



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**

**PPGBIOTEC**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX Mini-STR DE CROMOSSOMO  
Y e ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA CIDADE  
DE MANAUS**

**LARISSA BARROS MUNIZ ORLANDO**

**MANAUS, 2015**

**LARISSA BARROS MUNIZ ORLANDO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX Mini-STR DE CROMOSSOMO  
Y e ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA CIDADE  
DE MANAUS**

Documento apresentado ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para a obtenção de título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração biotecnologia para saúde.

**ORIENTADOR: Dr. SPARTACO ASTOLFI FILHO**

**CO-ORIENTADORAS: Dra. ISABEL DA MOTA PONTES**

**Dra. DAYSE APARECIDA DA SILVA**

MANAUS, 2015

*À Ugo Souto Orlando Filho. Meu filho, meu amor e meu maior presente. Enviado de Deus no início do Doutorado me acompanhando e me dando força nesta jornada e sempre !*

## AGRADECIMENTOS

- \* Ao meu querido orientador, professor Dr. Spartaco Astolfi Filho por toda orientação, paciência, apoio, amizade, e pela enorme importância que exerceu (e exerce) na minha formação.
- \* À minha querida e mais que Co-Orientadora, Dra. Dayse Aparecida da Silva por toda atenção, orientação, oportunidade de aprendizado e desenvolvimento, pela disponibilidade, paciência, amizade e co-orientação neste trabalho.
- \* À querida Co-Orientadora Isabel da Mota Pontes, pela confiança depositada em mim, acreditando e me incentivando bastante, para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tudo.
- \* Aos meus queridos Pais e irmãs pelo grande incentivo e confiança depositada em mim.
- \* Ao meu querido Esposo Ugo Souto Orlando, por toda paciência e confiança em acreditar que mais este sonho seria realizado.
- \* Aos meus tios, tias, que mesmo distantes, sempre deram o incentivo e carinho necessário.
- \* À querida Regina Cardoso Dantas, companheira mais que fundamental cuidando do meu filho e nos acompanhando sempre .

- \* Às Colegas do Laboratório de Diagnóstico por DNA da Uerj, Oly e Sílvia, pela grande atenção e apoio dado a mim durante os experimentos realizados neste Laboratório.
- \* Aos Colegas do Laboratório de Genética Forense Da Polícia Civil do Estado do Amazonas, pela compreensão da minha ausência por diversas vezes deste local de trabalho.
- \* Às minhas queridas amigas Daniela, Maryellen, Laura, pela compreensão quando muitas vezes estive ausente.
- \* A todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

*"HÁ UMA FORÇA MOTRIZ MAIS PODEROSA QUE O VAPOR, A ELETRICIDADE E A ENERGIA ATÔMICA: A VONTADE"*

*Albert Einstein*

## LISTA DE FIGURAS

### **INTRODUÇÃO GERAL**

- Figura 1. Esquema ilustrativo do ideograma do cromossomo Y humano com as duas regiões PAR 1 e PAR 2. 26
- Figura 2. Esquema ilustrativo demonstrando a diferença entre *primers* de STR convencionais e de Mini-YSTRs. 31

### **CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX DO TIPO MINI-YSTR**

- Figura 1. Ideograma dos marcadores YSTR no cromossomo Y. A linha horizontal de coloração cinza sobre cada um, indica a região em que está localizada o YSTR selecionado. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2011. 46
- Figura 2. Eletroferograma dos marcadores DYS442, DYS444, DYS445 e DYS448. A escala na lateral esquerda da figura demonstra a RFU referente ao marcador analisado. 54
- Figura 3. Continuação do eletroferograma dos marcadores DYS461 e DYS447. A escala na lateral esquerda da figura demonstra a RFU referente ao marcador analisado. 55
- Figura 4. Análise do eletroferograma do Mutlplex Mini YSTR09. Os picos azul, verde, vermelho e preto identificados, referem-se a cada locos do multiplex. 55
- Figura 5. Eletroferograma de uma amostra de DNA degradado (osso humano) amplificada com o multiplex Mini YSTR09. 56
- Figura 6. Gráfico demonstra em porcentagem, a amplificação total dos 09 locos do multiplex Mini YSTR09 para as quatro amostras analisadas, com exceção do valor de 0,031ng, o qual não houve amplificação total para todas as quatro amostras. 58
- Figura 7. Gráfico do perfil de mistura homem/homem, nas concentrações relativas de 19:1 a 1:19. As barras verticais referem-se às médias (em porcentagem) dos locos amplificados entre as amostras da mistura, H1:H2 em azul e H2:H3 em vermelho. 60

Figura 8. O gráfico demonstra a amplificação total dos 09 locus do multiplex, quando no sistema existe de 10 a 200ng de DNA feminino. Em 400ng de DNA feminino, a amplificação torna-se parcial.

60

Figura 9. O gráfico demonstra a amplificação de DNA masculino quando na presença de DNA feminino em 400ng.

61



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX DO TIPO MINI-YSTR

### CAPÍTULO II: ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA

Tabela 1. Características dos Mini- YSTR utilizados neste trabalho	47
Tabela 2. Características dos RM- YSTR utilizados neste trabalho	48
Tabela 3. Definições das condições da PCR para os marcadores Mini Y-STR monoplex.	47
Tabela 4. Definições das condições da PCR para teste de temperatura de anelamento.	49
Tabela 5. Comparação das médias dos resultados de amplificação obtido nos três sistemas.	62

### **CIDADE DE MANAUS**

Tabela 1. Informações dos locos presentes no kit comercial <i>PowerPlex® Y23 System</i> (Promega).	71
Tabela 2. Definições das condições da PCR para o multiplex comercial <i>PowerPlex® Y23 System</i> .	72
Tabela 3. Definições das condições da PCR para o multiplex Mini YSTR09.	72
Tabela 4. Frequências alélicas e diversidade gênica (DG) para os locos do Multiplex Mini YSTR09.	75
Tabela 5. Frequências alélicas e diversidade gênica (DG) para os 23 YSTRs do kit comercial <i>PowerPlex® Y23 System</i> .	75
Tabela 6. Frequências alélicas e diversidade gênica (DG) para o conjunto de locos de YSTRs do kit comercial <i>PowerPlex® Y23 System</i> mais o Mini YSTR09.	78
Tabela 7. Resumo da diversidade gênica dos locos mais informativos presentes nos grupos I, II e III analisados.	87
Tabela 8. Parâmetros genéticos obtidos nos indivíduos selecionados na população de Manaus-AM.	89

Tabela 9. Parâmetros genéticos obtidos com os locos DYS447, DYS626 nos indivíduos selecionados na população de Manaus-AM.

91

Tabela 10. Parâmetros genéticos obtidos com os locos DYS447, DYS626 nos indivíduos selecionados na população de Manaus-AM

92

## ANEXOS

### CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX DO TIPO MINI-YSTR

Anexo I. Amostras de DNA de osso humano amplificadas com o multiplex Mini YSTR09 117

Anexo II. Amostras de DNA de osso humano com o número de locos amplificados para o sistema I: Multiplex Mini YSTR09 mais o kit comercial *AmpFISTR® Minifiler™*. 118

Anexo III. Amostras de DNA de osso humano com o número de locos amplificados para o sistema II: Multiplex Mini YSTR09 mais o kit comercial *AmpFISTR® Identifiler™ (em azul)* e sistema III: Multiplex Mini YSTR09 mais o kit comercial *AmpFISTR Yfiler™ (em vermelho)®* 119

ANEXO IV: BONE DNA TYPING USING A NEW mini YSTR MULTIPLEX. Forensic Science International 120

### CAPÍTULO II: ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA CIDADE DE MANAUS

ANEXO V. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE 123

ANEXO VI. Frequência haplotípica e haplótipos incluídos neste estudo considerando os 9 Mini-YSTRs em 189 haplótipos analisados, sendo 181 únicos (0,00529) e 8 compartilhados ( 0,0106; 0,0212; 0,0159) 127

ANEXO VII. Frequência haplotípica e haplótipos incluídos neste estudo considerando os 23 Y-STRs em 204 haplótipos analisados, sendo 202 únicos (0,0049) e 2 compartilhados ( 0,0098) 134

ANEXO VIII. Frequência haplotípica e haplótipos incluídos neste estudo considerando os 29 Y-STRs e Mini YSTR em 168 haplótipos únicos analisados (0,00595). 141

ANEXO IX. Frequência haplotípica e haplótipos incluídos neste estudo considerando os 17 Y-STRs presentes no kit *AmpFISTR® Yfiler™* em 168 haplótipos, sendo 167 únicos (0,00595) e 1 compartilhado (0,0119). 148

- AENXO X. Frequência haplotípica e haplótipos incluídos neste estudo considerando 25 marcadores, sendo 17 presentes no kit AmpFISTR®Yfiler™ mais 08 marcadores do Mini YSTR09. Houve a ocorrência de 168 haplótipos únicos, (0,00595). 154
- ANEXO XI. Artgo a ser publicado: Desenvolvimento e Validação de nove miniSTRs do cromossomo Y para identificação de DNA de amostras degradadas de casos forense. 160
- ANEXO XII. Diversidade haplotípica de 29 Y-STRs, em homens da população de Manaus-Norte do Brasil.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b>	16
<b>ABSTRACT</b>	18
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	19
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
<b>2.1 O DNA e genoma humano</b>	21
<b>2.2 A Identificação humana por DNA.</b>	22
2.2.1 Marcadores moleculares para a identificação humana.	22
<b>2.3.Cromossomo Y.</b>	25
2.3.1 Os STRs do cromossomo Y	27
2.3.1.1 Y-STR	27
2.3.1.2 Mini- YSTR	30
2.3.1.3. (RM)-YSTR	32
<b>2.4. Marcadores simples e multicópia</b>	33
<b>2.5. Aplicações forenses do YSTRs</b>	34
<b>2.6 Parâmetros populacionais relativos aos Y-STRs</b>	36
2.6.1 Determinação das frequências dos alelos e haplótipos	37
2.6.2 Diversidade gênica	37
2.6.3 Diversidade haplotípica	38
2.6.4 Capacidade ou poder de discriminação (CD)	38
<b>2.7 Da análise de Y-STR e bases de dados genéticos</b>	38
<b>CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX DO TIPO MINI-YSTR</b>	
<b>RESUMO</b>	41
<b>ABSTRACT</b>	42
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	43
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	45
<b>2.1 Amostras biológicas</b>	45
<b>2.2 Construções dos Locos de MiniY- STR</b>	45

2.2.1 Seleção dos locos de Y-STR	45
2.2.2 Desenho dos iniciadores (primers)	46
<b>2.3 Amplificação através da reação em cadeia de polimerase-PCR</b>	48
2.3.1 Para o Mini Y-STR em sistemas monoplex	48
2.3.2 Para o sistema multiplex Mini-YSTR, Mini YSTR09	49
<b>2.4 Teste de temperatura de anelamento dos primers</b>	49
<b>2.5 Preparação das amostras (produto da PCR) e detecção por eletroforese capilar</b>	49
2.5.1 Análise dos produtos de PCR	50
<b>2.6 Construção dos bins</b>	50
<b>2.7 Etapas de validação</b>	50
2.7.1 Teste de sensibilidade	50
2.7.2 Teste de mistura	51
2.7.3 Teste em amostras de DNA degradado	51
<b>3.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	53
<b>3.1 Desenvolvimento do sistema Multiplex</b>	53
3.1.1 Desenho dos <i>primers</i> , amplificação do monoplex e multiplex e eletroforese capilar	57
3.1.2 Desenho dos <i>primers</i> e análise do multiplex Mini YSTR09	56
3.1.3 Estratégias de validação	57
3.1.3.1. Teste de sensibilidade	57
3.1.3.2. Teste de mistura	58
3.1.4 Teste em amostras biológicas	61
<b>4.CONCLUSÃO</b>	65
<b>CAPÍTULO II: ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA CIDADE DE MANAUS</b>	
<b>RESUMO</b>	66
<b>ABSTRACT</b>	67
<b>1.INTRODUÇÃO</b>	68
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	70
2.1 Amostras biológicas	70

<b>2.2 Coleta das amostras</b>	70
2.2.1 Extração de DNA	70
2.2.2.Determinação da concentração de DNA	70
<b>2.3 Amplificação das regiões STR do cromossomo Y</b>	71
2.3.1 Sistemas de amplificação multiplex utilizados	71
2.3.2 Reação de amplificação dos sistemas multiplex	72
<b>2.4 Preparação das Amostras (Produto de PCR) e detecção por eletroforese Capilar</b>	73
<b>2.5 Análise dos produtos de PCR</b>	73
<b>2.6 Análises estatísticas</b>	72
<b>3. RESULTADOS</b>	75
3.1 Determinação das frequências dos alelos e da diversidade gênica	75
3.2 Determinação das frequências de haplótipos do cromossomo Y na amostra populacional estudada.	80
3.3 Diversidade haplotípica	82
3.4 Capacidade de discriminação	83
<b>4 DISCUSSÃO</b>	84
4.1 Estudo da População da Cidade de Manaus	84
4.2 Análises estatísticas	84
4.2.1 Frequência Alélica e diversidade gênica	84
4.2.2 Diversidade e frequência haplotípica	88
4.2.3 Capacidade de discriminação	88
<b>5. CONCLUSÃO</b>	93
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAS</b>	95
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	96
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	97
<b>ANEXOS</b>	116





## RESUMO GERAL

Metodologias para análise molecular relacionadas com estudos populacional e forense, têm sido desenvolvidas a partir de marcadores de microssatélites (STRs) e as aplicações desses marcadores, potencializam os sistemas de amplificação por PCR, seja utilizando apenas um par de STRs (*monoplex*) ou vários STRs (*multiplex*). Para a identificação humana por DNA, os primeiros sistemas multiplex foram estabelecidos com STRs de cromossomos autossômicos, seguidos do uso de STRs de tamanho reduzido, conhecidos como Mini-STRs. Posteriormente, para o cromossomo Y, foram desenvolvidos os Y-STRs, os Mini-YSTRs e mais recentemente o uso dos YSTR de mutação rápida (RM)-YSTR. E por não existirem dados com STRs do cromossomo Y na população da Cidade de Manaus, o estudo com tais marcadores torna-se relevante. Assim, os objetivos deste trabalho foram desenvolver um sistema multiplex do tipo MiniY-STR para avaliar a eficiência na amplificação de amostras de casos forenses (DNA degradado) e além disso, em conjunto com o Kit comercial *PowerPlex®Y23 System* (Promega), determinar a frequência haplotípica da população da cidade de Manaus. Para tanto, foi construído um sistema multiplex “*in house*” denominado Mini YSTR09, contendo 9 locos de Mini-YSTR e (RM)-YSTR (Capítulo I). Para a validação, foram realizados testes de sensibilidade, de detecção em amostras com misturas e testes em amostras de DNA degradado (98 amostras de osso humano), conforme recomendação do SWGDAM. O multiplex foi capaz de amplificar todos os 09 (100%) locos nos sistemas de mistura de DNA e nos sistemas com amostras de DNA degradado (69,4%). Para o estudo populacional (capítulo II), as 214 amostras de sangue coletadas de indivíduos do sexo masculino não relacionados geneticamente, foram extraídas com kits comerciais e os produtos amplificados por PCR (31 Y-STRs em três grupos), foram submetidos a eletroforese capilar no sequenciador ABI 3500 e analisados no *software Genemapper* v. 4,1. 204 amostras foram tipadas com o kit comercial (grupo I), 189 com o Mini YSTR09 (grupo II) e 168 com o conjunto desses dois multiplexs, Kit comercial mais o Mini YSTR09 (grupo III). A presença de haplótipos únicos nos grupos I, II e III foi de 202, 181 e 168, respectivamente. A maior diversidade gênica foi dos DYS626, DYS570, DYS576 e DYS447, para o grupo I; dos DYS385, DYS570, DYS458, DYS481 e DYS456 para o grupo II e DYS385, DYS461, DYS626, DYS458, DYS576, DYS447 e DYS456 para o grupo III, sendo o DYS447, dentre os mais polimórficos quando das análises no grupo I e III. Portanto, a aplicação do multiplex Mini YSTR09 aqui desenvolvido, possibilitou a amplificação desse DNA em quantidades mínimas e degradado e além disso, para as

análises populacionais proporcionou uma maior capacidade de discriminação quando foi utilizado em conjunto com o kit comercial *PowerPlex® Y23 System*, destacando-se os locos DYS447, DYS570, DYS576 e DYS626.

Palavras-chave: Mini –YSTR; DNA degradado; Haplótipos

## ABSTRACT

Methodologies for molecular analysis population and forensic studies, have been developed based on microsatellites or STRs. The application of the markers, enhance the PCR amplification system, utilizing only one pair of primers (monoplex), or several pairs (multiplex). For human identification by using DNA techniques, the first multiplex system were stabilished with STRs on autossomal chromosomes followed by using of reduced-size STRs (Mini-STRs). Then to the Y chromosome, have been developed the Y-STRs, mini-YSTRs and more recently the rapidly mutating (RM)-YSTRs. However, there are no studies using STRs on Y chromosome for the population of Manaus city, the objective of this study was developed a multiplex system Mini-YSTR to evaluate the amplification efficiency of degraded forensic DNA samples. In addition, to determine haplotype frequency of the population in Manaus, a commercial Kit *PowerPlex® Y23 System* (Promega) was used. Therefore, was developed a multiplex system denominated Mini YSTR09, combining nine mini-YSTR markers and (RM)-YSTR (Chapter I). For validation, tests to evaluate sensibility, tests of detection sample containing mixtures and tests of degraded forensic DNA samples (98 samples of bones human) were conducted, by SWGDAM procedures. The multiplex was able to amplified 09 (100%) in a DNA mixture system and in 64,4% of degraded forensic DNA samples. For the population studies (chapter II), 214 blood samples were collected of male people, not correlated genetically. All de samples were extracted by using commercial kits and the amplified PCR products (31 Y-STRs in three dferent groups) and they are subjected to capillary electrophoresis in ABI 3500, automatic DNA sequence and analyzing in Genemapper v.4.1 software. 204 DNA samples were typed with the commercial kit (group I), 189 with the Mini YSTR09 (group II) and 168 with the set (Mini YSTR09 more commercial Kit *PowerPlex® Y23 System*), (group III). Results demonstrated the existing unique haplotypes in group I, II e III of the 202, 181 e 168, respectively. The greatest genetic diversity was found in locos DYS626, DYS570, DYS576, DYS447 (group I); DYS385, DYS570, DYS458, DYS481 e DYS456 (group II) e DYS385, DYS461, DYS626, DYS458, DYS576, DYS447 e DYS456 (group III). The locos DYS447, is was most polymorphic of group I and III. Therefore, the use of multiplex Mini YSTR09 developed made possible the forensic DNA samples amplification and for population analysis, provided a higher capacity of discrimination, when it was used in addition with the commercial kit *PowerPlex® Y23 System*, highlighting the locos DYS447, DYS570, DYS576, DYS626.

*Keywords:* Mini –YSTR; Degraded DNA; Haplotypes,

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Em 1909, Landsteiner descreveu o primeiro antígeno do grupo ABO. A partir daí, outros tipos de grupos sanguíneos foram sendo descobertos, como os sistemas MN e Rh e passaram a ser utilizado em análise genética juntamente com o sistema ABO (LANDSTEINER e WIENER, 1940; LEWIS MOURANT, 1946 e ANDRESEN, 1947). Porém, tais sistemas apresentavam baixa capacidade de individualização, em razão de seu reduzido grau de variabilidade.

Entretanto, a partir da década de 80 a identificação humana teve um avanço, com relação as metodologias utilizadas, tendo sua capacidade de individualização ampliada. Este marco histórico proporcionado pelo trabalho de Jeffreys e colaboradores (1985a), fazendo uso de sondas multilocais, denominadas de VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats* - ou minissatélites, relatou que certas regiões produziam uma espécie de “impressão digital” do DNA. Desde este importante fato, a Ciência Forense tem sido beneficiada cada vez mais com a tecnologia de análise do DNA solucionando questões cruciais.

Para os casos de identificação humana através da molécula de ácido desoxirribonucleico - DNA, são empregados atualmente marcadores polimórficos de DNA, conhecidos como marcadores de microssatélites. Tais marcadores, apresentam ampla distribuição pelo genoma e são analisados através da amplificação a partir da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), seguido de eletroforese capilar (BENNET, 2000).

No entanto, para a aplicação dos microssatélites em casos forense é necessária a realização de estudos populacionais prévios, como por exemplo, o estudo da frequência de seus alelos (variáveis) na população (Lincoln e Thomson, 1998). Tal estudo é relevante, pois em muitos casos forenses é necessário fazer a comparação de DNA de um determinado indivíduo com o de supostos parentes, já que um indivíduo tem o seu perfil genético definido a partir do DNA de seus genitores constituindo-se de 50% de alelos maternos e 50% de alelos paternos.

A frequência na qual cada alelo de um microssatélite se encontra na população, deve ser calculada com a finalidade de se determinar a probabilidade de ao acaso, um determinado alelo estar presente em duas amostras diferentes e esta probabilidade será elevada quando o alelo apresentar-se em grande frequência na população e baixa quando se tratar de alelos mais raros.

Estudos demonstram que existem variações nas frequências alélicas entre diferentes populações (GUSMAO et al., 2001). Por isso é importante a realização de estudos para que os

cálculos estatísticos obtidos a partir das análises da amostra de DNA de um indivíduo, apresente um maior índice de confiabilidade nos resultados. O número de alelos que determinada região de microssatélite apresenta, juntamente com a frequência na qual estes alelos são encontrados, irão determinar o grau de polimorfismo do marcador. Logo, nos estudos de identificação de indivíduos, o ideal é que sejam utilizados marcadores altamente polimórficos.

Outro motivo pelo qual é necessário o estudo da frequência dos alelos é que na maioria das vezes o DNA encontra-se degradado e com isso a amplificação desse material genético com todo o conjunto de marcadores de microssatélites, torna-se prejudicada. Daí a necessidade de se conhecer quais marcadores são mais informativos para que a tipagem destes forneça uma correta interpretação dos resultados.

Atualmente são empregados nos casos forenses marcadores presentes tanto nos cromossomos autossômicos, como nos sexuais, dependendo da particularidade do caso. Os microssatélites do cromossomo Y, os Y-STRs, têm sido empregados em investigações de crimes sexuais (BETZ et al., 2001; PRINZ et al., 2001) e de parentesco, quando o suposto pai não está disponível para o exame, mas existem outros parentes de linhagem paterna (KAYSER et al., 1997). Os Y-STRs, por apresentarem herança paterna, podem ser utilizados também em estudos de genéticas de populações e de evolução humana. (HENKE et al., 2001; KAYSER et al., 1997)

Além dos Y-STRs, os marcadores do tipo Mini-YSTR têm sido bastante utilizados como uma abordagem alternativa para a análise de DNA em amostras degradadas, assim como para estudo nas mais diversas populações demonstrando-se eficientes e relevantes quando utilizados em ambas situações.

Assim, tendo em vista a variedade de aplicações, bem como a necessidade de estudos prévios dos marcadores do cromossomo Y nas diferentes populações em que serão empregados, este trabalho tem como objetivo analisar 09 novos marcadores do tipo Mini-YSTR desenvolvidos “in house” (em laboratório de pesquisa) em amostras forenses e juntamente com os 23 YSTRs presentes no Kit comercial *Powerplex Y23 systems* (Promega), analisar as frequências haplotípicas e outros parâmetros estatísticos na população da cidade de Manaus.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O DNA e genoma humano

O DNA, a molécula de ácido desoxirribonucléico, é o material genético de todos os seres vivos, com exceção de alguns tipos de vírus cujo material genético é o ácido ribonucléico-RNA. A molécula foi caracterizada pela primeira vez em 1944 por Avery e colaboradores, como sendo a responsável por conter e transmitir a informação genética. Em 1953, Watson e Crick estabeleceram a estrutura tridimensional do DNA contendo duas cadeias de helicoidais que se enrolam em volta do mesmo eixo com as bases para dentro da hélice e os fosfatos para o lado de fora.

Nos seres humanos o DNA está organizado em um genoma complexo chamado de genoma nuclear e em um mais simples, o genoma mitocondrial (STRACHAN e READ, 2002). O genoma nuclear está distribuído em unidades denominadas cromossomos (22 pares autossômicos e um par sexual, cromossomo X e Y) e o genoma mitocondrial está distribuído na matriz das mitocôndrias de forma pequena e circular e com linhagem exclusivamente materna.

No genoma humano, cuja versão haplóide tem pouco mais de três bilhões de pares de bases encontram-se inúmeras regiões de DNA responsáveis pela formação dos genes (SALZANO, 1983). Este genoma pode ser dividido em regiões funcionais ou codificantes e em regiões extra gênicas ou não codificantes. Representando cerca de 30% do genoma, estão as regiões codificantes sendo compostas por genes e sequências relacionadas com genes (como pseudogenes e fragmentos de genes) além de regiões promotoras e íntrons com função estrutural e reguladora. Este DNA codificante sofre grande pressão seletiva e conservadora sendo pouco polimórfico, apresentando escassa variedade entre os indivíduos. E representando cerca de 70% do genoma, estão as regiões não codificantes que se manifestam em sequências repetitivas, apresentando alto grau de polimorfismo (WATSON et al., 2006). Sendo assim, constituem uma grande fonte de marcadores genéticos, assumindo grande importância na genética forense e populacional (PRAK e KAZAZIAN, 2002). As sequências repetitivas que se manifestam nessas regiões não codificantes podem ser do tipo longas (satélites), curtas (minissatélites) ou muito curtas (microssatélites) (JEFFREY et al., 1985; HANSSEN et al., 1999).

Quando ocorre algum erro durante a formação da cópia do DNA, dizemos que ocorreu algum processo mutacional. Essas mutações podem ser do tipo que alteram segmentos longos

de DNA ou do tipo pontual, que altera uma única base da molécula (DE ROBERTIS e DE ROBERTIS, 1993). Quando estas mutações ocorrem em locais onde não resultam em alterações sérias, como no caso das regiões não-codificantes, as quais não sofrem grande pressão seletiva elas tornam-se estáveis e são transmitidas para gerações futuras tornando o DNA polimórfico. Logo, estas regiões tornam-se extremamente úteis para a identificação humana (MUCKSICK, 1999).

## **2.2 A identificação humana por DNA**

Nos últimos 20 anos as metodologias empregadas na identificação humana passaram por um grande avanço técnico-científico, devido ao grande desenvolvimento científico e a descoberta de características especiais nas sequências de DNA, designadas de polimorfismos genéticos. Até 1985, predominavam técnicas baseadas na variabilidade de grupos protéicos tendo destaque o grupo sanguíneo ABO e marcadores genéticos do complexo de histocompatibilidade (sistema HLA) e dos sistemas MN e RH (RODENBUSH, 2008; LANDSTEINER e WIENER, 1940).

Allec Jeffreys (1985), descobriu regiões de grande variabilidade no DNA entre os indivíduos designadas por *DNA fingerprinting*, ou impressão digital por DNA, sendo única para cada indivíduo, exceto em gêmeos (GILL et al., 1985; NORDGREN, 2008).

Mullis e colaboradores (1987), desenvolveram uma nova metodologia de análise que revolucionou a biologia molecular e as ciências forenses devido à capacidade de amplificação de milhões de cópias de regiões específicas da molécula de DNA em poucas horas. Esta metodologia ficou designada como *polymerase chain reaction* - reação em cadeia da polimerase - PCR. O método da PCR é baseado na replicação do DNA e reproduz “in vitro” o fenômeno que acontece no interior das células. Devido a amplificação por PCR, amostras exíguas de tecidos ou fluidos corporais originados na maioria das vezes de casos forenses passaram a ser utilizadas como fonte de DNA, tornando essa metodologia uma importante ferramenta para os estudos identificação humana por DNA (DOLINSKY e PEREIRA, 2007; JEFFREYS et al., 1988).

### **2.2.1 Marcadores moleculares para identificação humana**

Os marcadores moleculares de DNA estão inseridos em dois grupos: os de polimorfismos de sequência e os de polimorfismos de comprimento. Os marcadores moleculares de polimorfismos de sequência são gerados por substituição de uma base ou por pequenos eventos de inserção e deleção (DOLINSKY e PEREIRA, 2007). Os polimorfismos de comprimento, correspondem a regiões no DNA que variam, entre os indivíduos em tamanho. Neste último grupo estão incluídas as regiões repetitivas de DNA tais como, as regiões “minissatélites” (VNTRs) e “microsatélites” (STR’s).

Os VNTRs (*variable number of tandem repeats* ou número variável de repetições *in tandem*) abrangem sequências de DNA altamente polimórficas, repetidas *in tandem*, podendo ser encontradas ao longo do genoma nuclear humano, organizados em blocos de 8 a 100 pb (JEFFREY et al., 1985). Por serem indivíduo-específicos, proporcionam um conjunto de marcadores genéticos denominados de “impressão digital de DNA” (*DNA fingerprint*) capazes de discriminar espécies e indivíduos dentro de grupos complexos (BRASILEIRO et al., 2004; RUAS et al., 2003).

A metodologia de análise está baseada no uso de sondas moleculares (processo de hibridização) capazes de detectar sequências VNTR no genoma humano (JEFFREY et al., 1987). A análise dessas regiões já foi empregada para resolver problemas de emigração, no esclarecimento de um duplo homicídio na Inglaterra e para resolver problemas de relações extraconjugais nos Estados Unidos (BUTLER, 2005). Essa metodologia porém, apresenta desvantagem pois, para a tipagem de alelos requer DNA íntegro e em grande quantidade (100 a 500 ng), tornando praticamente inviável a tipagem de amostras biológicas antigas, degradadas ou com pouca quantidade de DNA, sendo portanto pouquíssimo utilizada atualmente em investigações genéticas (GÓES, 2010).

Os microsatélites ou *Short Tandem Repeats* (STR) constituem uma versão reduzida dos VNTRs. São regiões de DNA com unidades de repetição contendo de 1-6 pares de bases (pb) de comprimento que se repetem um após o outro até algumas dezenas de vezes. Acredita-se que o surgimento dos microsatélites assim como das variações apresentadas por estes marcadores, estejam relacionados a falhas durante o processo de replicação do DNA, que causam o aumento ou diminuição do número de unidades de repetição. Estas falhas podem ocorrer devido ao processo conhecido como “escorregão” da polimerase (*polymerase slippage*) que é a enzima que promove a duplicação do DNA através da adição de nucleotídeos complementares as fitas da molécula originais previamente separadas. Desta forma, ocorre a



adição ou perda de uma ou mais unidades de repetição, devido a formação de alças durante a replicação na fita de DNA que está sendo sintetizada ou na fita molde, respectivamente. (BENNET, 2000)

O número de vezes em que a unidade de repetição se apresenta, varia muito entre os indivíduos. Podem ser classificados de acordo com o tipo de sequência que se repete em: a) simples: a sequência das bases se repete e não ocorre interrupção; b) misto: há a presença de nucleotídeo diferente da estrutura repetitiva; c) composto: pelo menos uma das repetições apresenta nucleotídeos intercalados; d) complexo: apresenta mais de um tipo de repetição em série adjacente (BHARGAVA e FUENTES , 2010)

Os STRs estão dispersos por todo o genoma humano, tanto nos autossomos como nos cromossomos sexuais, ocupando aproximadamente 3% de sua totalidade e ocorrendo, em média, a cada 10.000 nucleotídeos (COLLINS et al., 2003; EDWARDS et al., 1991; SUBRAMANIAN et al., 2003). São marcadores altamente polimórficos, co-dominantes, presentes em abundância no genoma e diferentemente dos minissatélites, podem ser avaliados mesmo com baixa quantidade de DNA a partir da técnica de PCR. Além disso, são passíveis de automatização através de processos envolvendo detecção dos *amplicons* por fluorescência. Esse conjunto de características os tornam altamente eficientes para fins de identificação genética humana, sendo úteis em estudos de mapeamento genético, de evolução e em investigações forenses (BUDOWLE et al., 2000; KAYSER et al., 2004). Por isso, a partir dos anos 90, a técnica de identificação humana através de marcadores VNTRs foi substituída por um novo sistema de tipagem de alelos baseado na análise de regiões de microssatélites, via amplificação por PCR.

Para a identificação humana, os microssatélites de grande importância são aqueles que apresentam maior polimorfismo (maior número de alelos), menor tamanho, uma elevada frequência de heterozigotos e baixa frequência de mutações (JOBIM e BRENNER, 1999). No início dos anos 90, ocorreram as primeiras aplicações destes marcadores no âmbito forense. No caso das tipagem dos restos cadavéricos de uma vítima de homicídio (HAGELBERG et al., 1991), seguida da tipagem dos restos cadavéricos de Josef Mengele, o “Anjo da Morte” de Auschwitz (JEFFREYS et al., 1992). Também na década de 90 os STRs foram utilizados na pesquisa e no diagnóstico de doenças na área do câncer, fibrose cística (MORRAL e ESTIVILL, 1992) e outras doenças (WEBER et al., 1992).

Entretanto, apesar de todas as vantagens dos STRs, a análise individual de um único loco, não fornece um poder de discriminação adequado para as análises forenses. Este fato, aliado à quantidade de amostra de DNA utilizada nas análises, que na maioria dos casos é limitada (principalmente em casos forenses), levou ao desenvolvimento de sistemas de amplificação em *multiplex*, tornando possível a genotipagem simultânea de um grande número de STRs em uma só reação de PCR (BUDOWLE et al., 2000). Esses sistemas, além de diminuir o tempo de análise, necessitam de uma menor quantidade de DNA para as análises genéticas (BUTLER, 2003 ; GUSMAO et al., 1999).

Os primeiros sistemas multiplex para identificação humana por DNA foram elaborados com STR localizados nos cromossomos autossômicos e a maioria dos laboratórios de genética forense recorre a utilização de kits comerciais, através dos quais se consegue proceder a amplificação simultânea de até 15 locos STR, o que proporciona um excelente poder de discriminação com baixo consumo de amostra.

Após os estudos pioneiros com STRs, variações de tais marcadores foram sendo identificadas e reconhecidas como novas alternativas para a ciência. Foram então surgindo os marcadores de STR de tamanho reduzido, conhecidos como Mini – STRs e os marcadores do cromossomo Y (Y-STR), seguidos dos Mini-YSTR e recentemente, os marcadores de rápida mutação, os (RM)-YSTR.

Aliados a descoberta de novos sistemas multiplex comerciais, diversos grupos de pesquisas vêm desenvolvendo os seus próprios sistemas multiplexes (BUTLER et al., 2002; HANSON e BALLANTYNE, 2004). O desenvolvimento de tais sistemas representa uma economia considerável para laboratórios de pesquisa e de diagnóstico molecular, já que a maioria dos kits utilizados na rotina é produzida por empresas multinacionais que detêm a comercialização de tais sistemas, com elevado custo (MANTA, 2008).

### **2.3 Cromossomo Y**

O cromossomo Y representa um dos cromossomos sexuais do cariótipo humano. É específico do sexo masculino. Classifica-se como cromossomo acrocêntrico, apresentando um braço curto (p) e um braço longo (q), como segue demonstrado na Figura 01. Representa apenas 2% do genoma, contendo aproximadamente  $6 \times 10^7$  pb (60Mb), sendo o terceiro menor dos cromossomos humanos (cromossomos 21 com 47Mb e o cromossomo 22 com 49Mb)

A heterocromatina, localizada no braço longo do cromossomo Y, abrange uma grande parte do cromossomo. É composta por regiões altamente repetitivas, assim como a região

pericentromérica, constituindo 70% do DNA deste cromossomo (ROEWER et al.,1996). A eucromatina possui tamanho constante e possui sequências homólogas ao cromossoma X, sequência repetitivas Y-específicas e alguns genes funcionais (Figura 01) (BACHTROG e CHARLESWORTH, 2001; GUSMÃO et al., 1999).

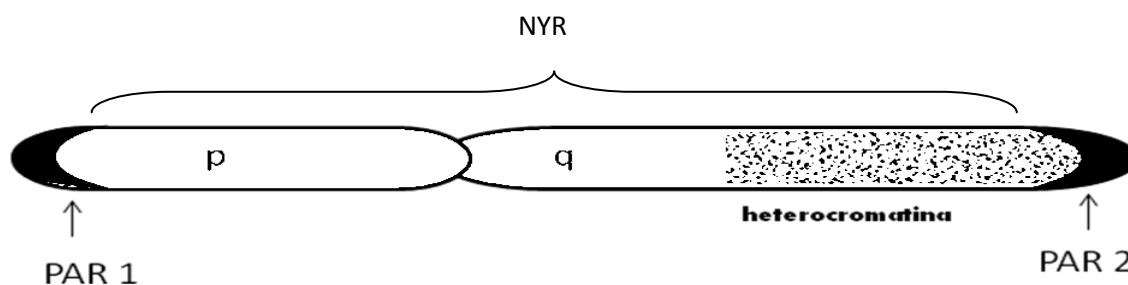


Figura 1. Esquema ilustrativo do Ideograma do cromossomo Y humano com as duas regiões PAR assinaladas com setas nas laterais direita e esquerda da figura. .

Por não haver um elemento homólogo, 95% do cromossomo Y não recombina durante a meiose. Essa região denomina-se de região não-recombinante do cromossoma Y ou NYR. É a fração exclusivamente masculina do genoma humano sendo herdada como um bloco (haplótipos). Assim, a informação passa de pai para filho sem que haja variações ou alterações, exceto aquelas que sejam criadas pela ocorrência de mutações quando da formação dos gametas.

Somente em duas pequenas regiões pseudoautosômicas denominadas PAR1 e PAR2, localizadas nos extremos do cromossomo é que existe recombinação com partes homólogas do cromossomo X (Figura 01) (JOBILING et al.,1997).

Por serem herdados apenas de um dos genitores (o pai) na forma de haplótipo, os marcadores do cromossomo Y são conhecidos como “marcadores de linhagem”. Dessa maneira é possível a identificação de diversos locos de STRs em um homem sendo os mesmos alelos encontrados em seu pai, irmãos, tios, primos, avô e demais antepassados masculinos. Estudos apontam um baixo índice de mutação, podendo os mesmos haplótipos serem encontrados em várias gerações de homens alcançando talvez várias centenas de anos (GILL et al., 1997).

Portanto, o cromossomo Y pode ser utilizado para estudos de vínculo de parentesco, para análises forenses como testes de identificação humana que evidenciam abuso sexual, identificação de pessoas desaparecidas e testes de paternidade (LIMA, 2010), além de contribuir com pesquisas sobre mecanismos da evolução e migração do ser humano ao redor do planeta (MAGALHÃES; SILVA, 2006). Mas, para a utilização deste cromossomo no contexto da criminalística biológica existem algumas limitações. Devido ao compartilhamento da mesma

informação genética por todos os indivíduos do sexo masculino pertencentes a mesma linhagem paterna, existem concordância entre dois perfis genéticos. Portanto, a caracterização de marcadores do cromossomo Y, pode ser altamente esclarecedora em casos de exclusão mas, tem um valor probatório limitado em casos de concordância de perfis genéticos.

### **2.3.1 Os STRS do cromossomo Y**

#### **2.3.1.1 Y-STR**

Quando o STR localiza-se no cromossomo Y é denominado de Y-STR. Devido a ausência de recombinação, os Y-STRs são herdados de forma haplotípica ao longo das gerações. Logo, sua análise não identifica o indivíduo, apenas aponta sua linhagem paterna sem alterações, exceto em casos de mutação (BUTTLE et al., 2005).

Os Y-STRs foram desenvolvidos como uma abordagem para o estudo na área da genética forense. Tornaram-se marcadores por excelência, pois dentre muitas vantagens oferecidas destacam-se as de: (1) identificação de DNA masculino em casos envolvendo crimes sexuais, em que geralmente ocorre mistura de material genético masculino e feminino na amostra biológica coletada para análise; (2) a determinação do número de contribuintes da mistura, em caso de crime sexual com mais de um criminoso; (3) a determinação de haplótipos de pessoas desaparecidas através da comparação de parentes de mesma linhagem paterna, e (4) em testes de vínculo genético, mais utilizado quando o alegado pai já é falecido (JOBILING et al.,1997; KAYSER et al.,1997). São utilizados também em pesquisas genealógicas e em estudos de evolução como investigações históricas e em estudos de migrações (JOBILING, 2001; JOBILING e TYLER-SMITH, 2003; Kayser et al., 2001).

Inicialmente o número de Y-STRs caracterizados era limitado, apenas 20 (BUTLER et al., 2002). Nos anos 90, apenas uma pequena porção de locos de Y-STR estavam caracterizados e disponíveis para serem usados em testes de identificação genética humana. O primeiro microsatélite descrito no cromossomo Y foi o DYS19, originalmente denominado DY-27H39 (ROEWER e EPPLIN, 1992) e também conhecido como Y-H39 (BUTLER, 2003). Até a metade da década de 90, apenas cinco microsatélites haviam sido descritos: os dinucleotídeos YCAI, YCAII, YCAIII ; o trinucleotídeo DYS19 ou 27H39; e o pentanucleotídeo DXYS156Y, sendo que somente o DYS19 era utilizado na rotina forense (KAYSER et al.,1997). Após o sequenciamento do genoma humano, os Y-STR desenvolvidos para a análise genética

sofreram um elevado crescimento no decorrer dos últimos 20 anos. Até 2002, foram publicados aproximadamente 50 marcadores de microssatélites, compreendendo de di a hexanucleotídeos (REDD et al., 2002). Entretanto, alguns dos microssatélites descritos, não são recomendados para a análise forense (KAYSER et al., 1997).

Desde o ano 2000 é possível acessar dados sobre YSTRs no maior banco de dados de haplótipos do cromossomo Y *online*, o qual é um banco de dados europeu designado de YHRD- *Y chromosome haplotype reference database* (ROWER et al., 2000). Este banco de dados estabeleceu a utilização de um conjunto de Y-STR para serem utilizados nos casos de identificação humana, constituído por nove STR e que ficou conhecido como haplótipo mínimo. Este é composto por sete de cópia única: DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393 e um loco altamente polimórfico, de múltiplas cópias, o DYS385a/b (SCHNEIDER et al., 1999). Em Janeiro de 2003 o SWGDAM (*U.S. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*) grupo de estudo americano, recomendou a expansão do Haplótipo Mínimo com o acréscimo de dois novos marcadores de cópia única: DYS438 e DYS439 (BUTLER et al., 2003), que haviam sido descritos três anos antes por Ayub e colaboradores (2000), formando assim o haplótipo estendido. Subsequentemente, foram sendo descritos diversos adicionais que, combinados com os do haplótipo estendido, aumentavam o poder de discriminação do conjunto haplotípico (HANSON et al., 2004; KAYSER et al., 2004; REDD et al., 2002).

Após 2002, dezenas de microssatélites do cromossomo Y foram sendo identificados e caracterizados. Hanson e Ballantyne (2006), referiam-se a mais de 400 de Y-STR localizados nas regiões Yq11.221 (25,3%), Yq11.222, (16,6%) e Yq11.223 (18,4%) no braço longo e Yp11.2 (22,1%) no braço curto do cromossomo Y. Cento e vinte destes YSTRs são suficientemente polimórficos para serem úteis nas análises forenses e genealógicas.

O primeiro kit comercial de Y-STR foi disponibilizado no mercado em janeiro de 2001 e incluía seis marcadores: DYS19, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS393 e DYS385a/b. Posteriormente foram lançados diversos outros e até 2011, encontravam-se disponíveis no mercado distintos kits já validados para a casuística forense, sendo que a maioria incorporava entre 12 e 17 em um único sistema *multiplex*. A partir de 2012, novos kits comerciais tornaram-se disponíveis no mercado, apresentando um número maior de marcadores o qual varia de 21 a 24 locos de STRs ou de Y-STRs, dependendo do fabricante.

Tais kits englobam todos os marcadores recomendados pelo SWGDAM. Mas, apesar da robustez e capacidade demonstrada para diferenciar dois indivíduos, nas análises genéticas utilizando-se de Y-STRs podem existir, mesmo que em menor quantidade quando comparados com STRs autossômicos, as probabilidades de coincidência (*matching probabilities*), ou seja, concordância entre perfis de Y-STR de diferentes indivíduos envolvidos em determinado caso em estudo. Portanto, continua existindo a necessidade de se desenvolver novos sistemas *multiplex* para complementar os já existentes (busca de um poder de discriminação adicional) (PASCALI et al., 1998).

Em diferentes populações, diversos estudos relativos a frequências de microssatélites do cromossomo Y vêm sendo realizados. Treze Y-STRs foram caracterizados em uma amostra de 3825 homens não aparentados, pertencentes a 48 diferentes grupos populacionais, procedentes de cinco continentes (KAYSER et al., 1997b). Estudos recentes também vêm sendo realizados com a população da Ucrânia (MIELNIK-SIKORSKA et al., 2013), da China (BAI et al., 2013) e do Paquistão, sendo utilizados neste trabalho 22 marcadores de YSTR, onde seis destes foram desenvolvidos “in house” (LEE et al., 2014).

No Brasil, inúmeros trabalhos também vêm sendo publicados. Na população do Rio de Janeiro foram realizados dois estudos com YSTR. O primeiro, analisado por Costa Silva e Moura-Neto(2002), com 109 indivíduos contendo sete marcadores de YSTR, observando no total 97 haplótipos diferentes. E o segundo, onde Góes e colaboradores (2005) analisaram uma amostra de 126 indivíduos utilizando 17 YSTR, sendo nesse caso observado um maior poder de discriminação do que quando se utilizou sete YSTR.

Cainé e colaboradores (2005) estudaram oito YSTR (DYS19, DYS385, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393) em uma amostra de 109 indivíduos da população de Santa Catarina. Grattapaglia e colaboradores (2005) estudaram o haplótipo mínimo na população brasileira e demonstraram que os DYS 385I/II e DYS389II apresentaram diversidade gênica de 70% e 90,5% respectivamente, sendo os mais informativos para a população brasileira, enquanto os DYS389I, DYS391 e DYS393, demonstraram-se menos informativos. Ainda houve estudos de análise populacional em São Paulo (GÓIS et al., 2008), no Rio Grande do Sul, (SCHWENGBER et al., 2009) e em Rondônia (TUCUNDUVA-NETO et al., 2008)

Assim, observa-se que a descrição de dados populacionais sobre Y-STRs no Brasil é relativamente frequente e diversos Estados tiveram suas populações estudadas. Porém, as

informações sobre os Y-STRs utilizados para fins forenses, ainda são limitadas, devido a um número relativamente baixo de amostras analisadas para um grupo limitado de marcadores. A grande maioria desses estudos incluem de nove Y-STRs preconizados pelo YHRD a 17 Y-STRs, do conjunto presente no kit comercial *YFiler (ThermoFisher)*. Logo é evidente que o poder de discriminação destes marcadores não são suficientes para evitar uma significativa proporção de alelos compartilhados dentro das populações estudadas (GRATTAPAGLIA et al., 2005; GÓIS et al., 2008; PEREIRA et al., 2007; SCHWENGBER et al., 2009; WOLFGRAMM et al., 2011).

Somente em 2011 é que Teresinha e colaboradores e em 2013 Chianca e colaboradores, analisaram a população da cidade de Belém e a população de Brasília, respectivamente com um total 23 YSTRs, ambos distribuídos em mais de um multiplex. E mais recentemente, Da Fré realizou um estudo com o Kit comercial *PowerplexY23 Systems (Promega)* na população do Rio Grande do Sul.

Apesar de diversas regiões do Brasil terem suas populações estudadas, a região Norte apresenta poucos estudos voltados para esse fim e conseqüentemente poucos trabalhos foram publicados até o momento (FRANCEZ et al., 2012; PALHA et al., 2011; PALHA et al., 2012). Dentre esses trabalhos, o único que relata estudos com YSTRs em amostras da população de Manaus, inclui somente 75 amostras de DNA dessa população e ainda assim, trata-se de um estudo em conjunto com diversas cidades da Amazônia Brasileira como Belém, Santarém, Macapá, Palmas, Rio Branco, Porto Velho (PALHA et al., 2012).

E mesmo diante de uma menor eficácia em relação aos genótipos obtidos dos STRs autossômicos (os quais segregam independentemente de geração em geração), os haplótipos obtidos dos Y-STRs (marcadores de linhagens), constituem um valioso acréscimo ao conjunto de ferramentas dos cientistas forenses e, quanto mais Y-STR forem estudados, maior será o poder de distinguir linhagens (MARTINS, 2008)

### **2.3.1.2 Mini-YSTR**

Os marcadores do tipo Mini-STR foram desenvolvidos como uma abordagem alternativa para tentar recuperar o máximo de informação possível em amostras degradadas, uma vez que em termos práticos, esta degradação poderá manifestar-se em uma redução da sensibilidade de detecção dos produtos amplificados, ou até mesmo, em casos mais críticos, em uma não



amplificação, principalmente para os marcadores de peso molecular mais elevados em torno de 200 a 250pb (ALVARES, 1996; BAR et al., 1988; PFEIFFER et al., 1999; SCHNEIDER PM et al., 2004; WHITAKER, 1995).

A técnica utilizada para a construção desses marcadores consiste em reduzir o tamanho dos fragmentos de amplificação, desenhando *primers* que se liguem o mais próximo possível da zona de repetição, como segue demonstrado na Figura 02 (WIEGAND et al., 2001).

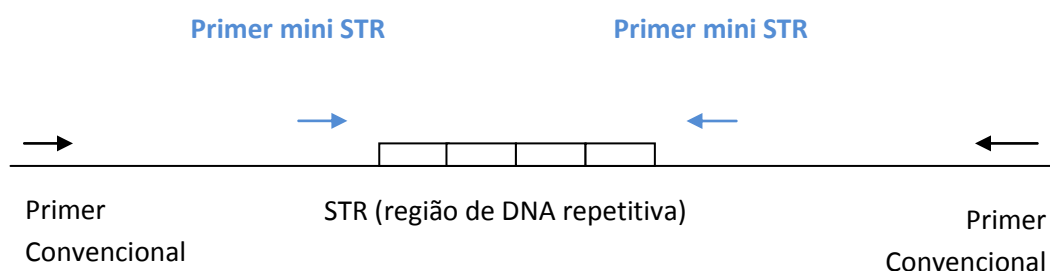


Figura 2. Esquema ilustrativo demonstrando a diferença entre *primers* de STR convencionais e de Mini-STRs.

A análise de produtos de PCR de menor tamanho demonstrou uma taxa de amplificação de sucesso mais elevada em amostras com DNA degradado. Tal análise foi empregada pela primeira vez, para a identificação das vítimas do fogo da Waco Branch Davidian, no Texas (WHITAKER et al., 1995). Diversos resultados foram confirmados por um vasto número de novos trabalhos desenvolvidos com diversos marcadores autossômicos, quer em sistemas *singleplex*, quer em *multiplexes* (WIEGAND et al., 2001, HOLLAND et al., 2003; BIESECKER et al., 2005; BUTLER et al., 2003; COBLE et al., 2005; CHUNG et al., 2004; DIXON et al., 2006; GRUBWIESER et al., 2006; HELLMANN et al., 2001; TSUKADA et al., 2002; WIEGAND et al., 2006).

Da mesma maneira que os Mini-STRs foram desenvolvidos para os cromossomos autossômicos, também foram desenvolvidos para o cromossomo Y (MiniY-STRs). E assim como para os Y-STRs comerciais e os desenvolvidos “in house”, os MiniY-STR também têm sido empregados para estudo nas mais diversas populações. Tais marcadores demonstram que além de relevantes para estudo populacional, são eficientes quando utilizados para análise de amostras degradadas.

Asamura e colaboradores (2007), desenvolveram oito locos de MiniY-STR, os quais foram utilizados juntamente com YSTR comerciais, para análise da população do Japão e para análise de amostras de DNA degradadas. Park e colaboradores (2007), estudaram a população da Coreia com 21 YSTRs sendo que nove locos foram redesenhados para MiniY-STR. Em 2008, Asamura e colaboradores desenvolveram três sistemas de multiplex com MiniY-STR, no total de 16, para estudos da população do Japão e para análise de DNA de amostras degradadas. Gayanayaka e colaboradores (2010), desenvolveram três locos de MiniY-STR para estudos de amostras degradadas provenientes de crime sexual.

Mas, apesar dos Mini-YSTRs mostrarem-se relevantes nos estudos acima citados, apresentam-se limitados em relação ao número de locos em um sistema *multiplex* quando comparados com o número de locos dos kits constituídos por STRs. Isto porque, com o reduzido intervalo de tamanhos dos fragmentos, torna-se mais difícil poder analisar em uma mesma reação e com o mesmo fluorocromo, diversos polimorfismos. Assim, na maioria das vezes, torna-se possível co-amplificar entre quatro a oito mini-STR em uma só reação. Consequentemente, para a obtenção de um mesmo poder de discriminação igual ao obtido com os STR é necessário proceder com várias amplificações em diferentes sistemas multiplexes, implicando assim em utilização de uma maior quantidade de amostra que nem sempre está disponível (MARTINS, 2008).

### **2.3.1.3 RM-YSTR**

Como citado anteriormente, os YSTRs são bastante utilizados para estudos populacionais e de genética forense. Porém, tais YSTRs atualmente disponíveis e em sua grande maioria presente em kits comerciais, apresentam-se limitados para análise de linhagens paternas quando em uma determinada população existe baixa diversidade de haplótipos. Além disso, não são eficazes em distinguir membros de uma mesma linhagem, como por exemplo, pai e filho ou dois irmãos (nos casos de paternidade ou nos casos de identificação através de familiares, respectivamente) (LEAT et al., 2007; WEI et al., 2013). Isto ocorre porque entre os perfis genéticos de um presumível pai e filho investigado, por exemplo, podem surgir diferenças, as quais são provenientes de mutações espontâneas na linha germinativa do progenitor. É necessário, portanto, conhecer as taxas de mutação dos diferentes Y-STRs para se proceder a uma correta interpretação dos perfis genéticos.

Para evitar essas limitações, tem sido sugerido a utilização de Y-STRs que apresentem uma elevada taxa de mutação (Ballantyne et al., 2010). Recentemente, Ballantyne e colaboradores (2012), investigaram a taxa de mutação de um grupo de 186 Y-STRs conhecidos (incluindo aqueles marcadores comumente utilizados na prática forense) em aproximadamente 2000 amostras de DNA de indivíduos masculinos relacionados geneticamente (pais e filhos). Tais marcadores, exibiram taxas de mutação entre  $1 \times 10^{-4}$  e  $1 \times 10^{-3}$ . Entretanto, treze desses Y-STRs apresentaram taxas médias de mutação em torno de  $1 \times 10^{-2}$ , ou seja, acima da observadas anteriormente. A partir dessa observação, os pesquisadores nomearam tais marcadores como “Y-STRs de mutação rápida” (*rapidly mutating Y-STR*; ou (RM) Y-STR). Diferentemente dos já existentes, esses 13 locos altamente mutáveis, podem fornecer um aumento do poder de identificação masculina relativa, podendo até mesmo identificar um indivíduo masculino, mesmo que esteja correlacionado. Mas, ainda que apresentem um alto poder discriminatório os (RM) Y-STR, somente ficaram disponíveis comercialmente recentemente, quando do lançamento do kit comercial *PowerPlex® Y23 System (Promega)* (DAVIS et al., 2012). A partir desta data é que o grande valor dos (RM)-YSTR em diferenciar indivíduos relacionados e não relacionados, têm sido explorado em recentes estudos ao redor do mundo, como no caso do International RM-YSTR Study Group (BALLANTYNE et al., 2014) e no Italian Working Group da International Society for Forensic Genetics (ROBINO et al., 2013), além de estudos para o desenvolvimento de novos multiplexes baseados nos RM-YSTR. (ALGHAFRI et al. 2015; ROGALLA et al., 2015 ). Portanto, não se pode concluir que o vínculo genético entre os dois indivíduos não exista, tendo em vista às mutações em mais de um Y-STR na mesma linhagem germinativa (DUPUY et al. 2004; KAYSER et al., 2000). É importante que em estudos populacionais e de genética forense, sejam aplicados os RM-YSTR, o qual fornecem uma solução para as diversas limitações dos marcadores do cromossomo Y com relação as mutações (BALLANTYNE et al., 2012).

## **2.4 Marcadores simples e multicópia**

A maioria dos Y-STRs utilizados pelos laboratórios forenses e até mesmo o Y-STRs presentes nos kit comerciais, são de cópia simples e possuem apenas um alelo. No entanto, devido as regiões duplicadas e palindrômicas, alguns ocorrem mais de uma vez e portanto, são conhecidos como marcadores multicópias. Quando amplificados com iniciadores de PCR – específicos produzem mais de um produto de PCR, já que, um único par de “primers” pode

produzir dois *amplicons*. Os marcadores multicópias já descritos na literatura e utilizados, são os DYS385 e o DYS389 (BUTLER et al.,2005); (GUSMAO et al. 2006).

O marcador DYS385 está presente em duas regiões no braço longo do cromossomo Y, que se localizam a 40.000 pares de base uma da outra e suas análises podem gerar dois alelos distintos. Sendo assim, para a análise haplotípica (estimativa de Y-STRs que compõe um haplótipo em estudo), considera-se cada alelo para cada marcador, ou seja, alelo A, para o marcador DYS385I e alelo B, para o marcador DYS385II. No entanto, para o cálculo de frequência haplotípica, ambos alelos são considerados para o marcador DYS385 e por isso, o resultado se assemelha a um genótipo (BUTLER et al.,2005).

O marcador DYS389, outro marcador multicópia, pode gerar também dois produtos de PCR com um único par de *primers*. Entretanto, diferentemente do que acontece com o DYS385 o produto de PCR DYS389 I é parte do produto de PCR do DYS389 II porque o *primer forward* é complementar a duas regiões separadas por 120 pares de bases e o *primer reverse* possui um único sitio de ligação. Assim, são gerados dois produtos de PCR e, como ambas as regiões amplificadas possuem sequências polimórficas diferentes, considera-se o DYS389 como dois Y-STRs (DYS389I e DYS389II) (BUTLER et al.,2005).

Além disso, alguns marcadores considerados cópia simples podem gerar resultados multicópia pelo fato do indivíduo estudado apresentar duplicação que não é observada para a maioria da população (GUSMAO et al.,2006).

## **2.5. Aplicações Forenses dos YSTRs**

O valor do cromossomo Y nas análises forenses está relacionado com as evidências encontradas somente nos indivíduos do sexo masculino. Uma vez que a grande maioria dos crimes, particularmente os crimes de natureza sexual, envolve indivíduos do sexo masculino como perpetradores, os testes de DNA específicos para examinar a porção masculina da amostra podem tornar-se extremamente valiosos.

Misturas de fluidos corporais provenientes de diferentes indivíduos são situações frequentes na casuística forense, particularmente no que se refere aos crimes de natureza sexual. Nestes casos, muitas amostras biológicas encaminhadas ao laboratório para análise genética contêm uma mistura de células masculinas e células femininas. Assim, o processo de extração de DNA baseia-se na lise diferencial, onde é obtido separadamente a fração

espermática (FE) e a fração não espermática (FNE), composta em sua maioria, por células epiteliais (GIL et al., 1985). Rotineiramente, após a extração, procede-se a amplificação e análise destas amostras, recorrendo primeiramente aos STRs autossômicos, resultando em duas situações: 1) na obtenção de mistura de perfis (vítima + agressor), nem sempre de fácil interpretação e 2) na obtenção somente do perfil genético da vítima, sendo nesse caso, devido a quantidade de material masculino que encontra-se em pequena proporção quando comparado com a quantidade de material feminino e/ou porque nem sempre se consegue uma separação de DNA total, pode haver a perda de parte da fração masculina o que pode ser problemático, principalmente quando se trata de amostras com muito pouco DNA masculino.

Nos últimos anos foram publicados diversos estudos demonstrando a aplicabilidade e eficácia dos Y-STR nestas situações, sem que seja necessário recorrer à lise diferencial (CERRI et al., 2003; DELFIN et al., 2005; HALL et al., 2003; PARSON et al., 2003; SIBILLE et al., 2002). Estudos demonstraram também que em casos de mistura de dois ou mais contribuintes do sexo masculino, a análise com Y-STR também é eficiente, uma vez que para cada marcador analisado, cada indivíduo apresenta um único alelo (em oposição as complicadas misturas obtidas com o estudo de marcadores autossômicos) (BETZ et al., 2001; PRINZ et al.).

No entanto, há que se levar em consideração, os marcadores de STRs multicópias que, quando amplificados com um par de *primers* específico para aquele, originam mais do que um fragmento de amplificação e, conseqüentemente, levam a presença de mais do que um pico no eletroferograma. Este fato pode gerar incertezas ao se determinar o número de contribuidores do material biológico para determinada amostra, uma vez que um só par de *primers* pode produzir dois ou mais produtos de amplificação que podem ser erroneamente interpretados como pertencentes a mais de um indivíduos.

Além das análises acima citadas, os Y-STRs ainda são capazes de analisar amostras sem espermatozoides, resultantes de ejaculados de indivíduos azoospermicos ou vasectomizados, ou de situações em que não houve ejaculação. Nestes casos, o material masculino presente na amostra provém unicamente de células epiteliais resultantes do processo de descamação celular (PRINZ et al., 1997).

Portanto, pode-se dizer que a tipagem de Y-STR será especialmente útil na análise de amostras de misturas envolvendo: (1) um ou mais contribuidores de sêmen, (2) homens azoospermicos ou vasectomizados e (3) na presença de mistura de outros fluidos corporais

(ex.: saliva-pele ou pele-suor) de vítimas femininas e suspeitos de sexo masculino (BETZ et al., 2001; KAYSER et al., 1997; PRINZ et al., 1997; 2001).

Outra aplicação de Y-STR, está relacionada com a questão de investigações de paternidade de filhos do sexo masculino, bem como na identificação de restos cadavéricos através de familiares masculino (CHAKRABORTY et al., 1985; FOSTER et al., 1998; KAYSER et al., 1998; KISHIDA et al., 1996). Um estudo recente e de repercussão foi a identificação de Sadam Hussein, realizada pela comparação de um conjunto de haplótipos do cromossomo Y, entre ele e o DNA extraído dos corpos dos seus filhos mortos em combate.

Em situações em que o suposto pai faleceu ou não está disponível para análise é possível determinar o haplótipo completo do cromossomo Y analisando qualquer parente do sexo masculino, pertencente a sua linhagem paterna. Assim, o desgaste com uma eventual exumação pode ser evitada por uma análise detalhada do cromossomo Y proveniente de irmãos reconhecidos, tios ou avós paternos do suposto filho. Contudo, um resultado baseado exclusivamente nos Y-STR não exclui como pai biológico qualquer outro homem dessa mesma linhagem e a aplicabilidade destes marcadores está limitada a aproximadamente metade dos casos de investigação de paternidade, aqueles em que o descendente é do sexo masculino. (FOSTER et al., 1998)

Os Y-STR ainda são utilizados também para análise de DNA de material arqueológico, como descrito no trabalho de Schultes e colaboradores em 1999, em que foi feita a tipagem de quatro microssatélites de cromossomo Y em ossos e dentes com idade variando de 250 a 3.000 anos.

Diversos estudos reportam os marcadores Y-STR como sendo mais sensíveis do que os STR autossômicos, pois por diversas vezes, se conseguiu resultados confiáveis com Y-STR em amostras nas quais quando analisadas com kits de STR autossômicos, não haviam produzido resultados consistentes (BETZ et al., 2001; DELFIN et al., 2005; DEKAIRELLE et al., 2001; PARSON et al., 2001; Paula, 2012).

Segundo Parson e colaboradores (2001), o DNA masculino só é detectado e interpretado corretamente por meio de microssatélites autossômicos quando presente em proporção maior que 5% e em muitos casos a proporção masculina em relação a feminina é inferior a este valor. Cerri e colaboradores (2003) analisaram amostras com mistura de material feminino e masculino e também demonstraram que quando o material masculino está presente em pequena quantidade, é necessário realizar análise com Y-STR.

Portanto, a capacidade de detectar e discriminar DNA masculino, possibilita aos marcadores STRs do cromossomo Y um vantajoso acréscimo aos já bem estabelecidos STRs autossômicos.

## **2.6. Parâmetros populacionais relativos aos Y-STRs**

O estudo genético das populações humanas são de interesse não somente do ponto de vista forense, mas também do ponto de vista antropológico. Para os trabalhos com genética forense, a valorização dos resultados somente é obtida mediante cálculos estatísticos aplicados sobre o resultado das análises nas amostras de DNA e tais cálculos, só podem ser realizados, após estudos das características genéticas de uma população designada como população de referência. Como na prática, o tamanho populacional é infinito (a não ser que se trabalhe com populações muito pequenas e confinadas num determinado espaço geográfico) não sendo possível o estudo de uma população completa, esta população de referência é composta por amostras de indivíduos selecionados aleatoriamente (WEI et al., 1996).

Nesse trabalho, os estudos populacionais referidos, consistirão na caracterização dos alelos e qual a sua respectiva proporção em amostras pertencentes a indivíduos do sexo masculino e não aparentados entre si, residentes ou naturais da cidade de Manaus. No caso dos Y-STRs, devido às características de transmissão genética do cromossomo Y, será necessário caracterizar os haplótipos populacionais e a respectiva proporção populacional a partir do cálculo da frequência haplotípica, bem como de outros parâmetros estatísticos populacionais relevantes para o estudo, como segue descrito:

### **2.6.1 Determinação das frequências dos alelos e haplótipos**

A determinação das frequências dos alelos ou haplótipos, refere-se a frequência relativa de um alelo ou haplótipo em uma população. Expressa o número de vezes em que estes são observados relativamente ao número total de alelos ou haplótipos em cada região Y-STR analisada. São calculadas usando o método de contagem direta, dividindo o número de cópias de um alelo ou haplótipo na população estudada sobre o total de alelo ou haplótipo encontrados, segundo a fórmula:  $f_{ij} = n_{ij} / n_j$ , onde:

$f_{ij}$  = frequência do alelo/haplótipo  $i$  na população  $j$ ;

$n_{ij}$  = número de ocorrência do alelo/haplótipo  $i$  na população  $j$ ;

$n_j$  = número total de alelos/haplótipo encontrados na amostra da população  $j$ .

### 2.6.2 Diversidade gênica

Os estudos relacionados aos cromossomos sexuais, neste caso o cromossomo Y, devem ser acompanhados da análise da diversidade dos haplótipos e para isto é necessário calcular a medida da *Diversidade Gênica* (DG) (WEIR et al., 1996). Tal cálculo está relacionado com a probabilidade de que dois indivíduos escolhidos ao acaso em uma mesma população tenham alelos distintos para cada loco (BALDING et al., 2001; JOBLING et al., 2004). É equivalentemente à heterozigidade esperada para os STRs autossômicos, significa que quanto mais diverso (polimórfico) for o marcador analisado, mais informativo ele é (BUTLER et al., 2005; NEI et al., 2005).

A Diversidade Genética num determinado  $l$ , é dada pela seguinte expressão matemática:

$$D \text{ ou } DG = 1 - \sum (\text{frequência de cada alelo})^2$$

O somatório de todas as frequências alélicas ao quadrado representa a chance combinada para todos os alelos possíveis ( $\sum \text{Freq. Alélicas}^2$ ), para determinado locos.

### 2.6.3 Diversidade haplotípica

A diversidade haplotípica é o principal parâmetro analítico de um conjunto de Y-STRs, pelo fato de não haver recombinação no cromossomo Y e os marcadores serem transmitidos na forma de haplótipo. Trata-se da probabilidade de que dois indivíduos selecionados ao acaso possuam haplótipos distintos (NEI et al., 2005). O cálculo é idêntico ao da diversidade gênica descrito anteriormente. No entanto, usa-se a frequência haplotípica em substituição às frequências alélicas. A diversidade haplotípica foi estimada de acordo com Nei e colaboradores em 1973.



#### **2.6.4 Capacidade ou Poder de discriminação (CD)**

É a capacidade de discriminar um indivíduo do outro. É determinada dividindo o número total de haplótipos diferentes pelo número total de indivíduos analisados (PIGLIONICA et al., 2013). Este valor quanto mais próximo de “1”, maior a quantidade de haplótipos distintos, conseqüentemente, maior a capacidade de diferenciar indivíduos. Espera-se obter maior CD ao aumentar o número de Y-STRs analisados, ao utilizar Y-STRs com maior diversidade gênica ou ambos (BUTLER et al., 2005; PIGLIONICA et al., 2013).

#### **2.7 Da análise de Y-STR e bases de dados genéticos**

Como já foi dito, grande parte do cromossomo Y é transferida diretamente de pai para filho sem que haja recombinação, fazendo com que as mutações sejam a única maneira de gerar variabilidade ao longo do tempo entre indivíduos relacionados por via paterna. Assim, enquanto um resultado de “exclusão” obtido ao analisar marcadores do cromossomo Y pode ser decisivo na investigação forense, uma “concordância” entre suspeito e evidência, ou seja, um resultado de “inclusão”, apenas indica que o indivíduo em questão pode ter contribuído para a amostra, tal como podem ter feito um irmão, pai, avô, tio ou primo paternos, ou mesmo qualquer outro familiar da linha paterna, mesmo que distante nessa linhagem. Apenas em circunstâncias muito específicas é que a concordância entre dois perfis genéticos do cromossomo Y pode ser vista como inequívoca. Tal situação só é possível, quando se comparam amostras de uma população fechada como, por exemplo, a análise de vestígios de uma catástrofe em que se conhece a identidade de todos os indivíduos envolvidos (queda de um avião, entre outras). Mas, ainda assim, os Y-STRs constituem um valioso acréscimo ao conjunto de ferramentas de pesquisadores forenses e, quantos mais Y-STRs forem estudados maior será o poder de distinguir linhagens.

Uma vez que os marcadores do cromossomo Y não gozam de independência entre si e são transmitidos em bloco, não podem ser analisados do ponto de vista estatístico ou de valor probatório, da mesma forma que os STR autossômicos. Assim sendo, as frequências haplotípicas não podem ser extrapoladas a partir das frequências alélicas por simples multiplicação.

Os resultados obtidos da análise de Y-STR têm que ser combinados na forma de um haplótipo, para comparação com bases de dados de haplótipos disponíveis, para que se possa estimar a raridade de um perfil haplotípico em particular (GUSMÃO et al., 2006).

Desde o ano 2000, a maior e mais usada base de dados de haplótipos do cromossomo Y, a YHRD (Y Chromosome Haplotype Reference Database), está disponível *online*. Foi criada por Lutz Roewer e colaboradores, na Universidade de Humbolt e teve origem a partir de um trabalho Kayser e colaboradores (1997), no qual foram analisadas cerca de 4.000 amostras de indivíduos do sexo masculino, pertencentes a 48 populações diferentes. Atualmente esta base de dados conta com mais de 70.000 haplótipos depositados (YHRD database). Na YHRD é possível pesquisar haplótipos com até 16 locos: DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 e DYS385a/b (haplótipo mínimo), acrescidos dos marcadores DYS438 e DYS439 (haplótipo “expandido” recomendado pelo SWGDAM) e ainda os DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 e YGATAH4.

Apesar do tamanho da base de dados ser extremamente importante para a confiabilidade de uma estimativa da frequência de qualquer haplótipo (ROLF et al., 2001), mais importante ainda é que estas bases de dados contemplem o maior número possível de de Y-STR, uma vez que quanto mais extenso for o haplótipo, maior será a capacidade de discriminação (PASCALI et al., 1998).

Existem muitas outras bases de dados de haplótipos Y-STR com acesso *online* como, por exemplo, as das empresas ReliaGene, Promega e Applied Biosystems (Reliagene database; Promega Corporation database; Applied Biosystem database), sendo diferentes apenas quanto ao número de marcadores Y-STR e de indivíduos representados apesar de todas conterem o conjunto de recomendados pelo SWGDAM. Segundo Gusmão e colaboradores (2003), essas bases de dados não são apenas importantes para estimarem frequências haplotípicas (para subsequente cálculo de probabilidades de *matching* em estudos forenses), mas também para a análise comparativa de populações.



## CAPÍTULO I

### DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA MULTIPLEX DO TIPO MINI-YSTR

#### Resumo

Nesse trabalho foi construído um sistema multiplex YSTR denominado de Mini YSTR09 contendo nove marcadores. Seis deles (DYS442, DHS444, DHS445, DHS447, DHS448 e DHS461) do tipo miniY-STR, ainda não incluídos em sistemas comerciais, onde sequências de *primers* foram redesenhadas para obtenção de amplicons em torno de 120 a 230pb. Os outros 03 marcadores (DYS570, DHS576, DHS626) do tipo (RM)-YSTR, altamente discriminativos e caracterizados como marcadores de rápida mutação, não tiveram *primers* redesenhados, pois já amplificam fragmentos de tamanho reduzido (em torno de 160 a 270pb). Com o objetivo de investigar a eficiência do referido sistema multiplex na amplificação de amostras de casos forenses, foram realizados testes de sensibilidade, de detecção em amostras com misturas e teste em amostras de DNA degradado conforme recomendados pelo SWGDAM. Os resultados demonstraram que o multiplex foi capaz de amplificar todos os nove marcadores em até 62.5 pg de DNA masculino e quando em situações de mistura de DNA contendo dois doadores masculinos, havendo DNA na proporção de até 3x mais DNA de um doador do que do outro e também, no sistema de mistura quando foram adicionados até 200ng de DNA feminino. Nos testes com amostra de DNA degradada, de noventa e oito amostras de osso humano em que o multiplex foi testado, em sessenta e oito houve amplificação, sendo que em quarenta e oito foi total e nas outras vinte foi amplificação parcial, variando de cinco a oito marcadores. Além disso, tais amostras foram submetidas a amplificação com três kits comerciais, AmpFISTR<sup>Y</sup>filer<sup>TM</sup>, AmpFISTR<sup>Mini</sup>Filer<sup>TM</sup> e AmpFLSTR<sup>Identifiler</sup><sup>TM</sup>(ThermoFisher). Foi demonstrado aqui que o multiplex Mini YSTR09 foi capaz de amplificar amostras de DNA, que haviam sido somente amplificadas parcialmente ou que não tinham sido amplificadas com os tais kits. Portanto, este novo multiplex contribui para estudos de casos forense, aumentando o número de amplificados com Y-STRs, possibilitando um aumento do poder de discriminação desses marcadores.

*Palavras-chave:* Mini-YSTR, Multiplex, DNA degradado.

**ABSTRACT:**

In this study was developed a multiplex system denominated Mini YSTR YSTR09 containing nine markers. Six of them (DYS442, DYS444, DYS445, DYS447, DYS448 and DYS461) of type mini YSTR, yet not included in commercial systems, where sequences of primers were redesigned to produce amplicons of 120 to around 230pb. The other 03 markers (DYS570, DYS576, DYS626) of type (RM)-YSTR, highly discriminatory and characterized as rapidly changing markers, not have redesigned, primers amplify fragments of small size (around 160 to 270pb). In order to investigate the efficiency of this system multiplex additional recommended tests (SWGDM) were performed in degraded forensic DNA samples. The results showed that the multiplex was able to amplify all nine markers up to 62.5 pg of male DNA and when in situations of mixture of DNA, containing two males, with DNA at a rate of up to 3 x more DNA from a donor than the other. Also in the mix were added until 200ng of female DNA. In testing with DNA degraded sample of 98 samples of human bone in 68 there was amplification. In 48 samples has been a total amplification and in 20 twenty has been partial amplification. In addition, such samples were subjected to amplification with three commercial kits AmpFISTR<sup>Y</sup>filer<sup>TM</sup>, AmpFISTR<sup>R</sup> MiniFiler<sup>TM</sup> and AmpFLSTR<sup>R</sup> Identifier<sup>TM</sup>(ThermoFisher). The 9948 DNA sample was used for the multiplex system optimization tests It was apparent that the Mini YSTR09 amplified samples that, when tested with commercial kits, were only partially or not amplified at all. Therefore, this new multiplex can contribute to studies of forensic cases, increasing the number of locos amplified for the Y chromosome, thus increasing the power of discrimination of Y-STRs.

*Keywords:* Mini-YSTR, Multiplex, Degraded DNA

## 1. INTRODUÇÃO

Os YSTR, marcadores moleculares de microssatélites para o cromossomo Y, são utilizados com frequência para identificar indivíduos do sexo masculino em estudos de casos forenses de: crimes sexuais, onde ocorre mistura de material genético feminino e masculino; de testes de paternidade na ausência do pai; de identificação de restos mortais (CERRI et al., 2003; JOBLING et al., 1997; KAYSER et al., 1997; SIBILE et al., 2002). Porém, para análise de DNA onde tais moléculas encontram-se degradadas e/ou com contaminantes do meio ambiente ou ainda em menor quantidade (no caso de mistura de material genético feminino e masculino), sua eficiência pode ser reduzida. Como alternativa para tentar recuperar o máximo de informação possível em amostras degradadas é sugerido o uso de marcadores do tipo mini STR, os quais apresentam o tamanho dos fragmentos de amplificação reduzidos, devido à utilização de iniciadores (*primers*) que se ligam o mais próximo possível da zona de repetição (WIEGAND et al., 2001). Vários estudos vêm demonstrando a eficiência desses marcadores de cromossomos autossômicos e de cromossomo Y em diferentes aplicações (ASAMURA et al., 2006, 2008; PARK et al., 2007). Por esse motivo, nós desenvolvemos neste trabalho um multiplex denominado de Mini YSTR09, reunindo nove marcadores de mini YSTR. Seis deles (DYS442, DYS444, DYS445, DYS447, DYS448 e DYS461) foram selecionados por apresentarem um elevado poder de discriminação nas populações em que foram estudados e por terem uma grande aplicabilidade em estudos forenses [10-13]. Suas sequências de *primers* foram redesenhadas (novos primers) visando a obtenção de amplicons em torno de 120 a 230pb. Os outros três marcadores (DYS570, DYS576 e DYS626) altamente discriminativos e caracterizados como marcadores do cromossomo Y de rápida mutação (RM) Y-STR, não tiveram *primers* redesenhados, pois já amplificam fragmentos de tamanho reduzido (em torno de 160 a 280pb) e estão presentes também nos Kits comerciais Powerplex®Y23 System da *Promega* e o YFiler®plus™ da *ThermoFisher*, [14-15]. (KAYSER et al., 2012). O sistema multiplex construído foi denominado de Mini YSTR09 e é um sistema formado por quatro cores. Os mini-YSTR DYS444, DYS461, assim como os DYS576, DYS626 são os que fluorescem na cor azul, (fluoróforo 6-FAM). Os mini-YSTR DYS442 e DYS448 na cor vermelha (fluoróforo PET). O mini-YSTR DYS445 na cor verde (fluoróforo VIC) e o mini-YSTR DYS447 e o DYS570 na cor amarela (fluoróforo NED). As condições de amplificação do multiplex construído foram otimizadas com amplificações de amostras de DNA de sangue humano e amostras de DNA padrão. Testes recomendados pelo SWGDAM, como os de sensibilidade, de mistura e testes em amostras de casos forense, foram realizados para verificar a eficácia do sistema. Além de testes, foi realizado também, testes comparativos de amplificação do Mini YSTR09 com outros três kits

comerciais **MiniFiler™**; AmpFLSTR®**Identifiler™** e AmpFISTR®**Yfiler™** . As amostras de osso humano foram as escolhidas para todos os testes, tendo em vista que tais amostras podem apresentar substâncias contaminantes, além de não apresentarem bom estado de conservação. Com o uso desse sistema multiplex temos a perspectiva de gerar um produto que possibilite a análise com qualidade de marcadores YSTR a partir de amostras forense com DNA degradado ou em quantidades mínimas. O objetivo geral desse trabalho foi desenvolver um sistema multiplex do tipo mini-STR de regiões do cromossoma Y (MiniY-STR) para a investigação de amostras forenses com DNA degradado e os objetivos específicos foram: sintetizar novos *primers* de MiniY-STR, para que origemem fragmentos de amplificação com tamanho de até 230pb; marcar os *primers* por fluorescência; otimizar as condições de amplificação e genotipagem para o multiplex; construir os sistemas multiplex; validar o sistema multiplex realizando testes de sensibilidade, de mistura e testes em amostras de DNA degradada e estimar a eficiência desses marcadores na prática forense.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS:**

### **2.1 Amostras biológicas**

Três amostras masculinas na concentração de 5ng/uL, do banco de DNAs do Laboratório de Diagnóstico por DNA da UERJ, foram escolhidas aleatoriamente. Essas amostras aqui denominadas de H1, H2 e H3 foram utilizadas para os testes de sensibilidade e de mistura. Duas amostras de DNA controle foram também utilizadas. A amostra masculina 2800, denominada aqui de H4 e a feminina K562, denominada de M1 ambas pertencentes a Promega. Para o teste em amostras de casos forense, foram utilizadas 98 amostras de DNA de osso humano, provenientes da base de dados de exames de identificação civis, criminais e de vínculo genético do Laboratório de Diagnóstico por DNA da UERJ.

### **2.2 Construção dos de MiniY-STR**

#### **2.2.1 Seleção dos de Y-STR**

Primeiramente foi realizada a escolha dos de Y-STR, a qual foi baseada em marcadores já conhecidos e descritos na literatura. Tais marcadores apresentaram alto índice de diversidade genética nas populações em que eles foram estudadas, bem como uma grande aplicabilidade em estudos de investigações forenses. Portanto, são reconhecidos como de grande importância para a construção de um multiplex para análise de identificação humana por DNA.

Todos os seis escolhidos, estão localizados na porção Yq (braço longo do cromossomo) como demonstra a Figura 01 a seguir:



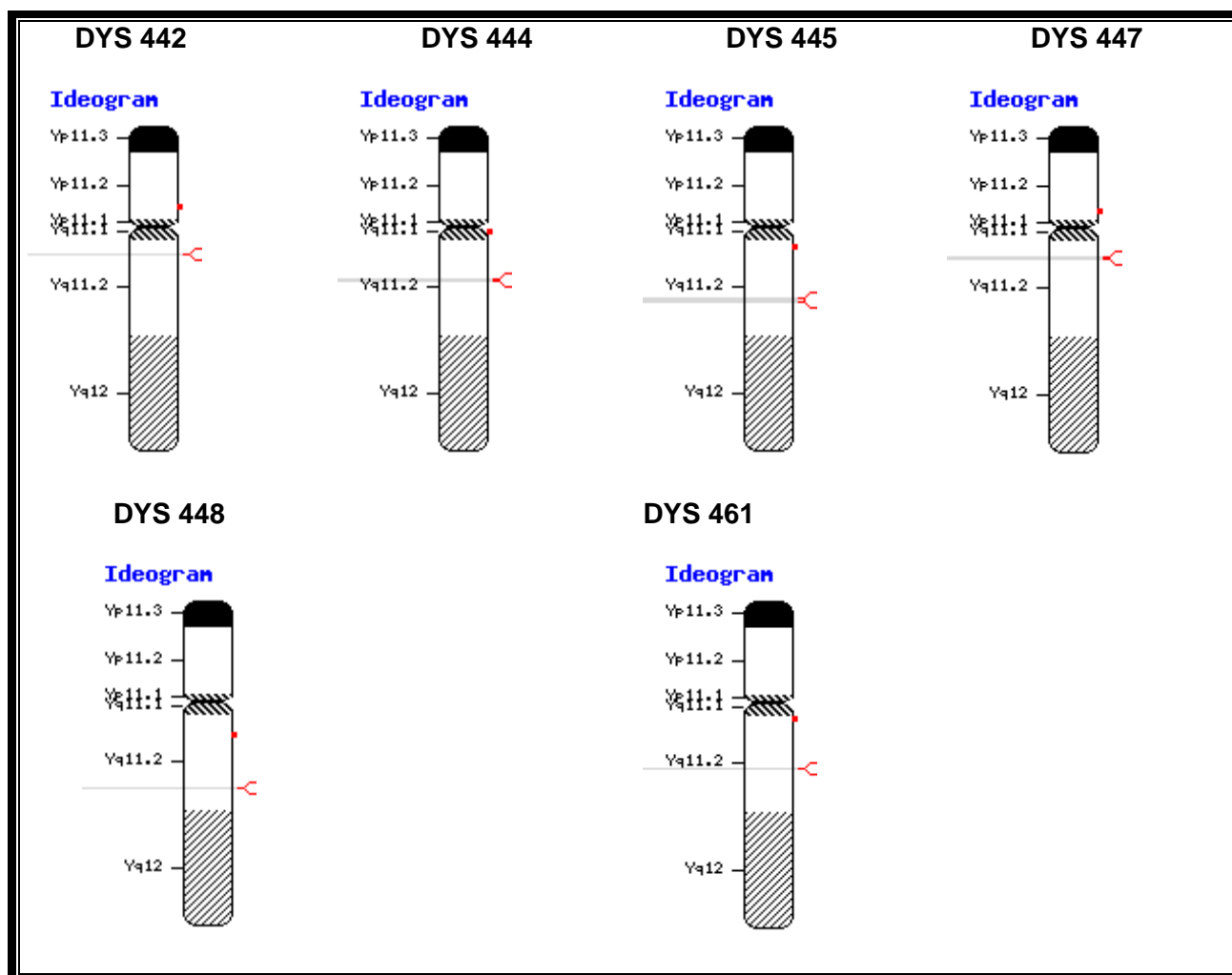


Figura 01. Ideograma dos marcadores YSTR no cromossomo Y. A linha horizontal de coloração cinza sobre cada um, indica a região em que está localizada o YSTR selecionado. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2011.

### 2.2.2 Desenho dos iniciadores (“primers”)

A partir da escolha dos Y-STR acima demonstrados, foram construídos novos iniciadores, os quais se ligam o mais próximo da zona de repetição de microsatélite, a fim de se obter marcadores do tipo miniY-STR. Para gerar *amplicons* em torno de 120 a 230 pb, os novos *primers* foram desenhados usando o programa Primer 3 v.4.0, baseado nos seguintes parâmetros: (1) Tamanho de primers, variando de 17 a 27 nucleotídeos, sendo 20 o tamanho ideal; (2) T<sub>m</sub>, variando de 57° a 63°C, sendo 60°C a temperatura ideal; (3) porcentagem de

bases GC%, variando de 20 a 80%. A possibilidade de formação de estruturas secundárias ou *dimers* entre os iniciadores, foi testada usando o programa Autodimer (VALONE et al., 2004). Os primers *forward* foram marcados com fluoróforos. Essas e outras informações seguem descritas na Tabela 01.

Ao conjunto de seis de MiniY-STR, foi adicionado também os três do tipo (RM)-YSTR, os quais já amplificam fragmentos de tamanho reduzido, variando de 160 até 280pb. Tais marcadores e suas características, seguem demonstradas na Tabela 2.

Tabela 1: Características dos Mini- YSTR utilizados neste trabalho

Mini YSTR09	Repetição	Tamanho do produto de amplificação (pb) *	Tamanho reduzido do produto de amplificação (pb) **	Fluoróforo	Sequência dos primers 5'-3' do presente trabalho
DYS442	(TATC) <sub>x</sub> (TGTC) <sub>3</sub>	305 <sup>(1)</sup>	201	PET	F: caatctcatccaagccactg R: cataattgcaaaatcacggaacc
DYS444	(TAGA) <sub>x</sub>	308 <sup>(1)</sup>	127	6-FAM	F: gcaatagatataggtaggtgaag R: Ctcacgtgttcaagggtca
DYS445	(TTTA) <sub>x</sub>	264 <sup>(1)</sup>	195	VIC	F:gcaactgggtagtggg R:cagggagctgagattatgcc
DYS447	(TAATA) <sub>x</sub> (TAAAA) <sub>1</sub>	211 <sup>(3)</sup>	199	NED	F: gcttggtttatacatatttaggg R: ggcttgcttgcgttatctc
DYS448	(AGAGAT) <sub>x</sub> N <sub>x</sub>	294 <sup>(2)</sup>	232	PET	F: gagatcgcgagacagaaagg R: ggccggtctggaatttatc
DYS461	(TAGA) <sub>x</sub> N <sub>x</sub>	224 <sup>(3)</sup>	160	6-FAM	F: ggatagatgatatggatagacag R:ccagtagtgatgctgtgt

\*Tamanho dos produtos de amplificação, conforme citados na literatura: (1) IIDA et al., 2001,(2) REDD .et al., 2002 , (3) GUSMAO et al.,2002;(4) Kayser M. et al., 2012.

\*\*Tamanho dos produtos de amplificação obtidos com primers redesenhados no presente trabalho.

Tabela 2: Características dos RM- YSTR utilizados neste trabalho

RM-YSTR	Repetição	Prod. de amplificação(pb)	Tamanho Reduzido(pb)*	Fluoróforo	Sequência dos primers 5'-3' ( seq. utilizadas em trab. anteriores)
DYS570	(TTTC) <sub>14-24</sub>	(246-286) <sup>(4)</sup>	-	NED	F: gaactgtctacaatggctcacg R: tgtctggttctgactatgctga
DYS576	(AAAG) <sub>13-22</sub>	(170-210) <sup>(4)</sup>	-	6-FAM	F: gttgggctgaggagtcaatc R: ctccaggaaatgagactgcc
DYS626	(GAAA) <sub>14-23</sub> N <sub>24</sub> (GAAA) <sub>3</sub> N <sub>6</sub> (GAAA) <sub>5</sub> (AAA) <sub>1</sub>	(221-269) <sup>(4)</sup>	-	6-FAM	F: gcaagaccccatagcaaaag R:aaactgtccaaaattcttctt

## 2.3 Amplificação através da reação em cadeia da polimerase- PCR

### 2.3.1 Para o MiniY-STR em sistemas monoplex (teste de eficiência dos novos primers).

Uma reação de amplificação monoplex, com *primers* marcados com fluorescência foi realizada para os marcadores DYS442, DYS444, DYS445, DYS447, DYS448, DYS461. Para a reação a um volume final de 10uL, foi utilizado: 5uL do tampão Qiagen multiplex PCR master mix 2x, 1uL de DNA (2ng/uL), 2uL de água e *primer* mix MiniYSTR 09 a 10pmol/uL. As condições termocíclicas utilizadas no termociclador Veriti (ThermoFisher) estão representada listada na Tabela 3 a seguir: (Não foi necessário realizar o teste com a PCR monoplex para os RM-YSTR, tendo em vista que já foram utilizados com sucesso em trabalhos anteriores.

Temperatura	Tempo	Referência
1. 95°C	15 min	
2. 94°C	01 min	30 ciclos      AmpFISTR Y Filer User's Manual
3. 62°C	02min	
4. 72°C	01min	

---

**Tabela 3.** Definições das condições da PCR para os marcadores Mini Y-STR monoplex.

6.	10°C	For ever
----	------	----------

---

### 2.3.2 Para o sistema multiplex Mini-YSTR, Mini YSTR09

Após a amplificação monoplex, foi realizada a amplificação do sistema multiplex. Para tanto, a reação no volume final de 10uL, continha: 5uL do tampão Qiagen multiplex PCR master mix 2x; 1uL de *primer* mix a 5pmol/uL; 1uL de DNA (2ng/uL) e água. As condições termocíclicas utilizadas no termociclador Veriti (ThermoFisher) foram as mesmas citadas na Tabela 3 do item anterior (2.3.1).

### 2.4 Teste de temperatura de anelamento dos *primers*

O sistema multiplex MiniYSTR 09 foi desenvolvido com a temperatura ótima de anelamento de 62°C, (Tabela 3). Porém, testes adicionais com a amostra de DNA 9948, variando a temperatura de 60°C a 65°C foram realizados, a fim de avaliar a amplificação de cada marcador deste multiplex. Para o teste utilizando o termociclador Veriti (ThermoFisher) foi realizada uma única reação de PCR, nas condições a seguir:

**Tabela 4.** Definições das condições da PCR para teste de temperatura de anelamento.

Temperatura	Tempo	Referência
1. 95°C	15 min (step 1/stage 1)	
2. 94°C	30 seg <u>05 ciclos</u> (step1/stage2)	
3. 65 <sup>Δ</sup> C	30seg <sup>Δ</sup> (step 2)	Thermo Veriti User's Manual
4. 72°C	01min (step 3)	
5. 94°C	30seg <u>30 ciclos</u> (step1 /stage 3)	
6. 60°C	30seg (step 2)	
7. 72°C	01min (step 3)	
8. 60°C	45min	
9. 15°C	For ever	

---

## **2.5 Preparação das Amostras (produtos da PCR) e detecção por eletroforese capilar**

Para a separação dos produtos da PCR, alíquotas de 1uL foram adicionadas a mistura contendo 8,8uL do desnaturante formamida (Hi-Di Formamide, ThermoFisher) e 0,2uL de LIZ 500 Size Standard (ThermoFisher). Em seguida, as amostras foram desnaturadas por 3min<sup>o</sup>/95°C e 3 min em banho de gelo. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese capilar, no sequenciador automático de DNA ABI PRISM<sup>®</sup> 3500 (ThermoFisher) e utilizando-se de polímero POP-7 em capilar de 50cm, por 3Kv/ 5s.

### **2.5.1 Análise dos Produtos da PCR**

Para análise dos fragmentos e tipagem dos alelos, foi utilizado o programa *GeneMapper v. 4.01* (ThermoFisher). O tamanho dos fragmentos considerados foram os que apresentavam-se com RFU a partir de 100.

## **2.6 Construção dos Bins**

Os bins do sistema Multiplex Mini YSTR09, foram desenvolvidos para a genotipagem automática dos alelos no programa *GeneMapper*. Foram desenvolvidos contendo informações referentes a cada Y-STR, suas respectivas faixas de alelos e tamanho em pares de bases. Tais informações foram primeiramente determinadas utilizando-se a amostra de DNA controle 9948. Um valor médio foi calculado para cada alelo, com um desvio padrão de 0,5. Arquivos em formato de bloco de notas foram criados contendo informações dos bins referente a cada alelo, seus respectivos tamanhos em pb, fluoróforo e unidades de repetição (tetra ou pentanucleotídicas). Por fim, os arquivos foram importados para o programa *GeneMapper*, para o processamento das análises.

## **2.7 Etapas de validação**

### **2.7.1 Teste de sensibilidade**

Este teste de sensibilidade objetivou a análise da quantidade mínima de DNA necessária para a amplificação e tipagem dos alelos referentes aos nove de mini -YSTR e do multiplex

Mini-YSTR09. Para a determinação de tais parâmetros, foram utilizadas quatro amostras de DNA, já descritas no item 2.1. Três amostras de DNA masculino (H1, H2 e H3) na concentração estoque de 5ng/uL e uma amostra (controle positivo) do Kit Powerplex<sup>®</sup>Y23 System da *Promega* (H4) na concentração estoque de 2ng/uL. O teste foi realizado em triplicata, em seis sistemas que variavam a quantidade de DNA em: 1ng, 500pg, 250pg, 125pg, 62.5pg e 31.25pg. As reações de PCR foram realizadas nas mesmas condições descritas no subitem 3.3.1.

### **2.7.2 Teste de Mistura**

O teste de mistura foi realizado utilizando-se três amostras masculinas (H1, H2 e H3) das quatro amostras citadas no subitem 3.2.1 e uma (M1) amostra feminina. As reações de PCR foram realizadas nas mesmas condições descritas no subitem 3.3.1 e tais testes foram subdivididos em dois sistemas, descritos a seguir:

✓ **Sistema I: Mistura homem/homem**

Somente mistura de DNA masculino, para determinar em que fração ficaria evidenciado a presença de de ambas as amostras de DNA. Foi realizada em dois sistemas: H1/H2 e H2/H3, na concentração final no sistema de 500pg/uL e foram testadas nas seguintes diluições: 19:1; 9:1; 3:1; 1:1; 1:3; 1:9; 1:19.

✓ **Sistema II: Mistura Homem/mulher**

Mistura de DNA masculino com DNA feminino, para determinar a influência do DNA feminino na amplificação de amostras masculinas. A amostra masculina foi a H4 e a feminina a M1. Esse sistema foi subdividido em duas etapas. A etapa I apresentava-se com mistura de DNA masculino, com concentração final fixa de 500pg/uL, na presença de DNA feminino, variando nas diluições de: 400ng, 200ng, 100ng, 50ng e 10ng. A etapa II apresentava-se com mistura de DNA feminino com concentração fixa de 400ng/uL, na presença de DNA masculino, que variava nas diluições de: 500pg, 250pg, 125pg, 62.5pg e 31.25pg.

### **2.7.3 Teste em amostras de DNA degradado**

Para o teste em amostras de DNA masculino, previamente extraídas de restos mortais (osso humano), foram selecionadas 98 amostras de DNA do Laboratório de Diagnóstico por DNA da UERJ, as quais foram amplificadas por PCR com três sistemas de amplificação: No sistema multiplex Mini YSTR09, desenvolvido neste trabalho e com os dois kits comerciais, o AmpFISTR®MiniFiler™ e AmpFLSTR® Identifiler™ da ThermoFisher. Além disso, oito dessas amostras também foram testadas como kit comercial, AmpFISTR®Yfiler™, da ThermoFisher. As reações de amplificação foram realizadas nas mesmas condições descritas no subitem 3.3.1, com exceção do volume e da concentração da amostra de DNA passou a ser de 4uL e 200-500pg/ul, respectivamente.

### 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Desenvolvimento do sistema multiplex

##### 3.1.1 Desenho dos *primers*, amplificação do monoplex e multiplex e eletroforese capilar

Os 06 *primers* redesenhados estão dispersos no cromossomo Y. O DYS442 está localizado no Yq11.1; o DYS444 no Yq11.21; o DYS445 no Yq11.22; o DYS447 no Yq11.111; o DYS448 no Yq11.222 e o DYS461 no Yq11.22. Para gerar *amplicons* de tamanho reduzido, as regiões 3' tanto do *primer* "forward" quanto do "reverse" dos marcadores DYS442, DYS445 e DYS461 ficaram distante da região de repetição entre 28 a 60 bases de DNA, enquanto que para os DYS444, DYS445 e DYS447 ficaram distantes entre 5 a 28 bases.

Para a análise do monoplex, a amplificação utilizando a temperatura de anelamento de 62°C, foi adequada para a amplificação de todos os seis marcadores. A análise dos eletroferogramas apresentou a leitura dos com a altura dos picos variando de 24.000 a 33.000 RFU. Picos "stutters" e alguns de artefatos foram encontrados. (Figura 2 e 3).

Para a análise do multiplex, o resultado da amplificação utilizando a amostra de DNA controle 9948, com a temperatura de anelamento de 62°C foi adequada para a amplificação de todos os nove marcadores. A análise dos eletroferogramas apresentou a leitura dos com a altura dos picos variando de 2.400 a 3.300 RFU. Picos "stutters" e alguns de artefatos, também foram encontrados. Apresentavam-se com a base mais larga, variando de 50 a 100 RFU, mas não interferiram na tipagem dos alelos. (Figura 4). Os RM-YSTRs não foram testados nesses sistemas de amplificação, tendo em vista que já foram padronizados em trabalhos já descritos na literatura.

Na Figura 5 é demonstrado um eletroferograma relativo à amplificação de 2ng de DNA de uma amostra de osso humano. Os *bins* desenvolvidos para o sistema Mini YSTR09 (ver item 2.6), referentes ao alelos de cada do multiplex, são representados pelas barras verticais na cor cinza.



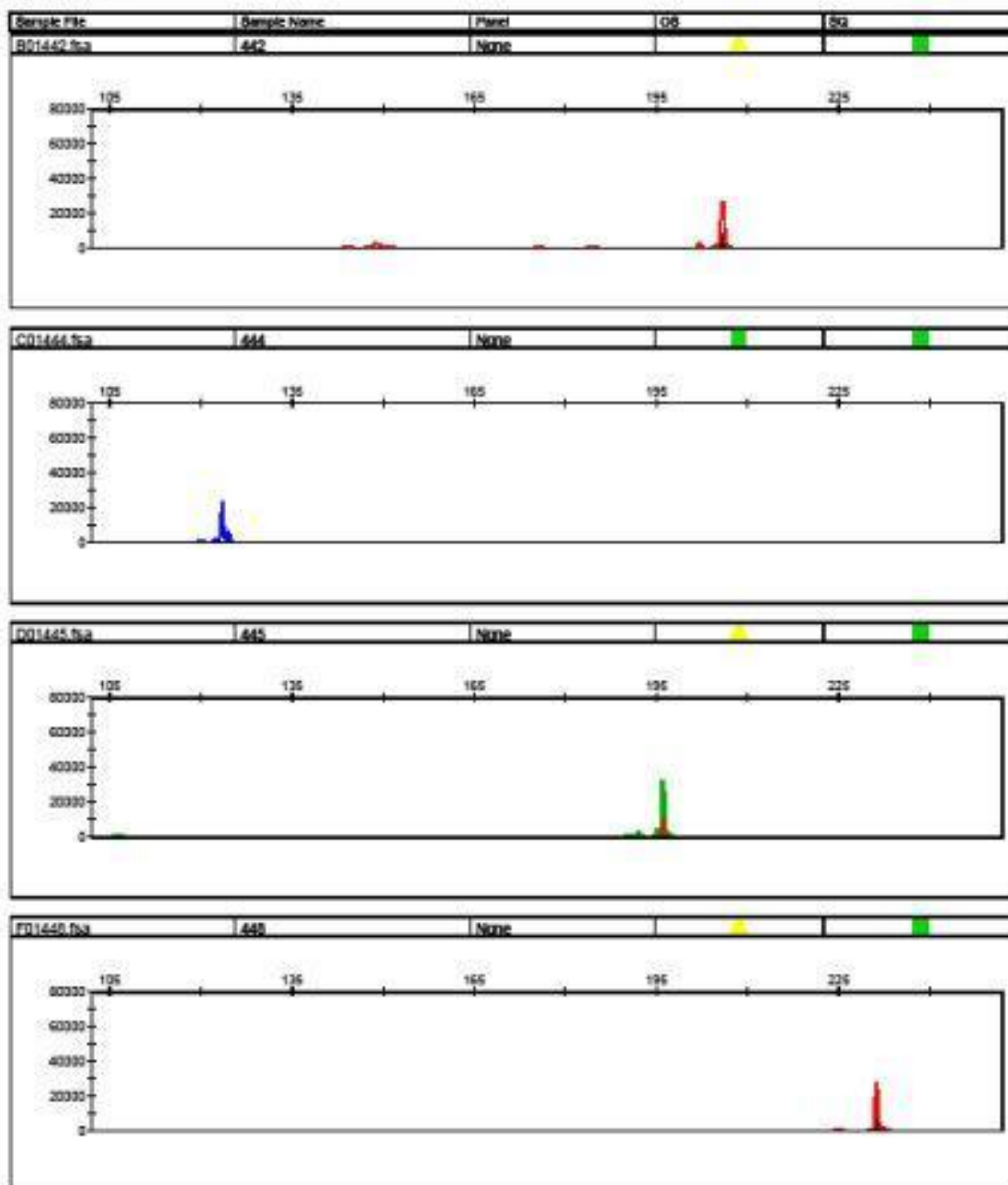


Figura 2. Eletroferograma dos marcadores DYS442 em vermelho, DYS444 em azul, DYS445 em verde e DYS448 em vermelho. A escala na lateral esquerda da figura demonstra a RFU referente ao marcador analisado.

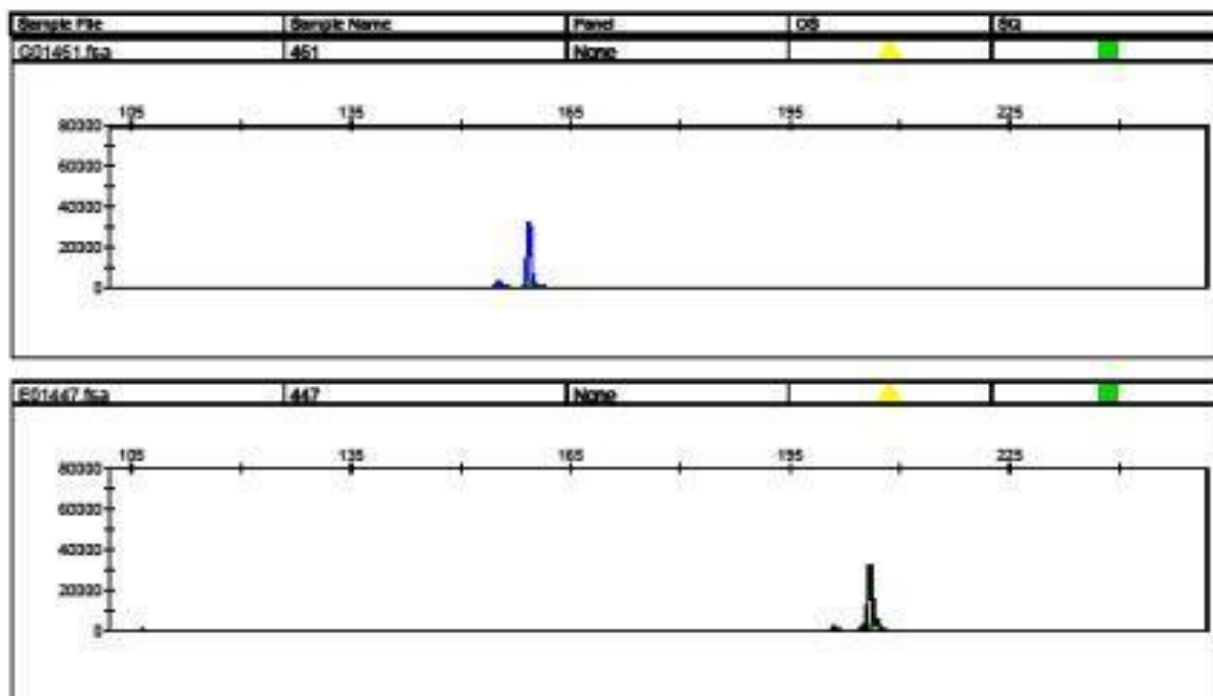
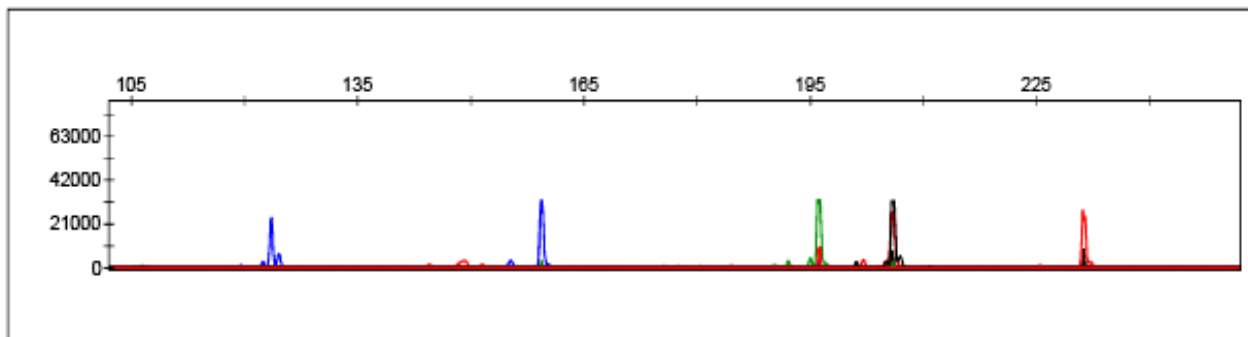


Figura 3. Continuação do eletroferograma dos marcadores DYS461 em azul e 447 em preto. A escala na lateral esquerda da figura demonstra a RFU referente ao marcador analisado.



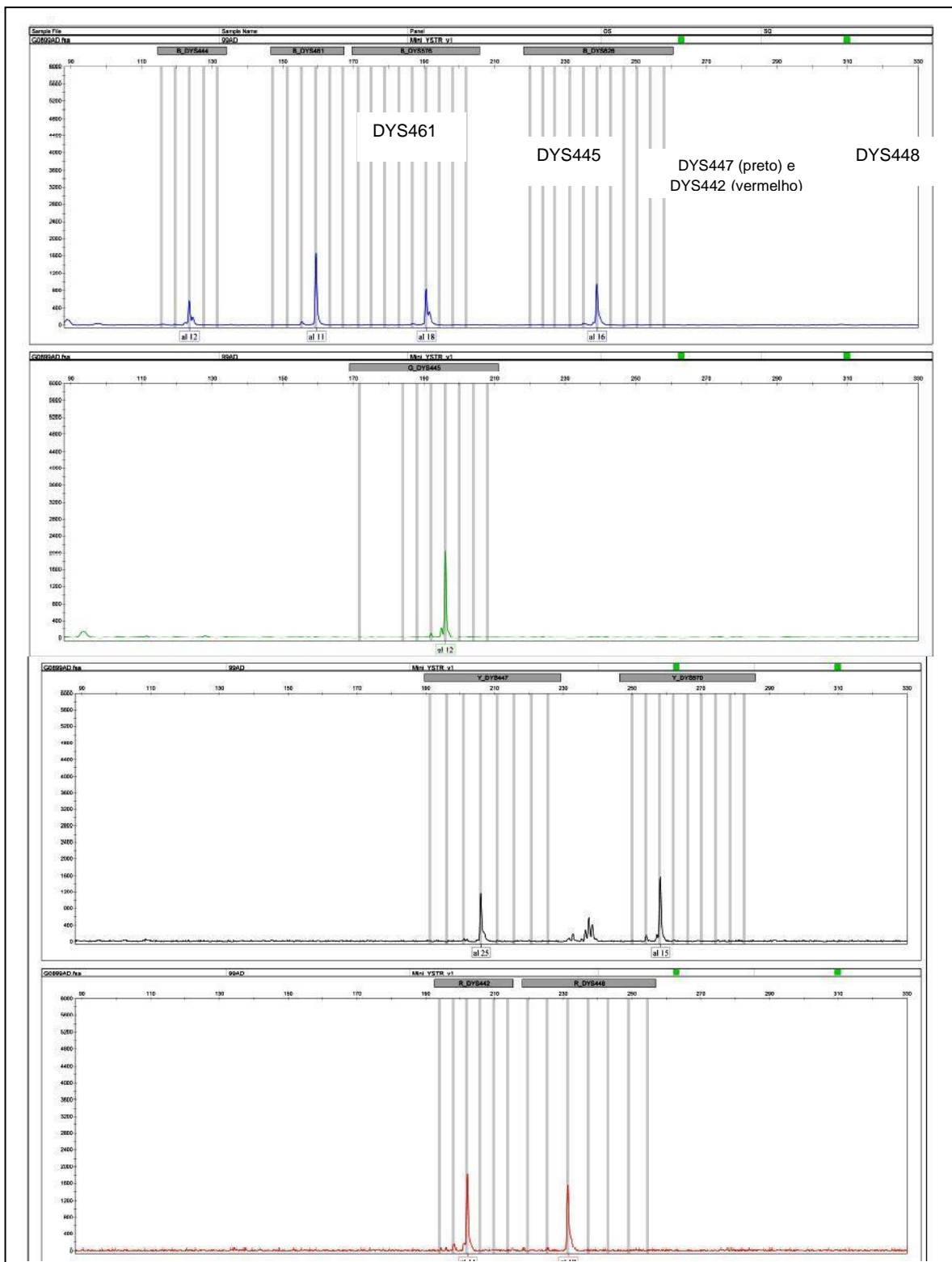


Figura 5. Eletroferograma de uma amostra de DNA degradado (osso humano) amplificada com o multiplex MiniYSTR09.

### **3.1.2 Desenho dos primers e análise do Multiplex MiniYSTR09**

O sistema multiplex MiniYSTR 09 foi desenvolvido com a temperatura ótima de anelamento 62°C. Porém, testes adicionais com a amostra de DNA 9948, variando a temperatura de 60° a 65°C, demonstraram que houve amplificação dos nove marcadores até a temperatura de 64°C. Entretanto, tais variações de temperatura não são recomendáveis, tendo em vista que nas temperaturas acima de 62°C as amplificações apresentaram alterações entre a altura dos picos, conforme análise pelo eletroferograma. Em 62°C a menor altura detectada foi de 6.000 RFU e a maior foi de 18.000 RFU, enquanto que com 64 °C, a menor foi de 2.000 e a maior foi de 10.000. Em 65°C, ainda houve amplificação de oito dos nove marcadores, variando de 2.000 a 10.000 RFU. O único marcador que não amplificou foi o DYS 444.

### **3.1.3 Estratégias de validação**

#### **3.1.3.1 Teste de sensibilidade**

Os testes demonstraram que houve amplificação total, ou seja, em todos os nove locos do multiplex MiniYSTR 09 nas variações de 1ng a 0,062ng para as quatro amostras de DNA masculino (H1 a H4) analisadas (Figura 6). Resultados estes similares aos obtidos em trabalhos já descritos na literatura (Asamura et al., 2006; Butler et al., 2002; Decorte et al., 2008; Park et al., 2007). A análise dos eletroferogramas, considerando como altura mínima dos picos 100 RFU, demonstrou que a altura dos picos excedia 2000 RFU para todas as amostras em até 62.5pg de DNA. Em 31.25pg de DNA, foi obtida amplificação parcial, variando de 07 a 08 (77,8% a 88,9%) amplificados, dependendo da amostra analisada.

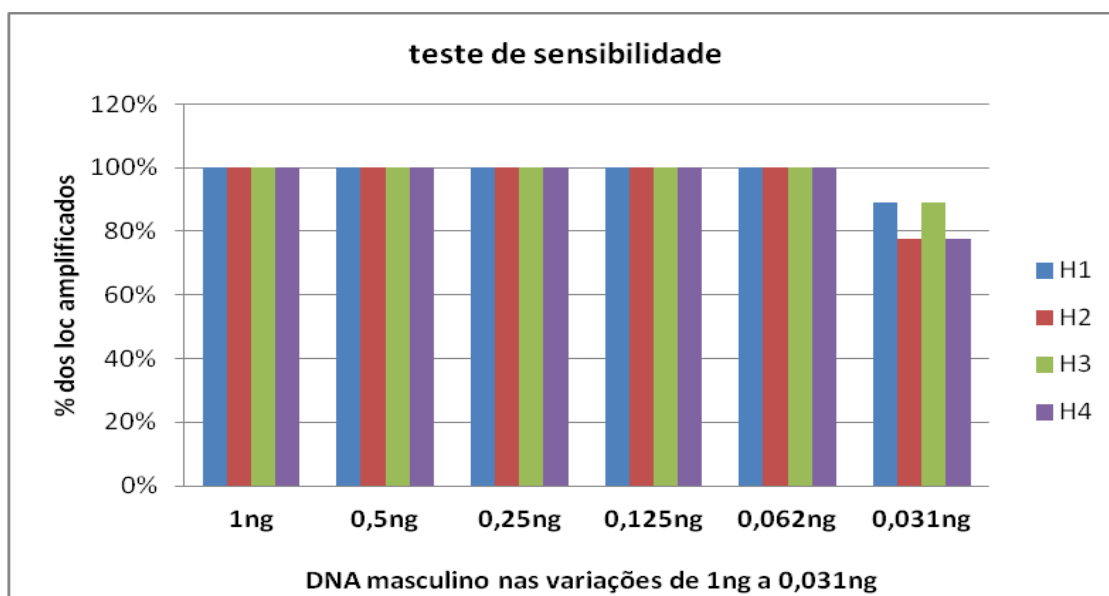


Figura 6. O Gráfico demonstra em porcentagem a amplificação total dos 09 loci do multiplex Mini YSTR09, para as quatro amostras analisadas, com exceção do valor de 0,031ng, o qual não houve amplificação desses loci para todas as quatro amostras.

Os nove marcadores *DYS444*, *DYS442*, *DYS445*, *DYS447*, *DYS448* e *DYS461*, *DYS570*, *DYS576* e *DYS626* (sendo que os seis primeiros tiveram as sequências de *primers* redesenhadas neste trabalho), foram amplificados em todas as amostras, nas diluições de 1 a 0,062ng de DNA. Porém, na menor diluição que é a de 0,031 ng (ou 31,25 pg) de DNA, houve amplificação de oito marcadores nas amostras H1 e H3 e de sete marcadores nas amostras H2 e H4. Portanto, com o limite de detecção variando de 1 a 0,062ng de DNA, tais resultados apresentaram-se eficientes e satisfatórios, quando comparados àqueles obtidos na amplificação de amostras de DNA forense com kits de multiplex comerciais disponíveis no mercado (contendo STRs e ou X-STRs e Y-STRs).

Para que ocorra a amplificação total dos locos nas amostras com 0,031ng de DNA, testes adicionais podem ser realizados aumentando o número de ciclos da PCR para até 32 ciclos (ASAMURA et al., 2008).

### 3.1.3.2 Teste de mistura

Misturas de DNA estão presentes na maioria das amostras de casos forenses. A presença de múltiplos alelos em vários locos- monoclonais de Y-STR, indica a presença de mistura e o número de contribuintes é determinado pelo máximo de número de alelos

encontrados em um ou mais desses monoclonais. (BALLANTYNE e MAYNTZ-PRESS et al., 2007). Contudo, as misturas encontradas em amostras forenses não consistem exclusivamente de misturas na proporção 1:1 e é importante que seja determinado em que menor proporção um dos contribuintes da mistura pode ser detectado. Portanto, para a verificação da eficiência do Mini YSTR09 em discriminar perfis genéticos em misturas formadas por diferentes proporções de DNA masculino e/ou de DNA masculino e feminino, os testes abaixo foram realizados. Para as misturas Homem/Homem e Homem/Mulher, houve amplificação dos em todas as diluições, sejam elas totais e parciais, como segue descrito abaixo:

✓ **Mistura Homem/Homem:**

O resultado do teste para os dois sistemas **H1:H2** e **H2:H3**, demonstrou que houve amplificação total dos nove marcadores do Mini YSTR09 nas diluições em que as taxas dos contribuintes estavam em proporções iguais, ou seja 1:1 ou quando apresentavam-se na proporção de três vezes mais um do que o outro contribuinte (3:1 e 1:3). Para as outras diluições, em que no sistema de mistura havia nove vezes ou dezenove vezes mais um contribuinte do que outro, o de maior concentração apresentava amplificação total, enquanto o outro apresentava-se com amplificação parcial. Portanto, nas diluições 19:1 e 9:1 e em 1:9 e 1:19, a amplificação parcial foi de quatro locos para o sistema H1:H2 e de dois para o sistema H2:H3. A Figura 7 demonstra o percentual médio da amplificação do multiplex nos dois sistemas e em cada diluição testada. A média de locos mínimo amplificado em cada um variou de 5,5 a 6,5. A análise individual dos marcadores demonstrou que os que amplificaram em todas as diluições (totais e/ou parciais) foram os marcadores: DYS445, DYS442, DYS444 e DYS576, sendo que os três primeiros tiveram as sequências de *primers* redesenhadas neste trabalho.

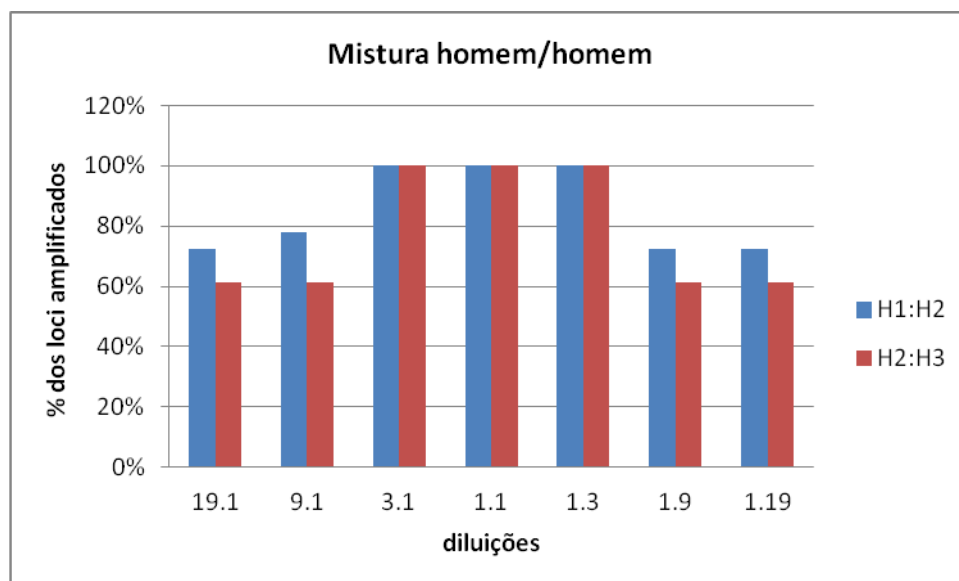


Figura 7. Gráfico do perfil de mistura homem/homem, nas concentrações relativas de 19:1 a 1:19. As barras verticais referem-se às médias (em porcentagem) dos locos amplificados entre as amostras da mistura, H1:H2 em azul e H2:H3 em vermelho.

✓ **Mistura homem/mulher:** Foi realizada em dois sistemas. No sistema I, com DNA masculino constante em 500pg/uL, houve a amplificação total dos 09 marcadores, quando no sistema a presença de DNA feminino era de 10 a 200ng. Quando no sistema havia 400ng de DNA feminino, foi obtida apenas amplificação parcial, dos quatro marcadores, *DYS442*, *DYS448*, *DYS570* e *DYS576*, sendo que os dois primeiros tiveram suas sequências de *primers* redesenhadas neste trabalho (Figura 8).

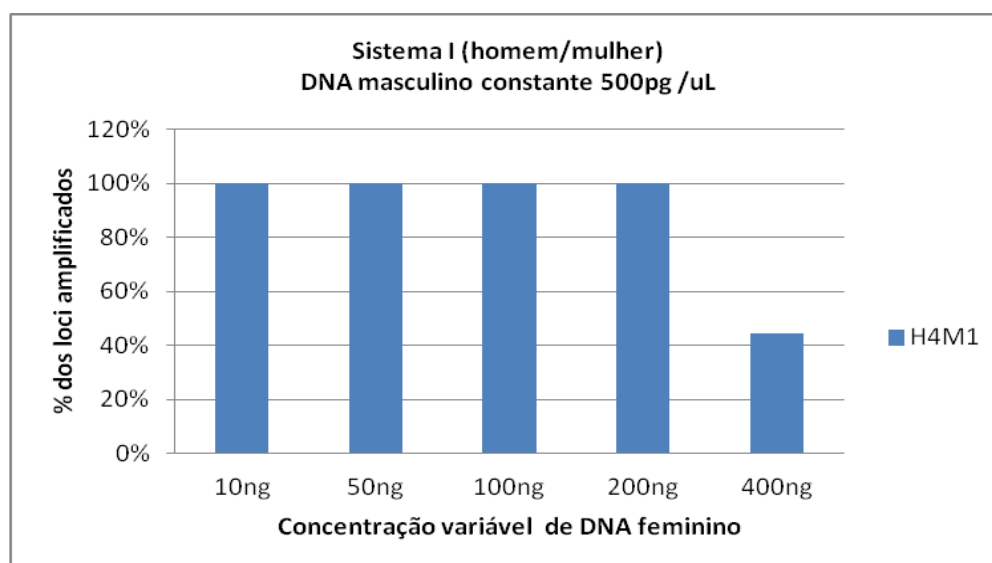


Figura 8. O gráfico demonstra a amplificação total dos 09 locus do multiplex, quando no sistema existe de 10 a 200ng de DNA feminino. Em 400ng de DNA feminino, a amplificação torna-se parcial.

No sistema II, com DNA feminino constante em 400ng e DNA masculino variando de 31,25pg a 500pg, não foi obtido amplificação total dos 09 marcadores. Houve somente amplificação parcial, de: 01 marcador (11,1%) em 31.25pg e 62,2pg; de 04 marcadores (44,4%) em 125pg; de 06 marcadores (66,7%) em 250pg e de 08 marcadores (88,9%) em 500pg (Figura 9). Os marcadores que foram amplificados em até 125pg de DNA masculino foram os marcadores DYS442, DYS448, DYS570, DYS576, sendo os dois primeiros com sequências de *primers* redesenhadas neste trabalho. Portanto, para essas amostras testadas, fica comprometida a detecção do DNA masculino nas concentrações de 31,25pg até 250pg, quando se tem no sistema 400ng de DNA.

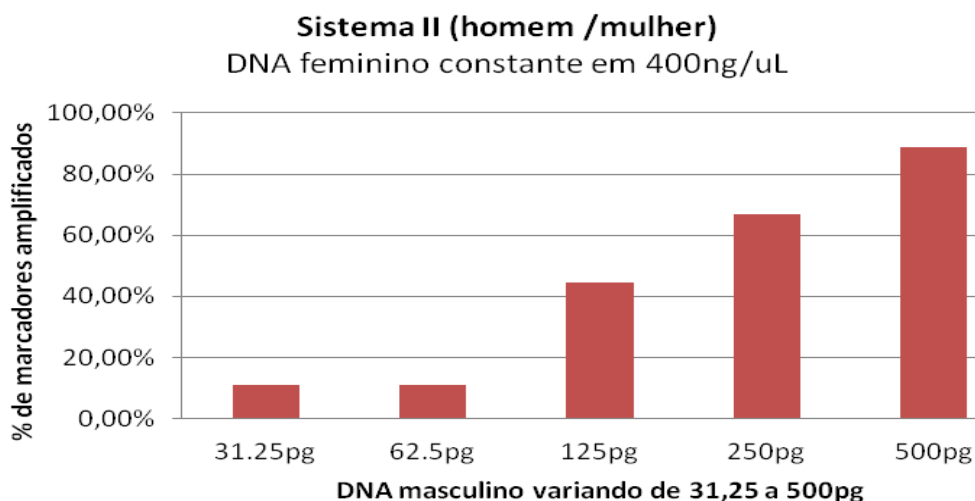


Figura 9. O gráfico demonstra a amplificação de DNA masculino quando na presença de DNA feminino em 400ng.

### 3.1.4 Teste em amostras biológicas

As noventa e oito amostras de DNA de osso humano foram amplificadas com o multiplex Mini YSTR09. Os resultados das tipagens dos alelos foram eficientes e satisfatórios, demonstrando que oitenta e oito amostras foram amplificadas, sendo trinta e nove amplificações totais e quarenta e nove parciais. O número de locos amplificados variou de 01 a 09 (sendo 01 loco amplificado em apenas quatro amostras) e a média de locos amplificados foi de 6,08 (66,9%), como demonstra o anexo I.



Além dessa análise, as amostras amplificadas com o Mini YSTR09 foram submetidas a três testes comparativos de amplificação com kits comerciais da ThermoFisher, os quais foram organizados em três sistemas: **Sistema I**- Mini-YSTR09 mais o kit AmpFISTR®**MiniFiler™**; **Sistema II**- Mini-YSTR09 mais o kit AmpFLSTR®**Identifiler™** e **Sistema III**- Mini-YSTR09 mais o kit AmpFISTR®**Yfiler™**. Do total de noventa e oito amostras de DNA analisadas com o Mini YSTR09, foram utilizadas setenta e cinco para amplificação no sistema I; vinte e cinco para o sistema II e sete amostras para o sistema III. O resultado também demonstrou que houve ampliações totais e parciais em todos os multiplex dos três sistemas testados e os anexos II e III, respectivamente demonstram o número de amplificado para cada sistema. A média de amplificados para cada multiplex do sistema assim como a média total, seguem descritos na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5. Comparação das médias dos resultados de amplificação obtidos nos três sistemas

<b>Médias de locos amplificados</b>	<b>Sistema I (Mini-YSTR09 mais o kit AmpFISTR®MiniFiler™)</b>	<b>Sistema II (Mini-YSTR09 mais o kit AmpFLSTR®Identifiler™)</b>	<b>Sistema III (Mini-YSTR09 mais o kit AmpFISTR®Yfiler™)</b>
Para cada Multiplex do Sistema (média parcial)	* 6,25 (69,4%) Mini YSTR09 * 7,4 (92,5%) para o AmpFISTR®MiniFiler™	* 6,6 (73,4%) para o Mini YSTR09 * 8,28 (55,2%) para o AmpFLSTR®Identifiler™,	*7,7 (85,6%) para o Mini YSTR09 *11,28 (70,5%) para o AmpFISTR®Yfiler™,
Do conjunto multiplex (média total)	* 13,6 (79,4%)	* 14,8 (61,7%)	* 19 (76%)

Segundo Matsuki e colaboradores (2002), existem diversos kits comerciais de STRs e Y-STRs disponíveis no mercado, os quais amplificam entre 100 a 450 pb de DNA. E mesmo que não sejam desenvolvidos especificamente para análise de amostras de DNA degradadas, são bastante utilizados para esse fim. Porém, os resultados obtidos não são tão satisfatórios, tendo em vista que a amplificação desse DNA torna-se prejudicada com STRs que amplificam fragmentos acima de 200 pb.

Nesse trabalho, os resultados das amplificações obtidas com os kits comerciais AmpFLSTR®Identifiler™(55,2%) do sistema I e AmpFISTR®Yfiler™(70,5%) do sistema II, ambos constituídos por STRs, confirmaram tal afirmação, quando comparados com os resultados obtidos com a amplificação dos Mini YSTR09 em ambos os sistemas e com o resultado da AmpFISTR®MiniFiler™(92,5%) do sistema I.

Nos últimos anos têm sido demonstrado que os Mini-STRs representam a melhor solução para análise de DNA degradado (BAR et al., 1988; COBLE et al.,2005; WIEGAND et al.,2001; WITAKER et al., 1995). Resultado também demonstrado neste trabalho, a partir dos testes de amplificação com o multiplex Mini YSTR09 e com o kit comercial AmpFLSTR®Minifiler™(Ver sistemas I, II e III). O Mini YSTR09 demonstrou resultados eficientes e satisfatórios nos três sistemas e a média total de amplificados foi maior no sistema I (79,4%), quando na presença dos dois multiplex constituídos de Mini STRs. Analisando individualmente, cada loco deste multiplex, os DYS461, DYS576, DYS442, DYS448, DYS445, DYS444 destacaram-se por amplificarem quase todas as amostras. Com exceção do DYS576, todos os outros foram redesenhados neste trabalho.

Todos os locos detectados com sucesso e considerados para todas as análises foram os que apresentaram no eletroferograma, picos com altura a partir de 100 RFU. Porém, tais locos, apresentaram desequilíbrio em relação a altura dos picos, quando comparados com o resultado das análises da amostra de DNA controle, a qual variava de 2.400 a 3.300 RFU. Isto pode ser explicado pelo fato de a amostra de DNA controle apresentar-se íntegra, pura, enquanto que as amostras de DNA de osso humano podem não apresentar-se em bom estado de conservação, além de apresentarem, na maioria das vezes, substâncias contaminantes. Como consequência, essas amostras amplificam com um baixo número de cópias de DNA. Metodologicamente, aumentando o número de ciclos da PCR e adicionando mais DNA polimerase ao sistema, existe a possibilidade de se elevar a quantidade de DNA amplificada e consequentemente balancear a altura dos picos (SCHNEIDER et al., 2004). Porém, tais metodologias, aumentam também o número de alelos *drop-out* e alelos *drop-in* e com isso a possibilidade de interpretação errônea dos dados genéticos gerados (PFEIFFER et al., 1999).

Nas análises com YSTRs em amostras de baixo número de cópias de DNA, os alelos *drop-out* não fornecem nenhuma informação. Contudo é importante observar o aumento dos alelos *drop-in*, bem como a presença de DNA contaminantes e de falsos alelos (*stutters*)

(SCHNEIDER et al., 2004). Para os locos analisados, foi detectada também a presença de picos e de artefatos. Porém, podem ser considerados como sendo resíduos ou “bolhas” de molécula de corante e que podem ser removidos em processo de filtração em colunas. Sabe-se que na amplificação de DNA de amostras degradadas a qual ocorre em pequenos fragmentos, a proporção desses resíduos no produto amplificado é maior e portanto, o impacto dessas impurezas no eletroferograma é mais relevante (WHITAKER et al., 1999).

#### 4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este estudo que o multiplex Mini YSTR09 aqui desenvolvido, dispõe de marcadores eficientes, capazes de amplificar DNA masculino em até 0,062ng. Nos casos dos testes de mistura de DNA contendo amostras de dois homens, a amplificação total é evidenciada para ambas as amostras quando no sistema, existem até três vezes mais DNA de uma amostra do que do outro. No teste de mistura na presença de 200ng DNA feminino, o DNA masculino na concentração de 0,5ng/uL, pode ainda ser detectado com amplificação total dos 09 marcadores.

Nos estudos em amostras forenses (osso humano), o multiplex Mini YSTR09 também demonstrou bons resultados, apresentando amplificação total ou parcial em 66,9% em oitenta e oito das noventa e oito amostras analisadas. Quando tais amostras foram comparadas com os kits comerciais, amplificou mais de 75% das amostras analisadas, incluindo nessa estatística amostras de DNA que ao serem testadas com tais kits, não haviam sido amplificadas e/ou havia sido de forma parcial. Resultados similares, porém com oito amostras, foi publicado em artigo científico como demonstra o anexo IV. Dentre os de Mini YSTR09 que foram amplificados na maioria das amostras destacam-se cinco deles; os DYS461, DYS442, DYS448, DYS445 e DYS444, que não estão incluídos em sistemas comerciais e que para este trabalho suas sequências de *primers* foram redesenhadas. Dentre os 03 marcadores do tipo RM-YSTR, destacou-se o DYS576, o qual também amplificou a maioria das amostras analisadas. Portanto, este novo multiplex, pode contribuir para estudos de amostras de DNA de caso forense e em amostras de DNA masculino como um todo. Pois, além de mostrar eficiência nas análises com DNA degradado (amplificam fragmentos de DNA em torno de 120 a 280pb) pode mostrar-se eficiente em diferenciar linhagens masculinas em amostras com baixa diversidade de haplótipos, como por exemplo, entre amostras de pai e filhos e entre irmãos, visto que nesse sistema multiplex existe a presença de 03 loci do tipo (RM) Y-STRs, além dos Mini YSTRs.

## CAPÍTULO II

### ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS NA POPULAÇÃO DA CIDADE DE MANAUS

#### RESUMO

Neste trabalho, foram avaliadas as frequências alélicas e haplotípicas, bem como os parâmetros estatísticos forenses, para 23 de STRs de cromossomo Y presentes no kit comercial *PowerPlex®Y23 system* (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, Y-GATA-H4, DYS481, DYS533, DYS549, DYS570, DYS576, DYS643) e para 09 locos de Mini-YSTR (DYS442, DYS444, DYS445, DYS447, DYS448, DYS461, DYS 570, DYS576, DYS626), presentes no multiplex desenvolvido “in house” e denominado de Mini YSTR09, em uma amostra de 214 homens não relacionados, residentes na cidade de Manaus, Norte do Brasil. Com o objetivo de analisar um maior número de locos possível, as análises das frequências alélicas e haplotípicas, foram realizadas em três grupos, os quais se diferenciavam pelo número de locos em cada grupo. Um total de 189, 204 e 168 haplótipos foram identificados (grupo I, grupo II e grupo III, respectivamente). O loco que apresentou microvariância foi o DYS458. E a maior diversidade gênica foi dos locos DYS626, DYS570, DYS576 e DYS447 no grupo I; DYS385, DYS570, DYS458, DYS481 e DYS456 no grupo II; e DYS385, DYS461, DYS626, DYS458, DYS576, DYS447 e DYS456 no grupo III. O DYS447, apresentou-se dentre os mais polimórficos quando das análises no grupo I e III. A capacidade de discriminação aumentou progressivamente com o número de Y-STRs incluídos na análise (95,76%, 99,40% e 100% para 9, 23, 29 Y-STRs, respectivamente). Portanto, o multiplex Mini YSTR09 contribuiu de forma relevante para o estudo populacional da Cidade de Manaus.

Palavras- Chave: Y- STR; Haplótipos; genética de população

## ABSTRACT

In this study, we evaluated the allele frequencies and haplotypic, as well as the statistical parameters, for 23 locos of STRs of Y chromosome present in commercial PowerPlex® Y23 system kit (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS392, DYS391, DYS437, DYS438, DYS393, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, Y-GATA-H4, DYS481, DYS533, DYS549, DYS570, DYS576, DYS643) and for 09 loci of Mini-YSTR (DYS442, DYS444, DYS445, DYS447, DYS448, DYS461, DYS576, DYS626, 570 DYS), present in the multiplex developed in chapter I and denominated the Mini YSTR09, in a sample of 214 men not related, residents in the Manaus city, northern Brazil. To analyze a larger number of locus as possible, thereby increasing the ability of discrimination, the analyses of allele frequencies and haplotypic, were carried out in five groups, which differed by the number of locus. A total of 189, 204 and 168 haplotypes were identified, depending on the group. Of the total number of locus examined, the who presented microvariacy was the DYS458. The largest gene diversity in Group I was of locus, DYS626, DYS570, DYS576 and DYS447; in Group II, went to the locos, DYS570, DYS458, DYS385, DYS481 and DYS456 and the Group III was for DYS385, DYS461 locos, DYS626, DYS458, DYS576, DYS447 and DYS456. The DYS447, among the most polymorphic when analyses in Group I and III. The ability of discrimination has increased progressively with the number of Y-STRs included in the analysis (95.76%, 99.40% and 100% for 9, 23, 29 Y-STRs, respectively) so the multiplex Mini YSTR09 contributed relevantly to the study of the city of Manaus.

Keywords: Y- STR; Haplotypes; Population genetics

## 1 INTRODUÇÃO

Marcadores de microssatélites, STRs em geral apresentam elevado poder de discriminação em nível de indivíduo e portanto, têm sido amplamente utilizados nas análises forense em humanos. Embora os STRs de cromossomos autossômicos tenham sido muito empregados neste tipo de análise, os Y-STRs se destacam quando a análise forense direciona-se para a detecção do DNA masculino, principalmente nos casos que envolvem: crimes com violência sexual em que geralmente ocorre mistura de material genético masculino e feminino; determinação do número de contribuintes da mistura, em caso de crime sexual perpetrado por mais de um criminoso; identificação de pessoas desaparecidas e também em casos de teste de paternidade em situações que o alegado pai já é falecido. (HANSON e BALLATYNE , 2006).

Em 1997, foi realizado um estudo contendo todos os Y-STRs disponíveis e os resultados demonstraram que o conjunto formado na época, por nove Y-STRs (haplótipo mínimo), era capaz de discriminar a maioria dos indivíduos da população (KAYSER et al., 1997). Porém, devido a capacidade de discriminação relativamente baixa desses YSTRs, diversos novos YSTRs vêm sendo identificados e caracterizados para utilização em estudos forense e de análise populacional, todos com o objetivo de aumentar esse poder de discriminação entre haplótipos de Y-DNA (HANSON e BALLATYNE , 2006; REDD et al., 2002).

Atualmente é possível acessar dados populacionais de Y-STRs e fazer buscas por compartilhamento de haplótipos no maior banco de dados de haplótipos do cromossomo Y, designado de YHRD. Mas, apesar do tamanho da base de dados ser extremamente importante para a confiabilidade de uma estimativa da frequência de qualquer haplótipo (ROLF et al., 2001), mais importante ainda é que estas bases de dados contemplem o maior número possível de *locos* Y-STR, uma vez que quanto mais extenso for o haplótipo, maior será a capacidade de discriminação (PASCALI et al., 1998). Além disso, é necessário e essencial o uso de um banco de dados da população local para o cálculo do índice de paternidade e probabilidades forenses, para se determinar a probabilidade do perfil encontrado, pertencer ao indivíduo testado.

No presente trabalho será avaliado o polimorfismo genético utilizando-se de 23 Y-STRs na população de Manaus, os quais estão presentes no kit comercial *PowerPlex® Y23 System* (Promega) e também de 09 MiniY-STRs desenvolvidos neste trabalho e já descritos no capítulo I. Para este estudo populacional, a população de referência utilizada baseou-se na escolha aleatória de um total de 214 indivíduos do sexo masculino e não aparentados entre si, os quais residem ou são naturais da cidade de Manaus.

Espera-se que os dados populacionais analisados, sejam ainda superados pelos dados do conjunto formado por o Mini YSTR09 mais o kit *PowerPlex® Y23 System*, totalizando 29 marcadores de cromossomo Y analisados.

Este trabalho é de grande importância, pois não existe um estudo populacional com somente amostras de Manaus e com esta quantidade de marcadores. Portanto, o objetivo geral deste trabalho é analisar o polimorfismo genético de um conjunto de 32 marcadores de microssatélites, sendo 23 destes presentes no kit comercial *PowerPlex® Y23 System* e 09 marcadores de microssatélites de MiniY-STR, do multiplex desenvolvido “in house”; Determinar as frequências alélicas e haplotípicas desse conjunto de 32 marcadores de microssatélites. Como objetivo específico, pretende-se: Descrever as frequências haplotípicas e alélicas dos marcadores Y (DYS576, DYS389I, DYS448, DYS389II, DYS19, DYS391, DYS481, DYS549, DYS533, DYS438, DYS437, DYS570, DYS635, DYS390, DYS439, DYS392, DYS643, DYS393, DYS458, DYS385a/b, DYS456 e Y-GATA-H4 do kit *PowerPlex® Y23 System* e dos marcadores DYS442, DYS444, DYS445, DYS447 e DYS461 do multiplex desenvolvido “in house”, em uma amostra populacional de Manaus; descrever a diversidade haplotípica, a diversidade gênica e a capacidade de discriminação, para os locos analisados.



## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras biológicas**

Foram selecionadas para o estudo 214 amostras biológicas existentes no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Universidade Federal do Amazonas, sob a responsabilidade do Professor Doutor Spartaco Astolfi Filho. As amostras foram originadas da Tese de Doutorado da Dra. Isabel da Mota Pontes, proveniente do programa de Pós-graduação em Biotecnologia. As amostras selecionadas pertencem a indivíduos somente do sexo masculino, geneticamente não relacionados, com idades iguais ou superiores a 18 anos, residentes na cidade de Manaus, Amazonas. Aos doadores foram entregues o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), (Anexo V), no qual cada indivíduo expressou sua vontade em participar deste projeto, e também de preencher um questionário, de acordo com a Resolução CNS 196/96.

### **2.2 Coleta das amostras**

Foram coletadas dos doadores cerca de 2 mL de sangue, utilizando-se seringas e agulhas descartáveis, por meio de sistema vacuntainer contendo EDTA. Após a coleta, os tubos foram codificados e armazenados a 4 °C até a extração dos DNAs. A coleta do material biológico e a extração do DNA foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM.

#### **2.2.1 Extração de DNA**

O procedimento adotado na extração de DNA de 100 amostras foi o mesmo descrito no protocolo do *Kit Wizard Genomic DNA Purification*, da Promega. As outras 100 já haviam sido previamente extraídas adotando-se o procedimento de extração descrito no *Kit QIAMP DNA mini e Blood Mini Handbook*, da Qiagen.

#### **2.2.2 Determinação da concentração de DNA**

A concentração de DNA das amostras biológicas aqui utilizadas foram determinadas por espectrofotometria. O equipamento utilizado para a leitura foi o espectrofotômetro modelo NanoDrop 2000 (Thermo scientific), que utiliza um sistema de retenção e medição do volume da amostra diretamente em um pedestal óptico com um espectro de 190 a 840 nm.

## 2.3 Amplificação das regiões STR do cromossomo Y

### 2.3.1 Sistemas de amplificação multiplex utilizados

Para a amplificação de regiões polimórficas STRs do cromossomo Y, foram utilizados primeiramente o sistema multiplex PowerPlex® Y23 System da Promega, seguido do multiplex “in house” Mini YSTR09, desenvolvido neste trabalho. O kit comercial apresenta iniciadores para a co-amplificação de 23 locos de YSTR, como seguem descritos na tabela 1. O Mini YSTR09, descritos nas Tabelas 1 e 2 do capítulo I, co-amplifica 09 locos de miniY-STR.

Tabela 1. informações dos locus presentes no kit comercial *PowerPlex® Y23 System* (Promega)

<b>YSTR</b>	<b>Repetição 5' → 3'</b>	<b>Fluoróforo</b>
DYS576	AAAG	Fluorescein
DYS389I/II	(TCTG) (TCTA)	Fluorescein
DYS448	AGAGAT	Fluorescein
DYS19	TAGA	Fluorescein
DYS391	TCTA	JOE
DYS481	CTT	JOE
DYS549	GATA	JOE
DYS533	ATCT	JOE
DYS438	TTTTC	JOE
DYS437	TCTA	JOE
DYS570	TTTCT	TMR-ET
DYS635	TSTA composto	TMR-ET
DYS390	(TCTA) (TCTG)	TMR-ET
DYS439	AGAT	TMR-ET
DYS392	TAT	TMR-ET
DYS643	CTTTT	TMR-ET

DYS393	AGAT	CXR-ET
DYS458	GAAA	CXR-ET
DYS385a/b	GAAA	CXR-ET
DYS456	AGAT	CXR-ET
Y-GATA-H4	TAGA	CXR-ET

### 2.3.2 Reação de amplificação dos sistemas multiplexes

A reação de amplificação por PCR com o kit *PowerPlex® Y23 System*, com um volume final de 10uL, continha: 2uL de master mix (5x), 1uL de primer pair mix (10x), 1uL de DNA (2ng/uL) e água. As condições termocíclicas utilizadas seguem descritas na Tabela 2 abaixo:

**Tabela 2.** Definições das condições da PCR para o multiplex *PowerPlex® Y23 System*.

Temperatura	Tempo	Referência
1. 96°C	02 min	
2. 94°C	10 seg	} 30 ciclos      Manual do Kit PowerPlex® Y23 System
3. 61°C	01min	
4. 72°C	30 seg	
5. 60°C	20 min	
6. 4°C	FOR EVER	

Para a amplificação do multiplex “in house”, Mini YSTR09 a reação de PCR com um volume final de 10uL, continha: 5uL do tampão Qiagen multiplex PCR master mix 2x; 1uL de *primer mix* a 5pmol/uL; 1uL de DNA (2ng/uL) e água. As condições termocíclicas utilizadas no termociclador Veriti (ThermoFisher) seguem descritas na Tabela 3 abaixo.

**Tabela 3.** Definições das condições da PCR para o multiplex Mini YSTR09.

Temperatura	Tempo	Referência
1. 95°C	15 min	

2.	94°C	01 min	} 30 ciclos	AmpFISTR Y Filer User's Manual
3.	60°C	02min		
4.	72°C	01min		
5.	62°C	80min		
6.	10°C	For ever		

## 2.4 Preparação das Amostras (Produto de PCR) e detecção por eletroforese Capilar

Para o processo de denaturação, alíquotas de 1uL das amostras de PCR foram adicionadas à mistura contendo 8,6uL do desnaturante formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) e 0,4uL de CC5 ILS 500 (internal Size Standard da Promega). Em seguida, foram submetidas por 3min<sup>o</sup>/95°C e 3 min em banho de gelo. Por eletroforese capilar no ABI PRISM<sup>®</sup>3500, as amostras foram separadas, usando o polímero POP-7 em capilar de 50cm, por 3Kv por 5s.

## 2.5 Análise dos Produtos da PCR

A análise dos fragmentos e tipagem dos alelos foram realizadas a partir programa *GeneMapper v. 4.01 (ThermoFisher)*. O tamanho dos fragmentos considerados para esta análise foram somente os que apresentavam- se com RFU a partir de 100.

## 2.6. Análises estatísticas

A determinação das frequência alélica ou genotípica (no caso do loco DYS385) e a diversidade gênica (DG) foram calculadas por meio da contagem direta. Foram calculadas também as frequências haplotípicas e a capacidade de discriminação (CD), utilizando-se software Arlequin, v. 3.5.1.2 (EXCOFFIER et al., 2005). Os cálculos foram realizadas com três grupos que se diferenciavam quanto ao número de marcadores genéticos analisados, sendo: 09 do multiplex Mini YSTR09 para o grupo I; 23 do Kit comercial *PowerPlex® Y23 System* para o grupo II e a somatória dos presente em ambos multiplexes, para o grupo III.

Para a obtenção do número de haplótipos e diversidade haplotípica, as análises foram realizadas para esses três grupos citados e também, para o conjunto de 17 microssatélites (DYS19, DYS385a, DYS385b, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, Y GATA H4). Esses 17 de Y-STRs, são os mais comumente utilizado por geneticistas forenses, pois além de serem os mesmos 17 presentes no kit comercial AmpFISTR Yfiler (Thermofisher), estão incluídos entre os 23 do kit comercial *PowerPlex® Y23 System* (Promega). Portanto, dois novos grupos foram analisados, sendo o grupo IV somente com os 17 locos acima citados e o grupo V, com a somatória dos locos presentes neste Kit comercial e no multiplex Mini YSTR09.

Desta maneira, pretende-se demonstrar que o aumento do número de marcadores genéticos deve contribuir para o aumento do poder discriminativo dos Y-STRs.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Determinação das frequências dos alelos e da diversidade gênica

As frequências alélicas foram utilizadas para este trabalho como base para os dados estatísticos em geral. Seguem descritas para os três grupos (I, II e III), separados pela quantidade de locos analisados.

✓ **Frequência alélica para os locos do multiplex Mini YSTR09 (Grupo I):** As frequências alélicas foram determinadas a partir da tipagem da amostra populacional constituída de 189 indivíduos não relacionados geneticamente. A Tabela 4 descreve para cada locus, as frequências alélicas e a diversidade gênica dos Y-STRs (Min Y-STRs e RM-YSTRs) avaliados neste grupo. Os mais polimórficos foram: DYS626 (0,8121), DYS570 (0,8086), DYS576 (0,7711) e DYS447 (0,7299). O locus menos polimórfico foi o DYS442 (0,4718). O número de alelos encontrados para os 9 YSTRs, variou entre 6 a 29 e nessa mesma Tabela 4, o alelo mais frequente segue juntamente com o valor respectivo de frequência alélica sublinhado e destacado em cinza.

Tabela 4. Frequências alélicas e diversidade gênica (DG) para os do Multiplex Mini YSTR09

Alelo	DYS442	DYS444	DYS445	DYS447	DYS448	DYS461	DYS570	DYS576	DYS626
6			0,01587						
7									
8									
9						0,04233			
10	0,02116		0,07407			0,11111			
11	0,16931	0,08995	0,19577			<u>0,63492</u>			0,05291
12	<u>0,69841</u>	<u>0,65608</u>	<u>0,63492</u>			0,1746			0,03704
13	0,10582	0,16931	0,07937			0,03704		0,00529	0,02116
14	0,00529	0,08466					0,01058	0,01058	0,01587
15							0,05291	0,02646	0,1164
16					0,00529		0,14815	0,09524	<u>0,34921</u>
17					0,02116		<u>0,31217</u>	0,25926	0,17989
18					0,08466		0,2381	<u>0,32804</u>	0,08995
19					<u>0,48148</u>		0,11111	0,20106	0,08466
20					0,25926		0,0582	0,0582	0,03704
21					0,12698		0,03175	0,01587	0,01587
22				0,01587	0,01587		0,03175		
23				0,11111	0,00529		0,00529		
24				0,16931					
25				<u>0,44974</u>					
26				0,14286					
27				0,06878					
28				0,03704					
29				0,00529					
DG	0,471883	0,525635	0,546513	0,729931	0,676914	0,550882	0,808653	0,771199	0,812014

✓ **Frequência alélica para os locos do kit comercial PowerPlex® Y23 System (Grupo II):**

Para este grupo, as frequências foram determinadas a partir da tipagem da amostra populacional constituída de 204 indivíduos não relacionados geneticamente.

A Tabela 5 descreve para cada genético, as frequências alélicas e a diversidade gênica (DG) para os 23 Y-STRs avaliados neste grupo. Os mais polimórficos foram: DYS385 (0,9950), DYS570 (0,7980), DYS458 (0,7947), DYS481(0,7506) e DYS456 (0,7367). Os menos polimórficos foram o DYS393 (0,4889) e DYS533 (0,3760). O número de alelos encontrados variou entre 9 a 26. Essa mesma Tabela 5, o alelo mais frequente segue juntamente com o valor respectivo de frequência alélica, segue sublinhado e destacado em cinza.

Tabela 5. Frequências alélicas e diversidade gênica (DG) para os 23 YSTRs do kit comercial *PowerPlex® Y23 System*

Alelo	DYS576	DYS389I	DYS448	DYS 389II	DYS19	DYS391	DYS481	DYS549
9								0,0049
<u>10</u>		0,02941				<u>0,52941</u>		0,0098
11		0,03922				0,35784		0,17157
<u>12</u>		0,22549		0,0049		0,03922		<u>0,37745</u>
<u>13</u>	0,0049	<u>0,54902</u>		0,0049	0,20588	0,07353		0,34804
<u>14</u>	0,0098	0,12745	0,0049	0,01961	<u>0,53431</u>			0,07353
15	0,03922	0,01961		0,06373	0,20588			0,01471
<u>16</u>	0,10294	0,0098	0,0098	<u>0,48529</u>	0,02941			
17	0,25		0,02451	0,27941	0,02451			
<u>18</u>	<u>0,34314</u>		0,08333	0,08824				
<u>19</u>	0,17157		<u>0,47059</u>	0,03922			0,0098	
20	0,05882		0,25	0,0049			0,0049	
21	0,01961		0,3725	0,0049			0,06373	
<u>22</u>			0,01471	0,0049			<u>0,43137</u>	
23			0,0049				0,13235	
24							0,16667	
25							0,10784	
26							0,01961	
27							0,03431	
28							0,02451	
29							0,0049	
DG	0,77422	0,628604	0,569384	0,672533	0,628274	0,584731	0,750627	0,70122

Alelo	DYS533	DYS438	DYS437	DYS570	DYS635	DYS390	DYS439	DYS392
9	0,0098	0,12255				0,0098	0,0098	
10	0,0049	0,23529				0,06863	0,06863	
11	<u>0,76471</u>	0,20098				0,33824	0,33824	<u>0,33824</u>
12	0,19608	<u>0,42647</u>				0,41176	<u>0,41176</u>	0,07353
13	0,02451	0,0049				0,15196	0,15196	0,42647
14			0,43627	0,01471		0,0098	0,0098	0,12255
15			<u>0,47059</u>	0,04412		0,0098	0,0098	0,03431
16			0,09314	0,08824				
17				<u>0,30882</u>				
18				0,26961				
19				0,13235	0,01471			
20				0,05392	0,02451			0,0049
21				0,03922	0,21569	0,05392		
22				0,04412	0,18137	0,06863		
23				0,0049	<u>0,45588</u>	0,33333		
24					0,08333	<u>0,46078</u>		
25					0,02451	0,07843		
26						0,0049		
DG	0,37605	0,707326	0,579538	0,7980587	0,704394	0,687957	0,68795737	0,682115

Alelo	DYS643	DYS393	DYS458	DYS456	YGATAH4	DYS385
5	0,0049					Genotipo
8	0,01961				0,01961	10-13 14-14
9	0,08824					10-14 14-15
10	<u>0,5098</u>				0,01471	10-15 14-16
11	0,15686			0,02941	0,41667	11-11 14-17
12	0,16667	0,16176			<u>0,51471</u>	11-12 14-18
13	0,04412	<u>0,68627</u>		0,05392	0,02941	11-13 14-19
14	0,0049	0,11275	0,01961	0,09804		<u>11-14</u> 14-21
15	0,0049	0,03431	0,14216	<u>0,39706</u>		11-15 15-15
16		0,0049	<u>0,27451</u>	0,31373	0,0049	11-16 15-16
16,2			0,0049			12-12 15-17
17			0,23529	0,08333		12-14 15-18
17,2			0,0098			12-15 15-19
18			0,22059	0,01471		12-16 16-16
19			0,06863			12-17 16-17
20			0,01961	0,0049		12-18 16-18
20,2			0,0049			13-13 17-17
21						13-14 17-18
22						13-15 17-19
23				0,0049		13-16 17-20
24						13-17 18-19
25						13-18 19-20
26						13-19
DG	0,67753	0,488953	0,79479	0,7367086	0,560354	0,99501



✓ **Frequência alélica para os locos do kit comercial *PowerPlex® Y23 System* mais os do Mini YSTR09 (Grupo III):**

Para este grupo, as frequências foram determinadas a partir da tipagem da amostra populacional constituída de 168 indivíduos não relacionados geneticamente.

A Tabela 6 descreve para cada genético, as frequências alélicas e a diversidade gênica para os 29 Y-STRs avaliados neste grupo. Os mais polimórficos foram o DYS385 (0,9285), DYS626 (0,8128), DYS458 (0,7986), DYS576 (0,7721), DYS447(0,7326), DYS456 (0,7245). Os menos polimórficos foram o DYS533 (0,4180), DYS393 (0,4830), DYS442 (0,4802). O número de alelos encontrados variou entre 9 a 29 e nessa mesma tabela, o alelo mais frequente segue juntamente com o valor respectivo de frequência alélica, segue sublinhado e destacado em cinza.

Tabela 6. Frequência alélica e diversidade gênica (DG) para o conjunto de de YSTRs do kit comercial *PowerPlex® Y23 System* mais Mini YSTR09

Alelo	DYS576	DYS389I	DYS448	DYS 389II	DYS19	DYS391	DYS481	DYS549
9						0,07143		
<b>10</b>		0,02976				<b>0,53571</b>		0,0119
11		0,04167				0,35714		0,15476
12		0,22619				0,03571		<b>0,39286</b>
<b>13</b>	0,00595	<b>0,54167</b>			0,21429			0,34524
<b>14</b>	0,0119	0,125			<b>0,55952</b>			0,07738
15	0,02976	0,02381			0,17857			0,01786
16	0,10714	0,0119	0,0119		0,02381			
17	0,2381		0,02381		0,02381			
<b>18</b>	<b>0,34524</b>		0,08929	0,00559				
<b>19</b>	0,19048		<b>0,49405</b>	0,00559			0,00595	
20	0,05357		0,23214	0,01676			0,00595	
21	0,01786		0,13095	0,06145			0,06548	
<b>22</b>			0,0119	<b>0,46927</b>			<b>0,43452</b>	
23			0,00595	0,31285			0,14286	
24				0,07821			0,16667	
25				0,02793			0,08929	
26				0,01117			0,01786	
27				0,00559			0,03571	
28				0,00559			0,02976	
29							0,00595	
DG	0,772105	0,636476	0,676019	0,670707	0,607996	0,579088	0,748158	0,696071

Alelo	DYS533	DYS438	DYS437	DYS570	DYS635	DYS390	DYS439	DYS392
9	0,0119	0,1131					0,0119	
10	0,00595	0,22024					0,07143	
11	<u>0,72619</u>	0,22024					0,31548	0,33929
12	0,23214	<u>0,44048</u>					<u>0,42857</u>	0,05357
13	0,02381	0,00595					0,14881	<u>0,43452</u>
14			0,44643	0,01786			0,0119	0,125
15			<u>0,47024</u>	0,04167			0,0119	0,04167
16			0,08333	0,10119				
17				<u>0,32738</u>				
18				0,2381				
19				0,13095	0,0119			
20				0,05357	0,02381			0,00595
21				0,04167	0,20833	0,05952		
22				0,04167	0,17262	0,07143		
23				0,00595	<u>0,47024</u>	0,32738		
24					0,08333	<u>0,45833</u>		
25					0,02976	0,07738		
26						0,00595		
DG	0,418015	0,696139	0,572631	0,80031	0,697137	0,668088	0,689129	0,675808

Alelo	DYS643	DYS393	DYS458	DYS456	YGATAH4	DYS385 I		
8	0,02381				0,01786	Genotipo		
9	0,10119					10-13	13-15	17-17
10	<u>0,51786</u>				0,00595	10-14	13-16	17-18
11	0,1369			0,02976	0,42262	10-15	13-17	17-19
12	0,17262	0,15476			<u>0,50595</u>	11-11	13-18	17-20
13	0,03571	<u>0,69048</u>		0,05952	0,04167	11-13	13-19	18-19
14	0,00595	0,125	0,01786	0,09524		<u>11-14</u>	14-14	19-20
15	0,00595	0,02381	0,1369	<u>0,39286</u>		11-15	14-15	
16		0,00595	<u>0,2619</u>	0,31548	0,00595	11-16	14-16	
16,2			0,00595			12-12	14-17	
17			0,25	0,08929		12-14	14-18	
17,2			0,0119			12-15	14-19	
18			0,21429	0,0119		12-16	14-21	
19			0,07143			12-17	15-15	
20			0,02381	0,00595		12-18	15-16	
20,2			0,00595			13-13	15-17	
21						13-14	15-18	

DG	0,671129	0,483059	0,798648	0,72452	0,563245	0,9285
Alelo	DYS442	DYS444	DYS445	DYS447	DYS461	DYS626
6			0,01786			
7						
8						
9					0,04167	
10	0,01786		0,06548		0,1131	
11	0,17262	0,08333	0,18452		<u>0,61905</u>	0,05952
12	<u>0,69048</u>	<u>0,66667</u>	<u>0,65476</u>		0,18452	0,03571
13	0,1131	0,16667	0,07738		0,04167	0,01786
14	0,00595	0,08333				0,01786
15						0,10714
16						<u>0,35119</u>
17						0,16667
18						0,09524
19						0,08929
20						0,04167
21						0,01786
22				0,01786		
23				0,11905		
24				0,16667		
25				<u>0,44048</u>		
26				0,1369		
27				0,07738		
28				0,03571		
29				0,00595		
DG	0,480294	0,513884	0,526647	0,737667	0,566465	0,812853

**3.2 Determinação das Frequências de Haplótipos do cromossomo Y na amostra populacional estudada.**

Foram utilizadas para o estudo amostras de DNA de 214 indivíduos masculinos, não correlacionados geneticamente. Porém, a obtenção do número de haplótipos completos foi inferior ao número de indivíduos estudados, pois algumas regiões de Y-STR e/ou mini-YSTR não foram amplificadas em todas as 214 amostras de DNA. E os haplótipos incompletos não foram utilizados nas determinações das frequências dos alelos em cada região dos Y-STR e/ou mini-YSTR, nos grupos de haplótipos analisados.

Os resultados da frequências haplotípicas seguem divididos em cinco grupos de análises, como citado anteriormente no item 2.7.

✓ **Para o grupo I, utilizando o multiplex Mini YSTR09:**

Do total de 214 amostras de DNA, 189 foram tipadas em todas as 09 regiões de miniY-STR. Nessas 189 amostras, o resultado demonstrou a ocorrência de 181 haplótipos únicos e de 08 haplótipos compartilhados por até quatro indivíduos. As frequências dos haplótipos variaram de  $5,29 \times 10^{-3}$ ,  $1,06 \times 10^{-2}$ ,  $1,59 \times 10^{-2}$  a  $2,12 \times 10^{-2}$ . No anexo VI, estão apresentados os diferentes haplótipos e tais frequências haplotípicas resultantes dessa análise.

✓ **Para o grupo II, utilizando o kit PowerPlex® Y23 System:**

Do total de 214 amostras de DNA, 204 foram tipadas em todas as 23 regiões de Y-STR. Nessas 204 amostras, o resultado demonstrou a ocorrência de 202 haplótipos únicos e de 02 haplótipos compartilhados por até dois indivíduos. As frequências dos haplótipos variaram de  $4,90 \times 10^{-3}$  a  $9,80 \times 10^{-3}$ . No anexo VII são apresentados os diferentes haplótipos e tais frequências haplotípicas resultantes dessa análise.

✓ **Para o grupo III, utilizando o conjunto multiplex:** Kit comercial PowerPlex® Y23 System mais o Mini YSTR09:

O número total de marcadores de microssatélites nos dois multiplex analisados é 32, sendo que 23 YSTR estão presentes no Kit comercial *PowerPlex® Y23 System* e 09 MiniY-STR, estão presentes no multiplex Mini YSTR09. Porém 03 marcadores do tipo Mini-YSTR são compatíveis com os existentes no Kit comercial. Portanto, o polimorfismo estudado é o mesmo,

variando simplesmente o tamanho do fragmento por deslocamento dos *primers* para um local mais próximo da zona de repetição. Sendo assim, para o estudo da frequência haplotípica será considerado para este grupo III, um total de 29 marcadores, sendo 23 do kit comercial e 06 do multiplex Mini-YSTR09.

Do total de 214 amostras de DNA 168 foram tipadas nas 29 regiões de YSTR/Mini-YSTR. O resultado demonstrou a ocorrência de 168 haplótipos únicos. A frequência haplotípica foi de  $5,95 \times 10^{-3}$ . No anexo VIII são apresentados os diferentes haplótipos resultantes dessa análise.

As 168 amostras tipadas no grupo III, foram as utilizadas para a análise dos grupos IV e V, como seguem descritas abaixo.

✓ **Para o grupo IV:** 17 Marcadores presentes também no Kit comercial AmpFISTR®Yfiler™ (ThermoFisher)

O resultado demonstrou para as 168 amostras tipadas no **grupo IV**, a ocorrência de 167 haplótipos únicos e de 01 haplótipo compartilhado por dois indivíduos com a frequência haplotípica foi de  $5,95 \times 10^{-3}$  e de  $1,19 \times 10^2$ . No anexo IX são apresentados os diferentes haplótipos resultantes dessa análise.

✓ **Para grupo V:** Conjunto de 25 marcadores, sendo 17 presentes no kit AmpFISTR®Yfiler™ mais 08 marcadores do Mini YSTR09.

O grupo V é composto por esses 17 e mais os 09 marcadores do Mini YSTR09 totalizando 26 marcadores analisados. O locus DYS448 está presente tanto neste kit comercial quanto no Mini YSTR09, Portanto, a análise desse grupo será composta de 25 marcadores no total.

Para o grupo V, o resultado demonstrou a ocorrência de 168 haplótipos únicos. A frequência haplotípica foi de  $5,95 \times 10^{-3}$ . No anexo X são apresentados os diferentes haplótipos resultantes dessa análise.

### 3.3 Diversidade Haplotípica

Visando avaliar a importância do número e do polimorfismo de regiões de Y-STR reunidas em um haplótipo para estudo de herança patrilinea, a diversidade haplotípica foi calculada com base nas frequências haplotípicas encontradas em cada grupo e subgrupo anteriormente citado.

Considerando-se o grupo I, com haplótipo baseado em 09 Mini Y-STRs, dentre as 189 amostras avaliadas, 181 eram diferentes e oito haplótipos foram encontrados por 13 vezes; para o grupo II das 204 amostras avaliadas, 202 eram diferentes e 02 foram compartilhadas por dois indivíduos. Para o grupo III e grupo V, houve somente haplótipos únicos no total de 168; para o grupo IV, houve 167 haplótipos únicos e um compartilhado por dois indivíduos.

### **3.4 Capacidade de discriminação**

A capacidade de discriminação, ou seja, a probabilidade dos dois indivíduos testados serem diferenciados, para cada grupo analisado, foi respectivamente de: 0,9576 (99,3%) para o grupo I; 0,9901 (99,01%) para o grupo II; 1,000 (100%) para o grupo III e grupo V e 0,9994 (99,04%) para o grupo IV.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo da população da Cidade de Manaus

Nas análises forenses e de estudos populacionais em geral, a partir da utilização de marcadores do cromossomo Y, sejam eles Y-STRs ou Mini - YSTRs é necessário conhecer a distribuição das características alélicas dos marcadores na população de referência, investigar quais apresentam maior diversidade, isto é, maior poder de discriminação, bem como quais os haplótipos mais frequentes, para que seja garantida uma correta interpretação dos resultados. Portanto, para as 214 amostras de DNA masculina da população de Manaus, foram utilizados nove Mini Y-STR do multiplex Mini YSTR09, (desenvolvido neste trabalho os quais, após otimização dos procedimentos de validação e genotipagem em amostras degradadas, demonstraram-se úteis e eficientes para aplicação na prática forense), além dos 23 marcadores de Y-STRs provenientes do kit comercial *kit PowerPlex Y23* (Promega). Os dados estatísticos estão descritos nos tópicos a seguir.

### 4.2 Análises estatísticas

#### 4.2.1 Frequência alélica e diversidade gênica

##### ✓ Para o Grupo I: Mini YSTR09

Dos 09 mini Y-STRs analisados, os que apresentaram maior diversidade gênica foram os: DYS626 (0,8121), DYS570 (0,8086), DYS576 (0,7711) e DYS447 (0,7299). Desses quatro marcadores, três (DYS570, DYS576 e DYS447) apresentaram resultados coincidentes quando comparados com os resultados de Palha e colaboradores (2012), o qual analisou uma população do Norte do Brasil (com 14 YSTRs), incluindo nesse estudo 75 amostras da cidade de Manaus.

O Marcador DYS447, que neste trabalho foi redesenhado com a finalidade de construção de um Mini-YSTR, para obtenção de melhores resultados em amostras com DNA degradado, não faz parte de nenhum kit comercial. Foi identificado e caracterizado por Redd e colaboradores (2002) como Y-STR, demonstrando-se com diversidade gênica elevada na população estudada. Este marcador, diferentemente de todos os outros marcadores é do tipo pentanucleotídeo, igual aos conhecidos e altamente polimórficos marcadores PENTA D e PENTA E do kit *PowerPlex 16* (Promega). As repetições de penta e hexanucleotídeos apresentam, aproximadamente, duas vezes menos repetições e são menos comuns que as repetições tri e tetranucleotídeos. Assim, os Y-STRs com unidades de repetição mais longas são mais robustos em distinguir os haplogrupos do cromossomo Y, sendo considerados como uma classe atrativa de YSTRs para estudos de populações e análises forenses (JÄRVE et al., 2009).

Os marcadores DYS626, DYS570 e DYS576, os quais apresentaram-se dentre aqueles citados com maior diversidade gênica do conjunto de 09 MinY-STR analisados, estão entre os 23 Y-STRs contemplados pelo recém-lançado Powerplex Y23 (Promega), o kit comercial com maior número de marcadores na atualidade (DAVIS et al., 2012). Portanto, fica evidenciada a importância de que haplótipos sejam compostos por novos marcadores com a finalidade de aumentar a capacidade discriminatória e conseqüentemente, diminuir a probabilidade de coincidência haplotípica devido ao acaso (SHI et al., 2009).

O DYS442 marcador que também foi redesenhado neste trabalho, diferentemente do que já havia sido descrito por Lida e colaboradores (2001), onde na população estudada demonstrou-se útil para análises forenses, aqui foi o que apresentou a menor diversidade gênica (0,4718).

#### ✓ **Para o Grupo II: Powerplex Y23**

Para os 23 YSTRs presentes nesse Kit, os marcadores que apresentaram maior diversidade gênica foram os: DYS385 (0,9950), DYS570 (0,7980), DYS458 (0,7947), DYS481 (0,7506) e DYS456 (0,7367). Em relação ao resultado obtido com o DYS385, de certa forma já era esperado, uma vez que o DYS385 representa a amplificação simultânea de duas regiões idênticas do cromossomo Y separadas por 40.000 pares de base e que mutam de forma independente. Resultados semelhantes são observado por todos os outros estudos envolvendo



este marcador (CAINE et al., 2005; CHEMALE et al., 2013; GÓIS et al., 2008; GRATTAPAGLIA et al., 2005; LEITE, FP et al., 2008; PALHA et al., 2007; PEREIRA et al., 2007; SCHWENGBER et al., 2009; WOLFGRAMM et al., 2011)

Diferentemente dos resultados também já observados, o marcador DYS389II não está entre os mais polimórficos (0,6725) nesta análise da população de Manaus, lembrando que este marcador também é multicópia e contém o DYS389I (0,6285). Portanto, mesmo os marcadores DYS385 e o DYS389I/II sendo mantidos nos kits comerciais devido a sua elevada diversidade gênica e, conseqüentemente, maior capacidade de discriminar indivíduos, faz-se necessário destacar neste trabalho, a diversidade gênica dos marcadores não duplicados. Até mesmo porque, esta diversidade elevada é consequência do maior número de alelos apresentado por estes marcadores para a população estudada.

Interessantemente, três dos cinco marcadores mais polimórficos deste estudo o DYS570 (0,7980), DYS456 (0,7367) e DYS481 (0,7506) não fazem parte do grupo de marcadores que constituem o YHRD e conseqüentemente, não participam do conjunto de marcadores mais comumente utilizados em casos forenses (usados com o popular kit comercial Y-Filer da Thermofisher). Estão entre seis novos Y-STRs altamente discriminatórios do kit *PowerPlex® Y23 System*, os quais tiveram uma tipagem bem sucedida em 951 amostras do estudo citado (DAVIS et al., 2012), o que demonstra o grande benefício do uso desse kit, devido a presença de adicionais que aumentam o poder e a discriminação da tipagem dos Y-STRs. Tais marcadores, mesmo sendo simples cópia, apresentam DG mais elevada do que os DYS389I/II e foram de fundamental importância para a maior capacidade de discriminação do haplótipo 23 Y-STRs. Isto é reflexo dos avanços ocorridos na área nos últimos anos e justifica a tendência de inclusão de marcadores novos recém caracterizados.

Verificando os resultados obtidos com o Mini YSTR09 (multiplex desenvolvido “in house”), observa-se que também o marcador DYS570 apresenta-se como um dos marcadores com maior diversidade gênica (sub-item 4.2.2.1). Resultado obtido também nos trabalhos com a população do Rio Grande do Sul e a de Brasília (CHIANCA, 2013; Da FRÉ, 2014)

Os marcadores que apresentaram menor diversidade gênica foram os: DYS437 (0,5795), DYS448 (0,5693), YGATAH4 (0,5603), DYS393 (0,4889) e DYS533 (0,3760). Com exceção do DYS533, todos os outros quatro marcadores fazem parte do grupo de marcadores que estão presentes no kit comercial *Y-Filer*. A menor DG destes marcadores também foi observada em outros estudos (CAINÉ et al., 2010; GÓIS et al., 2008; GRATTAPAGLIA et al.,

2005; WOLFGRAMM et al., 2011). Porém, mesmo com baixa DG, dificilmente um marcador já incluído em um kit comercial será substituído, pelo fato das bases de dados de haplótipos já o conterem. Daí a necessidade de pesquisadores descreverem conjuntos de Y-STRs complementares aos kits comerciais (DAVIS et al., 2012; VERMEULEN et al., 2009; SHI et al., 2009).

✓ **Para o grupo III: kit comercial PowerPlex® Y23 System mais os locos do Mini YSTR09**

Neste grupo, a frequência alélica baseou-se no conjunto de 29 marcadores. Sete marcadores apresentaram-se com a DG mais elevada, dentre eles: DYS385 (0,9285), DYS461 (0,8172), DYS626 (0,8127), DYS458 (0,7942), DYS570 (0,7912), DYS576 (0,7816), DYS447(0,7326), DYS456 (0,7207) .

Dos sete marcadores mais polimórficos destacam-se dois novos marcadores, o DYS461 (0,8179) que apresentou maior diversidade gênica do que todos os outros sete e o DYS447 (0,7326), que também apresentou DG elevada quando da análise somente com o Mini YSTR09. Estes marcadores fazem parte do multiplex Mini YSTR09 desenvolvido neste trabalho e não estão presentes em kits comerciais. Já foram identificados e caracterizados por Redd e colaboradores (2002) e por White e colaboradores (1999), respectivamente. Porém, nos trabalhos anteriores apresentam-se como YSTRs e neste trabalho apresentam-se como Mini - YSTR .

Os marcadores DYS626 e DYS576, fazem parte do Multiplex Mini YSTR09, desenvolvido neste trabalho, além de fazerem parte dos marcadores do kit comercial *PowerplexY23*, assim como os DYS458 e DYS456 e DYS385.

Somente nesta análise com 29 marcadores é que os marcadores DYS458 e DYS385 também presentes no kit *Yfiler*, ficaram entre os que obtiveram maior DG.

Os marcadores menos polimórficos DYS533(0,2016), DYS393 (0,4799) e DYS442 (0,4716) são constituintes do kit *Powerplex Y23*, *Yfiler* e Mini STR09, respectivamente.

A determinação das frequências alélicas para Y-STRs é realizada para se estimar a diversidade gênica, pois, devido à ausência de recombinação, as inferências forenses devem ser feitas considerando o haplótipo. Porém, com o cálculo da diversidade gênica pode se conhecer quais os Y-STRs são mais informativos e assim, compor um conjunto com maior

capacidade de discriminação. Portanto, a Tabela 7 demonstra um resumo dos mais informativos, ou seja com maior diversidade gênica, nos grupos, I, II e III analisados.

Tabela 7. Resumo da diversidade gênica dos Loci mais informativos presentes nos grupos

Sistemas	DYS626	DYS570	DYS576	DYS447	DYS458	DYS385	DYS481	DYS456
Grupo I	0,8121	0,8086	0,7711	0,7299	-	-	-	-
Grupo II	-	0,7980	0,7742	-	0,7947	0,9950	0,7506	0,7367
Grupo III	0,8128	0,8003	0,7721	0,7326	0,7980	0,9285	0,7481	0,7376

Estes marcadores já foram testados em outras populações do mundo e recentemente na população do Pará, apresentando-se com elevada diversidade genética. O *DYS447*, *DYS570*, *DYS576* têm sido comumente adicionados à conjuntos de YSTRs, inclusive já incluídos em kits comerciais, como no caso do *DYS570*, *DYS576* presentes no kit comercial *Powerplex23* aqui utilizado (Grupo III). Além disso, possuem estrutura de repetição simples além de não apresentarem ainda a presença de eventos de mutação do tipo duplicação. Portanto, tais resultados permitem sugerir, a inclusão do multiplex Mini YSTR09 aqui desenvolvido, nas análises populacionais e forenses da População de Manaus estudada. Pois, dentre os nove presente neste multiplex, quatro se destacam com elevado poder de discriminação. Além disso, esses quatro *DYS570*, *DYS576*, *DYS447* e *DYS626*, podem também (com exceção dos marcadores *DYS570* e *DYS576* em conjunto o kit *PowerPlex Y23*), ser analisado em conjunto com kits comerciais.

#### 4.2.2 Diversidade e Frequência haplotípica

A diversidade haplotípica é o principal parâmetro analítico de um conjunto de Y-STRs. Trata-se da probabilidade de que dois indivíduos selecionados ao acaso possuam haplótipos distintos. Este parâmetro resume o desempenho analítico de um conjunto e é calculado a partir das frequências haplotípicas, como citado anteriormente na introdução.

As análises de diversidade e frequência haplotípica foram também realizadas em grupos, com número variado de diferentes STRs do cromossomo Y, como nas análises das frequência alélicas. Porém, como já citado no item 2.6 e baseados nas informações de locos mais polimórficos anteriormente descritas, neste tópico, foram feitas análises em mais dois

novos grupos (IV e V). O grupo IV foi constituído de 17 marcadores que além de presentes no kit *PowerPlex® Y23 System* estão presentes no kit *AmpFISTR Yfiler* (da Thermofisher), o kit comercial mais utilizado em análises forense e populacional. O grupo V foi constituído pelo conjunto dos presentes neste Kit comercial e no multiplex Mini YSTR09.

As análises em cada grupo revelaram, haplótipos únicos e/ou compartilhados. Para os grupos I, II e IV, os quais envolveram indivíduos com compartilhamento de haplótipos, a diversidade haplotípica foi de 0,9993 (93%); 0,9999 (99,99%); 0,9999 (99,99%), respectivamente. Reanalizando a cadeia de custódia, não foi revelada evidência de parentesco entre tais indivíduos. Portanto, a coincidência haplotípica foi independente e aleatória. Entretanto, este achado indica que pertencem à mesma linhagem patrilinear. As análises para os grupos II e IV, demonstraram somente a ocorrência de haplótipos únicos sendo a diversidade haplotípica de 1,0000 (100%)

Como o esperado, a diversidade haplotípica, variou proporcionalmente de acordo com o número de analisados em cada grupo, sendo dependente portanto, do número de Y-STRs considerados (9, 23, 29, 25, 17, respectivamente). Embora os valores das diversidades haplotípicas sejam próximos, comparar haplótipos mais extensos na rotina laboratorial agrega maior qualidade aos exames e, conseqüentemente, aumenta a força da evidência genética (ASAMURA et al., 2007). É importante ressaltar que apenas dois trabalhos brasileiros recentes (CHIANCA, 2013 e DA FRÉ, 2014), analisaram haplótipos com tantos marcadores quanto este, sendo esta uma de suas principais relevâncias. As comparações com outros países são impossibilitadas por nenhum outro estudo incluir os mesmos conjuntos de marcadores (23 kit PowerPlex Y23 Promega mais 9 Mini Y-STRs, desenvolvidos neste trabalho).

A Tabela 8 apresenta um resumo dos parâmetros genéticos obtidos com essas análises.

Tabela 8. Parâmetros genéticos obtidos nos indivíduos selecionados na população de Manaus-AM

Multiplex de Y-STRs	N. De Haplótipos total	N. De Haplótipos únicos	Diversidade Haplótípica
<b>Grupo I:</b> (Mini YSTR09) 9 Y-STRs	189	181	0,9993
<b>Grupo II:</b> (PPY23/promega) 23 Y-STRs	204	202	0,9999

<b>Grupo III:</b> (Mini YSTR09 + PPY23/promega) 29 Y-STRs	168	168	1,0000
<b>Grupo IV</b> (Y Filer) 17 Y-STRs	168	167	0,9999
<b>Grupo V</b> (Y filer + Mini YSTR09) 25 YSTRs 25 Y-STRs	168	168	1,0000

#### 4.2.3 Capacidade de discriminação (CD)

A capacidade de discriminação aumentou progressivamente com o número de Y-STRs incluídos na análise, (95,76%, 99,4%, 99,01%, 100% e 100% para 9, 17, 23, 25 e 29 Y-STRs, respectivamente). Este resultado demonstra que o grupo I (com haplótipo constituído de 09 Mini YSTR do multiplex Mini YSTR09); o grupo II, (constituído de 23 marcadores do Kit Powerplex Y23) e o grupo IV, (constituído de 17 marcadores presentes também no kit comercial Y filer), não são suficientes para a individualização da população de Manaus quando analisados separadamente. Pois, dentre as 189 amostras analisadas do grupo I, em 08 ocasiões o mesmo haplótipo foi encontrado em um outro indivíduo; no grupo II, das 204 amostras, em 02 ocasiões o mesmo haplótipo foi encontrado em um outro indivíduo e das 168 amostras do subgrupo I, em 01 ocasião o mesmo haplótipo foi encontrado em um outro indivíduo (Tabela 13). Nestas situações, tais indivíduos seriam considerados da mesma linhagem paterna em uma investigação de vínculo genético (irmão, filhos, tios, primos, ou netos).

Porém é interessante observar que apesar de o grupo I, apresentar apenas 09 , ou seja, uma quantidade bem menor em relação aos outros dois grupos, o valor da CD não foi tão mais baixo quando comparado ao valor da CD do grupo IV, que contém 17 (Tabela 9). E este resultado confirma o que já se esperava em muitas populações humanas: que um número relativamente pequeno de Y-STRs (de 9 a 17) produza uma percentagem de mais de 90% de haplótipos diferentes em populações com amostras de indivíduos não relacionados (CARVALHO-SILVA et al., 2006; GÓIS et al., 2008; PALHA et al., 2011; PEREIRA et al., 2007).

Quando da análise do grupo III e grupo V, ambos contendo um maior número de (29 e 25 respectivamente), o valor da CD obtido nas análises foi igual a 1 ou 100%, o que significa dizer

que não foi encontrado o mesmo haplótipo em mais de um indivíduo. Diversos pesquisadores têm analisado esses mesmos parâmetros, adicionando e/ou substituindo marcadores de Y-STRs nos conjuntos previamente definidos ou formando conjuntos novos (HANSON e BALLANTYNE, 2004; REDD et al., 2002), sempre em busca de sistemas genéticos do cromossomo Y que apresentem valores elevados de diversidade genética. Portanto, tais resultados demonstraram que a análise populacional com multiplex mais polimórficos, fez uma diferença significativa nos parâmetros genéticos. Portanto, para a população de Manaus, o ideal é que os kits comerciais sejam utilizados em conjunto, seja este conjunto formado pelo Mini YSTR09 mais *Y Filer* ou pelo Mini YSTR09 mais o *Powerplex Y23*.

De acordo com Butler e colaboradores (2005) e Piglionica e colaboradores (2013) espera-se obter maior CD aumentando o número de Y-STRs analisados, e/ou utilizando Y-STRs com maior diversidade gênica.

Recentemente, Rodig e colaboradores (2008) avaliaram o poder de discriminação de trinta e cinco Y-STRs em diversas populações da Alemanha, com o objetivo de selecionar marcadores mais polimórficos e avaliar se a adição desses sistemas aos conjuntos já definidos, era vantajoso ou não para análises populacionais. Os resultados obtidos foram bastantes satisfatórios e os autores recomendam a adição de novos marcadores com elevados valores de diversidade genética pela vantagem que oferecem em aumentar os valores de diversidade haplotípica e os valores de capacidade de discriminação.

Portanto, seguindo estas recomendações, dentre os marcadores que obtiveram maior DG, foram escolhidos apenas os dois, *DYS447* e *DYS626* para um segundo estudo da população de Manaus, juntamente com os kit comercial *PPY23* e com os locos presentes no kit *Y Filer*. Essa escolha baseou-se no fato de estes marcadores estarem presentes somente no multiplex desenvolvido neste trabalho.

Tabela 9. Parâmetros genéticos obtidos com os locus *DYS447* e *DYS626* nos indivíduos selecionados na população de Manaus-AM

Multiplex de Y-STRs	N. de Haplótipos total	N. De Haplótipos únicos	Capacidade de discriminação
---------------------	------------------------	-------------------------	-----------------------------

PPY23/promega + <b>DYS447, DYS626</b> Total : <u>25 marcadores</u>	168	168	1,0000
Y Filer + <b>DYS447, DYS626</b> Total: <u>19 marcadores</u>	168	168	1,0000

Para 168 amostras, houve 168 haplótipos únicos. Este resultado foi eficiente e satisfatório para a confirmação de que em estudos utilizando Y-STRs com maior diversidade gênica, também se obtém valores de elevada capacidade de discriminação (BUTLER et.,al 2005). Portanto, tais marcadores podem ser adicionados aos já existentes e conhecidos marcadores dos kits comerciais *Powerplex Y23* e *Y Filer* para diferenciar os indivíduos nas análises populacionais e forenses da Cidade de Manaus.

É interessante observar que o marcador DYS447, do tipo mini - YSTR, foi desenvolvido neste trabalho e demonstrou-se tão eficiente e capaz de diferenciar os indivíduos quanto os marcadores DYS570, DYS576, e DYS626, já conhecidos e inseridos em kits, como por exemplo o kit comercial *PPY23*. Portanto, por se tratar de um novo marcador, com elevada diversidade gênica, optou-se por analisar as mesmas amostras populacionais adicionando ao conjunto de multiplex dos kits analisados, somente o marcador DYS447, como cita a Tabela 10. até mesmo porque com a retiradas do marcador DYS626 das análises, o tamanho do haplótipo formado não seria tão inferior aos já analisados.

Tabela 10. Parâmetros genéticos obtidos com os locus DYS447 e DYS626 nos indivíduos selecionados na população de Manaus-AM

Multiplex de Y-STRs	N. De Haplótipos total	N. De Haplótipos únicos	Capacidade de discriminação (CD)
2. PPY23/promega + <b>DYS447</b> Total: <u>24 marcadores</u>	168	168	1,0000
Y Filer + <b>DYS447</b> Total: <u>18 marcadores</u>	168	168	1,0000

Os resultados demonstraram que somente com o marcador DYS447, um alto nível de CD ainda foi encontrado. Portanto, o Mini-YSTR DYS447 mostrou-se eficiente para análises

neste trabalho, quando em conjunto com outros marcadores já existentes nos kit comerciais aqui analisados. Daí a importância de estudos com novos marcadores genéticos, para estudo populacionais.

## 5. CONCLUSAO

✓ O desenvolvimento do sistema Multiplex Mini YSTR09 possibilitou a amplificação eficiente de 09 marcadores de Y-STR em uma única reação de PCR, permitindo a genotipagem e caracterização genética de uma forma rápida e utilizando um baixo volume de amostras.

✓ Os marcadores DYS447, DYS570, DYS576 e DYS626, dentre os 09 do Multiplex Mini YSTR09, mostraram-se altamente polimórficos na amostra populacional estudada, apresentando elevada diversidade genética. Destaca-se aqui o marcador DYS447, que para este trabalho as sequências de *primers* foram redesenhadas para a obtenção de marcador do tipo mini-YSTR, não estando desta forma, incluídos em sistemas comerciais. Os outros três (DYS570, DYS576 e DYS 626), por serem do tipo RM-YSTR, possibilitam a discriminação entre indivíduos relacionados geneticamente.



✓ O marcador multicópia DYS385 e os marcadores de cópia única DYS570, DYS458, DYS481 e DYS45, dentre os 23 do kit comercial *PowerPlex® Y23 System*, destacam-se por apresentarem maior polimorfismo genético. Os marcadores DYS458 e o DYS481, são novos YSTRs, os quais estão presentes somente nesse kit comercial

✓ Os marcadores DYS447 e DYS626, se destacaram como os mais polimórficos, dentre o conjunto formado por 29 marcadores (sendo 23 do kit comercial *PowerPlex® Y23 System* mais, 06 do multiplex Mini YSTR09).

✓ Os valores de diversidade haplotípica (DH) e de capacidade de discriminação (CD) obtidos nas análises desse trabalho, sofreram influência não só pela quantidade de YSTRs analisados, mas também pela diversidade gênica dos marcadores presentes no multiplex Mini YSTR09.

✓ A escolha de novos marcadores de Y-STRs para a análise em conjunto com o kit comercial PPY23 e até mesmo com o kit mais comumente utilizado pelos geneticistas forenses (17 Y-STRs do Kit Y-Filer), apresentou resultados satisfatórios e foi decisivo para o aumento da capacidade discriminatória do conjunto. Portanto, este trabalho incentiva ainda mais as pesquisas e as buscas por novos marcadores que apresentem estrutura de repetição simples, capacidade de amplificação simultânea e parâmetros confiáveis de diversidade haplotípica e capacidade de discriminação para utilização em identificação humana.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi desenvolvido o estudo com novos marcadores do tipo Mini-YSTRs para a aplicação em análises forenses (principalmente para análise de amostras degradadas) e juntamente com o kit *PowerPlex® Y23 systems* foi realizado também o estudo populacional, com a finalidade de prover informações confiáveis próprias da população de Manaus relativas aos marcadores moleculares STRs de cromossomo Y. Os resultados deste estudo deverão permitir a sua utilização para fins de emissão de laudos periciais, sejam eles criminais ou cíveis, bem como contribuir com a formação do banco de dados desta cidade e com o aprimoramento de bancos de dados de Y-STRs do Brasil e do mundo.

## 7. PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos, pretende-se:

- ✓ Inserir o Multiplex Mini YSTR09 nas análises forenses do Laboratório de Genética Forense da Polícia Civil do Estado do Amazonas;
- ✓ Realizar novos estudos populacionais entre indivíduos relacionados geneticamente, com a finalidade de se estudar as taxas de mutação na população de Manaus, para poder se realizar análise de diferenciação entre indivíduos de mesma linhagem patrilínea com mais precisão.
- ✓ Realizar estudos comparativos com outras populações
- ✓ Inserir o resultado no banco de dados de YSTRs, o YHRD.
- ✓ Submeter os artigos científicos em anexo XI e XII.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAN J. REDD AL B. AGELLON, VERONICA A. KEARNEY, VERONICA A. CONTRERAS, TATIANA KARAFET, Hwayong Park Peter de Knijff, John M. Butler, Michael F. Hammer. Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome *Forensic Science International* 130 (2002) 97–111

ALVAREZ GARCIA A, MUNOZ I, PESTONI C, LAREU MV, RODRIGUEZ-CALVO MS, CARRACEDO A, Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp, *Int J Legal Med* 109 (1996) 125-129.

ASAMURA H, FUJIMORI S, OTA M, OKI T, FUKUSHIMA H. Evaluation of miniY-STR multiplex PCR systems for extended 16 Y-STR locos. *Int J Legal Med* (2008) 122:43–49

ASAMURA H, SAKAI H, KOBAYASHI K, et al., MiniX-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis, *Int. J. Legal Med.* 120 (2006) 174–181

ASAMURA H, SAKAI H, OTA M, FUKUSHIMA H. MiniY-STR quadruplex systems with short amplicon lengths for analysis of degraded DNA samples. *Forensic Science International: Genetics* 1 (2007) 56–61.

ASAMURA H, SAKAI H, OTA M, FUKUSHIMA H. MINIY-STR quadruplex systems with short amplicon lengths for analysis of degraded DNA samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(1):56-61.

AVERY OT, MACLEOD C, MCCARTY M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types. Induction of transformataion by a desoxyribonucleic acid fraction osolated from Pneumococcus type III. *J. Exper. Med* 1944;79 (2): 137-158.

AYUB Q, MOHYUDDIN A, QAMAR R, MAZHAR K, ZERJAL T, MEHDI SQ, TYLER-SMITH C, Identification and characterization of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information, *Nucleic Acids Research* 28 (2000).

BAI R, ZHANG Z, LIANG Q, LU D, YUAN LI, YANG XUE, SEN SHI MEI, Haplotype diversity of 17 Y-STR locos in a Chinese Han population sample from Shanxi Province, Northern China. *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 214–216

BALDING, D.J., BISHOP M. E CANNINGS C. (2001). *Handbook of Statistical Genetics*. Wiley and Sons, Chichester.

BALLANTYNE J, FATOLITIS L, ROEWER L, Creating and Managing Effective Y-STR Databases, *Profiles in DNA* 9 (2) (2006) 10-13.

BAR W, KRATZER A, MACHLER M, SCHMID W, Postmortem stability of DNA, *Forensic Sci Int* BENECKE, M. Coding or non-coding, that is the question. *EMBO reports*. v.3, n.6, p.498-502, 2002.

BENNETT, P DEMYSTIFIED. Microsatellites. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000;53:177-83

BETZ A, BABLER G, DIETL G, STEIL X, WEYERMANN G, PFLUG W, DYS STR analysis with epithelial cells in a rape case, *Forensic Sci Int* 118 (2001) 126-130.

BHARGAVA, A.; FUENTES, F.F. Mutational Dynamics of Microsatellites. *Mol Biotechnol*. V.44, p:250–266, 2010.

BIESECKER L, BAILEY-WILSON J, BALLANTYNE, J et al., DNA identifications after the 9/11 World Trade Center attack, *Science* 310 (2005) 1122–1123.

BRASILEIRO, B.T.R.V.; COIMBRA, M.R.M.; MORAIS JR.,M.A.; OLIVEIRA, N.T. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-Fingerprinting based on PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiol*, v.35, n.3, p.205-210, jul. 2004.

BUDOWLE B, CHAKRABORTY R, CAMONDY G, MONSON KL. Source attribution of a Forensic DNA profile. *Forensic Sci communications*. 2000; 2(3): 1-6.

BUDOWLE, B.; MORETTI, T.R.; Genotype Profiles for Six Population Groups at the 13 CODIS Short Tandem Repeat Core Locus and Other PCR-Based Locus. *Forensic Science Communications*, v.1, n.2. July, 1999.

BUTLER JM, Recent developments in Y-short tandem repeat and Y-single nucleotide polymorphism analysis. *In: Forensic Science. Review*, Vol. 15 Number 2, July 2003.

BUTLER JM, Recent developments in Y-short tandem repeat and Y-single nucleotide polymorphism analysis, *Forensic Sci Rev* 15 (2003) 91-111.

BUTLER JM, SHEN Y, MCCORD BR, The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA, *J Forensic Sci* 48 (2003) 1054-1064.

BUTLER JM. *Forensic DNA typing : biology, technology, and genetics of STR markers*. 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2005. xvii, 660 p. p..

BUTLER JMK, Margaret C. Decker, Amy E. Addressing Y-Chromosome Short Tandem Repeat(Y-STR) Allele Nomenclature. *Journal of Genetic Genealogy*. 2008;4(2):pp. 125 - 48.

BUTLER, J.M. Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Locus Used in Human Identity Testing. *J FORENSIC SCI.*, V.51, N.2, MARCH, 2006.

BUTLER,J.M; SCHOSKE,R; VALLONE, P.M. et al. A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. *Forensic Sci Int.*, vol.129, p.10-24, 2002.

C. ROBINO, A. RALF, S. PASINO, M.R. DE MARCHI, K.N. BALLANTYNE, A. BARBARO, C. BINI, E. CARNEVALI, L. CASARINO, C. DI GAETANO, M. FABBRI, G. FERRI, E. GIARDINA, A. GONZALEZ, G. MATULLO, A.L. NUTINI, V. ONOFRI, A. PICCININI, M. PIGLIONICA, E.PONZANO, C. PREVIDERÈ, N. RESTA, F. SCARNICCI, G. SEIDITA, S. SORÇABURUCIGLIERO, S. TURRINA, A. VERZELETTI, M. KAYSER, DEVELOPMENT OF AN ITALIAN RM Y-STR haplotype database: results of the 2013 GEFI collaborative exercise, *ForensicSci. Int.: Genet.* (2013).

CAINÉ L, CORTE-REAL F, VIEIRA DN, CARVALHO M, SERRA A, LOPES V, et al. Allele frequencies and haplotypes of 8 Y-chromosomal STRs in the Santa Catarina population of southern Brazil. *Forensic Sci Int.* 2005;148(1):75-9.

CARVALHO-SILVA DR, TARAZONA-SANTOS E, ROCHA J, PENA SDJ, SANTOS FR. Y chromosome diversity in Brazilians: switching perspectives from slow to fast evolving markers. *Genetics*. 2006; 126: 251–260.

CERRI N, RICCI U, SANI I, VERZELETTI A, DE FERRARI F, Mixed Stains from Sexual Assault Cases: Autosomal or Y-Chromosome Short Tandem Repeats?, *Croatian Medical Journal* 44 (2003) 289-292.

CHAKRABORTY R, Paternity testing with genetic markers: are Y-linked genes more efficient than autosomal ones?, *Am J Med Genet* 21 (1985) 297-305.

CHEMALE G, FREITAS JM, BADARACO JL, ROSA LD, MARTINS JA, MARTINS AD, et al. Y-Chromosomal STR haplotypes in a sample from Brasília, Federal District, Brazil. *Forensic Sci Int Genet.* 2013.

CHIANCA, F.C. DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA DE 23 Y-STRS EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DO DISTRITO FEDERAL (BRASIL) - UM TERRITÓRIO QUE SURTIU DO NADA A REALIDADE. 2013. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

CHUNG DT, DRABEK J, OPEL KL, BUTLER JM, MCCORD R Chromosome, as Revealed by Direct Observation in Father/Son Pairs, *Am J Hum Genet.* A Study on the Effects of Degradation and Template Concentration on the Amplification Efficiency of the STR Miniplex Primer Sets, *J Forensic Sci* 49 (2004) 733-740.

COBLE MD, BUTLER JM, Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA, *J Forensic Sci* 50 (2005) 43-53.

COLLINS JR, STEPHENS RM, GOLD B, LONG B, DEAN M, BURT SK. An exhaustive DNA micro-satellite map of the human genome using high performance computing. *Genomics* 82 (2003) 10-19.

DAVIS C, GE J, SPRECHER C, CHIDAMBARAM A, THOMPSON J, EWING M, FULMER P, RABBACH D, STORTS D, BUDOWLE B. Prototype PowerPlex(®) Y23 System: A concordance study. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; *In Press.*

DE ROBERTIS, E.D.P., DE ROBERTIS, E.M.F. *Biologia Celular e Molecular.* Editora Guanabara Koogan.; 2<sup>a</sup> ed., 1993.

DEKAIRELLE AF, HOSTE B, Application of a Y-STR-pentaplex PCR (DYS19, DYS389I and II, DYS390 and DYS393) to sexual assault cases, *Forensic Sci Int* 118 (2001) 122-125.

DELFIN FC, MADRID BJ, TAN MP, DE UNGRIA CA, Y-STR analysis for detection and objective confirmation of child sexual abuse, *Int J Legal Med* 119 (2005) 158-163.

DIXON LA, DOBBINS AE, PULKER HK, BUTLER JM, VALLONE PM, COBLE MD, PARSON W, BERGER B, GRUBWIESER P, MOGENSEN HS, MORLING N, NIELSEN K, SANCHEZ JJ, PETKOVSKI E, CARRACEDO A, SANCHEZ-DIZ P, RAMOS-LUIS E, BRION M, IRWIN JA, JUST RS, LOREILLE O, PARSONS TJ, SYNDERCOMBE-COURT D, SCHMITTER H,



STRAMANN-BELLINGHAUSEN B, BENDER K, GILL P, Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs – results of a collaborative European (EDNAP) exercise, *Forensic Sci Int* 164 (2006) 33-44.

DIXON, L.A., et al. Validation of a 21- autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes. *Forensic Science International*, v.154, n.1, p.62-77. November, 2005.

DOLINSKY, L.C.; PEREIRA, L.M.C.V. DNA Forense. *Saúde e ambiente em Revista*, Duque de Caxias, v.2, n.2, p.11-22, jul-dez. 2007.

DOMINGUES PM; GUSMÃO L, SILVA DA, AMORIM A, RINALDO WP, CARVALHO EF. Sub-Saharan Africa descendents in Rio de Janeiro (Brazil): population and mutation data for 12 Y-STR locos. *Int J Legal Med*. 2007;12:238-241.

DUPUY BM, STENERSEN M, EGELAND T, OLAISEN B, Y-Chromosomal Microsatellite Mutation Rates: Differences in Mutation Rate Between and Within Locus, *Human Mutation* 23 EDWARDS A, CIVITELLO A, HAMMOND HA, CASKEY CT, DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats, *Am J Hum Genet* 49 (1991) 746-756.

EDWARDS A, CIVITELLO A, HAMMOND HA, CASKEY CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats, *Am J Hum Genet* 49 (1991) 746-756. European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes, *Forensic Sci Int* 118 (2001) 106-113.

Excoffier L., (2005) Arlequin 3.5 An integrated software package for population Genetics Data analysis, *user manual*. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>

Excoffier L., Guillaume L., Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software FOSTER EA, JOBLING MA, TAYLOR PG, DONNELLY P, DE KNIJFF P, MIEREMET R, ZERJAL T, TYLER-SMITH C, JEFFERSON fathered slave's last child, *Nature* 396 (1998) 27-28.

GILL P, JEFFREYS AJ, WERRETT DJ, Forensic application of DNA fingerprints. *Nature*. 1985; 318: 577-579.

GÓES, A.C.S. Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais. *Revista do Biomédico*. Edição

nº 65. Disponível em:<[http://www.crbm1.gov.br/bio65/artigocien\\_65.asp](http://www.crbm1.gov.br/bio65/artigocien_65.asp)>. Acesso em mar. 2010.

GÓES,A.C.S; CARVALHO,E.F.C; GOMES,I; SILVA, D.A; GIL, E.H.F; ANTÔNIO AMORIM, A.et al. Population and Mutation analysis of 17 Y-STR locos from Rio de Janeiro (Brazil). Int.J. Legal. Med 2005; 119:70-6.

GÓIS CC, MARTINS JA, PEREIRA GA, FRESCHI A, PANETO GG, ALVARENGA VL, et al. Genetic population data of 12 STR locos of the PowerPlex Y system in the state of São Paulo population (Southeast of Brazil). Forensic Sci Int. 2008;174(1):81-6.

GRATTAPAGLIA D, KALUPNIEK S, GUIMARÃES CS, RIBEIRO MA, DIENER PS, SOARES CN. Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. Forensic Sci Int. 2005;149(1):99-107.

GRUBWIESER P, MUHLMANN R, BERGER B, NIEDERSTATTER H, PAVLIC M, PARSON W, A new “miniSTR-multiplex” displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA, Int J Legal Med 120 (2006) 115-120.

GUSMAO L AND CARRACEDO A, Y Chromosome-Specific STRs, Profiles in DNA 6 (1) (2003) 3-6.

GUSMÃO L, BUTLER JM, CARRACEDO A, GILL P, KAYSER M, MAYR WR, et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. Forensic Sci Int. 2006;157(2-3):187-97.

GUSMÃO, L.; ALVES,C.;AMORIM, A. Molecular characterization of four human Y-specific microsatellites (DYS434, DYS437, DYS438, DYS 439) for population and forensic studies. Ann Hum Genet 2001; 65: 285-91.

GUSMAO,L; BRION, M;GONZALEZ-NEIRA,A.et al. Y Chromosome specific polymorphisms in forensic analysis. Legal Medicine, vol.1, p.55-60, 1999.

GUSMAO,L; GONZÁLES-NERA, A; ALVES, C.; LAREU, M.; COSTA, S.; AMORIM, A; CARRACEDO, A. Chimpanze homologous of human Y specific STRs . A comparative study and a proposal for nomenclature. Forensic Science International 126. (2002) 129-136.

H. RODIG, L. ROEWER, A. GROSS, T. RICHTER, P. DE KNIJFF, M. KAYSER, W. BRABETZ, Evaluation of haplotype discrimination capacity of 35 Y-chromosomal short tandem repeat locos, *Forensic Sci. Int.* 174 (2008) 182–188.

HAGELBERG E, GRAY IC, JEFFREYS AJ, Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis, *Nature* 352 (1991) 427-429.

HALL A, BALLANTYNE J, Novel Y-STR typing strategies reveal the genetic profile of the semen donor in extended interval post-coital cervovaginal samples, *Forensic Sci Int* 136 (2003) 58-72.

HANSEN, M.M.; TAGGART, J.B.; MELDRUP, D. Development of new VNTR markers for pike and assessment of variability at di- and tetranucleotide repeat microsatellite locos. *Journal of Fish Biology*, v.55, p.1-183, 1999.

HANSON EK, BALLANTYNE J, A Highly Discriminating 21 Y-STR “Megaplex” System Designed to Augment the Minimal Haplotype Locus for Forensic Casework, *J Forensic Sci* 49 (2004) 40-51.

HANSON EK, BALLANTYNE J, Comprehensive annotated STR physical map of the human Y chromosome: Forensic implications, *Legal Med* 8 (2006) 110-120.

HANSON, E P. NERDOS, J. BALLANTYNE, Testing and evaluation of 43 “Noncore” Y chromosome markers for forensic casework applications, *J. Forensic Sci.* 51 (2006) 1298–1314.

HELLMANN A, ROHLEDER U, SCHMITTER H, WITTIG M, STR typing of human telogen hairs – a new approach, *Int J Legal Med* 114 (2001) 269-273.

HOLLAND, M.M.; CAVE, C.A.; HOLLAND, C.A.; BILLE, T.W. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. *Croatian Medical Journal.*, v.44, n.3, p. 264-272, 2003

IIDA, R ·TSUBOTA, E; MATSUKI, T. Identification and characterization of two novel human polymorphic STRs on the Y chromosome *Int J Legal Med* (2001) 115 :54–56

IIDA, R ·TSUBOTA, E; SAWAZAKI K; MASUYAMA M; ·MATSUKI T; YASUDA, T; KISHI, K. Characterization and haplotype analysis of the polymorphic Y-STRs DYS443, DYS444 and DYS445 in a Japanese population. *Int J Legal Med* (2002) 116 :191–194

JÄRVE M, ZHIVOTOVSKY LA, ROOTSI S, HELP H, ROGAEV EI, KHUSNUTDINOVA EK, KIVISILD T, SANCHEZ JJ. Decreased rate of evolution in Y chromosome STR locos of increased size of the repeat unit. *PLoS One*. 2009; 4(9):e7276.

JEFFREYS AJ, ALLEN MJ, HAGELBERG E, SONNBERG A, Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis, *Forensic Sci Int* 56 (1996) 65-76.

JEFFREYS AJ, WILSON V, NEUMANN, R et. al. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res*. 16:10953-71, 1988.

JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN S. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*. 1985;316: 76-79.

JEFFREYS, A.J. Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. *Biochem.Soc.Trans*. 15:309-317, 1987.

JEFFREYS, A.J.; BROOKFIELD, J. F.; SEMEONOFF, R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, v.317, p.818-819. set. 1985.

JIN PARK M, YOUNG LEE H, UKHEE CHUNG, SEUNG-CHUL KANG, KYOUNG-JIN SHIN . Y-STR analysis of degraded DNA using reduced-size amplicons *Int J Legal Med* (2007) 121:152–157.

JOBIM, M.R.; BRENNER, C. Identificação Humana pelo DNA: Investigação de paternidade e Análise de Casos Forenses. In: Identificação humana volume 1, Tochetto, D. Coord., Porto Alegre: Sagra Luzzato, Parte IV, p. 237-303, 1999.

JOBLING M, HURLES M, TYLER SC. *Human Evolutionary Genetics*. Garland Science 2004; 125-137.

JOBLING M.A., HURLES M.E. AND TYLER-SMITH C. (2004). *Human evolutionary Genetics, Origins, Peoples and Disease*, Garland Publishing. New York.

JOBLING MA, PANDYA A, TYLER-SMITH C, The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing, *Int J Legal Med* 110 (1997) 118-124.

JOBLING MA, TYLER-SMITH C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature* 2003;4:598-612.

K.N. BALLANTYNE, A. RALF, R. ABOUKHALID, N.M. ACHAKZAI, M.J. ANJOS, Q. AYUB, J. BALAŽIĆ, J. BALLANTYNE, D.J. BALLARD, B. BERGER, C. BOBILLO, M. BOUABDELLAH, H. BURRI, T. CAPAL, S. CARATTI, J. CÁRDENAS, F. CARTAULT, E.F. CARVALHO, M. CARVALHO, B. CHENG, M.D. COBLE, D. COMAS, D. CORACH, M.E. D'AMATO, S. DAVISON, P. DE KNIJFF, M.C.A. DE UNGRIA, R. DECORTE, T. DOBOSZ, B.M. DUPUY, S. ELMRGHNI, M. GLIWIŃSKI, S.C.GOMES, L. GROL, C. HAAS, E. HANSON, J. HENKE, L. HENKE, F. HERRERA- RODRÍGUEZ, C.R. HILL, G. HOLMLUND, K. HONDA, U.-D. IMMEL, S. INOKUCHI, M.A. JOBLING, M.KADDURA, J.S. KIM, S.H. KIM, W. KIM, T.E. KING, E. KLAUSRIEGLER, D. KLING, L. KOVAČEVIĆ, L. KOVATSI, P. KRAJEWSKI, S. KRAVCHENKO, M.H.D. LARMUSEAU, E.Y. LEE, R. LESSIG, L.A. LIVSHITS, D. MARJANOVIĆ, M. MINARIK, N. MIZUNO, H. MOREIRA, N. MORLING, M. MUKHERJEE, P. MUNIER, J. NAGARAJU, F. NEUHUBER, S. NIE, P. NILASITSATAPORN, T. NISHI, H.H. OH, J. OLOFSSON, V. ONOFRI, J.U. PALO, H. PAMJAV, W. PARSON, M. PETLACH, C. PHILLIPS, R. PLOSKI, S.P.R. PRASAD, D. PRIMORAC, G.A.PURNOMO, J. PURPS, H. RANGEL-VILLALOBOS, K. REBAŁA, B. RERKAMNUAYCHOKE, D.R.GONZALEZ, C. ROBINO, L. ROEWER, A. ROSA, A. SAJANTILA, A. SALA, J.M. SALVADOR, P.SANZ, C. SCHMITT, A.K. SHARMA, D.A. SILVA, K.-J. SHIN, et al., Toward male individualization with rapidly mutating Y-chromosomal short tandem repeats, *Hum. Mutat.* 35 (2014) 1021–1032.

K.N. BALLANTYNE, M. GOEDBLOED, R. FANG, O. SCHAAP, O. LAO, A.WOLLSTEIN, Y. CHOI, K. VAN DUIJN, M. VERMEULEN, S. BRAUER, R. DECORTE, M. POETSCH, N. VONWURMB-SCHWARK, P. DE KNIJFF, D. LABUDA, H. VUZINA, H. KNOBLAUCH, R. LESSIG, L. ROEWER, R. PLOSKI, T. DOBOSZ, L. HENKE, J. HENKE, M.R. FURTADO, M. KAYSER, MUTABILITY OF YCHROMOSOMAL MICROSATELLITES: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications, *Am. J. Hum. Genet.* 87 (3) (2010) 341–353.

KAYE N. BALLANTYNE; VICTORIA KEERL; ANDREAS WOLLSTEIN; YING CHOI; SOFIA B. ZUNIGA; ARWIN RALF MARK VERMEULEN; PETER DE KNIJFF; MANFRED KAYSER. A new future of forensic Y-chromosome analysis: Rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages. *Forensic Science International: Genetics* 6 (2012) 208–218.

KAYSER M, CAGIA A, CORACH D, FRETWELL N, GEHRIG C, GRAZIOSI G, HEIDORN F, HERRMANN S, HERZOG B, HIDDING M, HONDA K, JOBLING M, KRAWCZAK M, LEIM K, MEUSER S, MEYER E, OESTERREICH W, PANDYA A, PARSON W, PENACINO G, PEREZ-LEZAUN A, PICCININI A, PRINZ M, SCHMITT C, SCHNEIDER PM, SZIBOR R, TEIFELGREDING J, WEICHHOLD G, DE KNIJFF P, ROEWER L, Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study, *Int J Legal Med* 110 (1997) 125-133.

KAYSER M, KITTLER R, ERLER A, HEDMAN M, LEE AC, MOHYUDDIN A, MEHDI SQ, ROSSER Z, STONEKING M, JOBLING MA, SAJANTILA A, TYLER-SMITH C, A Comprehensive Survey of Human Y-Chromosomal Microsatellites, *Am J Hum Genet* 74 (2004) 1183-1197.

KAYSER M, KRUGER C, NAGY M, GESERICK G, DE KNIJFF P, ROEWER L (1998) Y-chromosomal DNA analysis in paternity testing: experiences and recommendations. In: Olaisen B, Brinkmann B, Lincoln PJ (eds) *Progress in forensic genetics* 7. Elsevier Science, Amsterdam, pp 494-496.

KAYSER M, ROEWER L, HEDMAN M, HENKE L, HENKE J, BRAUER S, KRUGER C, KRAWCZAK M, NAGY M, DOBOSZ T, SZIBOR R, DE KNIJFF P, STONEKING M, SAJANTILA A, Characteristics and Frequency of Germline Mutations at Microsatellite Loci from the Human Y Chromosome, as Revealed by Direct Observation in Father/Son Pairs, *Am J Hum Genet* 66 (2000) 1580-1588.

KAYSER M, ROEWER L, HEDMAN M, HENKE L, HENKE J, BRAUER S, KRUGER C, KRAWCZAK M, NAGY M, DOBOSZ T, SZIBOR R, DE KNIJFF P, STONEKING M, SAJANTILA A, Characteristics and Frequency of Germline Mutations at Microsatellite Loci from the Human Y

KISHIDA T, WANG W, FUKUDA M, TAMAKI Y, Two deficiency cases of disputed paternity: sibling or half-sibling?, *Nippon Hoigaku Zasshi* 50 (1996) 78-81.

LANDSTEINER, Karl; WIENER, Alexander Solomon. On the presence of M agglutinogens in the blood of monkeys. *The Journal of Immunology* 33 (1): 19-25, 1937.

LEE E; SHIN KYOUNG-JIN; RAKHA , A; SIM J, PARK M, NA YOUNG KIM, WOO ICK YANG, HWAN YOUNG LEE. Analysis of 22 Y chromosomal STR haplotypes and Y haplogroup distribution in Pathans of Pakistan. *Forensic Science International: Genetics* 11 (2014) 111–116.

LEE ,E. Y; SHIN, KYOUNG-JIN ; RAKHA ,A; JEONG ;SIM ,J.E; EUN A, MYUNG JIN PARK A, NA YOUNG KIM A, WOO ICK YANG A, HWAN YOUNG LEE Analysis of 22 Y chromosomal STR haplotypes and Y haplogroup distribution in Pathans of Pakistan a *Forensic Science International: Genetics* 11 (2014) 111–116

LEITE FP, CALLEGARI-JACQUES SM, CARVALHO BA, KOMMERS T, MATTE CH, RAIMANN PE, et al. Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations. *Am J Hum Biol.* 2008;20(3):359-63.

LESSIG,R J. EDELMANN, J. DRESSLER, M. KRAWCZAK, Haplotyng of Y-chromosomal short tandem repeats DYS481, DYS570, DYS576 and DYS643 in three Baltic populations, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 2* (2009) 429–430.

LIMA, L.O. Direito médico – Utilização de polimorfismo em Análises forenses. Edição: 2006. Disponível em: <<http://www.geneticaffcmpa.fch.br>>. Acesso em: fev.2010.

LINCOLN, P.J; THOMSON,J. *Methods in molecular biology-Forensic DNA profiling protocols.* 1998 Humana Press. Totowa, N.J.

MAGALHÃES, I.M; SILVA, D.M. Informações acerca de marcadores moleculares uniparentais: DNA mitocondrial e cromossomo Y. *Estudos Biol*, v.28, n.63, p.81-88, abr./jun.2006

MANTA, F.S.N. Desenvolvimento e Validação de sistemas multiplex de tipagem para identificação humana por DNA. 2008.132f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Médicas, UERJ, Rio de Janeiro, 2008.

MARTINS, T.M.V. Y-miniSTR: alternativa para a análise de amostras “complicadas” Estudo da população do Norte de Portugal. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Forenses). Universidade do Porto. Portugal, 2008.

MAYBRUCK, J. E. HANSON, J. BALLANTYNE, B. BUDOWLE, P. FUERST, A comparative analysis of two different sets of Y-chromosome short tandem repeats (Y-STRs) on a common population panel, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2009) 11–20.

MAYNTZ-PRESS KA, SIMS LM, HALL A, BALLANTYNE J. Y-STR profiling in extended interval (> or = 3 days) postcoital cervicovaginal samples. *J Forensic Sci.* 2008; 53(2):342-8.

McKUSICK, V.A. *A Tecnologia do DNA na Ciência Forense.* FUNPEC – RP Editora, 1999.

MIELNIK-SIKORSKA M, DACA P, WOZ'NIAK MARCIN, BORIS A, MALYARCHUK, BEDNAREK J, DOBOSZ T, GRZYBOWSKI T, Genetic data from Y chromosome STR and SNP locos in Ukrainian population. *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 200–203.

MORETI, T. Identificação humana: Uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina. 145f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Santa Catarina, 2009..

MORRAL N, ESTIVILL X. Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene. *Genomics.* 1992; 13:1362-1364.

MULIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase –catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155,355-50.

N. LEAT, L. EHRENREICH, M. BENJEDDOU, K. CLOETE, S. DAVISON, Properties of novel and widely studied Y-STR locos in three South African populations, *Forensic Sci. Int.* 168 (23) (2007) 154–161. NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST), Recent Developments in Y-Short tandem repeat and Y-Single nucleotide polymorphism analysis, *Forensic Sci Rev* 15 (2003) 91-111.

NEI M, (1973) Analysis of Gene Diversity in subdivides populations, *Procedures Natural Academy Sciences* **70**(12) 3321-3323.

NEI M. *Molecular evolutionary genetics.* New York: Columbia University Press; 1987. x, 512 p.

NORDGREN, A. Genetics and Identify. *Community Genetics*, vol. 11, p. 252-266, 2008.



NUNES AC, SILVA DA, TEIXEIRA MA, NUNES DD, LOPES CM, NETTO OR, GUSMÃO L, CARVALHO EF, MOURA MM. Y chromosome comparative analysis of Rondônia with other Brazilian populations. *Leg Med (Tokyo)*. 2011; 13(3):161-3.

PALHA T, GUSMÃO L, RIBEIRO-RODRIGUES E, GUERREIRO JF, RIBEIRO-DOS-SANTOS A, SANTOS S. Disclosing the Genetic Structure of Brazil through Analysis of Male Lineages with Highly Discriminating Haplotypes. *PLoS One*. 2012; 7(7):e40007.

PALHA T, RIBEIRO-RODRIGUES E, RIBEIRO-DOS-SANTOS A, SANTOS S. Fourteen short tandem repeat locos Y chromosome haplotypes: Genetic analysis in populations from northern Brazil. *Forensic Science International: Genetics* 6 (2012) 413–418.

PALHA TEJ, RODRIGUES EM, DOS SANTOS SE. Y-chromosomal STR haplotypes in a population from the Amazon region, Brazil. *Forensic Sci Int*. 2007;166(2-3):233-9.

PALHA TJ, RIBEIRO-RODRIGUES EM, RIBEIRO-DOS-SANTOS A, GUERREIRO JF, DE MOURA LS, SANTOS S. Male ancestry structure and interethnic admixture in African-descent communities from the Amazon as revealed by Y-chromosome Strs. *Am J Phys Anthropol*. 2011; 144(3): 471-478.

PARADELA, R.E.; FIGUEIREDO, S.L .O DNA vai ao tribunal: O impacto das tipagens genéticas. In: Âmbito Jurídico. Disponível em: <<http://www.ambitojuridico.com.br/pdfsGerados/artigos/1790.pdf>> Acesso em: fev.2010.

PARK, M. J ; LEE, H. Y; UKHEE,C; SEUNG-CHUL, K AND KYOUNG-JIN, S. Y-STR analysis of degraded DNA using reduced-size amplicons. *Int J Legal Med* (2007) 121:152–157.

PARSON W, NIEDERSTATTER H, BRANDSTATTER A, BERGER B, Improved specificity of Y-STR typing in DNA mixture samples, *Int J Legal Med* 117 (2003) 109-114.

PARSON W, NIEDERSTATTER H, KOCHL S, STEINLECHNER M, BERGER B, When Autosomal ShortTandem Repeats Fail: Optimized Primer and Reaction Design for Y-chromosome Shor Tandem Repeat Analysis in Forensic Casework, *Croatian Medical Journal* 42 (2001) 285-287.

PARVATHY S, GEETHA A, JAGANNATH C, Haplotype analysis of the polymorphic 17 YSTR markers in Kerala nontribal populations. *Mol Biol Rep* (2012) 39:7049–7059.

PASCALI VL, DOBOSZ M, BRINKMANN B, Coordinating Y-chromosomal STR research for the Courts, *Int J Legal Med* 112 (1998) 1.

PAULA ,K. A. A. DE. Análise molecular com Y-STRS em amostras biológicas sem espermatozoides coletadas de vítimas de estupro.2012.78f. Dissertação (Mestre em ciências genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília 2012.

PEREIRA R, MONTEIRO E, HIRSCHFELD G, WANG A, GRATTAPAGLIA D. Haplotype diversity of 17 Y-chromosome STRs in Brazilians. *Forensic Sci Int.* 2007; 171: 226–236.

PFEIFFER H, HUHNE J, SEITZ B, BRINKMANN B. Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth, *Int J Legal Med* 112 (1999) 142-144.

PIGLIONICA M, BALDASSARRA SL, GIARDINA E, STELLA A, D'OVIDIO FD, FRATI P, et al. Population data for 17 Y-chromosome STRs in a sample from Apulia (Southern Italy). *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7(1):e3-4.

PONTES ML, CAINÉ L, ABRANTES D, LIMA G, PINHEIRO MF. Allele frequencies and population data for 17 Y-STR locos (AmpF $\mathbb{I}$ STR $\mathbb{R}$  Y-filer $\mathbb{T}$ M) in a Northern Portuguese population sample. *Forensic Sci Int.* 2007; 170: 62–67.

PRAK, E.T.; KAZAZIAN, H. Jr. (2000). Y Chromosome- specific short tandem repeats in forensic casework *Croat Med J.* 2002;42: 288-291.

PRINZ M, BOLL K, BAUM H, SHALER B, MULTIPLEXING of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples, *Forensic Sci Int* 85 (1997) 209-218.

PRINZ M, ISHII A, COLEMAN A, BAUM HJ, SHALER RC. Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex. *Forensic Sci Int.* 2001;120(3):177-88. PROMEGA Corporation, PowerPlex Y Haplotype Database.

RASHED ALGHAFRI, WILL GOODWIN, ARWIN RALF, MANFRED KAYSER, SIBTE HADI A novel multiplex assay for simultaneously analysing 13 rapidly mutating Y-STRs *Forensic Science International: Genetics* 17 (2015) 91–98

REDD AJ, AGELLON AB, KEARNEY VA, CONTRERAS VA, KARAFET T, PARK H, DE KNIJFF P, BUTLER JM, HAMMER MF, Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome, *Forensic Sci Int* 130 (2002) 97-111.

RODENBUSCH, R. Frequências e distribuição haplotípica de STRs do Cromossomo Y em indivíduos do Rio Grande do Sul. 2008. 62f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina, UFRGS, Rio Grande do Sul, 2008.

ROEWER L, ARNEMANN J, SUPURR NK, GRZESCHIK KH, EPPLEN JT (1992). Simple repeat sequence on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *In: Hum Genet* **89:389-394**.

ROEWER L, KAYSER M, DE KNIJFF P, ANSLINGER K, BETZ A, CAGLIA A, CORACH D, FUREDI S, HENKE L, HIDDING M, KARGEL HJ, LESSIG R, NAGY M, PASCALI VL, PARSON W, ROLF B, SCHMITT C, SZIBOR R, TEIFEL-GREDING J, KRAWCZAK M, A new method for the evaluation of matches in non-recombining genomes: application to Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes in European males, *Forensic Sci Int* 114 (2000) 31-43.

ROEWER L, KAYSER M, DIELTJES P, NAGY M, BAKKER E, KRAWCZAK M, DE KNIJFF P, Analysis of molecular variance (AMOVA) of Y-chromosome-specific microsatellites in two closely related human populations, *Human Molecular Genetics* 5 (1996) 1029-1033.

ROEWER L, KRAWCZAK M, WILLUWEIT S, NAGY M, ALVES C, AMORIM A, ANSLINGER K, AUGUSTIN C, BETZ A, BOSCH E, CAGLIA A, CARRACEDO A, CORACH D, DEKAIRELLE A-F, DOBOSZ T, DUPUY BM, FUREDI S, GEHRIG C, GUSMAO L, HENKE J, HENKE L, HIDDING M, HOHOFF C, HOSTE B, JOBLING MA, KARGEL HJ, DE KNIJFF P, LESSIG R, LIEBEHERR E, LORENTE M, MARTINEZ-JARRETA B, NIEVAS P, NOWAK M, PARSON W, PASCALI VL, PENACINO G, PLOSKI R, ROLF B, SALA A, SCHMIDT U, SCHMITT C, SCHNEIDER PM, SZIBOR R, TEIFEL-GREDING J, KAYSER M, Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes, *Forensic Sci Int* 118 (2001) 106-113.

ROEWER L, KRAWCZAK M, WILLUWEIT S, NAGY M, ALVES C, AMORIM A, ANSLINGER K, AUGUSTIN C, BETZ A, BOSCH E, CAGLIA A, CARRACEDO A, CORACH D, DEKAIRELLE A-F, DOBOSZ T, DUPUY BM, FUREDI S, GEHRIG C, GUSMAO L, HENKE J, HENKE L, HIDDING M, HOHOFF C, HOSTE B, JOBLING MA, KARGEL HJ, DE KNIJFF P, LESSIG R, LIEBEHERR E, LORENTE M, MARTINEZ-JARRETA B, NIEVAS P, NOWAK M, PARSON W, PASCALI VL, PENACINO G, PLOSKI R, ROLF B, SALA A, SCHMIDT U, SCHMITT C, SCHNEIDER PM, SZIBOR R, TEIFEL-GREDING J, KAYSER M, Online reference database of RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; RAMPIM, L.; CARVALHO,V.P.; RUAS, E.A.; SERA, T. Genetic relationship in Coffea species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. *Genetics and Molecular Biology*, v.26, n.3, p.319-327, 2003.

RUFENG BAI, ZHONG ZHANG, QUANZENG LIANG, DI LU, LI YUAN, XUE YANG, MEI SEN SHI Haplotype diversity of 17 Y-STR locos in a Chinese Han population sample from Shanxi Province, Northern China. *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 214–216

SCHNEIDER PM, BENDER K, MAYR WR, PARSON W, HOSTE B, DECORTE R, CORDONNIER J, VANEK D, MORLING N, KARJALAINEM M, CARLOTTI CM, SABATIER M, HOHOFF C, SCHMITTER H, PFLUG W, WENZEL R, PATZELT D, LESSIG R, DOBROWOLSKI P, O'DONNELL G, GARAFANO L, DOBOSZ M, DE KNIJFF P, MEVAG B, PAWLOWSKI R, GUSMAO L, VIDE MC, ALONSO AA, FERNANDEZ OG, NICOLAS PS, KIHLLGREEN A, BAR W, MEIER V, TEYSSIER A, COQUOZ R, BRANDT C, GERMANN U, GILL P, HALLETT J, GREENHALGH M, STR analysis of artificially degraded DNA – results of a collaborative exercise, *Forensic Sci Int* 139 (2004) 123-134.

SCHNEIDER PM, BENDER K, MAYR WR, PARSON W, HOSTE B, DECORTE R, CORDONNIER J, VANEK D, MORLING N, KARJALAINEM M, CARLOTTI CM, SABATIER M, HOHOFF C, SCHMITTER H, PFLUG W, WENZEL R, PATZELT D, LESSIG R, DOBROWOLSKI P, O'DONNELL G, GARAFANO L, DOBOSZ M, DE KNIJFF P, MEVAG B, PAWLOWSKI R, GUSMAO L, VIDE MC, ALONSO AA, FERNANDEZ OG, NICOLAS PS, KIHLLGREEN A, BAR W, MEIER V, TEYSSIER A, COQUOZ R, BRANDT C, GERMANN U, GILL P, HALLETT J, GREENHALGH M, STR analysis of artificially degraded DNA – results of a collaborative exercise, *Forensic Sci Int* 139 (2004) 123-134.

SCHNEIDER PM, D'ALOJA E, DUPUY BM, ERIKSEN B, JANGBLAD A, KLOOSTERMAN AD, KRATZER A, LAREU MV, PFITZINGER H, RAND S, SCHEITHAUER R, SCHMITTER H, SKITSA I, SYNDERCOMBE-COURT D, VIDE MC, Results of a collaborative study regarding the standardization of the Y-linked STR system DYS385 by the European DNA Profiling (EDNAP) group, *Forensic Sci Int* 102 (1999) 159-165.

SCHWENGBER SP, KOMMERS T, MATTE CH, RAIMANN PE, CARVALHO BA, LEITE FP, et al. Population data of 17 Y-STR locos from Rio Grande do Sul state (South Brazil). *Forensic Sci Int Genet.* 2009;4(1):e31-3.

SHI M, BAI R, YU X, LV J, HU B. Haplotype diversity of 22 Y-chromosomal STRs in a southeast China population sample (Chaoshan area). *Forensic Sci Int Genet.* 2009;3(2):e45-7.

SIBILLE I, DUVERNEUIL C, DE LA GRANDMAISON GL, GUERROUACHE K, TEISSIERE F, DURIGON M, DE MAZANCOURT P, Y-STR DNA amplification as biological evidence in sexually assaulted female victims with no cytological detection of spermatozoa, *Forensic Sci Int* 125 (2002) 212-216.

SILVA, C. I.V. da. *Metodos Estatísticos para análise de Y-STRsem Genética Forense. Mestrado em Bioestatística 2011. UNIVERSIDADE DE LISBOA.FACULDADE DE CIÊNCIAS DEPARTAMENTO DE ESTATÍSTICA E INVESTIGAÇÃO OPERACIONAL*

SILVA, L.A.F.; PASSOS, N.S. *DNA Forense – Coleta de amostras biológicas em locais de crimes para estudo do DNA. Maceió: UFAL, 2006. 48 p.*

STRACHAN, T; READ, A.P. (2002) *Sinauer Associates Inc Publishers, Sunderland Masschussets.Genética Molecular Humana. Trad. Henrique Bunselmeyer Ferreira et al. 2º ed. Porto Alegre: Artmed Editora.*

SUBRAMANIAN S, MISHRA RK, SINGH L, *Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. Genome Biology* 4 (2003) R13.

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

The PowerPlex® Y23 System: A New Y-STR Multiplex for Casework and Database Applications 2012. Available from: <http://www.promega.com.br/resources/profiles-in-dna/2012/the-powerplex-y23-system-a-new-y-str-multiplex-for-casework-and-database-applications/?origUrl=http%3a%2f%2fwww.promega.com%2fresources%2fprofiles-in-dna%2f2012%2fthe-powerplex-y23-system-a-new-y-str-multiplex-for-casework-and-database-applications%2f>.

THOMPSON J, EWING M, FRANK W , POGEMILLER J, NOLDE C, KOEHLER J , ALYSSANDRA M. SHAFFER D, DAWN R. RABBACH A, PATRICIA M. FULMER A, CYNTHIA J. SPRECHER A, DOUGLAS R. Developmental validation of the PowerPlex1 Y23 System: A single multiplex Y-STR analysis system for casework and database samples *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 240.

TSUKADA K, TAKAYANAGI K, ASAMURA H, OTA M, FUKUSHIMA H, Multiplex short tandem repeat typing in degraded samples using newly designed primers for the TH01, TPOX, CSF1PO and vWA locos, *Legal Med* 4 (2002) 239-245.

TUCUNDUVA NETTO O, A. SILVA D, SILVA TD; Manta, F; AZEVEDO L; NUNES A; CARVALHO E; MOURA M. Statistical analyses of 10 short tandem repeat locos in Brazilian populations from Porto Velho City, Rondonia State for forensic purposes. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1 (2008) 375–377

URSZULA ROGALLA , MARCIN WOZ'NIAK, JACEK SWOBODZIN' SKI, MIROSLAVA DERENKO, BORIS A. MALYARCHUK, IRINA DAMBUEVA, MAREK KOZIN' SKI , JACEK KUBICA D, TOMASZ GRZYBOWSK. A novel multiplex assay amplifying 13 Y-STRs characterized by rapid and moderate mutation rate *Forensic Science International: Genetics* 15 (2015) 49–55

VERMEULEN M, WOLLSTEIN A, VAN DER GAAG K, LAO O, XUE Y, WANG Q, et al. Improving global and regional resolution of male lineage differentiation by simple single-copy Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms. *Forensic Sci Int Genet.* 2009;3(4):205-13.

W. WEI, Q. AYUB, Y. XUE, C. TYLER- SMITH, A. Comparison of Y- chromosomal lineage dating using either resequencing or Y-SNP plus Y-STR genotyping, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 7 (6) (2013) 568–572.

WATSON JD, CRICK FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribonucleic acid. *Nature* 1953;171:737-8

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, A.; LOSICK, R. *Biologia Molecular do gene*. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2006. 706 p.

WEBER JL, RIESS O, WOLFF G, ANDREW S, COLLINS C, GRAHAM R, et al. Delimitation of a 50 kilobases segment containing the recombination site in a sporadic case of Huntingtons disease. *Nature genetics.* 1992; 2: 216-222.

WEIR, B. S. (1996) *Genetic Data analysis II. Methods for Discrete Population Genetic Data*.

WHITAKER JP, CLAYTON TM, URQUHART AJ, MILLICAN ES, DOWNES TJ, KIMPTON CP, GILL P, Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples, *Biotechniques* (1995) 670-677.

WIEGAND P, KLEIBER M, Less is more – length reduction of STR amplicons using redesigned primers, *Int J Legal Med* 114 (2001) 285-287.

WIEGAND P, KLEIN R, BRAUNSCHWEIGER G, HOHOFF C, BRINKMANN B, Short amplicon STR multiplex for stain typing, *Int J Legal Med* 120 (2006) 160-164.

WILLUWEIT S, ROEWER L, Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update, *FSI: Genetics* 1 (2007) 83-87.

WOLFGRAMM EEV, SILVA BC, AGUIAR VR, MALTA FS, DE CASTRO AM, FERREIRA AC, et al. Genetic analysis of 15 autosomal and 12 Y-STR locos in the Espirito Santo State population, Brazil. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;5(3):e41-3.

YHRD, Y Chromosome Haplotype Reference Database. <http://www.yhrd.org>





# ANEXOS