Rede Integrada foi construída com o objetivo de diminuir as

taxas de violência e de aumentar as taxas de elucidação de crimes. Esse projeto iniciou-se em 2004, onde foi criado um programa nacional de apoio e investimentos às Instituições de perícias criminais, juntamente com a Secretaria Nacional de Segurança Pública / Ministério da Justiça (SENASP/MJ) (KAWAMURA, 2013).

No entanto, Kawamura (2013); Goés (2005), afirmam que, tanto bancos de dados para fins criminais ou na busca de pessoas desaparecidas, necessita de dados como a frequência alélica dos marcadores genéticos da população em estudo, sendo ele marcadores dos cromossomos autossômicos ou alossômicos. A frequência dos alelos é importante para a individualização de indivíduos, uma vez que se a maioria da população é portadora de tal alelo, ele não serve de referência para a diferenciação entre indivíduos (JOBIM, 2005).

Os dados de frequência dos alelos são aplicados em cálculos estatísticos realizados para investigação de vínculo genético (KAWAMURA, 2013).

3 Objetivo Geral:

Estimar, em uma amostra populacional brasileira, frequências alélicas e genotípicas, observadas em 12 marcadores STRs do cromossomo X para a consolidação de um banco de dados populacional com aplicações em investigação de vínculo genético e identificação humana.

Objetivos Específicos:

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos 12 marcadores STRs do cromossomo X;
- Calcular parâmetros estatísticos, tais como: heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), Equilíbrio de Hardy-Weinberg, e a Diversidade Genética do conjunto de loci para os 12 marcadores STRs do cromossomo X;
- Discutir quais marcadores podem ter maior contribuição na identificação humana na população estudada;

4 Material e Métodos

4.1 Delineamento do estudo e Aspectos Éticos

O presente projeto foi desenvolvido de acordo com as normas estabelecidas na resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O estudo foi realizado no LaGene – Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular/Lacen – Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Sysneiro/SES-GO da Secretária de Saúde do Governo de Goiás e NPR - Núcleo de Pesquisa Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Os perfis genéticos analisados foram obtidos de exames de vínculo genético enviados ao LaGene/LACEN e do Laboratório de DNA Biocroma situado na cidade de Goiânia, Estado de Goiás. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) do SES-Goiás com o CAAE: 70090317.9.3002.0034 e pela PUC-Goiás com o CAAE: 70090317.9.0000.0037.

4.2 Grupo Amostral

Participaram do estudo, 1.190 indivíduos não relacionados geneticamente submetidos a testes de investigações de vínculo genético, provenientes de todas regiões do Brasil, sendo 912 indivíduos do sexo feminino e 278 indivíduos do sexo masculino. Os perfis genéticos selecionados abrangem indivíduos das cinco regiões do país indicadas como no mapa mostrado na Figura 8.



Figura 8. Mapa do Brasil indicando as 5 Regiões do País. Acervo de FRANCISCO, Wagner de Cerqueira.

4.3 Coleta das amostras biológicas e Extração de DNA

As amostras biológicas dos indivíduos foram obtidas a partir de sangue e swab bucal impregnados em cartão FTA Whatman® (GE Healthcare). As amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando protocolos internos do Laboratório Biocroma para extração de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas impregnadas em cartão FTA. Esse processo de purificação conta com um tampão de extração desenvolvido pelo laboratório. O tampão é composto por DSD (Dodecil Sulfato Sódico) e EDTA (Ácido Etilenodiamino Treta-Acético).

4.4 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação foi realizada utilizando o sistema molecular Investigator® Argus X-12. Esse kit é composto por 12 loci do cromossomo X, sendo eles, DXS10148, DXS10135, DXS8378, DXS7132, DXS10079, DXS10074, DXS10103, HPRTB, DXS10101, DXS10146, DXS10134 E DXS7423. As proporções de reagentes utilizados na PCR estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Componentes e quantidade de reagentes utilizados na PCR. Fonte: Adaptado do Manual Investigator Argus X-12 Handbook, Qiagen 2013.

| Componentes | Volume (µL) |
|-----------------------|--------------------|
| Mix 1 | 2,5 |
| Primer Mix | 1,25 |
| Taq2 DNA Polimerase | 0,3 |
| Água (Nuclease- free) | 8,45 |
| DNA | Variável |
| Volume Total | 12,5 µl |

A ciclagem utilizada na PCR seguiu as recomendações do fabricante, conforme discriminado na tabela 2.

Tabela 2. Ciclagens utilizadas durante a PCR. Fonte: Adaptado do Manual Investigator Argus X-12 Handbook, Qiagen 2013.

| Temperatura | Tempo | Número de Ciclos |
|-------------|---------|------------------|
| 94° C | 4 min | - |
| 96° C | 30 seg | 5 ciclos |
| 63° C | 120 seg | |
| 72° C | 75 seg | |
| 94° C | 30 seg | 25 ciclos |
| 60° C | 120 seg | |
| 72° C | 75 seg | |
| 68° C | 60 min | - |
| 10° C | ∞ | - |

4.5 Genotipagem e Análise dos Fragmentos

A Genotipagem foi realizada pelo método de eletroforese capilar, executada no analisador genético ABI 3500 Thermo Fischer Scientific, em capilar de 36 cm, conforme recomendado. As concentrações e reagentes utilizados no preparo da reação estão descritos na tabela 3 e os parâmetros e configurações para eletroforese capilar conforme tabela 4.

Tabela 3. Reagentes e Concentrações utilizados na genotipagem. Fonte: Adaptado de Manual Investigator Argus X-12 Handbook Qiagen 2013.

| Reagentes | Concentração |
|-----------------|--------------|
| Hi-Di Formamida | 12,0 µL |
| SST-BTO | 0,5 µL |
| Amplicons | 1,0 µL |

Tabela 4. Parâmetros utilizados na configuração do analisador genético 3500 para configuração e genotipagem das amostras. Fonte: Adaptado de Investigator Argus X-12 Handbook Qiagen 2013.

| Parâmetros | Configuração |
|------------------------|--------------|
| Tipo de Aplicação | HID |
| Tamanho do Capilar | 36 cm |
| Polímero | POP4 |
| Conj. de Fluorescência | BT5 |

| | |
|------------------------------|------------|
| Módulo da Corrida | HID36_POP4 |
| Nome do Protocolo | Argus X-12 |
| Temperatura do forno °C | 60 |
| Voltagem da Corrida (kV) | 15.0 |
| Pré-Voltagem da Corrida (kV) | 15 |
| Voltagem da Injeção (kV) | 3.0 |
| Tempo de Corrida (s) | 1200 |
| Pré-Tempo de Corrida (s) | 180 |
| Tempo de Injeção (s) | 10 |
| Data Delay (s) | 1 |

A análise dos fragmentos obtidos foi realizada com a utilização do software GeneMapper® ID-X, versão 1.2 (Thermo Fischer Scientific®).

Toda a metodologia empregada neste estudo, para a genotipagem do total de 12 loci STRs.

4.6 Análise Estatística

A determinação das frequências alélicas e genotípicas para os 12 loci STRs do Cromossomo X foram realizadas mediante contagem direta. Essas frequências foram analisadas com auxílio do software Genetix 4.05.2 e do software Arlequin®.

A heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foram obtidas a partir da utilização do software Genetix 4.05.2. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi analisado através do software GenePop 4.1.3, comparando-se os índices de heterozigosidade observada e esperada, gerando os resultados para o teste exato de Fisher. No presente estudo, toda a análise estatística seguiu um intervalo de confiança de 95% e nível de significância ($\alpha \leq 0,05$).

5 Resultados e Discussão

No presente trabalho, um grupo de 1.191 indivíduos considerando o modo diferenciado de herança entre os sexos, as frequências alélicas obtidas de 12 regiões microssatélites do cromossomo X na população brasileira encontram-se nas tabelas 7 e 8. As frequências genótípicas foram calculadas e estão disponíveis em materiais suplementares.

O Equilíbrio de Hardy Weinberg é um parâmetro importante que deve ser testado na construção de banco de dados com a utilização de marcadores para a população (SZIBOR, 2003).

Não foi observado desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg no conjunto de marcadores quando analisados simultaneamente.

Diversos parâmetros foram calculados para cada locus STR do cromossomo X. Alguns alelos apresentaram frequências relevantes como foi o caso do alelo 15 do locus DXS7423 que em ambos os sexos apresentou-se com uma alta frequência. Em indivíduos do sexo feminino com uma frequência de 0,4008, e no sexo masculino com a frequência um pouco mais alta 0,4404 como apresentados na tabela 5 e 6.

Tabela 5. Alelos mais frequentes para cada marcador STRs do cromossomo X e suas frequências em indivíduos do sexo feminino.

| Alelo | DXS10148 | DXS10135 | DXS8378 | DXS7132 | DXS10079 | DXS10074 | DXS10103 | HPRTB | DXS10101 | DXS10146 | DXS10134 | DXS7423 |
|-------|----------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|--------|----------|----------|----------|---------|
| 18 | 0.2043 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 | - | 0.0869 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | 0.3447 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | - | - | - | 0.3110 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | - | - | - | - | 0.2706 | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 | - | - | - | - | - | 0.2121 | - | - | - | - | - | - |
| 19 | - | - | - | - | - | - | 0.3875 | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | 0.2936 | - | - | - | - |
| 32 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1174 | - | - | - |
| 28 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1519 | - | - |
| 36 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1902 | - |
| 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.4008 |

Tabela 6. Alelos mais frequentes para cada marcador STRs do cromossomo X e suas frequências em indivíduos do sexo masculino.

| Alelo | DXS10148 | DXS10135 | DXS8378 | DXS7132 | DXS10079 | DXS10074 | DXS10103 | HPRTB | DXS10101 | DXS10146 | DXS10134 | DXS7423 |
|-------|----------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|--------|----------|----------|----------|---------|
| 18 | 0.1585 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 | - | 0.1143 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | 0.3357 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | - | - | - | 0.3321 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | - | - | - | - | 0.2509 | - | 0.4158 | - | - | - | - | - |
| 18 | - | - | - | - | - | 0.2251 | - | - | - | - | - | - |
| 19 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | - | - | - | - | - | - | - | 0.3197 | - | - | - | - |
| 32 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1328 | - | - | - |
| 27 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1423 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------|--------|
| 37 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1828 | - |
| 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.4404 |

No entanto, diversos alelos em todos os marcadores apresentaram frequências inferiores a 0,001 sendo raros na população (tabela 7 e 8).

Na população dos USA (DIEGOLI et al. 2011), o alelo 15 do marcador DXS7423 também foi o mais frequente para indivíduos de etnia Americana Asiática. Entretanto, este mesmo marcador foi menos informativo em um estudo realizado na população coreana (SHIN, et al. 2005).

Portanto, dentre os doze marcadores X-STR analisados, dez apresentaram pelo menos um dos alelos com frequência de 0,0006 sendo a menor frequência observada. Apenas os marcadores DXS10074 e HPRTB não tiveram frequência alélica com este valor. Desta forma, este conjunto de marcadores analisados permite obter alto grau de confiabilidade nos resultados em identificação humana. Sendo, importantes como instrumentos na análise de vínculo genético, uma vez que os alelos raros elevam o valor do poder de discriminação (VIEIRA, 2014). De acordo com o autor (CZARNOGÓRSKA, 2010) os alelos com menor frequência aumentam poder de evidência e isso torna estes marcadores mais eficientes nas análises de identificação humana.

O marcador DXS10135 apresentou uma heterozigosidade esperada maior em relação aos outros loci para os indivíduos do sexo feminino, com frequência 0,9445, seguido pelo DXS10101 com 0,9219 e o DXS10146 com 0,9201. Os valores de H_e variaram de 0,9445 para DXS10135 a 0,6885 para DXS7423. A heterozigosidade observada também apresentou variação aos valores encontrados, de 0,9160 para DXS10101 a 0,6803 para DXS7423 (tabela 7 e 8).

Tabela 7. Frequência Alélica de loci Argus X-STR em Mulheres.

| Alelo | DXS10148 | DXS10135 | DXS8378 | DXS7132 | DXS10079 | DXS10074 | DXS10103 | HPRTB | DXS10101 | DXS10146 | DXS10134 | DXS7423 |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------|---------------|--------|----------|---------------|---------------|---------------|
| 8 | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - | - | - | - | - |
| 10.0 | - | 0.0011 | 0.3385 | 0.0011 | - | 0.0039 | - | 0.0086 | - | - | - | - |
| 11.0 | - | 0.0011 | 0.3447 | 0.0094 | - | 0.0170 | - | 0.1342 | - | - | - | 0.0006 |
| 12.0 | - | 0.0011 | 0.2730 | 0.1075 | - | 0.0395 | - | 0.2936 | - | - | - | 0.0028 |
| 12.1 | - | 0.0022 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12.3 | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 13.0 | - | 0.0006 | 0.0364 | 0.2644 | 0.0034 | 0.0379 | 0.0006 | 0.2792 | - | - | - | 0.0686 |
| 13.2 | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 13.3 | 0.0391 | - | - | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14.0 | - | 0.0017 | 0.0040 | 0.3110 | 0.0192 | 0.0712 | - | 0.1881 | - | 0.0006 | 0.0006 | 0.3594 |
| 14.3 | - | - | - | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15.0 | - | 0.0156 | - | 0.2118 | 0.0209 | 0.1432 | 0.0044 | 0.0786 | - | - | 0.0017 | 0.4008 |
| 15.2 | - | - | - | - | - | 0.0015 | - | - | - | - | - | - |
| 15.3 | - | - | - | 0.0028 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16.0 | 0.0006 | 0.0100 | - | 0.0588 | 0.0249 | 0.2121 | 0.1735 | 0.0143 | - | - | - | 0.1230 |
| 16.1 | - | 0.0039 | - | - | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - |
| 16.2 | - | - | - | - | - | 0.0008 | - | - | - | - | - | - |
| 16.3 | - | - | - | 0.0039 | - | 0.0008 | - | - | - | - | - | - |
| 17.0 | 0.0102 | 0.0217 | - | 0.0177 | 0.0729 | 0.1943 | 0.0865 | 0.0011 | - | - | - | 0.0431 |
| 17.1 | 0.0012 | 0.0117 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17.3 | - | - | - | 0.0006 | - | 0.0008 | - | - | - | - | - | - |
| 18.0 | 0.2043 | 0.0451 | - | 0.0083 | 0.1192 | 0.1803 | 0.2090 | - | - | - | - | 0.0011 |
| 18.1 | 0.0042 | 0.0178 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19.0 | 0.0270 | 0.0707 | 0.0006 | 0.0017 | 0.2237 | 0.0728 | 0.3875 | - | - | 0.0006 | - | 0.0006 |

| | | | | | | | | | | | | |
|------|--------|--------|---|---|---|--------|--------|--------|--------|--------|---|---|
| 27.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0316 | 0.0006 | - | - |
| 27.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 28.0 | 0.0084 | 0.0440 | - | - | - | - | - | 0.0558 | 0.1519 | 0.0062 | - | - |
| 28.1 | 0.0427 | 0.0006 | - | - | - | - | - | 0.0012 | - | - | - | - |
| 28.2 | 0.0012 | - | - | - | - | - | - | 0.0685 | 0.0006 | - | - | - |
| 29.0 | 0.0096 | 0.0312 | - | - | - | - | 0.0006 | 0.0644 | 0.1394 | 0.0062 | - | - |
| 29.1 | 0.0210 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 29.2 | - | - | - | - | - | - | 0.0011 | 0.0892 | 0.0011 | 0.0006 | - | - |
| 30.0 | 0.0084 | 0.0150 | - | - | - | 0.0006 | - | 0.0627 | 0.0825 | 0.0264 | - | - |
| 30.1 | 0.0090 | 0.0006 | - | - | - | - | - | 0.0006 | - | - | - | - |
| 30.2 | - | - | - | - | - | - | - | 0.1036 | 0.0017 | - | - | - |
| 31.0 | 0.0072 | 0.0195 | - | - | - | - | - | 0.1024 | 0.0523 | 0.0129 | - | - |
| 31.1 | 0.0018 | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - | - | - | - |
| 31.2 | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | 0.1024 | 0.0017 | - | - | - |
| 31.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - | - |
| 32.0 | 0.0024 | 0.0100 | - | - | - | - | - | 0.1174 | 0.0341 | 0.0253 | - | - |
| 32.1 | 0.0006 | 0.0011 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32.2 | - | - | - | - | - | - | - | 0.0345 | 0.0017 | - | - | - |
| 33.0 | 0.0006 | 0.0045 | - | - | - | - | - | 0.0696 | 0.0159 | 0.0449 | - | - |
| 33.1 | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0011 | - | - |
| 33.2 | - | - | - | - | - | - | - | 0.0058 | 0.0040 | 0.0006 | - | - |
| 34.0 | 0.0006 | 0.0022 | - | - | - | - | - | 0.0316 | 0.0142 | 0.0831 | - | - |
| 34.1 | - | 0.0022 | - | - | - | - | - | - | - | 0.0011 | - | - |
| 34.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0216 | 0.0039 | - | - |
| 35.0 | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | 0.0058 | 0.0011 | 0.1745 | - | - |
| 35.1 | - | 0.0017 | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - | - |
| 35.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0188 | 0.0011 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|--------|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------|--------|---|
| 35.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0022 | - | |
| 36.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1902 | - |
| 36.1 | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0028 | - |
| 36.2 | - | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - |
| 36.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0022 | - |
| 37.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.1706 | - |
| 37.1 | 0.0018 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - |
| 37.2 | - | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - |
| 37.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0051 | - |
| 37.5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - |
| 38.0 | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0932 | - |
| 38.1 | 0.0054 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 38.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 38.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0039 | - |
| 39.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0196 | - |
| 39.1 | 0.0048 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0337 | - |
| 39.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - |
| 39.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - |
| 40.0 | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0236 | - |
| 40.1 | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0051 | - |
| 40.2 | - | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 40.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0163 | - |
| 41.1 | 0.0018 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 41.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 41.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0165 | - |
| 42.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0196 | - |
| 42.1 | 0.0012 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
| 42.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0148 | 0.0006 | - |
| 42.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | 0.0095 | - |
| 43.0 | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - |
| 43.1 | 0.0006 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 43.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0239 | - | 0.0017 | - |
| 43.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0022 | - | - |
| 44.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0142 | - | - | - |
| 44.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0011 | - |
| 45.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0154 | - | - | - |
| 45.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 46.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0028 | - | - | - |
| 47.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0034 | - | - | - |
| 48.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0006 | - | - | - |
| He | 0.9061 | 0.9445 | 0.6907 | 0.7730 | 0.8239 | 0.8501 | 0.7526 | 0.7760 | 0.9219 | 0.9201 | 0.8821 | 0.6885 | - |
| Ho | 0.8185 | 0.9120 | 0.7190 | 0.7506 | 0.8305 | 0.8313 | 0.7428 | 0.7752 | 0.9160 | 0.8658 | 0.8754 | 0.6803 | - |

Tabela 8. Frequência Alélica de 12 loci Argus X-STR em Homens.

| Alelo | DXS10148 | DXS10135 | DXS8378 | DXS7132 | DXS10079 | DXS10074 | DXS10103 | HPRTB | DXS10101 | DXS10146 | DXS10134 | DXS7423 |
|-------|----------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|--------|----------|----------|----------|---------|
| 10.0 | - | - | 0.3141 | - | - | - | - | 0.0186 | - | - | - | - |
| 11.0 | - | - | 0.3357 | 0.0143 | - | 0.0260 | - | 0.1301 | - | - | - | - |
| 12.0 | 0.0038 | - | 0.3069 | 0.0893 | - | 0.0303 | - | 0.3048 | - | - | - | - |
| 13.0 | - | - | 0.0361 | 0.2714 | - | 0.0216 | - | 0.3197 | - | - | - | 0.0469 |
| 13.3 | 0.0226 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14.0 | - | - | 0.0072 | 0.3321 | 0.0108 | 0.0693 | - | 0.1487 | - | - | - | 0.3682 |
| 15.0 | - | 0.0071 | - | 0.2250 | 0.0179 | 0.1342 | 0.0072 | 0.0706 | - | 0.0036 | - | 0.4404 |
| 15.2 | - | - | - | - | - | 0.0043 | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | |
|------|--------|--------|---|---|---|---|---|---|--------|--------|--------|
| 37.2 | - | 0.0071 | - | - | - | - | - | - | 0.0036 | 0.0072 | - |
| 37.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0036 | - |
| 38.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0896 | - |
| 38.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0073 | - | - |
| 38.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0466 | - |
| 39.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0358 | - |
| 39.1 | 0.0113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0036 |
| 39.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0292 | 0.0036 | - |
| 39.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0358 | - |
| 40.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0036 | - |
| 40.1 | 0.0038 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 40.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0292 | - | - |
| 40.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0251 | - |
| 41.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0182 | - | - |
| 41.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0072 | - |
| 42.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0109 | - | - |
| 42.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 43.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0108 | - |
| 43.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0401 | 0.0036 | - |
| 44.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0072 | - |
| 45.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0182 | - | - |
| 45.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0182 | - | - |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.0036 | - |

Na população dos USA (DIEGOLI et al. 2011), o alelo 15 do marcador DXS7423 também foi o mais frequente para indivíduos de etnia Americana Asiática. Entretanto, este mesmo marcador foi menos informativo em um estudo realizado na população coreana (SHIN, et al.2008).

Segundo Rodovalho (2017), o número de alelos e a frequência alélica de cada marcador na população são valores que devem ser levados em conta durante a realização de uma investigação de vínculo genético.

A frequência alélica dos indivíduos do sexo feminino apresentou três marcadores com grande quantidade de alelos por locus, sendo o DXS10148 o marcador mais polimórfico com 56 alelos, seguido pelo DXS10135 com 50 alelos e o DXS10134 com 47 alelos. Por outro lado, com menor quantidade de alelos destacam-se os marcadores DXS10103 e o DXS7423, ambos com 9 alelos presentes, conforme demonstrados no Gráfico 1.

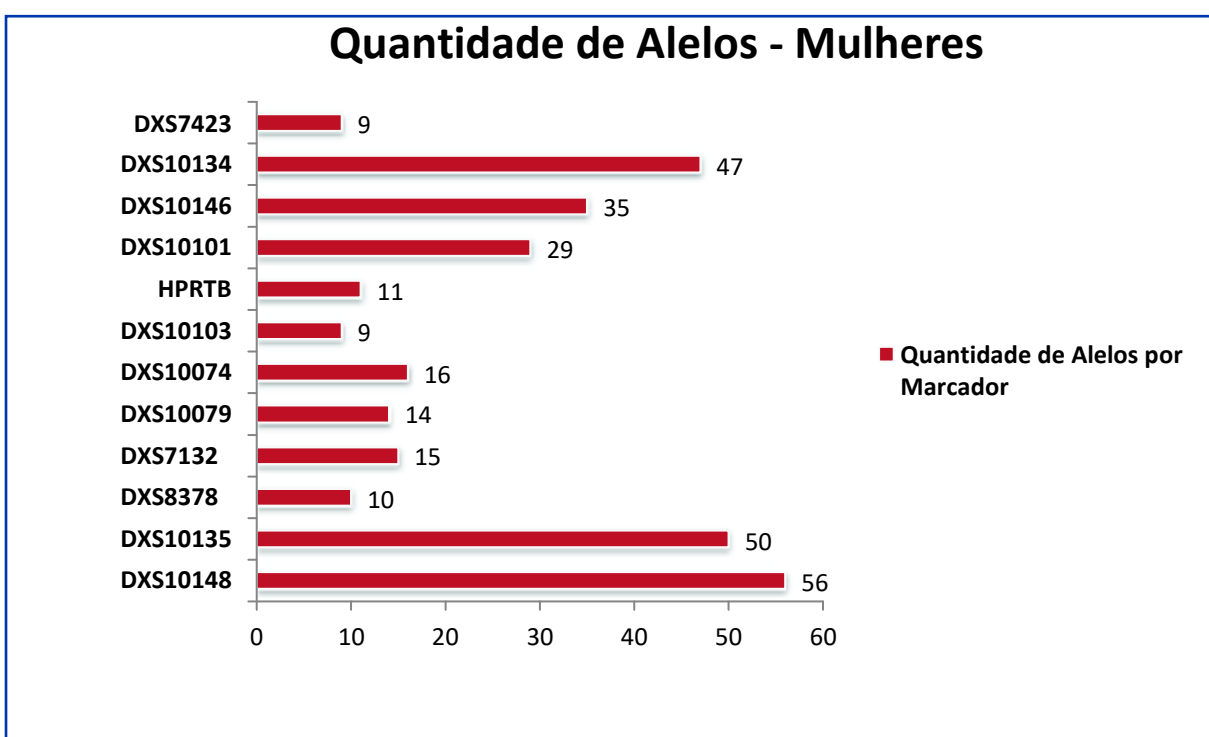


Gráfico 1. Quantidade de Alelos por locus em Mulheres.

Já na frequência alélica dos indivíduos do sexo masculino, dois marcadores apresentaram uma quantidade de alelos bem semelhante. O mesmo marcador apresentado para os indivíduos do sexo feminino, sendo o DSX10148 com 31 alelos, e o DXS10135 com 30 alelos. O marcador com menor número de alelos foi o DXS8378, com apenas 5 alelos presentes como mostrado no Gráfico 2.

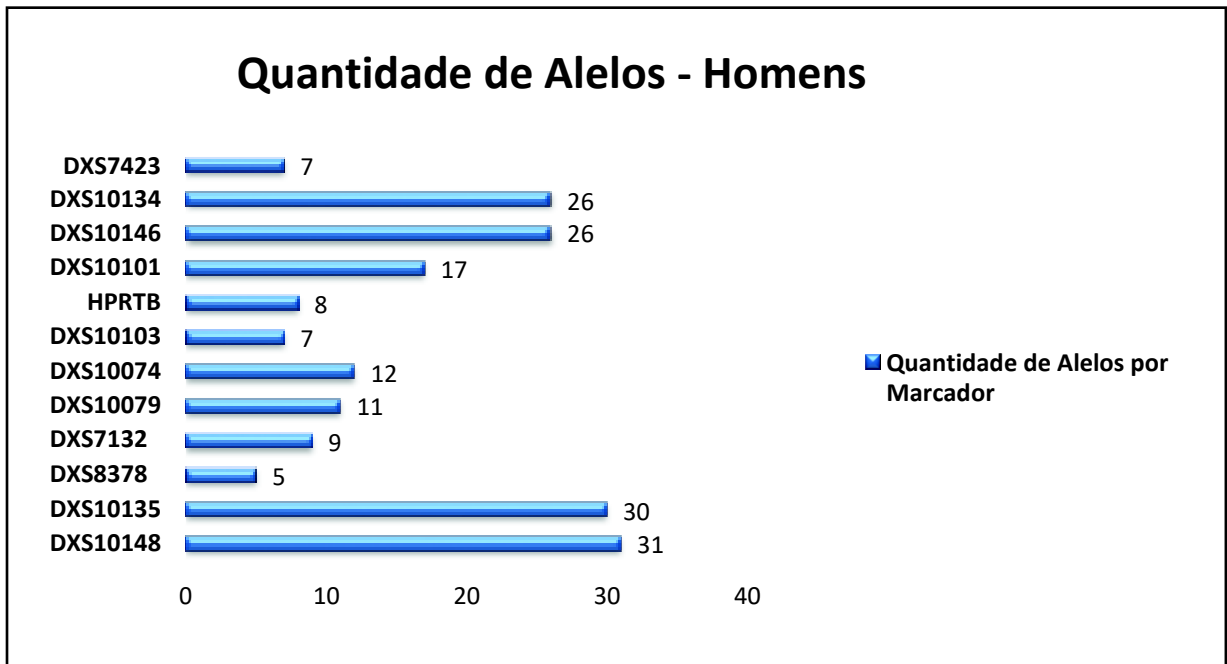


Gráfico 2. Quantidade de Alelos apresentado por locus em Homens.

Os dados das frequências alélicas obtidos da população brasileira foram comparados com 2 estudos das frequências alélicas de Países Europeus, sendo Portugal (CAINÉ et al. 2013) e a Croácia (CRNJAC et al. 2017), e com o Estados Unidos (DIEGOLI et al, 2011).

Na população de Portugal, oito alelos que apresentaram ser mais frequentes assim como na população brasileira para os seguintes marcadores DXS10148, DXS8373, DXS7132, DXS10079, DXS10103, HPRTB, DXS10134, DXS7423. No entanto, quatro (4) alelos apresentaram-se diferentes para os marcadores (DXS10135, DSX10074, DXS10101 e o DXS10146). A Croácia também apresentou oito (8) alelos mais frequentes (DXS8378, DXS7132, DXS10079, DXS10074, DXS10103, HRPTB, DXS10134 e o DXS7423) e quatro (4) alelos diferentes, idênticos a da população brasileira (DXS10148, DXS10135, DXS10101 e o DXS10146).

Desta forma, os alelos mais frequentes para cada marcador X-STR estudado nestas populações estão destacados no gráfico 3.

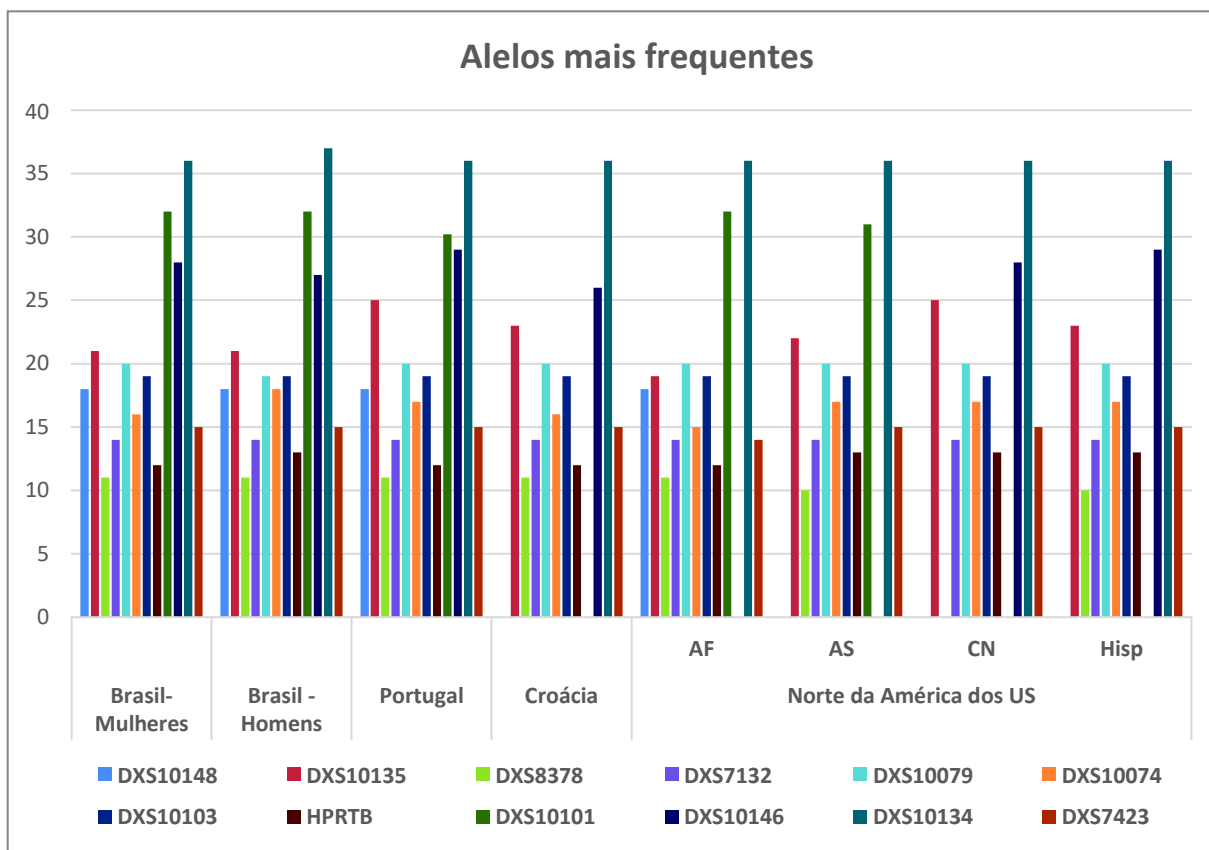


Gráfico 3. Alelos mais frequentes em diferentes populações.

O estudo realizado na população norte americana, foi dividido por etnia. A população foi dividida por Americanos com descendência Africana, Americanos asiáticos, Caucasianos e Hispânicos. Com os Americanos Africanos a semelhança foi maior, com nove (9) alelos sendo mais frequentes em ambas populações (DXS10148, DXS8378, DXS7132, DXS10079, DXS10103, HRPTB, DXS10101, DXS10146 DXS10134) e três diferentes (DXS10135, DXS10074 e o DSX7423). Com os Americanos Asiáticos e os Hispânicos a semelhança foi a mais distante com seis alelos sendo mais frequentes em ambas as populações e seis diferentes.

Para os Americanos Asiáticos os marcadores com semelhança foram (DXS7132, DXS10079, DXS10103, DXS10146, DXS10134, DXS7423) e os diferentes (DXS10148, DXS10135, DXS8378, DXS10074, HRPTB, DXS10101). Hispânicos com a seguinte semelhança (DXS7132, DXS10079, DXS10103, DXS10101, DXS10134, DXS7423), diferentes (DXS10148, DXS10135, DXS8378, DXS10074, HRPTB, DXS10046). E os caucasianos com sete alelos idênticos (DXS8378, DXS7132, DXS10079, DXS10103, DXS10146, DXS10134, DXS7423) e cinco diferentes (DXS10148, DXS10135, DXS10074, HRPTB, DXS10101).

Embora alguns marcadores tenham mostrado semelhança entre os alelos, alguns alelos, mesmo que sejam minoria, mostraram-se diferentes entre as populações comparadas. Isso mostra a grande importância para população brasileira nas análises de vínculo genético. Segundo Rodenbush et al. (2009), uma das recomendações da Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG), é a necessidade da identificação do polimorfismo que possibilite a diferenciação entre as diferentes etnias de uma determinada população.

De acordo com Tomas et al. (2012), a variabilidade genética entre populações aumenta com o aumento da distância geográfica. No entanto, essa variabilidade genética não foi tão observada entre as populações comparadas, uma vez que o processo de miscigenação brasileira segundo Pena et al. (2000), é constituída de Africanos, Ameríndios e Europeus, onde as frequências alélicas obtidas foram comparadas. Portanto, comparando a população brasileira com os americanos com descendência asiáticas, a diferença foi maior com seis alelos diferentes, e com os hispânicos com a mesma quantidade.

Vieira (2013), afirma que pela frequência alélica é possível identificar os alelos raros.

De acordo com os dados apresentados, na população brasileira o marcador mais informativo e polimórfico nas mulheres e nos homens foi o mesmo DXS10148, devido ao maior número de alelos.

6. Conclusão

Com o desenvolvimento deste estudo foi construído um banco de frequências alélicas e genotípicas de 1.190 indivíduos proveniente das (5) cinco regiões do País e os parâmetros necessários para a composição de um banco de dados.

1. Foram obtidas as frequências alélica e genotípicas dos 12 marcadores do cromossomo X presentes no sistema comercial Argus X, sendo possível complementar o banco de dados genéticos da população brasileira permitindo que marcadores adicionais possam ser incorporados às análises de forma eficiente, garantindo resultados confiáveis em identificação humana e investigação de vínculo genético.

2. Em relação aos 12 marcadores analisados simultaneamente não foi observado desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3. Neste estudo foram considerados raros e, portanto, com alto poder de evidência os alelos com frequência correspondente a 0,0006 devido a sua baixa frequência na população estudada.

4. O sistema Argus X-12 apresentou-se bastante informativo na população brasileira, sendo, portanto, uma ferramenta útil na prática forense, particularmente em casos inconclusivos e outros casos de análise de parentesco.

7. Referências Bibliográfica

- AKHTERUZZAMAN, S. MAJUMDER, A. K. FERDOUS, A. et al. 2012. **False Paternity with one or two mismatches using commercial STR Kits.** *Australian Journal of Forensic Sciences*, v. 44, n. 3, p. 253-259.
- ANDRADE, E. S. *Desequilíbrio de Ligação e blocos de haplótipos determinados pela análise de 250k SNPs em três remanescentes de Quilombos.* Tese (Genética) Ribeirão Preto. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – São Paulo, 2013.
- ASUMURA, H; SAKAI, H; KOBAYASHI, K. et al. 2006. **Mini X-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis.**
- BENECKE, M. 1997. **DNA Typing in Forensic medicine and in Criminal Investigations a corrente survey.** *Naturwissenschaften*, v.84, p. 181-188.
- BENNET, P. 2000. **Demystified... Microsatellites.** *Journal of Clinical Pathology*, v, 53, n. 4, p-177.
- BERED, F. BARBOSA NETO, J. F. CARVALHO, F. I. F. 1997. **DNA Markers and their application in plant breeding.** v. 27, n.3, p. 513-520.
- BESSELINK, Scriptie Biomedische Wetenschappen van E. **Current and Future Developments in Forensic DNA Typing.** 2003.
- BONACCORSO, Norma Sueli. *Aspectos técnicos, éticos e jurídicos relacionados com a criação de banco de dados criminais de DNA no Brasil.* Tese (Doutorado em Direito Penal) – Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- BUTLER, Jonh Marshall. 2015. **The Future of Forensic DNA analysis.** *Philosophical Transactions Royal Society B*, v. 370, n. 1674, p. 20140252.
- BUTLER, Jonh Marshall. *Advanced topics in Forensic DNA typing: methodology.* Academic Press, 2012.
- BUTLER, Jonh Marshall. **Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.** Elsevier Academic Press, 2005.
- BUTLER, Jonh Marshall. **Forensic DNA Typing: Biology, Tecnology behind STR Markers.** Academic Press, 2001.
- CAINÉ, L. COSTA, S. PINHEIRO, M. F. 2013. **Population data of 12 X-STR loci in a North of Portugal sample.** *International Journal Legal Medicine*, v. 127, p. 63-64.
- CARLSON, K. D. SUDMANT, P. H. PRESS, M. O. et al. 2015. **MIPSTR: a method for multiplex genotyping of germline and somatic STR variation across many individuals.** *Genome Research*, v. 25, p. 1244.
- CHOW, J. C.; YEN, Z.; ZIESCHE, S. M.. et al. 2005. **Silencing of the mammalian X chromosome.** *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*, v.6, p. 69-92.
- COE, H. E. NEUFFER, M. G. HOISINGTON, D. A. 1988. **The Genetics of corn.** In: **SPRAGUE, G. F. DUDLEY, J. W. (Eds). Corn and corns improvement**, p. 81-237.

CRNJAC, J. OZRETIC, P. MERKAS, S. et al. 2017. **Investigator Argus X-12 Study on the population of Northern Croatia.** *Genetic Mol. Biol.*, V. 40, n. 1, p. 80-83.

CZARNOGÓRSKA, M. SANAK, M. PINIEWSKA, D. et al. 2010. **Identification of rare genetic variants at DXS10074, DXS10079, DXS10146 and DXS10148 loci of investigator argus X-12 multiplex in the South Polish population.** *Archiwum Medycyny Sadowej i Kryminologii*, v.60, n.4, p.235-42.

DECANINE, D. 2016. **O Papel de marcadores moleculares na genética forense.** *Revista Brasileira de Criminalística*, v.5, n. 2, p.18 - 27.

DEMOGRÁFICO, IBGE Censo - Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9662-censo-demografico-2010.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em: 02 de Março de 2018.

DIAS, F. A. A. 2013. **Prova na Investigação de Paternidade.** *Revista de Ciências Jurídicas e Sociais*, v. 3, n. 1, p. 70-76.

DIEGOLI, T. M. LINACRE, A. VALLONE, P. M. et al. 2011. **Allele frequency distribution of twelve X-Chromosomal short tandem repeat markers in four US population groups.** *Forensic Science International: Genetics*, v. 3, n. 1, p. 481-483.

EDELMANN, J. HERING, S. KUHLISH, E. et al. 2002. **Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-Chromosome.** *Forensic Science International*, v. 125, p. 217-222.

ELLEGREN, H. 2004. **Microsatellites: Sample sequences with complex evolution.** *Nature Reviews*, v. 5, p. 435-445.

ELLIS, N. GOODFELLOW, P. N. 1989. **The mammalian Pseudoautosomal region.** *TRENDS Genet*, v.5, p. 406-410.

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION (FBI) - 2018 - Disponível em <<https://www.fbi.gov/>>. Acesso em: 27 de Fevereiro de 2018.

FEITOSA, Márcio Porto. **Fundamentos de Banco de Dados: Uma abordagem prático-didática.** 1º edição. São Paulo, 2013.

FERREIRA, Elisângela Alves de Moraes. **Refletindo o conceito de miscigenação no Brasil.** Monografia (Pedagogia)- Universidade Estadual da Paraíba, Guarariba, 2012.

FERREIRA, L. B. MENDES-JUNIOR, C. T. WIEZEL, C. E. V. et al. 2006. **Y-STR diversity and ethnic admixture in White and mulato Brazilian population samples.** *Genet. Mol. Biol.*, v. 29, p. 605-607.

FERREIRA, Márcio Elias. GRATTAPAGLIA, Dário. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética.** 3º edição. Brasília: Ed. Embrapa, 1998.

FILHO, Aluisio Trindade. **Caracterização Genética da População do Distrito Federal com base em marcadores STR do cromossomo X.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

FRANCISCO, Wagner de Cerqueira. "Regiões Brasileiras"; *Brasil Escola*. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/brasil/regioes-brasileiras.htm>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2018.

FREIJE, D. HELMS, C. WATSON, M. S. et al. 1992. **Identification of a Second e Pseudoautosomal Region Near the Xq and Yq Telomeres.** *Science*, v. 258, p. 1784-1787.

GAO, S. QIAO, K. RAKHA, A. et al. 2007. **Allele frequencies for X-STR loci in Nu population of Yunnan, China.** *Legal Medicine*, v. 9, n. 5, p. 284-286.

GOÉS, A. C. S. 2005. **Análise de regiões polimórficas do DNA com objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais.** *Revista do Biomédico*, São Paulo: edição 65. P. 22-23.

GOMES, I. ALVES, C. MAXZUD, K. et al. 2007. **Analysis of 10 X-STRs in three African population.** *Forensic Science International: Genetics*, v.1, p. 208-211.

GOMES, I. PLÁCIDO, J. P. PEREIRA, S.H. 2017. **Genetic Characterization of Guinea-Bissau using a 12 X-Chromosomal STR system: Inferences from a multiethnic population.** *International Forensic Science: Genetics*, v.31, p. 89-94.

GRIFFITHS, Anthony. J. F. WESSLER, Susan. R. CARROLL, Sean. B. DOEBLEY, Jonh. **Introdução a Genética.** 10ª edição. New York: W, 11. Freeman and Company, 2015.

HARTL, D. L. CLARK, A. G. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates Inc, Sunderland.

Investigator® Argus X-12 Handbook- 2013 – Disponível em <<https://b2b.qiagen.com/de/shop/detection-solutions/human-identity/investigator-argus-x-12-kit/#resources>>. Acesso em : 27 de Fevereiro de 2018.

JOBIM, L. F. 2005. **Identificação Humana pelo DNA: Tratado de pesquisas Criminalísticas: Identificação Humana.** Campinas: Millenium, v.2, p. 1-100.

JOBLING, M. A. 2013. **Curiosity in the genes: The DNA fingerprinting story.** *Investigative Genetics*, v. 4, n. 20.

JOBLING, M. A. GILL, P. 2004. **Encoded evidence: DNA in Forensic analysis.** *Nature Reviews: Genetics*, v. 5, p. 739- 750.

JORGE, A. A. NISHI, M.Y. FUNARI, M.F. et al. 2008. **Short Stature caused by SHOX gene haploinsufficiency from diagnosis to treatment.** *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v.52, n. 5, p. 765-773.

KAWAMURA, Bárbara. *Desenvolvimento de um Banco de Dados Genético Brasileiro para Marcadores STR do Cromossomo X*. Monografia (Farmácia- Bioquímica). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, 2013.

KLING, D. DELL'AMICO, B. TILLMAR, A. O. 2015. **FamLink – Implementation of a general model for likelihood computations for X-Chromosomal Marker data.** *Forensic Science International: Genetics*, v. 17, p. 1-7.

KOBACHUK, Luciellen D'avila Giacomel. *Estudo de Frequências Alélicas de dez locus STRs do cromossomo X na população do estado do Paraná e sua contribuição na*

identificação humana. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LEITE, Fábio Pereira das Neves. *Análise da estrutura genética da população do rio grande do sul através de microssatélites autossômicos e de cromossomos sexuais*. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – MS, 2006.

MACHADO, A. P. L. B. LEITE, R. F. S. BARCELOS, R. S. S. 2017. **Aplicabilidade do Cromossomo X do DNA Forense**. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 16, n.2, p. 197-209.

MALUF, S. W. RIEGEL, M. **Citogenética Humana**. Porto Alegre. p.334. 2011.

MANGS, A. H. MORRIS, B. J. 2007. **The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future**. *Current Genomic*, v.8, p.129-136.

MARKET, C. L. MOLLER, F. 1959. **Multiple forms of enzyme: tissues, ontogenetic, and species specific patterns**. *Proceeding of the National Academic of Sciences of United States of America*, Washington, v. 45, p. 753-763.

MENEZES, M. P. C. MARTINEZ, A. M. RIBEIRO, M. N. et al. 2006. **Caracterização Genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n.4, p. 1336-1341.

MILLS, R. E. LUTTING, C. T. LARKINS, C. E. et al. 2006. **An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome**. p. 1182-1190.

MORTERA, J. VECCHIOTTI, C. ZOPPIS, S. et al. 2016. **Paternity testing that involves a DNA mixture**. *Forensic Science Internacional: Genetics*, v. 23, p. 50-54.

NEVES, W. PILÓ, L. B. **Quando e como os Humanos chegaram à América. In: O povo de Luzia**. São Paulo: Editora Globo, 2008.

OHNO, S. **Sex Chromosomes and Sex-linked genes**. Berlin: Springer, 1967.

PARDINI, V. C. FERREIRA, A. C. S. GOMES, K. B. et al. 2001. **Uso do DNA proveniente de polpa dentaria para investigação humana: relato de caso e técnica**. *CROMG*, v.7, n.1, p.33-35.

PATERSON, A. H. TANKSLEY, S. D. SORRELLS, M. E. 1991. **DNA markers in plant improvement**. *Advances in Agronomy*, v. 46, p. 39-90.

PENA, S. D. CARVALHO-SILVA, D. R. ALVES-SILVA, J. et al. 2000. **Retrato Molecular do Brasil**. *Ciências hoje*, v. 27, n. 159, p. 16-25.

PINTO-MAGLIO, C. A. F. CUÉLLAR, T. BARBOSA, R. L. 2000. **Aplicação de técnicas de Citogenética molecular na caracterização dos cromossomos da espécie *Coffea arabica* L.** *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, p. 444-446.

RICK, C. M. YODER, J. L. 1988. **Classical and molecular Genetics of tomato: highlights and perspectives**. *Annu Rev, Genet*, v. 22, p. 281-300.

- ROBINO, C. GIOLLITI, A. GINO, S. et al. 2006. **Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 12 X-Chromosomal STR loci in a northwestern Italian population sample.** *International Journal Legal Med*, v. 120, p. 315-318.
- RODENBUSCH, R. SCHUMACHER, S. GASTALDO, A. Z. et al. 2009. **Population Genetic data for 11 STR loci, including SE33, in Southern Brazil.** *Legal Medicine Tokyo*, v. 11, p. 200-202.
- RODOVALHO, Ricardo Goulart. *Desenvolvimento de um sistema multiplex de loci STRs autossômicos polimórficos para identificação humana.* Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- SÃO-BENTO, M. CARVALHO, M. ANDRADE, L. et al. 2008. **STR data for the 15 AmpFISTR1 Identifier™ loci in Brazilian population of São Paulo State.** *Forensic Science International*, v. 1, p. 367-369.
- SHIN, S.H. YU, J.S. PARK, S. W. et al. 2005. **Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population.** *Forensic Sci Int*, v. 147, p.35-41.
- SILVA, D. A; CROUSE, C. A; CHAKRABORTY, R. et al. 2004. **Estatistical analysis of 14 short tandem repeat loci in Brazilian population from Rio de Janeiro and MatoGrosso do Sul states for forensic identity testing purposes.** *Forensic Science International*, v. 139, p. 173-176.
- SILVA, Iede Hercilia Emerenciano Ferreira. *Estudo de frequência haplotípicas dos marcadores microssatélites ligados ao cromossomo X DXS7424, DXS101, DXS10079, DXS10075, e DXS10074 na população de Alagoas.* Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió- Alagoas, 2008.
- SILVA, Ricardo Henrique Alves. *Estudo de frequência alélica de cinco loci STR do cromossomo X na população do Estado de São Paulo e sua contribuição na identificação humana.* Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- STABELLINI, R. **Análise Funcional dos Genes Xist e DNMT1 na manutenção do processo de Inativação do Cromossomo X em humano através do silenciamento gênico por RNAi.** São Paulo, p.143. 2008.
- SUN, M. ZHANG, X. WU, D. et al. 2016. **Mutations of short tandem repeat loci in cases of paternity testing in Chinese.** *International Journal of Legal Medicine*, v. 130, n. 5, p. 1203-1204.
- SZIBOR, R. 2007. **X-Chromosomal Markers: past, presente and future.** *Forensic Science International: Genetics*, v.1, n. 2 p. 93-99.
- SZIBOR, R. KRAECZAK, M. HERING, S. et al. 2003. **Use of X-linked markers for Forensic purposes.** *International Journal of Legal Medicine*, v. 117, n. 2, p. 67-74.
- TILLMAR, A. O. MOSTAD, P. 2014. **Choosing Supplementary markers in Forensic casework.** *Forensic Science International: Genetics*, v.13, p. 128-133.

- TOMAS, C. PEREIRA, V. MORLING, N. 2012. **Analysis of 12 X-STRs in Greenlanders, Danes and somalis using Argus X-12.** *International Journal Legal Medicine*, v. 126, p. 121-128.
- TOMAS, C. SKISTA, I. STEINMEIER, E. et al. 2015. **Results for five sets of Forensic genetic markers studied in a greek population traits.** *Forensic Science International: Genetics*, v.16, p. 132-137.
- VIEIRA, T. C. GIGONZAC, M. A. D. SILVA, D.M. et al. 2014. **Y-STR haplotype diversity and population data for Central Brazil: implications for environmental Forensic and paternity testing.** *Genetics and Molecular Research*, v.13, n. 2, p. 3403-3410.
- VIEIRA, Thaís Cidália. **Caracterização Genética da População do Estado de Goiás baseada em Marcadores STRs Autossômicos e do Cromossomo Y.** Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- VIGUERA, E. CANCEILL, D. EHELICH, S. D. 2001. **In vitro replication slippage by DNA polymerases from thermophilic organisms.** *J Mol Biol*, v. 312, n. 2, p. 323-33.
- WEISS, K. M. CLARK, A. G. 2002. **Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits.** *TRENDS in Genetics*, v. 18, p. 19-24.
- ZARRABEITA, M.T. PINHEIRO, F. de PANCORBO, M.M. et al. 2009. **Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated population.** *Forensic Science International: Genetics*, v. 3, n. 2, p. 63-66.

Anexo

Anexo I – Parecer Consubstanciado do CEP - PUC- Goiás.

Anexo II - Parecer Consubstanciado do CEP – SES-Goiás.