



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO  
ESTADO DO ESPIRITO SANTO PARA  
ANÁLISES FORENSES DE Y-STRs**

VICTOR SANTOS STANGE

Vitória  
2019

VICTOR SANTOS STANGE

**CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO  
ESTADO DO ESPIRITO SANTO PARA  
ANÁLISES FORENSES DE Y-STRs**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) - ponto focal Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de doutorado. Orientador: Prof. Dr. Iuri Drumond Louro

VITÓRIA

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

S784c Stange, Victor Santos, 1985-  
Caracterização da população do Estado do Espírito Santo para análises forenses de Y-STRs / Victor Santos Stange. - 2019.  
81 f. : il.

Orientador: Iuri Drumond Louro.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Biotecnologia. 2. Genética Forense. 3. Genética molecular humana. I. Louro, Iuri Drumond. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

# VICTOR SANTOS STANGE

## **CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO ESPIRITO SANTO PARA ANÁLISES FORENSES DE Y-STRs**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em 07 de janeiro de 2019.

### COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

---

Prof. Dr. Antônio Alberto Ribeiro Fernandes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
RENORBIO

---

Prof. Dra. Flávia de Paula  
Universidade Federal do Espírito Santo  
RENORBIO

---

Prof. Dra. Valéria Fagundes  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro externo

---

Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho  
Universidade Estadual do Rio de Janeiro  
Membro externo

## **AGRADECIMENTOS**

À UFES e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, vinculado à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), pela possibilidade de desenvolver esse trabalho e conceder a titulação de Doutor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro referente ao desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Ao orientador Lúri Drumond Louro, pela orientação, compreensão e apoio.

Às professoras Flávia de Paula e Valéria Fagundes e ao professor Antônio Alberto R. Fernandes, por aceitarem compor a banca examinadora e contribuírem com seu conhecimento para o aprimoramento do trabalho.

Ao Professor Elizeu F. de Carvalho, por, além de compor a banca, ter permitido o aprendizado de Genética de Populações e Estatística no LDD (UERJ). Em especial à Professora Leonor Gusmão que propiciou tais ensinamentos de maneira próxima e atenciosa.

À Raquel Reis e Fernanda Mariano por todo o auxílio durante a realização deste trabalho e durante as etapas de desenvolvimento desde o projeto à construção dessa Tese.

A todos os amigos do NGHМ e da BIOTEC que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de DNA Forense da PC-ES pelo auxílio, dedicação, discussão e compreensão durante todo esse tempo transcorrido durante o doutoramento.

Aos meus pais, Alfredo e Ana, pelo incentivo irrestrito aos estudos, dedicação durante toda minha vida, pelo amor e por sempre me propiciarem tudo para o desenvolvimento da minha educação da melhor forma possível.

À Clara, minha esposa, amor, amiga e companheira, por me apoiar e ser verdadeira quando da necessidade de pisar no freio ou acelerar. Obrigado pela paciência e por toda ajuda, direta ou indiretamente. Tenho a certeza de poder contar sempre com você!

## **ESTRUTURA DA VERSÃO DA TESE**

Esta versão da Tese está organizada em formato de artigo científico e de acordo com o exigido pelo regimento desse programa - com a comprovação de submissão de, pelo menos, dois artigos em periódicos Qualis B1 ou superior, sendo pelo menos 1 como primeiro autor e 1 como coautor.

As Referências Bibliográficas desta Tese contemplam apenas as informações descritas na Introdução e Revisão de Literatura.

## RESUMO

STANGE, V.S., **Caracterização da População do Estado do Espírito Santo para Análises Forenses de Y-STRs**. 2019. 81f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O Estado do Espírito Santo foi historicamente marcado por diversos influxos migratórios desde 1535, e isso afetou diretamente a demografia da sua população. A falta de dados e uma quantidade limitada de haplótipos publicados para caracterizar a população atual do Espírito Santo, especialmente quando se trata de Y-STRs, incentivaram a realização deste estudo. Através da identificação genética de uma amostra cerca de 5 vezes maior do que a amostra disponível no banco de dados para estudos forenses de vínculo de parentesco e investigação criminal, utilizaram-se os 27 *loci* Y-STR presentes no *kit Yfiler Plus*<sup>®</sup> para realizar inferências nas 409 amostras coletadas no Estado, divididas em quatro macrorregiões. Testes estatísticos populacionais ( $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$  e Análise de Variância Molecular- AMOVA) foram realizados para medir as distâncias genéticas entre os indivíduos e possíveis subpopulações. Apesar das amostras da população geral do ES não apresentarem diferenças genéticas nas quatro macrorregiões analisadas, nem quando comparadas às outras populações brasileiras, foi encontrada no trabalho uma subpopulação de descendentes da Pomerânia que apresentou perfil genético significativamente diferente das subpopulações vizinhas e até mesmo da subpopulação não pomerana do ES (variação de 2,32% em AMOVA). A análise das distâncias genéticas mostrou grande proximidade da subpopulação pomerana com os europeus (alemães e poloneses), enquanto que a população geral do ES mostrou-se mais próxima de outras populações brasileiras. Observou-se que a população pomerana é geneticamente muito mais próxima dos europeus da Alemanha e mais semelhante à população polonesa do que a própria população alemã, demonstrando a influência dos imigrantes na composição da população do ES. Sugere-se a adoção de um banco de dados específico para a comunidade pomerana ou a utilização de fatores estatísticos de correção para a estrutura dessa subpopulação quando forem realizadas análises forenses envolvendo este grupo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Haplótipos Y-STR, Estado do Espírito Santo, pomeranos, distâncias genéticas, ancestralidade.

## ABSTRACT

STANGE, V.S., **Population Characterization of the Espírito Santo State for Y-STRs Forensic Analysis**. 2019. 81f. Thesis (PhD in Biotechnology) - Postgraduation Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil.

The Espírito Santo state has been characterized by several migration events since 1535, which directly affected the demography of its population. The lack of data and a limited disclosure of haplotypes to characterize the current population of Espírito Santo, especially when related to Y-STRs, motivated this study. Through the genetic identification of samples 5 times larger than the one publicly available for studies about forensic kinship and criminal investigation, the Yfiler Plus® kit 27 Y-STR *loci* were used to make inferences in 409 samples collected in the State, divided into four macro regions. Population statistical tests ( $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$  and Molecular Variation Analysis - AMOVA) were performed to measure genetic distances among individuals and possible subpopulations. Although the general ES population did not present significant genetic differences among four macroregions, or when compared to other Brazilian populations, a subpopulation of Pomerania descendants was found to have a significantly distinct genetic profile from the neighboring subpopulations and even of the non-Pomeranian subpopulation of ES (variation of 2.32% in AMOVA). Genetic distances analysis showed a high proximity of the Pomeranian subpopulation with Europeans (Germans and Polish) and a high proximity of the general ES population with other Brazilian populations. The Pomeranian population is genetically much closer to Europeans from Germany and more similar to the Polish population than the German population itself, demonstrating an immigrant's influence in the composition of the population of Espírito Santo. Therefore, we suggested the creation of a specific database for the Pomeranian community or the use of statistical correction factors for this subpopulation in forensics analysis.

**KEYWORDS:** Y-STR haplotypes, Espírito Santo State, pomeranians, genetic distances, ancestry.



# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>08</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>10</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
4.1 AMOSTRAS .....	25
4.2 COMPOSIÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL .....	26
4.3 SIGILO E ASPECTOS ÉTICOS .....	26
4.4 EXTRAÇÃO DO DNA .....	27
4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – POLYMERASE CHAIN REACTION) .....	27
4.6 ELETROFORESE CAPILAR E PARÂMETROS DE CORRIDA .....	28
4.7 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS .....	30
4.8 ANÁLISES EM GENÉTICA POPULACIONAL .....	30
<b>5 MANUSCRITOS DERIVADO DA TESE</b> .....	<b>31</b>
5.1 Stratification among European descent and admixed Brazilian populations of Espírito Santo for 27 Y-STRs.....	32
5.2 A view of the maternal inheritance of Espírito Santo populations: the contrast between Admixed and Pomeranian descendant groups .....	43
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>61</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>62</b>
<b>9 ANEXOS</b> .....	<b>70</b>
I COMPROVANTES DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITOS .....	70
II TABELA GERAL DE FREQUENCIAS ALÉLICAS .....	72
III TABELA S1 – HAPLÓTIPOS ANALISADOS .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

A Genética Forense representa uma importante área das ciências forenses, apresentando um papel ímpar na resolução de casos relacionados a investigações de paternidade, identificação genética e análise de vestígios biológicos em criminalística (PINHEIRO, 2010). A partir dos estudos de Jeffreys e colaboradores, em 1985, passou-se a utilizar o DNA como marcador molecular, através da técnica de DNA *fingerprinting*. A descoberta de determinadas regiões no genoma humano que se repetiam por diversas vezes, de maneira a variar em número e apresentavam alta diversificação entre indivíduos, possibilitou a realização de testes de identificação humana (BUTLER, 2010).

Apenas um ano após de sua descoberta, a análise de marcadores genéticos foi aplicada em um caso forense pela primeira vez, permitindo a identificação do estuprador e assassino de duas jovens no Reino Unido (MORETI, 2009). A partir de então, a disseminação da técnica molecular mostrou alta capacidade de aplicação tanto na vertente cível, por meio dos testes de paternidade, quanto na esfera criminal, usada na identificação de corpos em desastres em massa, covas coletivas e até mesmo para solução de casos envolvendo a criminalística.

Neste sentido, os marcadores de DNA deram uma nova perspectiva aos estudos forenses e de variabilidade genética em nível molecular, sendo amplamente utilizados em diferentes casos e aplicados inclusive, na identificação humana individual e nos estudos populacionais (CARRACEDO et al., 2010; PINTO et al., 2013).

Os trabalhos que envolvem a composição genética das diferentes populações humanas ocupam um lugar de destaque na ciência, e diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de identificar os perfis de ancestralidade, a origem geográfica, as diferenças intra e interpopulacionais, os graus de diferenciação genética e a formação de diversas etnias que podem constituir uma população (CHUNG & FUNG, 2013; WEI et al., 2013).

Os estudos moleculares em populações brasileiras demonstram que há grande diversidade genética entre grupos de indivíduos de uma mesma região, que é negligenciada em estudos que comparam populações de regiões diferentes (BARCELOS et al., 2006; GODINHO et al., 2008). Esta diversidade pode ser

avaliada pela forma de distribuição das frequências alélicas de determinados marcadores moleculares, permitindo-se estimar o nível de divergência entre as populações. A causa da variabilidade pode ser decorrente de diversos fatores, entre eles, destacam-se os fluxos migratórios como um dos mais impactantes (DALTON, 2010). Outro importante fator responsável por promover pequenas mudanças nas frequências alélicas de uma população consiste nas variações decorrentes de mutações, com uma maior ou menor taxa de ocorrência (SOARES VIEIRA et al., 2008; DE ANDRADE et al., 2009).

Desse modo, observa-se um direcionamento científico para a utilização de marcadores moleculares em análises de populações humanas, com o objetivo de determinar a prevalência dos alelos na população em estudo e analisar a sua composição genética para, assim, inferir os possíveis processos de colonização e migração (CAVALLI-SFORZA & FELDMAN, 2003).

O Brasil tem um território de dimensões continentais e é dividido em cinco regiões geográficas, cada uma delas com uma complexa e variada composição étnica de sua população. A alta diversidade de sua população é resultante de diferentes graus e modelos de miscigenação, principalmente entre os nativos, os europeus e os africanos (OLIVEIRA et al., 2014).

No Estado do Espírito Santo os estudos populacionais são escassos e há poucos dados moleculares sobre as linhagens dos seus habitantes. Assim, estudos genéticos populacionais baseados em amostras numerosas e representativas de regiões geopolíticas do Estado podem ser efetivos na caracterização e mapeamento das linhagens existentes, bem como de sua dinâmica populacional.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar, por meio de marcadores moleculares do cromossomo Y (Y-STRs), os perfis genéticos das populações do Estado do Espírito Santo, e determinar seu padrão de ancestralidade e suas características através da avaliação das distâncias genéticas quando comparadas com outras populações.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 O ESTADO DO ESPIRITO SANTO**

O Espírito Santo foi fundado em 23 de maio de 1535 pelo navegador português Vasco Fernandes Coutinho. Durante 25 anos o navegador foi donatário, realizando obras importantes na capitania, tais quais a construção das vilas de Vila Velha e Vitória. Também ergueu as duas primeiras igrejas locais, a Igreja do Rosário e a Igreja de São João. Foi responsável ainda pela construção dos primeiros engenhos de açúcar, principal produto da economia até 1850, quando foi substituída pelo café. Com a chegada de missionários por volta de 1555, foram fundadas novas localidades e foi construído o principal monumento religioso do Estado, o Convento da Penha (ESPIRITO SANTO - 2017).

O Espírito Santo está localizado na região Sudeste do Brasil, fazendo fronteira com o oceano Atlântico a leste, com o Estado da Bahia ao norte, Minas Gerais a oeste/noroeste e com o Estado do Rio de Janeiro ao sul. Estende-se por um território de 46.086,907 km<sup>2</sup>, compreendendo duas regiões naturais distintas: o litoral que se estende por 400 km e o planalto (IBGE-2010). Ao longo da costa litorânea, encontra-se uma faixa de planície que representa cerca de 40% da área total do Estado e, ao se deslocar direção ao interior, o planalto dá origem a uma região serrana, com altitudes superiores a 1.000 metros, conferindo temperaturas mais amenas.

Atualmente, passados cerca de 460 anos, o Estado está dividido em 112 municípios e possui uma população estimada de quatro milhões de pessoas. Dados do último censo (IBGE-2010) contabilizam uma população de 3.514.952 pessoas, densidade demográfica de 76,25 hab./km<sup>2</sup>, Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 0.740.

Situada na região metropolitana, Vitória, capital do Espírito Santo, possui hoje uma população de aproximadamente 358.000 habitantes. Sua economia está baseada nas atividades portuárias, no comércio e na prestação de serviços. Possui posição geográfica estratégica por possuir excelente infraestrutura logística, além de rodovias, ferrovia, um aeroporto e dois grandes portos (ESPIRITO SANTO - 2017).

A principal influência europeia no Espírito Santo se deu no início da colonização do Brasil, em meados do século XVI. Os portugueses, em disputa pela posse de terra, e os missionários europeus, até então responsáveis pela catequese dos índios e pela assistência religiosa aos colonos e seus familiares, foram, sem dúvida, o primeiro marco herdado do continente europeu (SALETTTO, 2011).

Durante o início do século XIX, o Brasil enfrentava problemas singulares, uma vez que necessitava de braços para movimentar suas riquezas pois o sistema de produção escravista começava a definhando. Também, a proibição do tráfico de escravos a partir de 1850, fez com que houvesse a escassez de mão-de-obra, não diferente do que ocorreu no Espírito Santo (FRANCESCHETTO, 2014).

Nesse período, com a finalidade de suprir a mão de obra e aumentar a ocupação territorial, o Espírito Santo recebeu grandes contingentes de imigrantes europeus. Na Europa ocorriam revoltas populares como consequência da unificação dos países que constituem, hoje, a Itália e a Alemanha. Esses conflitos geraram um grande empobrecimento da população, causando fome e falta de emprego o que fez ocorrer uma emigração em massa de suas populações para outros países.

O Espírito Santo é o resultado de uma mistura, um encontro de etnias que faz a sua história rica de tradição e costumes. A herança europeia está presente nas montanhas do interior do ES nas danças italianas, pomeranas, alemãs, holandesas e polonesas que resistem e renovam-se. Elas foram incorporadas à cultura popular capixaba (MEDEIROS, 2004).

Na região Serrana, porção central do Espírito Santo, a presença da ocupação Europeia é evidente. Destacam-se os municípios de Santa Leopoldina e Santa Maria de Jetibá, por possuírem localidades com denominações que homenageiam países e regiões da Europa como Suíça, Tirol, Holanda e Luxemburgo, bem como a preservação de suas línguas originais, tais quais o dialeto pomerano e o alemão, e a religião protestante propagada por Martin Lutero, também uma importante herança cultural (VENTORIM, 2018).

### 2.1.2 IMIGRAÇÃO E ASPECTOS ÉTNICOS DO ESPIRITO SANTO

Ao longo de vários anos, o Espírito Santo acolheu imigrantes de diversas partes da Europa, principalmente da Itália e da Alemanha que, juntamente com os portugueses, africanos e populações nativas de indígenas, deram origem aos principais traços étnicos do estado.

Dados de um censo realizado em 1789 mostram que a população indígena (5.729 habitantes) era superior à população livre de vilas como Vitória, Vila Velha e Guarapari somadas (4.930 habitantes) (FRANCESCHETTO, 2014). No início da colonização, como as mulheres europeias eram raras, as índias tornaram-se as mulheres dos colonos portugueses, cedidas a eles pelos indígenas aliados a fim de estabelecer relações de parentesco que cimentariam a aliança, formando assim numerosa prole de mestiços (SALETTI, 2011).

Pesquisas genéticas realizadas na Universidade Federal de Minas Gerais sobre as origens dos brasileiros brancos apontam que um terço (33%) dos brasileiros brancos da amostragem têm pelo menos uma ancestral índia, enquanto os ancestrais masculinos encontrados são quase exclusivamente europeus (PENA et al. 2000).

Certamente que não se pode, simplesmente, adotar esse valor para o Espírito Santo, porém é possível supor que os capixabas não se afastam muito do padrão brasileiro, tendo em vista que nos estados do sul do país, onde a imigração europeia foi mais marcante, a proporção de ancestrais índias encontrada entre os brancos foi de 24% (PENA et al. 2000).

A partir de 1621, o Espírito Santo começou a importar escravos diretamente da África de forma numerosa (DAEMON, 2010). Até então com a presença de africanos em Pernambuco e na Bahia, no Espírito Santo, onde havia “quatro ou cinco engenhos (...) o trabalho era realizado por índios.” (ANCHIETA, 1954).

No entanto, durante a segunda metade do século XVII, a transição para a escravidão africana se consolidou e a escravidão indígena declinou no Brasil. Porém, no censo de 1789, dados mostram que os escravos africanos constituíam quase 40% da população. O censo de 1824, registrando a existência de 35 mil habitantes na província, aponta para 13 mil (37%) o número de escravos (FRANCESCHETTO, 2014).

Desde sua proibição em 1830 até 1850, quando o governo imperial efetivamente aboliu o tráfico, a importação de escravos provenientes da África cresceu acentuadamente. Entretanto, nem mesmo a extinção do tráfico impediu que novamente o número de cativos quase dobrasse até 1872 (IBGE -1872), com seu declínio efetivo em 1890.

A escassez de mão de obra no Brasil e os conflitos que ocorriam na Europa, impulsionaram o fluxo migratório de estrangeiros para o país. O Espírito Santo se destacou por dispor de terras desocupadas e portos marítimo e fluvial bons para o acesso. A imigração atingiu seu auge em meados de 1890, com a entrada de pouco mais de 20 mil imigrantes, o que correspondia a quase 15% da população na época (ESPIRITO SANTO, 2017).

Durante o período imigratório, foi registrada a entrada de 54.155 imigrantes europeus (Tabela 1) com cerca de 36.666 cidadãos italianos, que constituíram a imensa maioria dos imigrantes (68,4%), 8.283 germânicos, eslavos e pomeranos, além de 8.843 ibéricos, franceses, portugueses e libaneses e uma minoria de outras etnias (FRANCESCHETTO, 2014).

#### Distribuição dos imigrantes Europeus de acordo com os grupos étnico-linguísticos

Grupos	Imigrantes	Percentual
Itálicos	37.029	70,2
Ibéricos	6.896	13,1
Germânico	6.231	11,8
Eslavos	2.052	3,9
Franceses, ingleses e outros	511	1,0

**Tabela 1** – Distribuição dos Imigrantes por grupo. Fonte: Adaptado de FRANCESCHETTO, 2014.

Diferentemente do que ocorreu nos estados vizinhos do Rio de Janeiro e Minas Gerais (Tabela 2), no Espírito Santo a imigração estrangeira teve um forte peso, e os imigrantes eram predominantemente de tipo claro e cabelos louros, da Europa Central e do norte da Itália (FRANCESCHETTO, 2014).

É notório que os imigrantes europeus do século XIX desempenharam um papel de fundamental importância na história capixaba e misturaram-se a estes, no

contexto histórico, índios, negros e outros imigrantes de diversas origens, tornando o Espírito Santo “um grande caldeirão racial” (MEDEIROS, 1997).

### População de não brancos nos estados (percentual)

	1872	1890	1940	1950	1960
Brasil	61,9	56,0	35,8	37,5	-
Distrito Federal, São Paulo, Região Sul	48,7	38,2	16,3	15,8	-
Espírito Santo	67,6	57,9	38,4	41,3	39,1
Rio de Janeiro	61,3	57,0	39,9	39,8	-
Minas Gerais	59,3	59,4	38,6	41,4	-

**Tabela 2** – Proporção de brancos na população por década. Fonte: Adaptado de “Recenseamentos Nacionais e HASENBALG, 2005”.

### 2.1.3 POMERANOS NO ESPIRITO SANTO

A história dos pomeranos (“*Po Morje*” que na língua *wende* significa ‘terra perto do mar’) inicia-se em 1856 com a fundação da Colônia Imperial de Santa Leopoldina (inicialmente Santa Maria). Por estar às margens do rio Santa Maria da Vitória, cuja foz dá-se junto à ilha de Vitória, essa colônia se tornou uma das maiores do Brasil imperial, sendo ocupada inicialmente por imigrantes suíços e alemães provenientes das fazendas de café paulistas.

A partir de 1867, o fluxo de germânicos se intensificou, coincidindo com o período de guerras que resultaram na unidade dos Estados alemães em 1871 (FRANCESCHETTO, 2014). Durante o período pós-unificação do Império Alemão (entre 1872 até 1918) (Figura 1), ocorreu o maior fluxo de entradas de alemães no Espírito Santo, totalizando 2.318 imigrantes (RÖLKE, 1996). Nos anos de 1872 e 1873, porém, verificou-se a entrada de 1.586 indivíduos desse total, com predominância de famílias oriundas das antigas províncias da Pomerânia e os poloneses da Prússia Ocidental (1.597 indivíduos, cerca de 79%



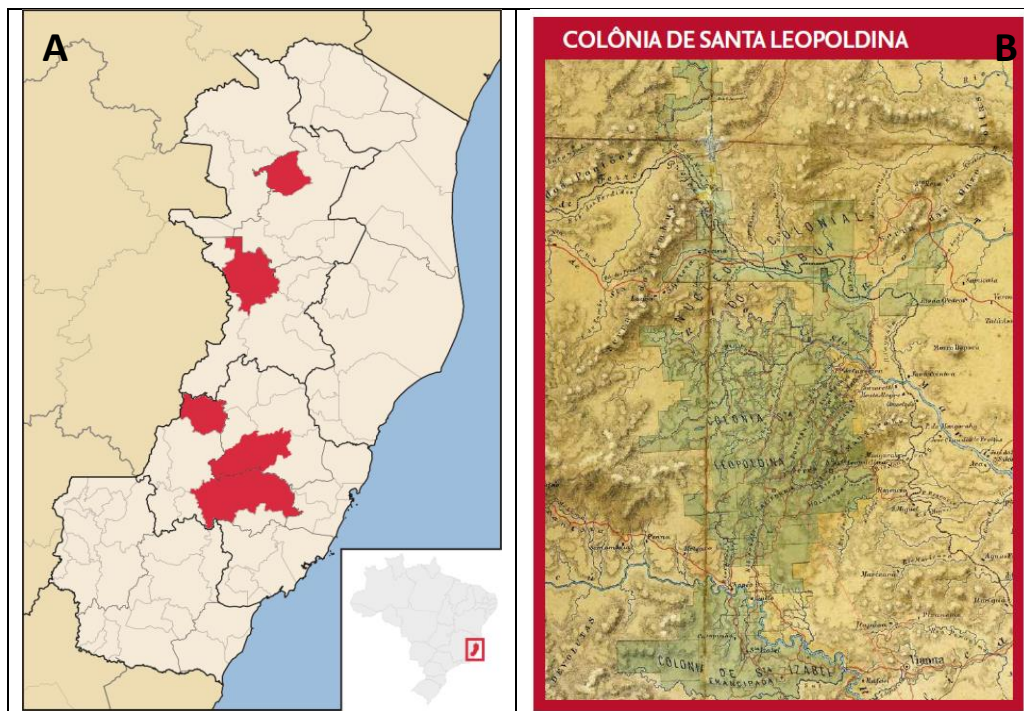
do total de eslavos). Outros 694 chegaram após 1919 ou foram registrados em documentos a partir desse ano (RÖLKE, 1996).



**Figura 1:** Mapa do império Germânico em 1871. (Fonte: Disponível em: <[http://home.wlu.edu/~patchw/His\\_214/index.htm](http://home.wlu.edu/~patchw/His_214/index.htm)>. Acessado em agosto de 2018.

No total, mais de 2.300 pomeranos se instalaram em terras do Espírito Santo ao longo do século XIX. Sendo os principais responsáveis por desbravar as localidades das regiões serrana e norte do Espírito Santo (Figura 2) e deixando descendentes presentes em quase vinte dos municípios do Estado.

*A saga da imigração pomerana no Espírito Santo, assim como no Brasil, é mais um capítulo de uma história de resistência, força e crença desse povo na possibilidade de uma vida sempre melhor, a partir do trabalho responsável e dedicado. Da antiga Pomerânia, que não mais existe como unidade geográfica na Europa, para uma diáspora intercontinental, ao longo dos séculos os pomeranos mantêm vivos os traços de sua identidade. (Paulo Hartung em GRANZOW, K. Pomeranos sob o Cruzeiro do Sul: colonos alemães no Brasil, 2009)*



**Figura 2:** A – Estado do Espírito Santo e municípios com colonização Pomerana; B- Mapa antigo da colônia de Santa Leopoldina (1878). (Fonte: A- *Gemeinden im Bundesstaat Espírito Santo, da Deutsch („Pommersch“) Co-Amstssprache ist*(Out, 2012) Disponível em <https://nds.wikipedia.org/wiki/Pomerano> e B – retirado de FRANCESCETTO, 2014.)

## 2.2 A GENÉTICA FORENSE

Na década de 80, a evolução na área das análises forenses usando material genético apresentava um progresso lento. A transição do uso de marcadores sorológicos para marcadores baseados em ácidos nucleicos representou um grande avanço para as investigações criminais (NIJ, 2000).

Nos mais de trinta anos que separam a criação da genética forense e a atualidade, os testes de DNA evoluíram e evoluem significativamente, de forma a se tornarem uma ferramenta imprescindível no apoio à Justiça. O desenvolvimento da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), o Projeto Genoma Humano, o Sequenciamento de Nova Geração e novas tecnologias, bem como a descoberta incessante de novos marcadores genéticos, tornaram possível a mecanização dos procedimentos e a obtenção de melhores resultados em menor tempo.

A identificação humana por DNA tornou-se uma importante ferramenta na resolução de casos envolvendo questões criminais e de paternidade (DOLINSKY e PEREIRA, 2007), além de ser tema de grande repercussão na sociedade.

Enquanto que no aspecto forense criminal a caracterização do perfil genético tem por objetivo limitar ou reduzir o número de indivíduos que poderiam contribuir com o material, no cível a caracterização do perfil genético objetiva resolver questões familiares de registro de paternidade ou sucessões familiares.

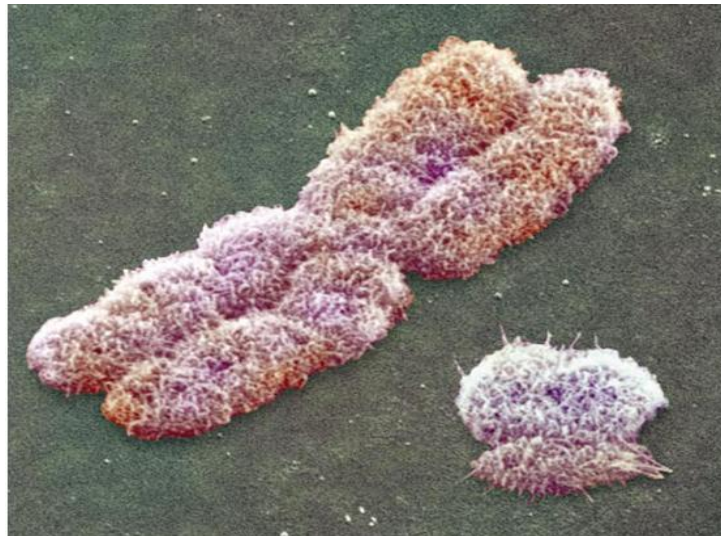
Os STRs (*short tandem repeats*) são os marcadores genéticos mais utilizados atualmente na área forense. Sua fácil e rápida amplificação por PCR, associada à possibilidade de analisar vários fragmentos numa única reação (*multiplex*) permitem acesso rápido aos resultados (GOODWIN et al., 2010). Sua característica de elevado grau de variabilidade na população, elevado poder de discriminação, elevadas taxas de mutação e a facilidade de interpretação dos resultados permitem obter respostas confiáveis e de maneira segura (KAYSER et al., 2004).

### **2.2.1 O CROMOSSOMO Y E SEUS STRs**

Cerca de 99,7% do patrimônio genético da nossa espécie é igual em todos os humanos. Aproximadamente 10 milhões de nucleotídeos (0,3%) correspondem à variação existente restante e são suficientes para tornar cada um de nós um ser único. É essa “porção” de variação o objeto central das análises forenses (MARTINS, 2008).

O cromossomo humano Y, segundo menor cromossomo humano (Figura 3), é composto por 60 megabases (Mb) contendo apenas 78 genes (JOBBLING et al., 2003). O gene SRY (*sex-determining region Y*) localizado neste cromossomo é responsável pela codificação da proteína TDF (*testis-determining factor*), a qual desencadeia o desenvolvimento dos testículos e, através de uma cascata hormonal, determina o sexo do feto.

Portanto, um embrião que herda o cromossomo Y desenvolve-se como um macho e, em sua ausência, desenvolve-se como uma fêmea. Este fato ocorre devido à presença dos genes determinantes do sexo no cromossomo Y e é de extrema importância no desenvolvimento das características masculinas (SINCLAIR et al., 1990).



**Figura 3** - Cromossomos Humanos - X (maior) e Y (menor), ampliação aproximada de 10.000 vezes (WILLARD, 2003)

A exclusividade masculina do cromossomo Y possibilita a utilização de marcadores genéticos específicos para este cromossomo como discriminadores na identificação de DNA masculino em amostras. Essa especificidade faz do cromossomo Y muito útil na genética forense, nos casos de vínculo de parentesco e principalmente em casos de violência sexual (BARALDI, 2008).

A metodologia atualmente utilizada na maioria dos laboratórios para identificação genética (parentesco ou forense) é a análise de sequências repetidas altamente polimórficas. Estas repetições são denominadas STR (*Short Tandem Repeats* ou Repetições Curtas em Tandem) e estão distribuídas ao longo de todo o genoma, tanto nos cromossomos autossômicos como nos sexuais (X e Y).

A maioria dos laboratórios forenses utiliza kits comerciais validados, através dos quais consegue-se proceder à amplificação simultânea de muitos *loci* STR, o que, além de proporcionar um excelente poder de discriminação, demanda uma pequena quantidade de amostra e economiza muito tempo. Com o desenvolvimento dos sistemas de amplificação em *multiplex*, passou-se a realizar a genotipagem simultânea de um grande número de STR em uma única reação de PCR.

O cromossomo Y é muito sensível à estruturação populacional (seleção e deriva)

e isso pode representar vantagens e desvantagens simultaneamente (REBALA et al. 2007). Além da haploidia que nos permite a genotipagem direta, uma das maiores vantagens do cromossomo Y é a sua transmissão de pai para filhos, permitindo definir toda uma linhagem patriarcal da família para estabelecer vínculos de parentescos (HANSON e BALLANTYNE, 2006, UNDERHILL et al. 2007, HELGASON et al. 2015).

Outra vantagem é a possibilidade da amplificação seletiva em misturas de células masculinas e femininas, utilizando marcadores específicos do cromossomo Y até na presença de elevados níveis de DNA feminino, como ocorre frequentemente em casos de violência sexual ou análise de DNA fetal circulante (DIEDERICHE et al. 2005, BALLANTYNE et al. 2012 e DIEGOLI, 2015).

Por fim, outra vantagem consiste na existência de diversos kits Y-STR comerciais e que permitem a homogeneização dos resultados e o cruzamento das informações dos bancos de dados de Y-STRs de diversos países no mundo (ROEWER, et al. 2009).

Prinz, em 2003, destacou como as principais desvantagens da utilização dos marcadores de Y-STR a inabilidade de distinção entre parentes provenientes da mesma linhagem masculina e as limitações na abordagem das frequências haplotípicas.

Apesar do poder de discriminação dos haplótipos Y-STR ser mais baixo do que os obtidos quando são usados STRs de cromossomos autossômicos, altas taxas de discriminação vêm sendo descritas em trabalhos forenses que oferecem metodologias baseadas na detecção de DNA (RM-STR) ou RNA (RT-PCR semiquantitativo, PCR em tempo real e *microarray*) (ROMERO-MONTOYA et al., 2011).

Existem duas grandes categorias de marcadores de DNA usados para estudar a diversidade do cromossomo Y: os *loci* bialélicos e os *loci* multialélicos. Utilizando os marcadores bialélicos é possível obter informações sobre os haplogrupos, enquanto que com os multialélicos, obter dados dos haplótipos (JOBILING, 2003 e UNDERHILL, 2007). Os marcadores bialélicos incluem os SNPs e elementos Alu, e são, devido à sua baixa taxa de mutação ( $\approx 10^{-8}$  a  $10^{-$



9 por geração), considerados eventos polimórficos únicos (SANCHEZ et al. 2004). Os marcadores multialélicos entretanto, incluem dois minissatélites e várias centenas de STRs, permitindo diferenciar os haplótipos do cromossomo Y com maior precisão quando comparado com os anteriormente descritos, tendo em vista que possuem taxas de mutação mais elevadas (1 em 10<sup>-3</sup>) (PEMBERTON et al. 2009). Os Y-STRs são os marcadores mais utilizados para fins forenses.

Outrossim, a ocorrência dessas mutações, aliadas à falta de recombinação intercromossômica no cromossomo Y, tem como resultado a organização seletiva dos marcadores, incluindo os polimorfismos. Esses processos auxiliam na concentração geográfica de variantes do Y, tornando assim uma ótima ferramenta nas investigações de genética de populações humanas (SANTOS et al., 2000; JOBLING & TYLER, 2000).

### **2.2.2 APLICAÇÃO NAS INVESTIGAÇÕES CRIMINAIS**

Os Y-STRs recentemente descritos, apresentam inúmeras características que lhes permitem o emprego nas análises forenses. O alto poder discriminatório, conferido por seu alto grau de polimorfismo e sua robustez durante as metodologias de análise laboratorial, lhes proporcionam uma eficiente e precisa genotipagem, com maior facilidade e rapidez (BUTTNER, 2010).

Embora os marcadores convencionais Y-STR identifiquem apenas linhagens masculinas, o desenvolvimento de metodologias que utilizam um conjunto de microssatélites altamente polimórficos, chamados Rapidly Mutating Y-STRs (RM-YSTRs), apresentam as características desejáveis para serem aplicados na diferenciação de indivíduos da mesma linhagem (REGO, 2015).

Esses RM-YSTRs apresentam taxas de mutação 10 vezes superiores às taxas de outros Y-STRs e, por consequência, são potencialmente capazes de diferenciar indivíduos com vínculo de parentesco próximo, pertencentes à mesma linhagem patrilínea. Essa alta capacidade de discriminação, confere vantagem na utilização desses loci em vestígios de crimes sexo-relacionados tendo em vista que muitos desses crimes ocorrem dentro do ambiente familiar

da vítima, permitindo assim identificar com certa precisão o real perpetrador e não somente sua linhagem.

Outra aplicação dos RM-YSTRs é na identificação de restos humanos, tanto em casos de acidentes em massa quanto em corpos putrefeitos ou carbonizados, possibilitando a comparação dessas amostras com familiares do sexo masculino provenientes da mesma linhagem paterna, incluindo irmãos. (KAYSER et al., 2012). Ainda, o reconhecimento de paternidade de restos fetais com alta degradação (parafinizados e formalinizados), onde os cromossomos autossômicos encontram-se muito mais degradados do que o cromossomo Y.

### **2.2.3 O DNA MITOCONDRIAL**

De maneira análoga ao DNA nuclear, o DNA mitocondrial (mtDNA) apresenta herança uniparental materna e pequenas taxas de recombinação (ELSON et al., 2001). Dessa forma, as linhagens de indivíduos com parentesco de origem materna apresentam haplótipos compartilhados de mtDNA (MONSON et al., 2002). Tal fato só é possível tendo em vista a características singular das mitocôndrias de serem as únicas organelas da célula eucariótica animal que apresentam DNA próprio e permanecem no zigoto durante o processo de embriogênese.

A utilização forense do DNA mitocondrial se iniciou em 1993 com os trabalhos de HOLLAND et al. e passou a fazer parte da rotina de laboratórios em todo o mundo, principalmente para amostras biológicas com decomposição avançada e alta degradação (carbonizados) além de fragmentos ósseos muito antigos (LUTZ et al., 1996). Tornou-se uma importante ferramenta também nos casos de investigação criminal de vínculo de parentesco (maternidade), aborto e identificação de restos humanos.

Como o mtDNA corresponde ao somatório de mutações acumuladas ao longo do tempo em determinada linhagem materna e que linhagens próximas compartilham entre si certas variantes, é possível realizar estudos populacionais

e de ancestralidade materna através do agrupamento dessas linhagens com base em seu ancestral comum mais recente (haplogrupos), remetendo a populações com origem geográfica específica (MITCHELL et al., 2015).

### 2.3 ANCESTRALIDADE MOLECULAR

A falta de recombinação na maioria da extensão das sequências dos cromossomos Y e X propiciou aos genes localizados nessas regiões uma evolução separada (FERNANDES, 2016). Essa evolução pode ter acontecido por etapas, tendo em vista que existem, nestas regiões, genes mais relacionados que outros, sugerindo que a ausência de recombinação entre eles iniciou-se mais cedo em uns que nos outros. Além disso, outros eventos como inversões, também estão envolvidos no final da recombinação (CLARK, 2014).

O padrão de variações que caracteriza o perfil genético de cada indivíduo representa fato extremamente importante na genética forense, sendo relacionado em estudos populacionais, que remetem à história das populações, intrinsicamente relacionadas à sua demografia, o que nos permite traçar possíveis movimentos migratórios, ancestralidade e colonizações (JOBLING, 2012).

A variação das frequências dos marcadores STRs na população (taxas de mutação), aliada a informações de como elas ocorrem *per locus* e usando amostragens representativas de distribuição populacional dos marcadores genéticos, os tornam candidatos perfeitos em várias aplicações (REGO, 2015). Desde estudos complexos de movimentos migratórios dos povos através do tempo, estudos de reconstrução antropológica por meio da origem remota dos indivíduos da população atual até a aplicações na ciência forense e na investigação de vínculos genéticos. Além desses marcadores serem altamente informativos na inferência da história das populações, podem ser utilizados para descobrir relações genealógicas e determinar a evolução através da linhagem masculina (DIEGOLI, 2015).



## 2.4 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE DADOS GENÉTICOS

Em genética de populações, a avaliação das taxas de mutação dos marcadores de cromossomo Y é particularmente importante na determinação da origem das linhagens paternas, e com muita relevância em estudos antropológicos. O conhecimento amplo dessas taxas é necessário para a interpretação mais correta dos dados relativos aos Y-STRs, sobretudo nas investigações de vínculo de parentesco (VIEIRA-SILVA, 2009).

Considerando que no cromossomo Y os *loci* não são independentes, não é possível obter as probabilidades de *matching* pela regra do produto. Para isso devem ser usados os haplótipos (combinação dos alelos observados em todos os *loci* testados) (ROEWER, 2009). Um perfil genético do cromossomo Y, portanto, só é coincidente com o perfil da linhagem paterna se houver coincidência entre todos os alelos das amostras em comparação (SILVA, 2011). O importante nestes casos, quando existe *matching* de um determinado perfil de DNA, não é o *matching* por si só, mas a valorização matemática do mesmo (SJRPS & KLOOSTERMAN, 2003).

Atualmente, os dados dos perfis haplótipos dos Y-STRs e suas distribuições haplotípicas estão disponíveis para as mais variadas populações do mundo através de publicações e por meio de bancos de dados forenses em larga escala. Se tratando do cromossomo Y, o *Y Haplotype Reference Databases* (YHRD - [www.yhrd.org](http://www.yhrd.org)) (WILLUWEIT & ROEWER, 2015) é o banco de dados de haplótipos de referência online mais acessado, com o objetivo de produzir e divulgar conhecimento confiável acerca das frequências haplotípicas de Y-STRs, disponibilizando dados de populações de diferentes locais ao longo do mundo. Este repositório reúne informação de todos os laboratórios associados e pesquisadores que, no desenvolvimento de seus trabalhos, contribuem com os seus dados laboratoriais para o cálculo relativo às taxas de mutação, bem como das informações genéticas populacionais, de etnia e ancestralidade.

Além do incremento de tais bancos de dados e consequentes cálculos de probabilidades e análises comparativas de populações (RÊGO, 2015), a adição dos novos marcadores contribui de maneira contundente nas rotinas dos casos forenses, pois com o aumento do poder de discriminação desses marcadores, aumenta-se a capacidade de determinação da diversidade genética (SILVA, 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar frequências haplotípicas dos 27 marcadores do cromossomo Y contidos no kit *Yfiler Plus*<sup>®</sup> e calcular os parâmetros estatísticos forenses em 409 amostras da população masculina do Estado do Espírito Santo.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar possíveis variações regionais, padrões de ancestralidade, subestratificação e diversidade inter/intrapopulacionais.
- Calcular as frequências haplotípicas dos marcadores utilizados e determinar sua diversidade alélica;
- Categorizar os haplótipos e determinar possíveis dinâmicas populacionais (origem geográfica, ancestralidade e possível aporte migratório).
- Comparar as medidas de diferenciação populacional genética ( $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ ) entre as macrorregiões do ES, com estados vizinhos e dados globais.
- Representar as distâncias em gráfico de escalonamento multidimensional e armazenar os perfis obtidos em banco de dados para futuras consultas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 AMOSTRAS

Foram selecionadas para o trabalho 409 amostras biológicas de voluntários do sexo masculino, não aparentados e nascidos em alguma das 4 regiões geopolíticas (norte, central, metropolitana e sul) do Estado do Espírito Santo. Todos os voluntários consentiram em participar da pesquisa coordenada pelo Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), cedendo uma amostra biológica e permitindo seu processamento de maneira codificada.

A autorização foi dada mediante leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), respondendo ao questionário de informações pessoais e à concordância na utilização das amostras biológicas para tal fim. Informações sobre ascendência paterna, idade, local de nascimento, auto declaração de etnia e outras perguntas pertinentes foram obtidas por meio de entrevista na assinatura do TCLE e organizados em bancos de dados do Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). Foi esclarecido que as amostras só seriam utilizadas para o estudo em questão e que sua identificação e demais dados seriam mantidos em sigilo.

Foram coletados materiais biológicos de esfregaço de mucosa oral, de maneira indolor e segura, utilizando materiais estéreis e descartáveis. Após limpeza do interior da boca com um bochecho vigoroso com água, a mucosa oral foi raspada com movimentos circulares, girando o *swab* na superfície interior da boca. As hastes de algodão foram acondicionadas em recipiente plástico estéril próprio e devidamente identificado. As amostras foram armazenadas em refrigeração - 20°C até o momento da extração.

A coleta do *swab* foi realizada por um pesquisador capacitado, atendendo todos os cuidados de biossegurança e assepsia. As amostras foram armazenadas na à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) para durante o período de estudo. Foram mantidas sob refrigeração durante o transporte e processamento até que fossem submetidas à extração de DNA.

As amostras utilizadas como controles no estudo foram provenientes do próprio kit de amplificação (*Control DNA 007*). Os processos de extração e compilação

de dados de perfis genéticos foram realizados no Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) da Universidade Federal do Espírito Santo, enquanto que a eletroforese de capilar e obtenção dos perfis genéticos foi realizada no Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil do Espírito Santo.

#### **4.2 COMPOSIÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL**

O grupo amostral foi composto de 409 amostras do sexo masculino, das quais 18 são da região norte, 56 da central, 244 da região metropolitana, 88 da região sul e 3 sem dados de localidade. Das amostras coletadas, foram selecionadas 79 provenientes de descendentes de europeus, autodenominados de pomeranos.

O número amostral estipulado representa um incremento considerável nos dados disponíveis atualmente para o ES e atendem aos critérios mínimos para submissão no banco de haplótipos (YHRD) do cromossomo Y e para a publicação de dados em genética de populações e casos forenses nos periódicos mais relevantes da comunidade científica (*New guidelines for the publication of genetic population data- FSI*).

#### **4.3 SIGILO E ASPECTOS ÉTICOS**

A privacidade e confidencialidade dos dados foram garantidos no estudo por meio do armazenamento dos questionários com informações pessoais dos participantes em local de acesso restrito e sob tutela do pesquisador responsável. As amostras biológicas receberam identificação codificada, não expondo a identificação do voluntário da pesquisa.

O projeto de pesquisa que derivou a Tese, de responsabilidade do Prof<sup>o</sup> Iuri Drumond Louro, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde - CIAS/Unimed Vitória (CAAE: 79664817.4.0000.5061) por meio da Plataforma Brasil.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA de cada amostra foi extraído organicamente através de digestão com proteinase K e dodecil sulfato de sódio (SDS), seguida de extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol (SAMBROOK, 1989).

#### 4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR - *Polymerase Chain Reaction*)

As regiões do cromossomo Y analisadas neste estudo foram amplificadas por PCR em um termociclador Veriti® da marca *Applied Biosystems*, utilizando-se o kit de amplificação de marcadores de Y-STR *Yfiler Plus®* (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*, Waltham, MA, USA), descritos na tabela 3 abaixo.

Marcador Y-STR	Alelos incluídos na escada alélica
DYS576	10, 11,12,13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25
DYS389I	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
DYS635	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30
DYS389II	24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35
DYS627	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
DYS460	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
DYS458	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
DYS19	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
YGATAH4	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
DYS448	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
DYS391	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
DYS456	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
DYS390	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
DYS438	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16

DYS392	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
DYS518	32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49
DYS570	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26
DYS437	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
DYS385	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
DYS449	22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40
DYS393	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
DYS439	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
DYS481	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32
DYF387S1	30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44
DYS533	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17

**Tabela 3** – Marcadores Y-STR do Kit *Yfiler Plus* e seus alelos. Fonte: Adaptado de Manual do usuário *Yfiler Plus* (Thermo Fisher).

O kit de amplificação *Yfiler Plus*® (*Thermo Fisher*) foi selecionado para o trabalho por representar o kit comercial mais moderno e com maior número de marcadores STR do cromossomo Y disponíveis no mercado atualmente.

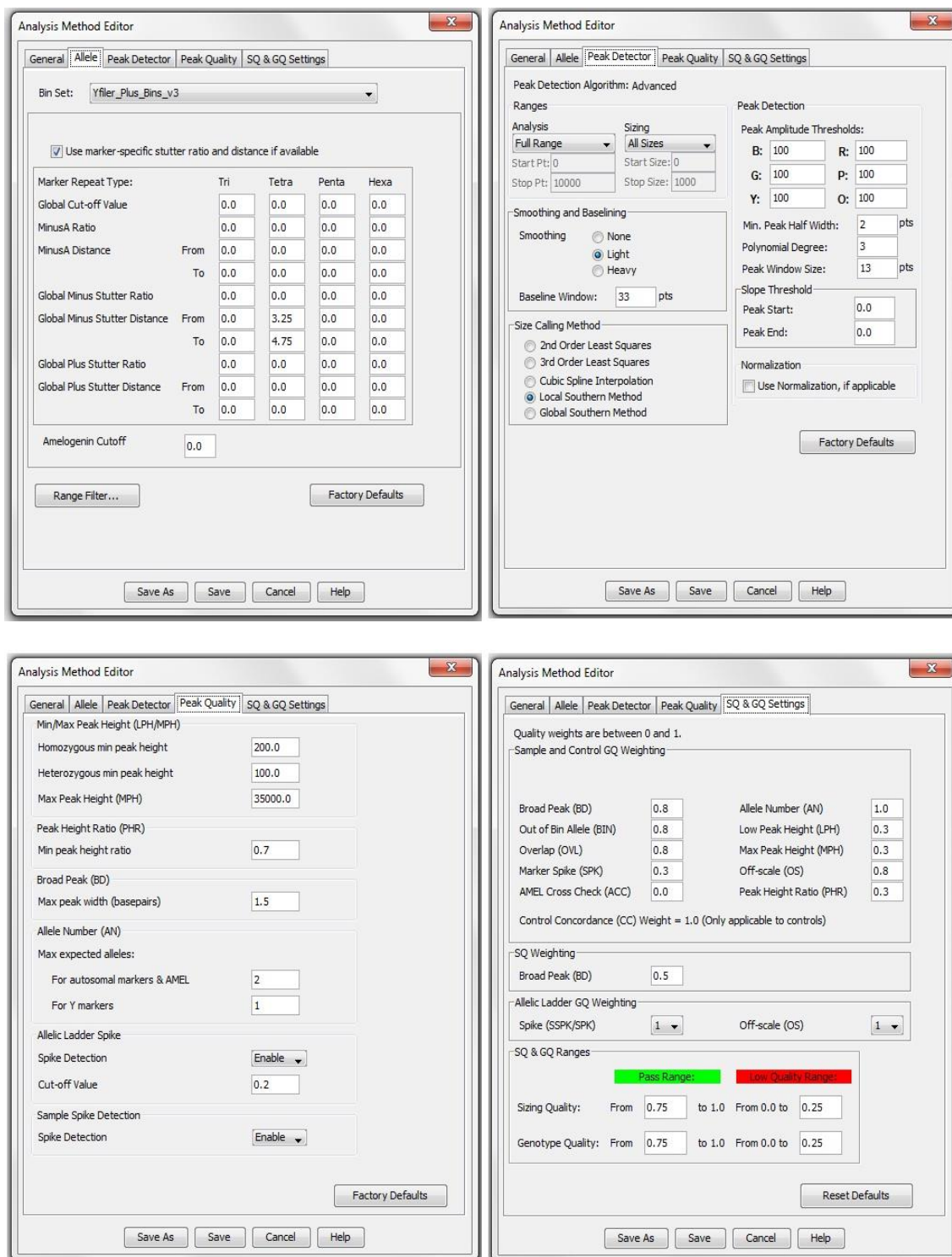
A reação de PCR foi realizada a partir de adaptação da metodologia descrita pelo fabricante. Foi utilizado um volume de reação correspondente à metade do valor sugerido pelo fabricante, mantendo-se as proporções de tampão e mix de *primers*. As temperaturas de termociclagem e o número de ciclos não foram alteradas.

As reações foram realizadas de forma que todas as amostras foram testadas juntamente com um controle positivo de amplificação (*DNA control 007*), fornecido pelo próprio kit.

#### 4.6 ELETROFORESE CAPILAR E PARÂMETROS DE CORRIDA

Os fragmentos foram separados por eletroforese capilar no analisador genético *Applied Biosystems*® *3500 Series Genetic Analyzer* (*Thermo Fisher*) com

polímero POP-4™. Os parâmetros do método de análise de detecção dos fragmentos de Y-STR foram estipulados e estão relacionados na figura 4 abaixo:



**Figura 4** – Método de análise e detecção de fragmentos em sequenciamento por eletroforese capilar.

#### 4.7 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os fragmentos amplificados foram analisados em conjunto por haplótipo, utilizando o *software GeneMapper® ID-X v1.4 (Thermo Fisher)*. As designações dos alelos foram baseadas na comparação com a escada alélica, padronizada pelo fabricante e dispostas no próprio kit. Os painéis e *bins* adotados foram os padrões fornecidos pelo fabricante. Definiu-se por utilizar um limiar mínimo de 100 unidades relativas de fluorescência (RFU). Artefatos de corrida, *Off ladders*, *pull ups* e *spikes* foram removidos mecanicamente após análise criteriosa.

O perfil haplótipo foi exportado em modo de tabela e formato “.csv” para compilação em tabela de Excel (Microsoft Corporation, USA) e trabalho estatístico dos dados.

#### 4.8 ANÁLISES EM GENÉTICA POPULACIONAL

As frequências dos marcadores foram estimadas por contagem direta utilizando-se o programa Excel (*Microsoft*). As frequências haplotípicas e de diversidade foram estimadas de acordo com NEI (1987) usando o *software ARLEQUIN Ver 3.11 (EXCOFFIER L. & LISCHER, 2005)*.

Os cálculos de distâncias genéticas entre pares de populações ( $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ ) e AMOVA (Análise de Variância Molecular) foram efetuados através do *software ARLEQUIN Ver 3.11 (EXCOFFIER L. & LISCHER, 2005)*. Para a análise do escalonamento multidimensional (MDS) das distâncias genéticas ( $F_{ST}$ ) entre as populações foi utilizado o programa SPSS Statisticsv17.0 (SPSS *Incorporation*, IBM, Chicago) e as coordenadas foram exportadas. Com as coordenadas foram gerados os gráficos de MDS no programa Excel (*Microsoft*).



## 5 MANUSCRITOS DERIVADOS DA TESE

5.1 O artigo intitulado “Stratification among European descent and admixed Brazilian populations of Espirito Santo for 27 Y-STRs” foi submetido à revista *Forensic Science International - Genetics*, classificada como Qualis Capes A1 em Biotecnologia, ISSN: 1872-4973, fator de impacto: 5.637. O comprovante da submissão está disponível no Anexo I, constando como primeiro autor;

O artigo foi formatado no modelo “*Letters to the editor*”, modelo mais adotado em publicações de trabalhos semelhantes na revista em questão.

5.2 O artigo intitulado “A view of the maternal inheritance of Espirito Santo populations: the contrast between Admixed and Pomeranian descendant groups” também foi submetido à revista *Forensic Science International - Genetics*. O comprovante da submissão está disponível no Anexo II, constando como co-autor;

O segundo artigo foi formatado no modelo “*Research Paper*”.

# 1 “Stratification among European descent and admixed 2 Brazilian populations of Espirito Santo for 27 Y-STRs”

3 Victor Santos Stange<sup>1,2</sup>, Raquel Silva dos Reis<sup>1</sup>, Fernanda Mariano Garcia de Souza Rodrigues<sup>1</sup>,  
4 Mariana Lima Lugon<sup>2</sup>, Carolina Mayumi Vieira<sup>2</sup>, Flávia de Paula<sup>1</sup>, Eldamaria de Vargas  
5 Wolfgramm dos Santos<sup>1</sup>, Adriana Madeira Álvares da Silva-Conforti<sup>1</sup>, Iuri Drumond Louro<sup>1</sup>,  
6 Leonor Gusmão<sup>3</sup>.

7 <sup>1</sup> Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM), Universidade Federal do Espirito Santo,  
8 Espirito Santo, Brasil.

9 <sup>2</sup> Laboratório de DNA Forense, Departamento de Laboratórios Forenses, Polícia Civil do Espirito  
10 Santo, Espirito Santo, Brasil.

11 <sup>3</sup> Laboratório de Diagnóstico por DNA (LDD), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de  
12 Janeiro, Brasil.

## 13 **Highlights,**

- 14 • A set of 27 Y-STR haplotypes were analyzed in 5 Espirito Santo subpopulations.
- 15 • General population of Espirito Santo showed no differences from other Brazilian  
16 populations.
- 17 • Pomeranians showed significant genetic distances from all other samples of  
18 Espirito Santo.
- 19 • Pomeranians showed lower genetic distances with German populations.
- 20 • Pomeranians are closer than the Berlin-Germans to the Polish populations.

21 Dear Editor,

22 The Espirito Santo state is one of the 27 states of Brazil. It is located in the Southeast region of  
23 the country, bordering the Atlantic Ocean, and the states of Bahia, Minas Gerais and Rio de  
24 Janeiro (Supplementary Figure S1A). Its capital is Vitória and the official language is the  
25 Portuguese (Brazilian). Data from the last census in 2010 [1] revealed the following figures  
26 concerning people self-declaration: 1.7 million Whites (48.6%), 1.5 million Pardos (admixed)  
27 (42.2%), 293 thousand Blacks (8.4%) and 0.8% Yellows (21.9 thousand) or Indigenous (9  
28 thousand). This state was historically marked by diverse migratory inflows since 1535, when the  
29 Europeans and Africans start admixing with the Amerindian population. The last inflow directly  
30 affected the demography by bringing a large group of Europeans in 19th and 20th centuries [2],  
31 contributing to the current genepool of the region. The state of Espirito Santo can be divided in

32 four macroregions, namely North, Central, Metropolitan and South. Apart from the general  
33 admixed population living in the Metropolitan region, this region is also known for harboring a  
34 large community of Pomeranian descents, relatively well preserved in terms of traditions and  
35 language.

36 A limited amount of data was published to characterize the current Espirito Santo population,  
37 especially when dealing with Y-STRs. Data currently available at the Y-Chromosome STR  
38 Haplotype Reference Database (<https://yhrd.org>) [3] include 359 PowerPlex Y (Promega,  
39 Madison, WI, USA) profiles, 257 for Yfiler (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA),  
40 33 for PowerPlex Y23 (Promega) and just 79 profiles for the Yfiler Plus markers (Thermo Fisher).  
41 These profiles were published in Wolfgramm et al. [4], Figueiredo et al. [5] and Jannuzzi et al.  
42 [6]. The study from Wolfgramm et al. [4] comprised samples from Vitória, genotyped for 12 Y-  
43 STRs, as well as for 15 autosomal STRs. The other two studies included samples selected from  
44 the general population, which were genotyped for the Yfiler or Yfiler Plus kits (Thermo Fisher)  
45 [5,6]. Nevertheless, none of these studies investigated population stratification inside Espirito  
46 Santo State.

47 Considering the amplification kits that are currently in use, there are only 33 samples typed for  
48 PowerPlex Y23 and 79 for Yfiler Plus kits, for the population studied in this work. Therefore, the  
49 objective of this study was to characterize a sample of Espirito Santo, five times increased, by the  
50 analysis of the 27 Y-STR loci present on the Yfiler Plus kit. Moreover, we selected samples from  
51 the four macroregions, as well as the Pomeranian community, in order to see if a single forensic  
52 database can be used as reference for all subpopulations of Espirito Santo.

53 A total of 409 samples were collected by buccal swab, from individuals living in the state, as  
54 indicated in Supplementary Fig. S1B. Genomic DNA was extracted using a standard organic  
55 method. Written informed consent was obtained, along with self-declared ancestry and ethnicity  
56 information. The voluntarily participation and the anonymity and confidentiality were at all time  
57 respected according the local Human Research Ethical Committee.

58 The 27 loci were amplified in a Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher) using the Yfiler Plus PCR  
59 Amplification kit (Thermo Fisher), according to the manufacturer's protocol. The capillary  
60 electrophoresis was performed using Applied Biosystems™ 3500xL Genetic Analyzer™  
61 (Thermo Fisher) with POP-4™ standards protocol. The raw data was obtained by Applied  
62 Biosystems® 3500xL Data Collection Software v3.1 and further analyzed with GeneMapper®  
63 ID-X v1.4 software, considering the panels and bins provided by the manufacturers (Thermo  
64 Fisher).

65 The 409 haplotypes obtained in this study were uploaded to the YHRD with the  
66 submission numbers YA004540 (n=330, from general admixed population) and  
67 YA004541 (n=79, Pomeranians), and they are listed in Supplementary Table S1. In the  
68 total sample, 401 different haplotypes were observed, out of which 395 were unique and  
69 fourteen showed identical haplotypes, as described in Supplementary Table S2. The  
70 haplotype diversity (HD) generated by the software Arlequin v3.5.1.2 [7], was 1.0000 ( $\pm$   
71 0.0002).

72 Apart from DYS385 and DYF387S1, rare patterns of duplicated alleles were found in  
73 samples F217 (DYS392\*11-12), 344A (DYS437\*15-16 and DYS439\*10-12) and the  
74 sample I64 (DYS389II\*29-30, DYS437\*15-16 and DYS439\*10-11). Duplications  
75 involving the three above-mentioned loci have been previously described as duplication  
76 of a segment in the 780 kb AZFa region [8]. When comparing the profile of our sample  
77 (I64), we found just one difference with Brazilian and Spanish samples described by  
78 Diederiche et al. [8], and a search in the YHRD showed five exact matches: one with a  
79 sample from the North region of Brazil, and four with samples from USA.

80 A null allele at DYS458 was observed in one sample (F65). Micro-variant alleles were  
81 observed at DYS458 (17.2, 18.2 and 19.2), DYS448 (18.2) and DYS385 (12.2 and 13.2),  
82 all of them already described in other populations and present in the YHRD.  
83 Duplications, null and variant alleles were all confirmed using second amplifications.

84 A population differentiation test was performed among the five population samples of  
85 Espirito Santo included in this study, by calculating exact  $p$ -values of non-differentiation  
86 based on  $F_{ST}$  genetic distance, as implemented in the Arlequin software v3.5.1.2 [7]. In  
87 these analyses, DYS385 and DYF387S1 were not included, the number of repetitions in  
88 DYS389I was subtracted from DYS389II, and null, duplicated and non-consensus alleles  
89 were coded as missing data.

90 The results of this analysis showed large  $F_{ST}$ s between the Pomeranian population and the  
91 samples representing the four macroregions of the state ( $F_{ST} \geq 0.022$ ;  $p < 0.024$ ).  
92 However, no statistically significant differences were detected in the comparison of the  
93 four macroregions of Espirito Santo State: North, Central, South and Metropolitan  
94 (pairwise  $F_{ST}$ s  $\leq 0.0106$ ; non-differentiation  $p$ -values  $\geq 0.1802$ , 50,175 permutations),  
95 suggesting a genetic homogeneity of these subpopulations. An analysis of molecular  
96 variance (AMOVA) [7] was performed by separating the Pomeranian population in one

97 group and the remaining subpopulation in a second group. The AMOVA results showed  
98 that 2.32% of variation was due to differences among groups ( $p$ -value  $< 0.000005$ ), and  
99 no variation was found within groups ( $F_{SC} = 0.00019$ ;  $p$ -value = 0.50535). Therefore, for  
100 subsequent analysis, we have pooled all samples from the North, Central, South and  
101 Metropolitan regions in a single group, representing the General population of Espirito  
102 Santo (the term adopted henceforth), separated from the Pomeranian population group.

103 The sample of 330 individuals from the General population presented 326 different  
104 haplotypes and a high diversity ( $HD = 0.99991 \pm 0.0003$ ). The haplotype diversity was  
105 lower in the Pomeranian group ( $HD = 0.9994 \pm 0.0022$ ) that has 77 different haplotypes  
106 out of 79 samples analyzed.

107 Both samples from general population and Pomeranians were further compared with  
108 other Brazilian admixed populations typed for the Yfiler Plus marker set (Supplementary  
109 Table S3), using the AMOVA tool available at the YHRD (<https://yhrd.org/amova>). To  
110 better elucidate the differences between general population and Pomeranian samples, we  
111 have also selected two samples from Poland (from general population and Krakow) and  
112 one sample from Germany (Berlin-Brandenburg). These samples were selected from the  
113 available populations in YHRD, since they were the closest to the old Pomeranian  
114 province (in terms of geographic proximity and relationship). Since the African Y-  
115 chromosome contribution has been described as the second most prevalent (after the  
116 European one) in populations from the Southeast region of Brazil [09,10], two African  
117 American samples were also included (see Table S3), considering that no Yfiler Plus data  
118 is yet available at YHRD for African populations. The  $R_{ST}$  genetic distances between all  
119 population pairs are shown in Supplementary Table S4, together with the corresponding  
120 non-differentiation  $p$ -values. The observed distances were represented in 2-dimensional  
121 space (Supplementary Fig. S2), by multidimensional scaling (MDS) analysis, using the  
122 software StatSoft, Inc. (2007), STATISTICA ver.8.0 ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

123 The data showed that the Pomeranians are closer to the Europeans than to African or  
124 Admixed Brazilian populations, including the General population of the Espirito Santo  
125 itself ( $R_{ST} = 0.0542$ ). A low, statistically non-significant,  $R_{ST}$  value was found between  
126 Pomeranians and Germany ( $R_{ST} = 0.0074$ ; non-differentiation  $p$ -values  $> 0.0943$ ). It is  
127 worth noting that the Pomeranians, although closer to the German than to any other  
128 populations (Supplementary Fig. S2), it has a lower genetic distance to Poland than  
129 Germany.

130 The General population of Espirito Santo showed no significant differences in pairwise  
131 genetic distances ( $R_{ST}$ ) when compared with other admixed Brazilian populations,  
132 including those from the Southeastern region (namely, Rio de Janeiro, São Paulo and  
133 another sample from Espirito Santo), as well as with those in different regions (namely,  
134 Ceará, Goiás, Marajó, Maranhão, Mato Grosso, Piauí, Recife, Rio Grande do Norte and  
135 Rio Grande do Sul) (Supplementary Table S4).

136 A relatively high homogeneity of the Brazilian populations was also observed in previous  
137 studies using diverse sets of Y-STRs, because of the high European contribution to the  
138 paternal genepool of most populations in Brazil [9,11,12].

139 In summary, the size of the Y-STR database of Espirito Santo was significantly increased,  
140 allowing to improve the evaluation of forensic investigations and kinship analysis. The  
141 results of the present study showed that populations from different macroregions of  
142 Espirito Santo are quite similar in their Y-STR profiles, supporting the use of a single  
143 forensic database to evaluate match probabilities involving these subpopulations.  
144 Nonetheless, the Pomeranian community from the Central and Metropolitan  
145 macroregions of Espirito Santo showed a significantly different genetic profile from the  
146 neighboring admixed populations, being much closer to the Europeans from Germany  
147 and Poland. The positive impact of the European inflow in Espirito Santo, together with  
148 some degree of isolation, point to the need of a specific database for the Pomeranian  
149 community or, at least, the use of correction factors to the population substructure, in the  
150 evaluation of forensic evidences.

## 151 **Acknowledgements**

152 We sincerely thank to Mr. Caio Nucci de Araújo, technical manager of the ES State Police  
153 DNA Laboratory, for his support to this work. This work was supported by the Programa  
154 de Apoio a Núcleos Emergentes — FAPES. LG was supported by Conselho Nacional de  
155 Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (ref. 305330/2016-0).

## 156 **References**

157 [1] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística—IBGE, Censo Demográfico, 2010.

- 158 [2] Arquivo Público do Espírito Santo (APEES), Projeto imigrantes  
159 (<http://imigrantes.es.gov.br/>) – Accessed in 26/11/2018.
- 160 [3] S.Willuweit, L.Roewer, The new Y chromosome haplotype reference database,  
161 *ForensicSci.Int.Genet.*15(2015):43–48.
- 162 [4] Wolfgramm E de V., Silva BC., Aguiar VR., Malta FS., Castro D., Ferreira AC., Prezoti AN.,  
163 Paula D., Louro ID. (2011), 'Genetic analysis of 15 autosomal and 12 Y-STR loci in the  
164 Espírito Santo State population, Brazil.', *Forensic Sci Int Genet* 5(3):41-3.
- 165 [5] Figueiredo de F., Ambrosio I.B., Braganholi D.F., Chemale G., Martins J.A., Gomes V.,  
166 Gusmão L., Cicarelli R.M. Male-specific contributions to the Brazilian population of  
167 Espírito Santo. *Int J Legal Med.* 2016 May;130(3):679-81.
- 168 [6] J.Jannuzzi, C.S.Alho, C.Fridman, S.R.B.Ferreira, D.F.Braganholi, I.B.Ambrosio,  
169 R.M.B.Cicarelli, V.Gomes, E.F.Carvalho, L.Gusmão. Genetic characterization of four  
170 Brazilian states with 25 Yfiler®Plus markers. *Forensic Sci Int: Genet Sup Series*, 2017  
171 Dec, vol (6):82-83.
- 172 [7] Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to  
173 perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*  
174 *Resources.* 10: 564-567.
- 175 [8] Diederiche M, Martín P, Amorim A, Corte-Real F, Gusmão L. A case of double alleles at  
176 three Y-STR loci: forensic implications. *Int J Legal Med.* 2005 Jul;119(4):223-5.
- 177 [09] Oliveira AM, Domingues PM, Gomes V, Amorim A, Jannuzzi J, de Carvalho EF, Gusmão  
178 L. Male lineage strata of Brazilian population disclosed by the simultaneous analysis of  
179 STRs and SNPs. *Forensic Sci Int Genet.* 2014 Nov;13:264-8
- 180 [10] Resque R, Gusmão L, Geppert M, Roewer L, Palha T, Alvarez L, et al. (2016) Male Lineages  
181 in Brazil: Intercontinental Admixture and Stratification of the European Background. *PLoS*  
182 *ONE* 11(4): 0152573.
- 183 [11] Palha T, Gusmão L, Ribeiro-Rodrigues E, Guerreiro JF, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S..  
184 Disclosing the genetic structure of Brazil through analysis of male lineages with highly  
185 discriminating haplotypes. *PLoS One.* 2012;7(7):40007.
- 186 [12] Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-  
187 chromosome lineages. *Send to Am J Hum Genet.* 2001 Jan;68(1):281-6.

O artigo submetido é complementado pelas figuras suplementares S1 (A e B) e tabelas suplementares S2, S3 e S4, descritas abaixo. A tabela suplementar S1 encontra-se no Anexo III.

188

## Supplementary Material

189

*Stange et al. Stratification among European descent and admixed Brazilian*

190

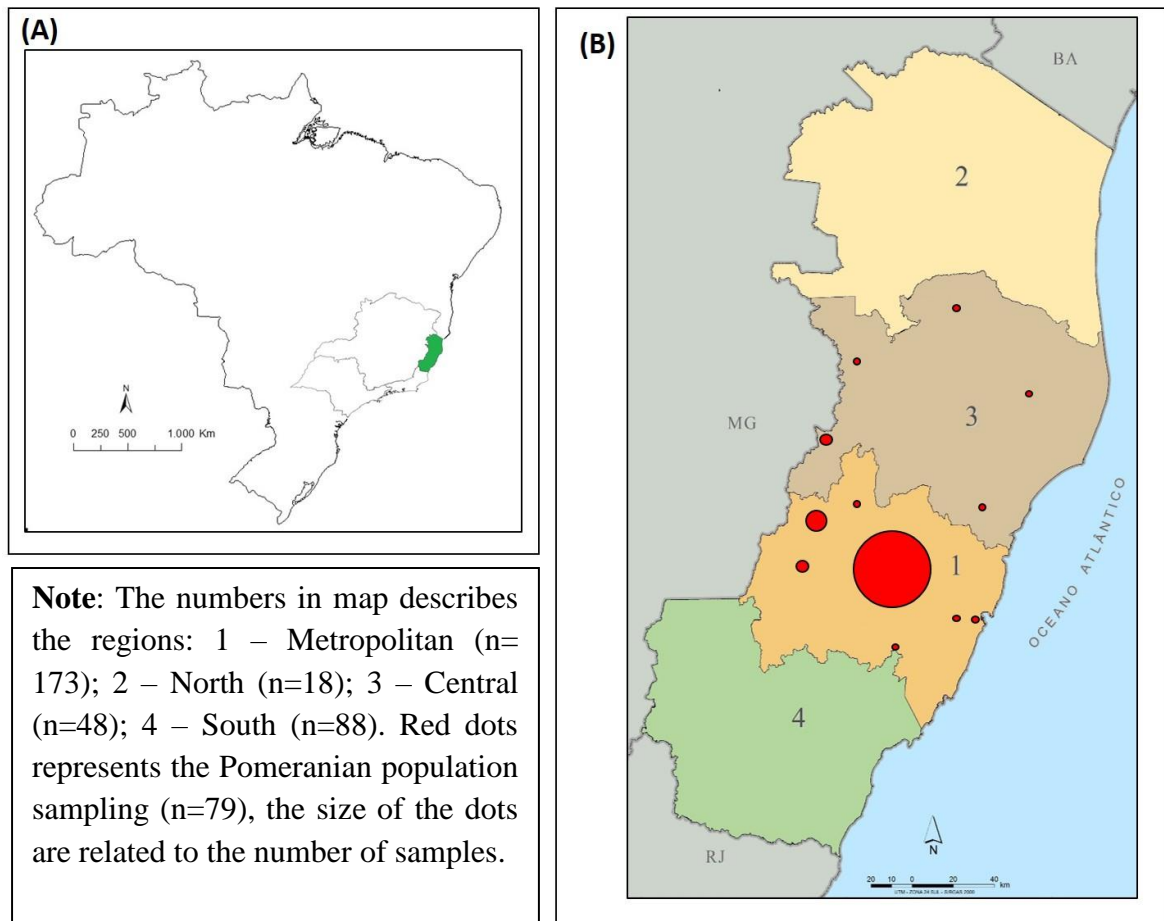
*populations of Espirito Santo for 27 Y-STRs. Forensic Sci Int Genet. 2019*

191

**Supplementary Fig. S1.** Maps showing: (A) Position of the State of Espirito Santo

192

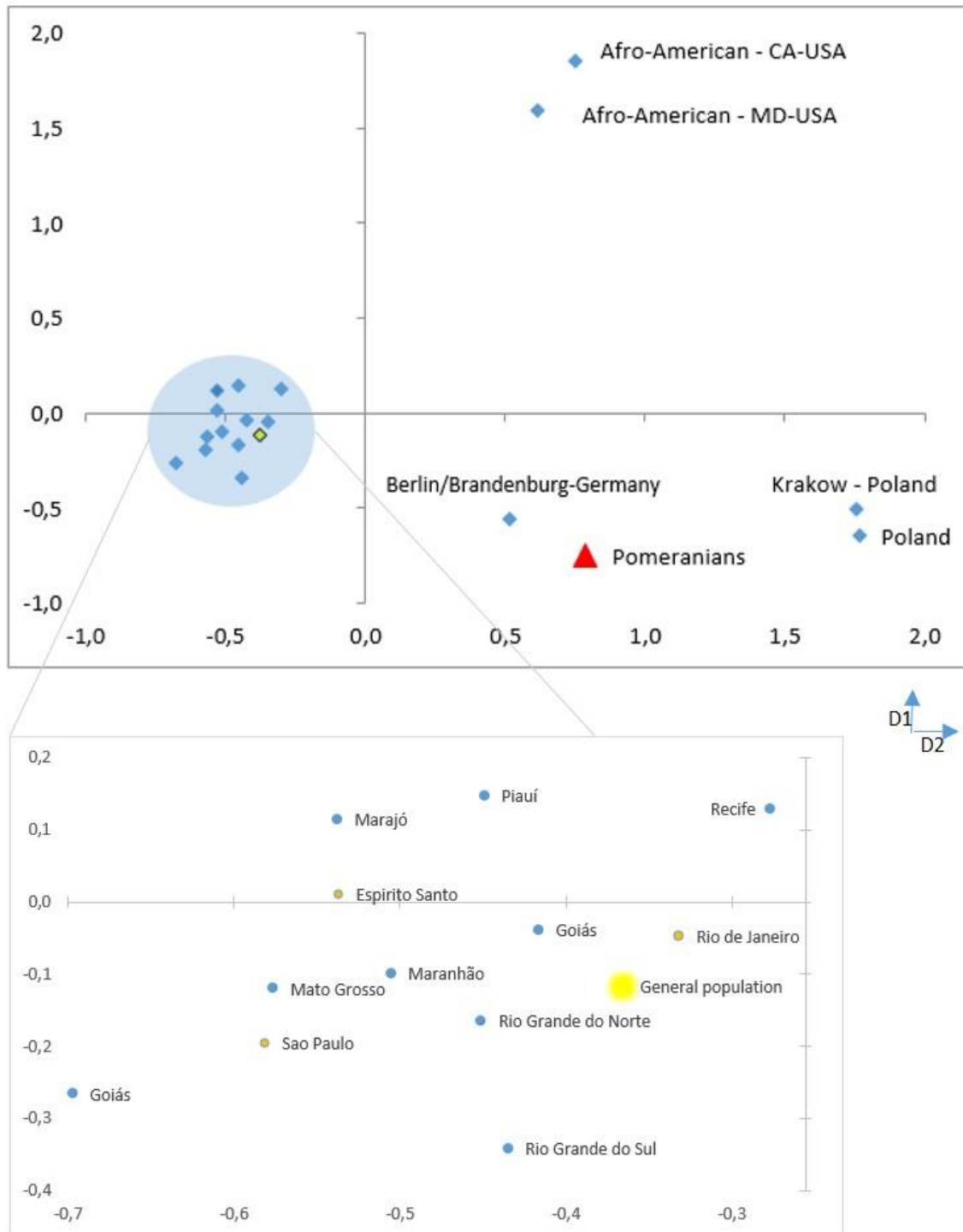
relative to Brazil; (B) State of Espirito Santo and its four macroregions.



193



194 **Supplementary Fig. S2.** (A) Multidimensional scaling plot of the pairwise  $R_{ST}$   
 195 genetic distances (Table S4) calculated between Espirito Santo (Pomeranians and  
 196 General population) and other worldwide populations (Stress= 0 .0307). (B)  
 197 Brazilian admixed populations comparison in spotlight.



198

**Note:** Blue circle represents all Brazilian admixed populations. Yellow dots represent the Southeast states of Brazil admixed populations (geographically near).

**Table S2. The 14 haplotype matches encountered in the total sample from the study.**

ID	Haplótipo	Population	Region	DYS576	DYS389I	DYS635	DYS389II	DYS627	DYS460	DYS458	DYS19	YGATAH4	DYS448	DYS391	DYS456	DYS390	DYS438	DYS392	DYS518	DYS570	DYS437	DYS385	DYS449	DYS393	DYS439	DYS481	DYF387S1	DYS533
F197	HPL 1	Pomeranian	metropolitan	16	12	21	28	19	10	15	14	11	20	10	14	23	10	11	37	21	16	14, 14	28	13	11	25	37, 39	11
F223	HPL 1	General Population	north	16	12	21	28	19	10	15	14	11	20	10	14	23	10	11	37	21	16	14, 14	28	13	11	25	37, 39	11
90P	HPL 1	Pomeranian	metropolitan	16	12	21	28	19	10	15	14	11	20	10	14	23	10	11	37	21	16	14, 14	28	13	11	25	37, 39	11
F228	HPL 2	General Population	metropolitan	16	13	24	30	21	11	19	14	12	19	11	15	24	12	13	41	17	15	11, 14	31	13	11	23	35, 36	12
F231	HPL 2	Pomeranian	metropolitan	16	13	24	30	21	11	19	14	12	19	11	15	24	12	13	41	17	15	11, 14	31	13	11	23	35, 36	12
F232	HPL 3	Pomeranian	metropolitan	19	14	23	31	22	11	17	14	12	19	11	16	24	12	13	40	16	15	11, 15	31	13	12	22	35, 36	12
F237	HPL 3	Pomeranian	metropolitan	19	14	23	31	22	11	17	14	12	19	11	16	24	12	13	40	16	15	11, 15	31	13	12	22	35, 36	12
P13	HPL 4	General Population	south	18	14	21	31	23	11	17	15	11	20	10	13	22	10	12	37	17	15	16, 18	29	14	11	25	37, 38	12
2A	HPL 4	General Population	south	18	14	21	31	23	11	17	15	11	20	10	13	22	10	12	37	17	15	16, 18	29	14	11	25	37, 38	12
9A	HPL 4	General Population	south	18	14	21	31	23	11	17	15	11	20	10	13	22	10	12	37	17	15	16, 18	29	14	11	25	37, 38	12
132A	HPL 5	General Population	south	21	12	23	28	21	11	17	15	12	19	11	15	24	12	13	36	16	15	11, 14	31	13	12	22	35, 36	11
147A	HPL 5	General Population	south	21	12	23	28	21	11	17	15	12	19	11	15	24	12	13	36	16	15	11, 14	31	13	12	22	35, 36	11
515A	HPL 6	General Population	south	18	13	24	29	22	10	17	14	12	19	11	17	24	12	13	37	17	15	11, 14	28	13	13	22	36, 36	11
520A	HPL 6	General Population	south	18	13	24	29	22	10	17	14	12	19	11	17	24	12	13	37	17	15	11, 14	28	13	13	22	36, 36	11

199

**Table S3. Populations available in YHRD used in comparisons in this work.**

Population	Sample size	Acession number	References in YHRD
Ceará, Brazil [Admixed]	38 Haplotypes	YA004508	not published
Goías, Brazil [Admixed]	204 Haplotypes	YA004377	not published
Marajó, Brazil [Admixed]	83 Haplotypes	YA004365	not published
Maranhão, Brazil [Admixed]	114 Haplotypes	YA004348	not published
Maranhão, Brazil [Admixed]	182 Haplotypes	YA004387	not published
Mato Grosso, Brazil [Admixed]	100 Haplotypes	YA004380	not published
Piauí, Brazil [Admixed]	42 Haplotypes	YA004507	not published
Recife, Brazil [Admixed]	141 Haplotypes	YA004379	not published
Rio Grande do Norte, Brazil [Admixed]	19 Haplotypes	YA004509	not published
Rio Grande do Sul, Brazil [Admixed]	211 Haplotypes	YA004511	not published
Rio de Janeiro, Brazil [Admixed]	258 Haplotypes	YA004276	Jannuzzi et al. <i>Forensic Sci Int: Genet Sup Serie s</i> 2017 (6):82
Sao Paulo, Brazil [Admixed]	169 Haplotypes	YA004129	not published
Espirito Santo, Brazil [Admixed]	79 Haplotypes	YA003849	not published
Berlin-Brandenburg, Germany [German]	138 Haplotypes	YA002904	not published
Krakow, Poland [Polish]	157 Haplotypes	YA003124	Ploski et al. <i>Hum Genet.</i> 2002 110(6):592
Poland [Polish]	496 Haplotypes	YA004147	not published
California, United States [Afro-American]	236 Haplotypes	YA004477	not published
Maryland, United States [Afro-American]	242 Haplotypes	YA004438	Coble et al. <i>Forensic Sci Int Genet</i> 2013 (3):66

200

**Table S4. Pairwise genetic distances ( $R_{ST}$ ) and p-values between the two populations of Espirito Santo (Pomeranians and General population) and 18 reported populations. Lower triangle represents RST values based on Y-STR haplotypes; upper-right triangle: p-values for 10.000 permutations.**

	Pomeranians	General Population	Ceará,Brazil [Admixed]	Goiás,Brazil [Admixed]	Marajó, Brazil [Admixed]	Maranhão, Brazil [Admixed]	Mato Grosso, Brazil [Admixed]	Piauí, Brazil [Admixed]	Recife, Brazil [Admixed]	Rio Grande do Norte, Brazil [Admixed]	Rio Grande do Sul, Brazil [Admixed]	Rio de Janeiro, Brazil [Admixed]	Sao Paulo, Brazil [Admixed]	Espirito Santo, Brazil [Admixed]	Berlin-Brandenburg, Germany [German]	Krakow, Poland [Polish]	Poland [Polish]	California, United States [Afro-American]	Maryland, United States [Afro-American]
Pomeranians	-	0.0000	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0197	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0943	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000
General Population	0.0542	-	0.1884	0.8056	0.2530	0.6312	0.6918	0.3477	0.1429	0.9537	0.0924	0.9078	0.3935	0.5307	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Ceará,Brazil [Admixed]	0.0798	0.0054	-	0.2294	0.0946	0.3077	0.6640	0.0963	0.0308	0.9908	0.3817	0.1568	0.6540	0.2438	0.0009	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Goiás,Brazil [Admixed]	0.0626	-0.0017	0.0042	-	0.2029	0.9295	0.7928	0.5101	0.1133	0.9089	0.0580	0.7109	0.2907	0.5024	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Marajó, Brazil [Admixed]	0.0790	0.0015	0.0138	0.0027	-	0.1760	0.2038	0.5259	0.3286	0.6366	0.0397	0.3536	0.1164	0.5124	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Maranhão, Brazil [Admixed]	0.0730	-0.0009	0.0017	-0.0025	0.0030	-	0.9789	0.3551	0.0649	0.9792	0.0432	0.5930	0.5199	0.6754	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Mato Grosso, Brazil [Admixed]	0.0734	-0.0021	-0.0054	-0.0032	0.0035	-0.0045	-	0.3629	0.0794	0.9891	0.2045	0.6529	0.9612	0.6509	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Piauí, Brazil [Admixed]	0.0864	0.0007	0.0202	-0.0023	-0.0031	0.0006	0.0004	-	0.8353	0.4582	0.0307	0.4711	0.1847	0.6011	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Recife, Brazil [Admixed]	0.0690	0.0028	0.0252	0.0038	0.0006	0.0051	0.0075	-0.0077	-	0.3951	0.0010	0.1805	0.0138	0.4550	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Rio Grande do Norte, Brazil [Admixed]	0.0534	-0.0185	-0.0307	-0.0171	-0.0093	-0.0204	-0.0241	-0.0056	-0.0012	-	0.9669	0.9456	0.9993	0.8760	0.0636	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003
Rio Grande do Sul, Brazil [Admixed]	0.0548	0.0027	0.0003	0.0049	0.0095	0.0047	0.0024	0.0185	0.0195	-0.0201	-	0.0446	0.2406	0.1196	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Rio de Janeiro, Brazil [Admixed]	0.0593	-0.0019	0.0074	-0.0016	0.0003	-0.0009	-0.0021	-0.0017	0.0023	-0.0189	0.0050	-	0.3544	0.4331	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Sao Paulo, Brazil [Admixed]	0.0712	0.0000	-0.0044	0.0007	0.0051	-0.0007	-0.0048	0.0057	0.0119	-0.0260	0.0012	0.0002	-	0.4577	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Espirito Santo, Brazil [Admixed]	0.0810	-0.0014	0.0045	-0.0013	-0.0018	-0.0025	-0.0032	-0.0047	-0.0010	-0.0180	0.0048	-0.0006	-0.0007	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Berlin-Brandenburg, Germany [German]	0.0074	0.0341	0.0553	0.0410	0.0541	0.0457	0.0474	0.0549	0.0408	0.0307	0.0334	0.0389	0.0462	0.0476	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Krakow, Poland [Polish]	0.0414	0.1469	0.2116	0.1633	0.1844	0.1749	0.1810	0.1812	0.1512	0.1803	0.1624	0.1546	0.1818	0.1854	0.0574	-	0.7535	0.0000	0.0000
Poland [Polish]	0.0414	0.1561	0.2097	0.1698	0.1912	0.1801	0.1860	0.1882	0.1612	0.1792	0.1641	0.1633	0.1849	0.1897	0.0593	-0.0017	-	0.0000	0.0000
California, United States [Afro-American]	0.2234	0.1705	0.2409	0.1708	0.1517	0.1832	0.1937	0.1257	0.1191	0.2119	0.2182	0.1654	0.2067	0.1686	0.1966	0.2387	0.2510	-	0.1557
Maryland, United States [Afro-American]	0.1745	0.1225	0.1846	0.1209	0.1055	0.1327	0.1418	0.0799	0.0764	0.1550	0.1647	0.1169	0.1541	0.1195	0.1483	0.2007	0.2144	0.0022	-

# 1 **A view of the maternal inheritance of Espirito Santo** 2 **populations: the contrast between Admixed and** 3 **Pomeranian descendant groups**

4 Raquel Silva dos Reis<sup>a,c</sup>, Filipa Simão<sup>b</sup>, Victor dos Santos Stange<sup>a,c</sup>, Fernanda Mariano Garcia<sup>a,c</sup>,  
 5 Raquel Spinassé Dettogni<sup>a</sup>, Elaine Stur<sup>c</sup>, Adriana Madeira Álvares da Silva<sup>c</sup>, Elizeu Fagundes de  
 6 Carvalho<sup>b</sup>, Leonor Gusmão<sup>b\*</sup>, Iúri Drumond Louro<sup>a,c</sup>

7 <sup>a</sup> Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM), Universidade Federal do Espirito Santo  
 8 (UFES), Fernando Ferrari Avenue, 514 - Goiabeiras, Vitória - Espirito Santo. Zip Code: 29075-  
 9 910, Brazil.

10 <sup>b</sup> Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD), Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
 11 (UERJ), São Francisco Xavier Street, 524 - Maracanã, Rio de Janeiro – Rio de Janeiro. Zip code:  
 12 20550-900, Brazil.

13 <sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espirito Santo (UFES),  
 14 Marechal Campos Avenue, 1468 - Bonfim, Vitória - Espirito Santo. Zip code: 29047-105, Brazil.

15 \*Corresponding author at: Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD), Universidade do Estado  
 16 do Rio de Janeiro (UERJ), São Francisco Xavier Street, 524 - Maracanã, Rio de Janeiro – Rio de  
 17 Janeiro. Zip code: 20550-900, Brazil. E-mail address: [leonorbgusmao@gmail.com](mailto:leonorbgusmao@gmail.com) (Leonor  
 18 Gusmão).

19 Declarations of interest: none.

## 20 **Highlights**

- 21 • This work includes samples from 4 macro-regions of Espirito Santo (ES), Brazil.
- 22 • This is the first study of total control region from Pomeranian descendants.
- 23 • The ES stands out in the Southeast region due to its high European ancestry.
- 24 • The North's African heritage indicates stratification in the ES general population.
- 25 • In mtDNA lineages perspective, the Pomeranian descendants are genetically  
 26 isolated.

## 27 **ABSTRACT**

28 Besides its valuable utility in the forensic practice, the mtDNA analysis is a reliable tool  
 29 to uncover the origins of admixed populations such as Brazilians. The Espirito Santo (ES),  
 30 like the other coastal Brazilian states, has a population shaped by 3 main ancestral roots:  
 31 Amerindian, African and European. Among the latter, the Pomeranian descendants stand  
 32 out for the preservation of traditional aspects of their culture, especially the Pomeranian  
 33 language. Despite the genetic data already available, there is no mtDNA database that  
 34 adequately reflects the diversity, geographic distribution, and origins of the maternal  
 35 lineages from ES. In order to increase knowledge about maternal ancestry and to

36 investigate population genetic stratification, a total of 291 samples were collected in the  
37 4 macro-regions (Metropolitan, South, Central and North) of ES and in Pomeranian  
38 communities. Full control region data were produced for general (N=214) and  
39 Pomeranian (N=77) groups. About the general population, the high values of haplotype  
40 diversity (H=99.9%) and pairwise differences (MNPD=16.9) found are in agreement with  
41 those reported for other populations in the Southeast region of the country. Regarding  
42 maternal inheritance, the ES stood out for the predominance of European haplogroups  
43 (49.5%), although the North macro-region presented a more African profile (47.1%).  
44 Among the Pomeranians, lowest MNPD value (11.2) and a high percentage of shared  
45 haplotypes (15%) were indicative of founder events. The  $F_{ST}$  analysis showed that  
46 Pomeranians (98.7% of European lineages) are genetically isolated from the other  
47 admixed populations of Brazil. This study evidenced that ES state presents singularities  
48 regarding the intra and interpopulational diversity of mtDNA. Even after 5 centuries of  
49 interethnic admixture, the present-day population of Espirito Santo harbours genetic  
50 marks that trace back to historical aspects of its formation.

51 Keywords: mtDNA, Brazil, macro-regions, ancestry, population stratification

## 52 **1. Introduction**

53 Although it represents a very small fraction of the entire human genome, the  
54 mitochondrial DNA (mtDNA) has become a useful tool in forensic and populational  
55 analyses. Among its valuable characteristics are the high copy number per cell, high  
56 mutation rate, small size and maternal inheritance without recombination [1]. Most of the  
57 polymorphic content of the molecule resides in the non-coding portion called the control  
58 region (CR), spanning 1122 bp [2]. In CR there are even more variable fragments, called  
59 hypervariable segments (HVS) I, II and III, which have a mutation rate 5-10 times greater  
60 than that of single copy nuclear genes [3].

61 The mtDNA lineages (represented by haplotypes) are characterized by specific mutations  
62 accumulated over the evolutionary time [4,5]. The mtDNA lineages close to each other  
63 share a set of variants that allows grouping them into so-called haplogroups, based on the  
64 most recent common ancestral [6]. According to Phylotree [7], a phylogenetic tree of  
65 global mtDNA variation, each haplotype can be allocated in one haplogroup, that  
66 represent African, European, Amerindian or Asian maternal ancestries [8]. Thus, mtDNA  
67 is an important genetic marker in the revelation of the origins of heterogeneous  
68 populations.

69 The state of Espírito Santo (ES) is located in the Southeast of Brazil, the most developed  
70 and populous region of the country. The historical data point out that, like other coastal  
71 regions, its population is derived from admixture processes between Amerindians,  
72 Europeans and Africans. The establishment of the first colonial nucleus by Vasco  
73 Fernandes Coutinho in 1535 started the Portuguese colonization of the captaincy, initially  
74 inhabited by natives belonging to Tupi-Guarani (the Tupiniquins group) and Jê (the  
75 Botocudos group) linguistic families [9,10]. The direct importation of slaves from Africa  
76 dates from the end of 1621 to the mid-19<sup>th</sup> century [11]. Later, between the 19<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup>  
77 centuries, the ES received several waves of immigrants, of which 97.34% were European,  
78 mainly from Italy, Germany, Spain, Poland and the extinct Pomerania [12]. The ancient  
79 Pomerania, on the southern shore of the Baltic Sea, ceased to exist as a geographical unit  
80 after the end of Second World War, and its territory was divided between Germany and  
81 Poland [12]. From the second half of the 19<sup>th</sup> century, the families emigrated mainly to  
82 Brazil and the United States [13]. The first immigrants arrived to ES in 1859, and their  
83 descendants constitute one of the largest Pomeranian communities in the world, located  
84 in the mountains of the Metropolitan macro-region [12,13]. The still existing geographic  
85 and cultural isolation contributes to the preservation of traditional aspects of their culture,  
86 especially the Pomeranian language, an exclusively oral language [13,14].

87 The last demographic census of Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) in  
88 2010 pointed out that the inhabitants of the ES would be divided, according to self-  
89 declaration, into 48.62% Brown, 42.15% White, 8.35% Black, 0.62% Yellow and 0.26%  
90 Indigenous (or Amerindian) [15]. However, the self-declaration is a subjective concept  
91 that takes into account mainly physical characteristics such as skin color, hair type, nose  
92 and lip shape. According to Telles [16], the classification as White, Brown or Black is  
93 consistent 79% of the time. Different studies were performed in order to correlate genetics  
94 and self-declaration ancestries in Brazilian populations, pointing to a discrepancy  
95 between them and recommending the use of genetic markers for a proper assessment of  
96 the ancestry genetic background of admixed groups, e.g. [17,18].

97 The mtDNA pool of the present-day Brazilian population has been investigated at local,  
98 regional and national levels. The first study addressing ES was performed by Sanches et  
99 al. [19] who analyzed CR haplotypes from 97 individuals. The authors found a  
100 predominance of African haplogroups (43.3%) followed by European (32.0%) and  
101 Amerindian (23.7%) lineages. In the Southeast region, Fridman et al. [20] reported a

102 similar frequency of Amerindian and African haplogroups (36.9% and 35.2%,  
103 respectively) followed by European (27.6 %) haplogroups. For the Brazilian territory,  
104 Alves-Silva et al. [21], after analyzing 247 samples from 4 regions, found 39% European,  
105 33% Amerindian and 28% African lineages.

106 Because populations can have different genetic backgrounds, specific mtDNA databases  
107 are important to reveal the diversity and to estimate the frequency of matrilineal  
108 haplotypes in each population. This information allows to statistically estimate the weight  
109 of evidence in a forensic casework [22,23]. Considering that the rarity of a haplotype  
110 consists in the number of times it is observed in a database [24], the greater the number  
111 of unrelated individuals included, the more reliable the estimate will be.

112 The present study aimed to expand the mtDNA control region data for ES by examining  
113 the genetic profile of 291 unrelated volunteers. It is important to highlight that this is the  
114 first study including population samples representing the 4 macro-regions of ES, as well  
115 as a sample from one of the largest Pomeranian communities in the world.

## 116 **2. Materials and Methods**

### 117 *2.1. Ethics statement*

118 The study design and the written informed consent form were approved by Research  
119 Ethics Committee of Centro Integrado de Atenção a Saúde – CIAS/Unimed Vitória in  
120 March 16, 2018 (CAAE: 79664817.4.0000.5061). All volunteers signed the informed  
121 consent and their samples were analyzed anonymously.

### 122 *2.2. Sampling and DNA extraction*

123 A total of 291 samples were collected from non-related individuals from Espírito Santo,  
124 Brazil, belonging to two major groups: general and Pomeranian population. The general  
125 population group included 214 samples from the 4 macro-regions of the ES state (for a  
126 total of 78 cities): North (N = 17 from 7 cities), Central (N = 54 from 12 cities),  
127 Metropolitan (N = 81 from 15 cities) and South (N = 62 from 21 cities).

128 As recommended by the IBGE [25], all volunteers were classified according to their self-  
129 declaration in White, Black, Brown, Yellow or Indigenous (or Amerindian). There was  
130 no record of Amerindian and Yellows and only one participant did not declare a color.

131 The Pomeranian population were composed by 77 samples from the cities of Santa Maria  
132 de Jetibá (N = 55), Laranja da Terra (N = 6), Domingos Martins (N = 5), Santa Leopoldina

133 (N = 4), Vila Pavão (N = 2) and Itaguaçu, Santa Teresa, Serra, Vila Pavão and Vila  
134 Valério (N = 1 for each). The volunteers identified themselves as Pomeranian's descent,  
135 visually appeared to be, besides being born and living in well-known Pomeranian  
136 communities.

137 The biological samples consisted of buccal swabs and/or peripheral blood. The latter were  
138 collected either on FTA® Elute Cards (GE Healthcare) or EDTA Vacutainer® tubes  
139 (BD). Genomic DNA was extracted according to the FTA Elute Card® manufacturer  
140 protocol or using a standard protocol with proteinase-K digestion followed by phenol-  
141 chloroform extraction and ethanol precipitation [26].

### 142 2.3. *mtDNA typing*

143 Conventional PCR was performed to amplify the mtDNA control region (from position  
144 16024 to position 576), in a 8 µl final volume reaction composed by 1–5 ng of DNA, 0.5X  
145 of Qiagen® Multiplex PCR Kit and 0.2 µM of each primer. Good quality samples were  
146 amplified with the L15900 and H639 primer pair (Table 1). For the poor-quality samples,  
147 the primers L15997 and H639 were used instead (Table 1). The thermocycling profile  
148 was: initial denaturation at 95 °C for 15 min; 30 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 90 s  
149 and 72 °C for 60 s; and a final extension at 72 °C for 10 min. After checking the results  
150 of the PCR in a 1% agarose-gel electrophoresis, the amplicons were purified using  
151 illustra™ ExoProStar™ 1-Step reagent (GE Healthcare). The CR sequencing was done  
152 using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and the  
153 same primers used in the PCR. When necessary, a second round of sequencing was done  
154 using the following internal primers, described in Table 1: L314, L16268, L16555, H016,  
155 H460, H484 and H16175. The thermocycling protocol was: denaturation at 96 °C for  
156 2 min; followed by 35 cycles of 96 °C for 15 s, 50 °C for 9 s and 60 °C for 2 min; and a  
157 final extension at 60 °C for 10 min. The Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal  
158 Cycler was used for all amplification and sequencing reactions. The extension products  
159 were cleaned by ethanol/EDTA/sodium acetate precipitation. The capillary  
160 electrophoresis was carried on an ABI 3500 (Applied Biosystems) sequencer using POP-  
161 7™ polymer (Applied Biosystems).

### 162 2.4. *Sequences alignment and haplogroup classification*

163 The mtDNA sequences were aligned and compared to the revised Cambridge Reference  
164 Sequence (rCRS) [27] using SeqScape® Software-version 2.7 (Applied Biosystems).



165 Haplotypes were determined following the guidelines proposed by International Society  
166 for Forensic Genetics (ISFG) [28]. Haplogroups were assigned on EMPOP v4 [29] and  
167 Haplogrep 2.0 (v2.1.13) [30]. The automated haplogrouping was manually checked on  
168 Phylotree build 17, February 2016 [7]. The EMPOP tools “Network” [31] and  
169 “EMPcheck” (<https://empop.online/empcheck>) were used to detect potential errors in the  
170 dataset. Data were submitted to EMPOP [32] for quality control and will be available for  
171 forensic searches under the accession number EMP00748.

## 172 *2.5. Statistical analysis*

173 Haplogroup frequencies were calculated by direct counting. The conversion of haplotypes  
174 into DNA sequences was done using HaploSearch software (<https://haplosearch.com/>)  
175 [33]. Calculations of genetic diversity, haplotype frequencies, and genetic distances were  
176 performed on the Arlequin software [34]. Genetic distances were visualized in two  
177 dimensional plots using the multidimensional scaling (MDS) method included in  
178 STATISTICA v8.0 program (StatSoft, Inc. 2007; [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

## 179 **3. Results and discussion**

180 The full list of haplotypes and the corresponding haplogroups obtained in this study is  
181 available in Table S1.

182 Considering the entire set of haplotypes, point heteroplasmy was detected in 4.4%  
183 (13/291) of the samples (Table S2). All heteroplasmy occurred in positions within the  
184 HVS I and II, in accordance with the described by Irwin et al. [35]. A search in the  
185 EMPOP database (on November 2018) showed that the observed point heteroplasmy  
186 are all recorded in the database, except for 151Y, which was already described by Simão  
187 et al. [36], in a sample from Rio de Janeiro. The most common point heteroplasmy was  
188 16189Y, shared by 4 samples, followed by 234R that was detected 2 times. None of these  
189 6 samples presented the same haplogroup, and no individuals were found with more than  
190 one point heteroplasmy (Table S2).

191 Length heteroplasmy was frequently observed associated with insertion in the C-tracts of  
192 HVSI, HVSII and HVSIII and in the AC dinucleotide repeat region. The length  
193 heteroplasmy was also associated with the polymorphism 460C in the sample F91 and  
194 with a TAA insertion at position 241 of the sample 96P (see Table S1).

### 195 *3.1. Maternal genetic ancestry analysis*

196 Regarding maternal ancestry, the following proportions were obtained for the general  
197 population sample from Espirito Santo (excluding the Pomeranians): 49.1% European,  
198 28.5% African and 22.4% Amerindian lineages.

199 Comparing the overall ancestry proportions in different regions of Brazil (Fig. 1A), a  
200 decreasing south-east-north gradient can be observed concerning the European lineages.  
201 The Northern region has the highest frequency of Amerindian haplogroups, and the  
202 African haplogroups are more prevalent both in Northern and Northeastern regions (Fig.  
203 1A).

204 The ancestry profile of the general sample from Espirito Santo is similar to those from  
205 other admixed populations from the Southeastern region of Brazil, namely Rio de Janeiro,  
206 São Paulo and Minas Gerais (Fig. 1B), although ES presents a higher European ancestry.  
207 When studying ancestry informative autosomal indels, Manta et al. [37] found higher  
208 values of African ancestry in all Southeast and Northeast states than in the rest of the  
209 country, except for Espirito Santo. Therefore, Espirito Santo stands out from the  
210 remaining east coast populations, showing a lower African influx for both the autosomal  
211 and mtDNA genepools.

212 In a previous study of the mtDNA variation in 97 samples from the general population of  
213 Espirito Santo [19], the authors found a higher African ancestry (43.0%) than in this  
214 study. This can most probably be explained by different sampling strategies, since, in the  
215 present work, the haplogroup distributions varied among the 4 macro-regions (see  
216 supplementary Table S3; Fig. 1C). The North macro-region presented the highest  
217 proportion of African haplogroups (47.1%) and the lowest European ancestry (35.3%).  
218 Indeed, the proportion of African haplogroups in the North macro-region is more similar  
219 to the described for populations from Northeast than from Southeast regions (Fig. 1A).  
220 This result can be due to the close proximity of North macro-region cities to the state of  
221 Bahia, which is known to have a high African heritage. In this state, Blanton et al. [38]  
222 reported an average African ancestry of 46.6% using autosomal markers. The  
223 predominance of an African genetic component in the Northeast region was also  
224 confirmed in other states, such as Alagoas [39] and Pernambuco [21], for mtDNA  
225 markers. It should be noted that the South macro-region showed a slight increase in the  
226 proportion of African ancestry, compared to the Metropolitan and Central regions,  
227 probably due to its geographical proximity to Rio de Janeiro. As for the greater presence  
228 of African lineages in the North and, to a lesser extent, in the South macro-regions, it is

229 also important to point out the asymmetric distribution of the Afro-descent communities  
230 (known as Quilombos) along the territory, with 26 communities reported in the North  
231 (between the cities of Conceição da Barra and São Mateus), 6 in the South, 3 in the  
232 Metropolitan area, and just one in the Center [11,40,41].

233 The other ES macro-regions showed a more uniform maternal ancestry profile, with a  
234 predominance of European haplogroups, as occurs in the south of the country (Fig. 1A  
235 and 1C).

236 Among the Pomeranians, 98.7% European and 1.3% Amerindian haplogroups were  
237 found. As illustrated in Figure 1C, the genetic structure of the Pomeranians is very  
238 different from the other Brazilian regions, regarding its maternal heritage. These data  
239 point to a genetic footprint of the peculiar lifestyle maintained by the Pomerania  
240 descendants which encompasses geographic and cultural isolation. It is worth mentioning  
241 that the most “Pomeranian” town of ES, Santa Maria de Jetibá (where most of the samples  
242 were collected), is in the Metropolitan macro-region, only 96 km apart from the capital.

### 243 3.2. Genetic distances between Brazilian populations

244 In order to statistically evaluate the differences observed in the ancestry of the different  
245 Brazilian sub-population groups, an analysis of genetic distances was performed. In  
246 addition to our samples, available data for the full CR in other Brazilian population  
247 samples were included, namely from Santa Catarina [42], São Paulo [43], Espírito Santo  
248 (ES\*) [19] and Rio de Janeiro [36]. The matrix of pairwise  $F_{ST}$  values was used to design  
249 the MDS plot that is presented in Fig. 2.

250 The results of pairwise  $F_{ST}$  analysis showed large distances between the Pomeranians and  
251 all other Brazilian population groups, with statistically significant values of non-  
252 differentiation probability (Table S4). In the comparisons involving Santa Catarina,  
253 significant p-values of non-differentiation were found with ES\*, São Paulo and Rio de  
254 Janeiro. No significant genetic differences were detected among ES macro-regions, ES\*,  
255 Rio de Janeiro and São Paulo.

256 The results of genetic distances analysis confirmed the genetic isolation of the  
257 Pomeranian descendants, which clearly differentiates from all other Brazilian  
258 populations, including those from the same region of the country (Brazilian Southeast  
259 region), or even from the same macro-region of Espírito Santo (Fig. 2). This distancing

260 from neighboring populations may be the result of genetic drift enhanced by the small  
261 population size and the voluntary endogamy resulting of cultural isolation.

262 The smaller genetic distance of the Pomeranians to Santa Catarina (Table S4) can be  
263 explained by the predominance of the European maternal component in both populations.  
264 Current populations of Pomeranian descendants and Santa Catarina show genetic  
265 similarities dating back to the European immigration waves encouraged by the Brazilian  
266 government from the second half of the 19<sup>th</sup> century [9]. In addition to Germans and  
267 Italians, the state of Santa Catarina also has one of the largest Pomeranian communities  
268 who arrived in the same period as in ES [13]. However, beyond the present study, no  
269 other studies concerning the genetic ancestry of the Pomeranians in Brazil are available.

270 No significant genetic differences were found between all samples from the Brazilian  
271 Southeast region, namely Espirito Santo, Rio de Janeiro and São Paulo. While the relative  
272 number of Amerindians does not vary greatly between the populations compared, the  
273 percentage of Europeans and Africans tends to separate the South population of Santa  
274 Catarina from the Southeast populations, at opposite extremes. This was evidenced by the  
275 pairwise comparisons. In this context, the proportions of Europeans and Africans allocate  
276 the general population of ES in an intermediate position, with lower  $F_{ST}$  values (and not  
277 statistically significant) than those between south and southeast (Table S4).

278 It is important to mention that although the size of the samples did not allow to detect  
279 statistically significant differences among our population samples, the distribution of  
280 haplogroups and  $F_{ST}$  values indicate a genetic stratification of the Espirito Santo  
281 population. In Fig. 2, it is possible to see that Rio de Janeiro and São Paulo (2 distinct  
282 states) are grouped more closely than the samples belonging to the different macro-  
283 regions of Espirito Santo.

284 As illustrated in Fig. 2, the Northern macro-region is closer to the populations of Rio de  
285 Janeiro and São Paulo than to the other macro-regions of the ES. The North presented the  
286 highest percentage of African haplogroups (47%), which is consistent with data already  
287 reported in neighboring states. An over representation of this macro-region could explain  
288 the high proportion of African lineages found in the study of Sanches et al. [19]. However,  
289 to test this hypothesis it would be necessary to have more detailed information on the  
290 origin of the samples and it would be also necessary to increase the size of our sample,  
291 since the differences found were not statistically significant.

### 292 3.3. *Self-declared and maternal ancestries*

293 When comparing self-declaration and the mtDNA continental origin (Fig. 3), different  
294 trends among Whites, Blacks and Browns were found. Among self-declared Whites, there  
295 was an increase in the proportion of European haplogroups in relation to the general  
296 population sample, with a concordance in 71.3% of the times. Although it was the  
297 smallest sample, self-declared Africans had the highest proportion of African maternal  
298 ancestry (64.3%). Notably, the percentage of self-declared Black individuals was lower  
299 in the ES macro-regions with the highest proportion of African maternal lineages (North  
300 and South) (Table S3). Among the Browns, there was a more equitable distribution of  
301 haplogroups, with an increase of Amerindian and African lineages regarding to the total  
302 population.

303 The non-perfect correlation between self-declaration and mtDNA haplogroups is not  
304 surprising, since the genetic ancestry of an individual can only be accessed through the  
305 analysis of a large number of recombining autosomal markers. Nevertheless, the observed  
306 increase in the frequency of African and Amerindian maternal lineages in the groups self-  
307 declared as Black or Brown is consistent with historical data, describing sex-biased  
308 admixture processes between European males and non-European females, for most South  
309 American populations.

### 310 3.4. *Haplotype diversity in Espirito Santo*

311 Information on the number of unique haplotypes (U), haplotype diversity (H) and mean  
312 number of pairwise differences (MNPd) for ES, including the general (and macro-  
313 regions) and Pomeranian samples, is depicted in Table 2. In addition, for comparison  
314 purposes, data for the same populations used in genetic distance analysis were also  
315 included in Table 2, namely from Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro and ES\*.

316 In the general population, 201 different haplotypes were found among 214 samples,  
317 resulting in an H value of 99.9%. The analysis per region showed similarly high values,  
318 especially in the North macro-region, which also presented the highest proportion of  
319 African haplogroups (47.0%). Both from the state and regional points of view, the MNPd  
320 values found were similar to those observed in other Brazilian admixed populations, such  
321 as those from the Southeast region, including Rio de Janeiro and São Paulo states, as well  
322 as another sample from ES\*. The MNPd found between the samples from general

323 population of Espirito Santo can be considered high when compared with those in non-  
324 admixed populations, such as Europeans whose MNPD values varying 7 to 10 [1,44,45].  
325 It is worth mentioning that a slightly lower value of MNPD was found in the Central  
326 macro-region that holds the largest relative proportion of Europeans and the lowest of  
327 Africans.

328 Among the 77 Pomeranians studied, only 56 unique haplotypes were identified and the H  
329 value was 99.5% (Table 2). Taken together, the low MNPD value and the high number  
330 of shared haplotypes (15%) are indicative of founder events and inbreeding. According  
331 to records of the public archive of the state government, the Pomeranian community of  
332 the ES began with the arrival of 27 families (117 people) who, after coming to the capital,  
333 went directly to "Colonia of Santa Leopoldina", current city of Santa Maria de Jetibá [13].

#### 334 **4. Conclusions**

335 Although previous studies have repeatedly shown the highly admixed profile of the  
336 Southeastern region, with balanced proportions of the major haplogroups, this study  
337 evidenced that the Espirito Santo is an exception and appears closer to the South, showing  
338 a lower genetic distance to Europeans than the other populations from de same region.

339 Our results also indicate a genetic stratification of the general population, with a  
340 geographically unequal distribution of maternal lineages. The North macro-region shows  
341 a maternal genetic heritage richer in African lineages than the remaining ones. In this  
342 sense, the adoption of a single database for ES may not be adequate for forensic purposes.  
343 It would be more reasonable to think of the North macro-region and the Central-South  
344 Zone as distinct references.

345 The mtDNA analyses attest the Pomeranians as a genetically isolated population whose  
346 profile is clearly distinguishable from other Brazilian populations due to its strong  
347 maternal European ancestry. The genetic data produced by this study support historical  
348 and recent records on the preservation of isolated and endogamic customs by Pomeranian  
349 descendants. This history began almost 160 years ago, when the difficulty of locomotion  
350 to urban area and the problems of communication in Portuguese (Pomeranian is a  
351 Germanic language) may have been barriers in the contact with neighboring populations.

#### 352 **Acknowledgements**

353 This work was mainly financed by Fundação de Amparo a Pesquisa do Espirito Santo  
354 (FAPES) (Grant Term nº 87/2017); the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

355 Nível Superior – Brazil (CAPES) (Finance Code 001). LG was supported by Conselho  
 356 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (ref. 305330/2016-0);  
 357 IDL received financial support from FAPES (Grant Term nº 19/2016). We are grateful to  
 358 all sample donors and NGHM members for assisting during the sampling campaign. We  
 359 also thank teams from the DNA Diagnostic Laboratory (LDD) and the Núcleo de  
 360 Genética Aplicada à Biodiversidade (NGACB) for support during DNA analyzes.

### 361 **References**

- 362 [1] L. Chaitanya, M. Van Oven, S. Brauer, B. Zimmermann, G. Huber, C. Xavier, W. Parson,  
 363 P. De Knijff, M. Kayser, High-quality mtDNA control region sequences from 680  
 364 individuals sampled across the Netherlands to establish a national forensic mtDNA  
 365 reference database, *Forensic Sci. Int. Genet.* 21 (2016) 158–167.  
 366 doi:10.1016/j.fsigen.2015.12.002.
- 367 [2] M. Ingman, U. Gyllensten, Analysis of the complete human mtDNA genome:  
 368 Methodology and inferences for human evolution, in: *J. Hered.*, (2001).  
 369 doi:10.1093/jhered/92.6.454.
- 370 [3] W.M. Brown, E.M. Prager, A. Wang, A.C. Wilson, Mitochondrial DNA sequences of  
 371 primates: Tempo and mode of evolution, *J. Mol. Evol.* (1982). doi:10.1007/BF01734101.
- 372 [4] A. Torroni, A. Achilli, V. Macaulay, M. Richards, H.J. Bandelt, Harvesting the fruit of the  
 373 human mtDNA tree, *Trends Genet.* 22 (2006) 339–345. doi:10.1016/j.tig.2006.04.001.
- 374 [5] D.C. Wallace, Bioenergetics in human evolution and disease: Implications for the origins  
 375 of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases, *Philos.*  
 376 *Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* (2013). doi:10.1098/rstb.2012.0267.
- 377 [6] S.L. Mitchell, R. Goodloe, K. Brown-gentry, S.A. Pendergrass, D.G. Murdock, D.C.  
 378 Crawford, Characterization of mitochondrial haplogroups in a large population-based  
 379 sample from the United States, *133* (2015) 861–868. doi:10.1007/s00439-014-1421-  
 380 9.Characterization.
- 381 [7] M. van Oven, M. Kayser, Updated comprehensive phylogenetic tree of global human  
 382 mitochondrial DNA variation., *Hum. Mutat.* (2009). doi:10.1002/humu.20921.
- 383 [8] H.J. Bandelt, M. Van Oven, A. Salas, Haplogrouping mitochondrial DNA sequences in  
 384 Legal Medicine/Forensic Genetics, *Int. J. Legal Med.* (2012). doi:10.1007/s00414-012-  
 385 0762-y.
- 386 [9] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Brazil: 500 years of settlement, Rio  
 387 de Janeiro (2007). <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv82844.pdf>.
- 388 [10] P. Ehrenreich, Índios Botocudos do Espírito Santo no século XIX, Arquivo Público do  
 389 Estado do Espírito Santo, Vitória, 2014.  
 390 [https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Livros/MIOLO\\_LivroIndiosBotocudos\\_Jun2014\\_0](https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Livros/MIOLO_LivroIndiosBotocudos_Jun2014_041214.pdf)  
 391 [41214.pdf](https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Livros/MIOLO_LivroIndiosBotocudos_Jun2014_041214.pdf).
- 392 [11] C. Maciel, Negros no Espírito Santo, Arquivo Público do Estado do Espírito Santo,  
 393 Vitória. (2016).  
 394 [https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Livros/MioloLivroNegros\\_FINAL\\_BAIXA.pdf](https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Livros/MioloLivroNegros_FINAL_BAIXA.pdf).
- 395 [12] C. Franceschetto, Imigrantes: base de dados da imigração estrangeira no Espírito Santo

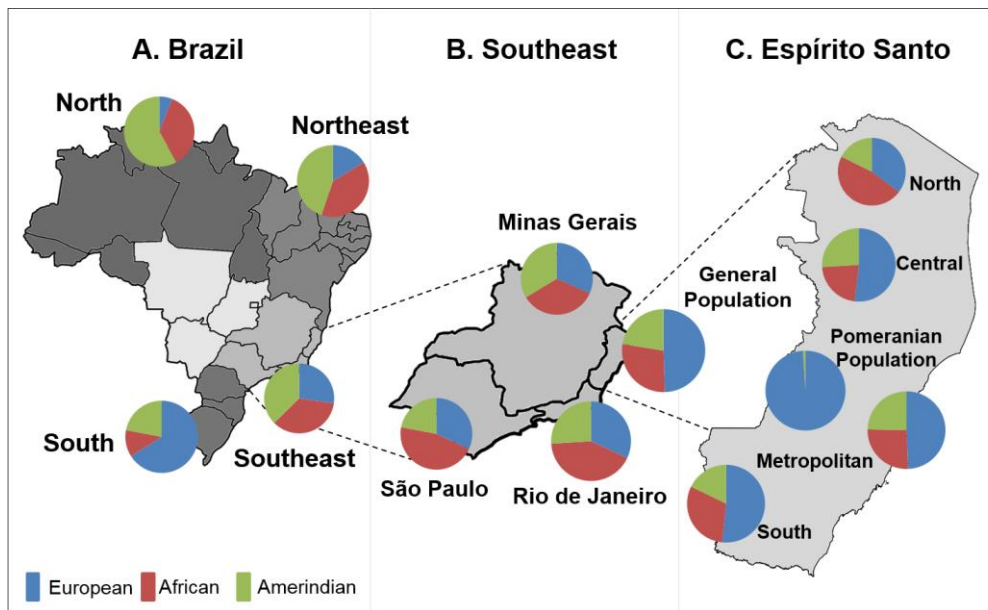
- 396 nos séculos XIX e XX, Arquivo Público do Estado do Espírito Santo, Vitória. (2014).  
397 [https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Livros/Imigrantes\\_Livro\\_21\\_05\\_14.pdf](https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Livros/Imigrantes_Livro_21_05_14.pdf).
- 398 [13] K. Granzow, Pomeranos sob o Cruzeiro do Sul: colonos alemães no Brasil, Arquivo  
399 Público do Estado do Espírito Santo, Vitória. (2009).  
400 [https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Livros/pomeranos\\_sob\\_o\\_cruzeiro\\_do\\_sul.pdf](https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Livros/pomeranos_sob_o_cruzeiro_do_sul.pdf).
- 401 [14] J. Fehlberg, P.R.M. Menandro, Terra, família e trabalho entre descendentes de pomeranos  
402 no Espírito Santo, Barbarói. (2011) 80–100.  
403 <http://pepsic.bvsalud.org/pdf/barbaroi/n34/n34a06.pdf>.
- 404 [15] Instituto Jones dos Santos Neves (IJSN), Distribuição populacional no Espírito Santo:  
405 resultados do censo demográfico 2010, IJSN. (2011) 1–11.  
406 <http://www.ijsn.es.gov.br/biblioteca/revistas>.
- 407 [16] E.E. Telles, Racial ambiguity among the Brazilian population, *Ethn. Racial Stud.* (2002).  
408 doi:10.1080/01419870252932133.
- 409 [17] T.K.M. Leite, R.M.C. Fonseca, N.M. de França, E.J. Parra, R.W. Pereira, Genomic  
410 ancestry, self-reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian  
411 admixed siblings, *PLoS One*. (2011). doi:10.1371/journal.pone.0027162.
- 412 [18] M.M.S.G. Cardena, Â. Ribeiro-dos-Santos, S. Santos, A.J. Mansur, A.C. Pereira, C.  
413 Fridman, Assessment of the Relationship between Self-Declared Ethnicity, Mitochondrial  
414 Haplogroups and Genomic Ancestry in Brazilian Individuals, *PLoS One*. (2013).  
415 doi:10.1371/journal.pone.0062005.
- 416 [19] N.M. Sanches, G.G. Paneto, R.F. Figueiredo, A.O. de Mello, R.M.B. Cicarelli,  
417 Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Espírito Santo state,  
418 Brazil, *Mol. Biol. Rep.* 41 (2014) 6645–6648. doi:10.1007/s11033-014-3547-1.
- 419 [20] C. Fridman, R.S. Gonzalez, A.C. Pereira, M.M.S.G. Cardena, Haplotype diversity in  
420 mitochondrial DNA hypervariable region in a population of southeastern Brazil, *Int. J.*  
421 *Legal Med.* 128 (2014) 589–593. doi:10.1007/s00414-014-1023-z.
- 422 [21] J. Alves-Silva, M. da Silva Santos, P.E.M. Guimarães, A.C.S. Ferreira, H.-J. Bandelt,  
423 S.D.J. Pena, V.F. Prado, The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages, *Am. J. Hum. Genet.*  
424 67 (2000) 444–461. doi:10.1086/303004.
- 425 [22] M. Holland, T. Parsons, Mitochondrial DNA Sequence Analysis - Validation and Use for  
426 Forensic Casework, *Forensic Sci. Rev.* (1999). doi:1042-7201/11-01-99/21-50.
- 427 [23] A. Brandstätter, H. Niederstätter, M. Pavlic, P. Grubwieser, W. Parson, Generating  
428 population data for the EMPOP database-An overview of the mtDNA sequencing and data  
429 evaluation processes considering 273 Austrian control region sequences as example,  
430 *Forensic Sci. Int.* (2007). doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.006.
- 431 [24] J.M. Butler, *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. (2010). doi:10.1016/C2009-0-  
432 01945-X.
- 433 [25] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Pesquisa Nacional por Amostra de  
434 Domicílios (PNAD) (2014- 2015). doi:ISSN 0101-6822.
- 435 [26] J. Sambrook, D.W. Russell, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory*  
436 *manual*, Cold Spring Harb. Lab. Press. (1989). doi:10.3724/SP.J.1141.2012.01075.
- 437 [27] R.M. Andrews, I. Kubacka, P.F. Chinnery, R.N. Lightowers, D.M. Turnbull, N. Howell,  
438 *Reanalysis and revision of the cambridge reference sequence for human mitochondrial*



- 439 DNA [5], *Nat. Genet.* (1999). doi:10.1038/13779.
- 440 [28] W. Parson, L. Gusmão, D.R. Hares, J.A. Irwin, W.R. Mayr, N. Morling, E. Pokorak, M.  
441 Prinz, A. Salas, P.M. Schneider, T.J. Parsons, DNA Commission of the International  
442 Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA  
443 typing, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2014). doi:10.1016/j.fsigen.2014.07.010.
- 444 [29] A. Röck, J. Irwin, A. Dür, T. Parsons, W. Parson, SAM: String-based sequence search  
445 algorithm for mitochondrial DNA database queries, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2011).  
446 doi:10.1016/j.fsigen.2010.10.006.
- 447 [30] H. Weissensteiner, D. Pacher, A. Kloss-Brandstätter, L. Forer, G. Specht, H.J. Bandelt, F.  
448 Kronenberg, A. Salas, S. Schönherr, HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup  
449 classification in the era of high-throughput sequencing, *Nucleic Acids Res.* (2016).  
450 doi:10.1093/nar/gkw233.
- 451 [31] B. Zimmermann, A.W. Röck, A. Dür, W. Parson, Improved visibility of character conflicts  
452 in quasi-median networks with the EMPOP NETWORK software, *Croat. Med. J.* (2014).  
453 doi:10.3325/cmj.2014.55.115.
- 454 [32] W. Parson, A. Dür, EMPOP-A forensic mtDNA database, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2007).  
455 doi:10.1016/j.fsigen.2007.01.018.
- 456 [33] R. Fregel, S. Delgado, HaploSearch: A tool for haplotype-sequence two-way  
457 transformation, *Mitochondrion.* (2011). doi:10.1016/j.mito.2010.11.001.
- 458 [34] L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider, Arlequin (version 3.0): An integrated software  
459 package for population genetics data analysis, *Evol. Bioinforma.* (2005).  
460 doi:10.1177/117693430500100003.
- 461 [35] J.A. Irwin, J.L. Saunier, H. Niederstätter, K.M. Strouss, K.A. Sturk, T.M. Diegoli, A.  
462 Brandstätter, W. Parson, T.J. Parsons, Investigation of heteroplasmy in the human  
463 mitochondrial DNA control region: A synthesis of observations from more than 5000  
464 global population samples, *J. Mol. Evol.* 68 (2009) 516–527. doi:10.1007/s00239-009-  
465 9227-4.
- 466 [36] F. Simão, A.P. Ferreira, E.F. de Carvalho, W. Parson, L. Gusmão, Defining mtDNA  
467 origins and population stratification in Rio de Janeiro, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2018).  
468 doi:10.1016/j.fsigen.2018.02.003.
- 469 [37] F. Saloum de Neves Manta, R. Pereira, R. Vianna, A. Rodolfo Beuttenmüller de Araújo,  
470 D. Leite Góes Gitaí, D. Aparecida da Silva, E. de Vargas Wolfgramm, I. da Mota Pontes,  
471 J. Ivan Aguiar, M. Ozório Moraes, E. Fagundes de Carvalho, L. Gusmão, Revisiting the  
472 Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels, *PLoS One.* 8 (2013) 1–11.  
473 doi:10.1371/journal.pone.0075145.
- 474 [38] R.E. Blanton, L.K. Silva, V.G. Morato, A.R. Parrado, J.P. Dias, P.R.S. Melo, E.A.G. Reis,  
475 K.A.B. Goddard, M.R.T. Nunes, S.G. Rodrigues, P.F.C. Vasconcelos, J.M. Castro, M.G.  
476 Reis, M.L. Barreto, M.G. Teixeira, Genetic ancestry and income are associated with  
477 dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population, *Eur. J. Hum. Genet.* 16 (2008)  
478 762–765. doi:10.1038/ejhg.2008.4.
- 479 [39] A.B.G. Barbosa, L.A.F.D. Silva, D.A. Azevedo, V.Q. Balbino, L. Mauricio-Da-Silva,  
480 Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas State,  
481 North-Eastern Brazil, *J. Forensic Sci.* 53 (2008) 142–146. doi:10.1111/j.1556-  
482 4029.2007.00619.x.
- 483 [40] Fundação Cultural Palmares, Certidões expedidas às comunidades remanescentes de

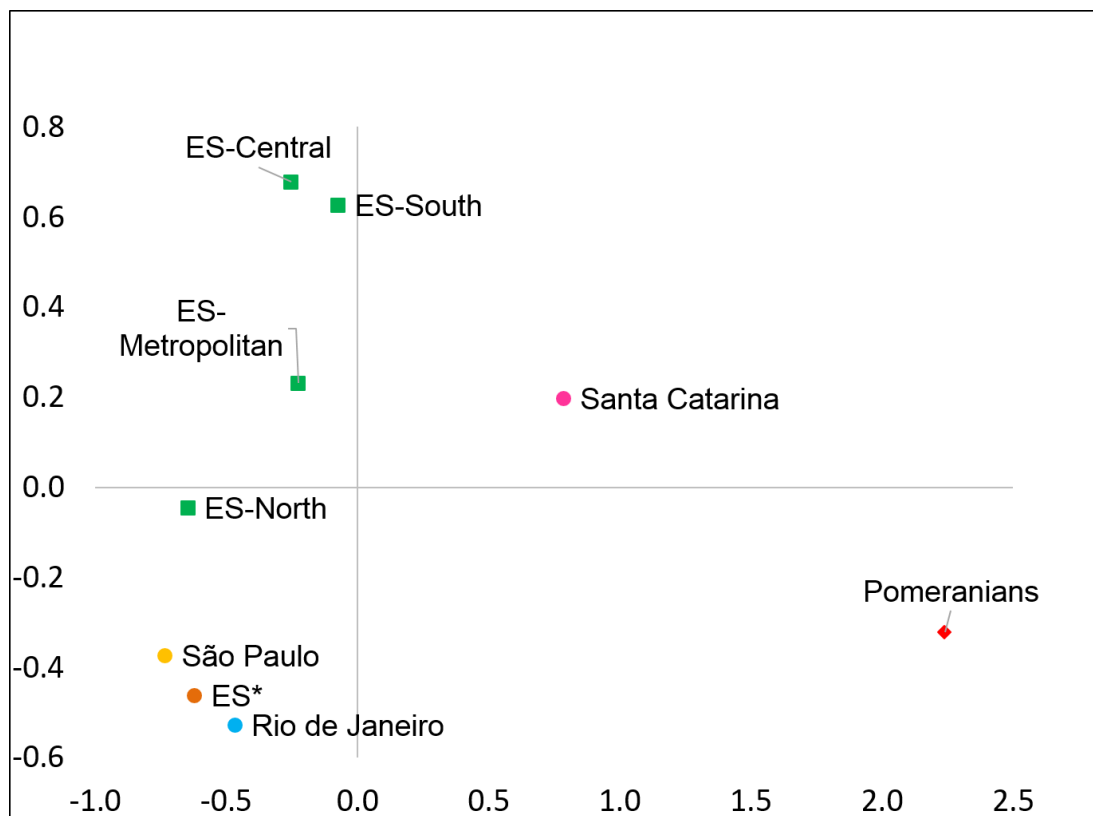
- 484 quilombos (CRQs). (2018). [http://www.palmares.gov.br/wp-](http://www.palmares.gov.br/wp-content/uploads/2015/07/COMUNIDADES-CERTIFICADAS-23-11-2018-site.pdf)  
485 [content/uploads/2015/07/COMUNIDADES-CERTIFICADAS-23-11-2018-site.pdf](http://www.palmares.gov.br/wp-content/uploads/2015/07/COMUNIDADES-CERTIFICADAS-23-11-2018-site.pdf).
- 486 [41] V.M.L. Moreira, Espírito Santo indígena: conquista, trabalho, territorialidade e  
487 autogoverno dos índios, 1798-1860, Arquivo Público do Estado do Espírito Santo, Vitória,  
488 2017. [https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Espirito\\_Santo\\_Indigena\\_completo\\_site.pdf](https://ape.es.gov.br/Media/ape/PDF/Espirito_Santo_Indigena_completo_site.pdf).
- 489 [42] L. Palencia, L. Valverde, A. Álvarez, L.M. Cainé, S. Cardoso, M.A. Alfonso-Sánchez,  
490 M.F. Pinheiro, M.M. De Pancorbo, Mitochondrial DNA diversity in a population from  
491 Santa Catarina (Brazil): Predominance of the European input, *Int. J. Legal Med.* 124.  
492 (2010) 331–336. doi:10.1007/s00414-010-0464-2.
- 493 [43] L. Prieto, B. Zimmermann, A. Goios, A. Rodriguez-Monge, G.G. Paneto, C. Alves, A.  
494 Alonso, C. Fridman, S. Cardoso, G. Lima, M.J. Anjos, M.R. Whittle, M. Montesino,  
495 R.M.B. Cicarelli, A.M. Rocha, C. Albarrán, M.M. De Pancorbo, M.F. Pinheiro, M.  
496 Carvalho, D.R. Sumita, W. Parson, The GHEP-EMPOP collaboration on mtDNA  
497 population data - A new resource for forensic casework, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2011).  
498 doi:10.1016/j.fsigen.2010.10.013.
- 499 [44] C.L. Hernández, G. Reales, J.M. Dugoujon, A. Novelletto, J.N. Rodríguez, P. Cuesta, R.  
500 Calderón, Human maternal heritage in Andalusia (Spain): Its composition reveals high  
501 internal complexity and distinctive influences of mtDNA haplogroups U6 and L in the  
502 western and eastern side of region, *BMC Genet.* 15 (2014) 1–16. doi:10.1186/1471-2156-  
503 15-11.
- 504 [45] A. Boattini, B. Martinez-Cruz, S. Sarno, C. Harmant, A. Useli, P. Sanz, D. Yang-Yao, J.  
505 Manry, G. Ciani, D. Luiselli, L. Quintana-Murci, D. Comas, D. Pettener, S. Adhikarla,  
506 C.J. Adler, E. Balanovska, O. Balanovsky, J. Bertranpetit, A.C. Clarke, A. Cooper, C.S.I.  
507 Der Sarkissian, M.C. Dulik, J.B. Gaieski, A.K. GaneshPrasad, W. Haak, M. Haber, L.  
508 Jin, M.E. Kaplan, H. Li, S. Li, E.A. Matisoo-Smith, N.C. Merchant, R.J. Mitchell, A.C.  
509 Owings, L. Parida, R. Pitchappan, D.E. Platt, C. Renfrew, D.R. Lacerda, A.K. Royyuru,  
510 F.R. Santos, T.G. Schurr, H. Soodyall, D.F.S. Hernanz, P. Swamikrishnan, C. Tyler-  
511 Smith, A.V. Santhakumari, P.P. Vieira, M.G. Vilar, R.S. Wells, P.A. Zalloua, J.S. Ziegler,  
512 Uniparental Markers in Italy Reveal a Sex-Biased Genetic Structure and Different  
513 Historical Strata, *PLoS One.* 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0065441.

O artigo submetido é complementado pelas figuras suplementares Fig.1, Fig.2 e Fig.3 e tabelas suplementares Table 1 e Table 2, descritas abaixo:



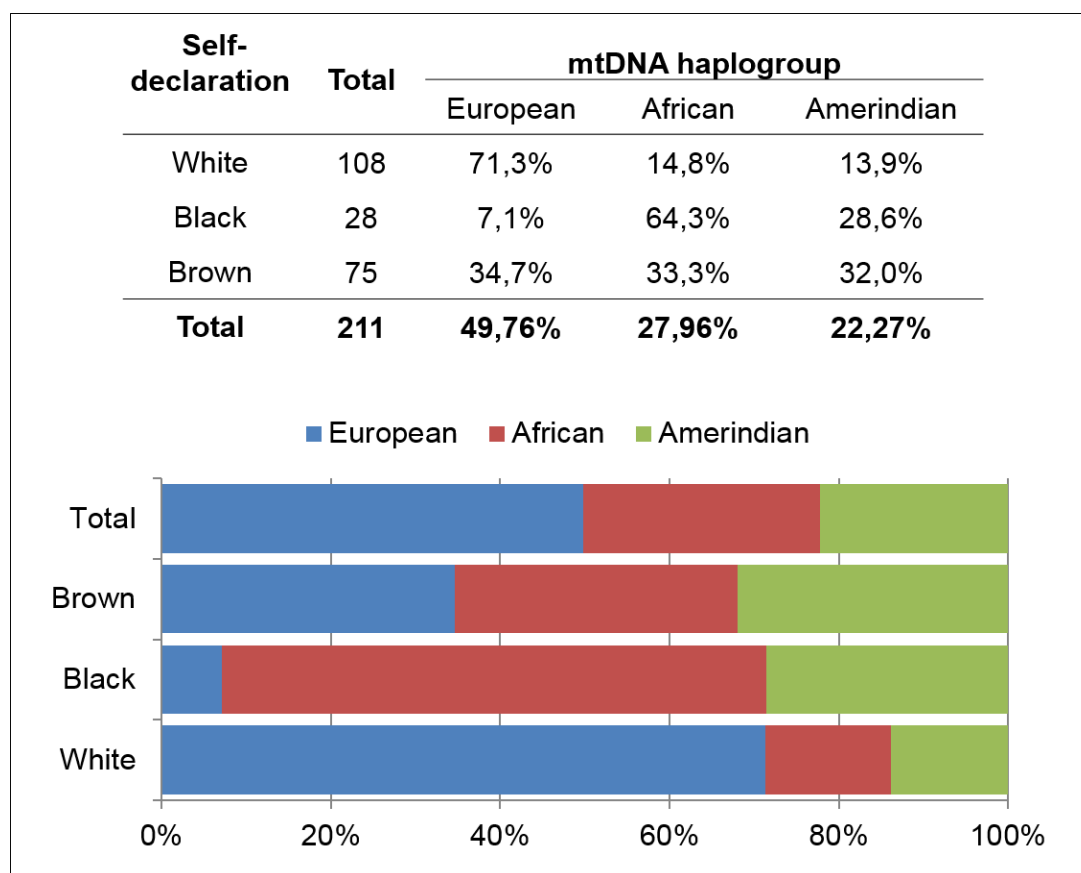
514

515 **Fig. 1.** Maternal genetic ancestry in the Brazilian sub-populations. The proportions of European  
 516 (blue), African (red) and Amerindian (green) haplogroups are presented for: A. four regions of  
 517 the country [20,21,37,38] (no data were available for Center-West); B. the states of Southeastern  
 518 region [21,36,39]; C. the Espírito Santo state, showing separately the 4 macro-regions and the  
 519 Pomeranian population.



520

521 **Fig. 2.** MDS plot of  $F_{ST}$  genetic distances among samples of this work (ES-macro-regions and  
 522 Pomeranian population) and those from previous studies with full CR data (ES\*, Rio de Janeiro,  
 523 Santa Catarina and São Paulo). ES\* refers to Sanches et al. [19].



524

525 **Fig. 3.** Comparison between self-declaration data and maternal ancestry in the general population  
 526 of Espirito Santo.

527 **Table 1.** Primers used for PCR and sequencing of the entire control region.

528

	Primers (5' - 3')	Reference
PCR and Sequencing	L15900 TAAACTAATACACCAGTCTTGTAACC	Cavalcanti et al. (2017)
	L15997 CACCATTAGCACCCAAAGCT	Wilson et al. (1995)
	H639 GGGTGATGTGAGCCCGTCTA	Chaitanya et al. (2016)
Additional sequencing	L314 CCGCTTCTGGCCACAGCACT	Brandstätter et al. (2004)
	L16268 CACTAGGATACCAACAAACC	Edson et al. (2004)
	L16555 CCCACACGTTCCCTTAAAT	Cavalcanti et al. (2017)
	H016 TGATAGACCTGTGATCCATCGTGA	Edson et al. (2004)
	H460 AGGGGAAAATAATGTGTTAGT	Chaitanya et al. (2016)
	H484 TGAGATTAGTAGTATGGGAG	Chaitanya et al. (2016)
	H16175 TGGATTGGGTTTTTATGTA	Brandstätter et al. (2004)

529

530 **Table 2.** Standard diversity indices.

531

Populations		N	T	U	H	MNPD	Reference
Espirito Santo (ES)	ES-Metropolitan	81	79	77	0.9994 ± 0.0021	17.246 ± 7.746	This study
	ES-South	62	59	56	0.9984 ± 0.0033	17.099 ± 7.707	
	ES-Central	54	53	52	0.9993 ± 0.0037	16.326 ± 7.387	
	ES-North	17	17	17	1.0000 ± 0.0202	17.566 ± 8.213	
	General population	214	201		0.9994 ± 0.0005	16.893 ± 7.545	
	Pomeranian population	77	66	56	0.9959 ± 0.0029	11.198 ± 5.140	
Espirito Santo (ES*)		95	91	87	0.9991 ± 0.0017	17.732811 ± 7.943552	Sanches et al. (2014)
Other Brazilian populations	Rio de Janeiro	205	194	184	0.9994 ± 0.0006	18.591 ± 8.274	Simão et al. (2018)
	São Paulo	142	134	127	0.9991 ± 0.0010	17.134 ± 7.664	Prieto et al. (2011)
	Santa Catarina	80	66	56	0.9943 ± 0.0031	15.704 ± 7.082	Palência et al. (2010)

Abbreviations: N (number of samples); T (total number of haplotypes); U (number of unique haplotypes); H (haplotype diversity) and MNPD (mean number of pairwise differences).

532

## 6 CONCLUSÕES

A produção de dados moleculares concretos e mais representativos da população do Estado do Espírito Santo, no Brasil, representa desafio constante para a descrição das características forenses do seu povo. O desenvolvimento deste trabalho, utilizando marcadores Y-STR para aplicação forense na população do estado, aumentou significativamente (cerca de 500%) os dados disponíveis para estudos, pesquisas e análises genéticas de vínculo de parentesco e investigação criminal nesta população.

Com este trabalho, foi possível verificar que as amostras da população geral do ES não apresentaram diferenças genéticas entre as quatro macrorregiões analisadas nem quando comparadas às outras populações brasileiras, incluindo uma população descrita em estudo prévio com amostras do próprio estado.

Ficou evidente que as amostras da comunidade pomerana estudada apresentaram perfis genéticos significativamente diferentes das populações de outros estados brasileiros e até mesmo da população não pomerana do ES. Observou-se que a população pomerana é geneticamente muito mais próxima dos europeus da Alemanha e mais semelhante à população polonesa do que a própria população alemã, geograficamente vizinhas.

A utilização dos dados obtidos nesse trabalho permitirá o desenvolvimento de novas metodologias tanto biotecnológicas quanto de análise de dados genéticos para a população do Estado do Espírito Santo, principalmente nos casos criminais em que haja a necessidade de resultados estatísticos mais confiáveis, em comparações de linhagens patriarcais e também nos crimes sexuais onde há vestígio de origem masculina.

Do ponto de vista biotecnológico, poder distinguir uma subpopulação com características singulares e muito diferentes dentro da população geral do estado obriga a adoção novas tecnologias de análise e tratamento de dados para obter resultados fidedignos em genética forense.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A necessidade de novos estudos e de um banco de dados específico para a comunidade pomerana ou, pelo menos, o uso de fatores estatísticos de correção para a estrutura dessa subpopulação, mostrou-se evidente para avaliação genética do cromossomo Y de vestígios em casos forenses ou de vínculo de parentesco.

Estudos envolvendo outras possíveis subpopulações de imigrantes, tais quais de descendentes de italianos, que corresponderam à grande maioria dos imigrantes do ES, semitas ou luxemburgueses, também se mostram promissores tendo em vista que esses grupos étnicos apresentavam características de vida comparáveis aos pomeranos e tiveram papel ímpar na colonização desse Estado, tendo seus descendentes a necessidade de bancos de dados fidedignos de sua origem no contexto forense.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANCHIETA J.. **Informação do Brasil e de suas capitanias**, in LEITE, S.. História da Companhia de Jesus no Brasil. Lisboa: Portugália; Rio de Janeiro: Civilização Brasileira/INL, 1939-49, 10 v. e Cartas dos primeiros jesuítas do Brasil. São Paulo: IV Centenário, 1954, 3 vol. op. cit., p.327.

BALLANTYNE, K.N., KEERL V, WOLLSTEIN A, CHOI Y, ZUNIGA SB, RALF A, VERMEULEN M, DE KNIJFF P, KAYSER M.. **A new future of forensic Y-chromosome analysis: rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages**. Forensic Sci Int Genet, 2012. 6(2): p. 208-18.

BARALDI, A. M.. **Utilização da técnica de identificação genética: panorama da realidade dos serviços oficiais de identificação brasileiros e a importância da atuação do cirurgião-dentista na equipe forense**. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 77p, 2008.

BARCELOS R.S.S; RIBEIRO G.G.B.L.; SILVA-JR W.A.; ABE-SANDES K.; GODINHO, N.M.; MARINHO-NETO F.; GIGONZAC M.A.D.; KLAUTAU-GUIMARÃES M.N.; OLIVEIRA S.F.. **Male contribution in the constitution of the Brazilian Centro-Oeste population estimated by Y-chromosome binary markers**. International Society of Forensic Genetics. (Org.). Progress in Forensic Genetics, 11. 11 ed. Amsterdam: Elsevier Science. v. 11, p. 228-230. 2006.

BUTLER, J. M. - Overview and History of DNA Typing. Em BUTLER, J. M. (Ed.) - **Fundamentals of Forensic DNA Typing**. USA : Elsevier, 2010. p. 1–42.

CARRACEDO, A.; BUTLER, J.M; GUSMAO, L.; PARSON W.; ROEWER L.; SCHNEIDER, P.M.. **Editorial: Publication of population data for forensic purposes**. Forensic Sci. Int. Genet., 4: 145-147. 2010.

CAVALLI-SFORZA L.L & FELDMAN M.W.. **The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution**. Nat. Genet., (Suppl 33): 266-275. 2003.

CHUNG Y.K. & FUNG W.K.. **Identifying contributors of two-person DNA mixtures by familial database search**. Int J Legal Med., 127: 25-33. 2013.



CLARK A.G.. **Genetics: The vital Y chromosome**. Nature, 2014. 508(7497): p. 463-5

DAEMON, BC. **Província do Espírito Santo: sua descoberta, história cronológica, sinopse e estatística**. 2ª ed, 2010, p. 107.

DE ANDRADE E.S.; GOMES A.V.; RAPOSO G.; MAURICIO-DA-SILVA L. & SILVA R.S.. **Mutation rate at 14 STR loci in the population from Pernambuco, Northeast Brazil**. Forensic Science International: Genetics, 3: 141-143. 2009.

DIEDERICHE M., MARTÍN P., AMORIM A., CORTE-REAL F., GUSMÃO L. **A case of double alleles at three Y-STR loci: forensic implications**. Int J Legal Med, 2005. 119(4): p. 223-5.

DIEGOLI T.M., **Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes**. Forensic Sci Int Genet, 2015. 18: p. 140-51.

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.

ELSON, J. L.. **Analysis of European mtDNAs for Recombination**. The American Journal of Human Genetics, v. 68, n. 1, p. 145–153, 2001.

ESPIRITO SANTO, Governo do Estado do Espírito Santo. Disponível em: <<https://es.gov.br/historia/colonizacao>> e <<https://www.es.gov.br/>>. Acessados em: Agosto de 2017.

EXCOFFIER L. and LISCHER H.E.L.. **Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows**. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567. 2010.

FERNANDES A.J.R. **Estudo de Estudo de marcadores genéticos com interesse forense**. Dissertação de mestrado em Genética Forense. Departamento de Biologia, Universidade do Porto – 2016.

FRANCESCHETTO C., **IMIGRANTES: Espírito Santo, Base de dados da imigração estrangeira no Espírito Santo nos séculos XIX e XX**. Arquivo Público do Estado do Espírito Santo, 2014. ISBN: 978-85-98928-15-9.

GRANZOW K. **Pomeranos sob o Cruzeiro do Sul: colonos alemães no Brasil**. Vitória (ES): Arquivo Público do Estado do Espírito Santo, 2009.

GODINHO N.M.O.; GONTIJO C.C.; DINIZ M.E.C.; FALCÃO-ALENCAR G.; DALTON G.C.; AMORIM C.E.G.; BARCELOS R.S.S.; KLAUTAU-GUIMARÃES M.N. & OLIVEIRA S.F.. **Regional patterns of genetic admixture in South America**. *Forensic Sci. Int.* 1: 329-330. 2008.

GOODWIN W., LINACRE A., and HADI S.. **An introduction to Forensic Genetics**. 2010, England: Wiley. 214.

HANSON E.K. & BALLANTYNE J.. **Comprehensive annotated STR physical map of the human Y chromosome: Forensic implications**. *Leg Med (Tokyo)*, 2006. 8(2): p. 110-20.

HASENBALG C.. **Race relations in post-abolition Brazil: the smooth preservation of racial inequalities**. Traduzido para Discriminação e desigualdades raciais no Brasil. 2ª ed, Ed UFMG, Belo Horizonte, 2005.

HELGASON A., EINARSSON A.W., GUÐMUNDSÓTTIR V.B., SIGURÐSSON Á., GUNNARSDÓTTIR E.D., JAGAÐEESAN A., EBENESERSDÓTTIR S.S., KONG A., STEFÁNSSON K., **The Y-Chromosome point mutation rate in humans**. *Nat Genet*, 2015. 47(5): p. 453-7.

HOLLAND, M. M.. **Mitochondrial DNA Sequence Analysis of Human Skeletal Remains: Identification of Remains from the Vietnam War**. *Journal of Forensic Sciences*, 1993.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Estudo em geociência: Por cidades e Estado - 2017. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br>>. Acessado em: Agosto de 2018.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Recenseamento da População do Império do Brasil – 1872. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Vol 4 livro nº 25477. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/biblioteca-catalogo?id=225477&view=detalhes>>. Acessado em: Agosto de 2018.

JOBLING M.A. & TYLER-SMITH C.. **The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age**. Nat Rev Genet, 2003. 4(8): p. 598-612.

KAYSER M., ROWER, L., HEDMANN M., HENKE L., HENKE J., BRAUER S., KRÜGER C., KRAWCZAK M., NAGY M., DOBOSZ T., SZIBOR R., 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**. American Journal of Human Genetics. 66,1580-1588, 2000.

KAYSER M., ERLER A., HEDMAN M. ,LEE A.C., MOHYUDDIN A. MEHDI S.Q., ROSSER Z., STONEKING M., JOBLING M.A., SAJANTILA A., TYLER-SMITH C.. **A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites**. Am J Hum Genet, 2004. 74(6): p. 1183-97.

KAYSER M. et al. **A new future of forensic Y-chromosome analysis: rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages**. Forensic Sci Int Genet 2012, 6 (2): 208-218 p.

LUTZ, S.. **mtDNA as a tool for identification of human remains: Identification using mtDNA**. International Journal of Legal Medicine, v. 109, n. 4, p. 205–209, 1996.

MARTINS T.M.V..**Y-miniSTR: alternativa para a análise de amostras “complicadas” - Estudo da população do Norte de Portugal**. Dissertação de Mestrado, Porto-Portugal, 84fl., 2008.

MEDEIROS, R. **Espirito Santo, encontro das raças**, Rio de Janeiro, [s.n.], 1997.

MEDEIROS, S. **Espirito Santo - um estado singular**. Ed. Ima, 2004, p.78.

MONSON, K. L.. **The mtDNA population database: an integrated software and database resource for forensic comparison**. Forensic Science Communications (<http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/current/index.htm>), 2002.

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.** Dissertação (Mestrado) - Santa Catarina, 2009. 145f.

NEI M., **Molecular Evolutionary Genetics.** Columbia University Press, 1987 – 512p.

**New guidelines for the publication of genetic population data.** Editorial / Forensic Science International: Genetics 7 (2013) 217–220.

NIJ - NATIONAL INSTITUTE OF JUSTICE. **The future of forensic DNA testing: predictions of the research and development working group of the National Commission on the future of DNA evidence.** Washington, DC, 2000. Acesso em: 10 agosto de 2013.

OLIVEIRA A.M., DOMINGUES P.M., GOMES V., AMORIM A., JANNUZZI J., CARVALHO E.F.DE, GUSMÃO L.. **Male lineage strata of Brazilian population disclosed by the simultaneous analysis of STRs and SNPs.** Forensic Science International: Genetics. 2014. Vol 13, p. 264-268.

PEMBERTON, T.J., SANDEFUR CI, JAKOBSSON M, ROSENBERG NA.. **Sequence determinants of human microsatellite variability.** BMC Genomics, 2009. 10: p. 612.

PENA, S D. J., CARVALHO-SILVA D.R., ALVES-SILVA J., PRADO V. F.. **Retrato molecular do Brasil.** Ciência Hoje, nº 159, p. 17-25, abril. 2000.

PINHEIRO, M. F. - Algumas perspectivas da identificação genética. Em PINHEIRO, M. F. (Ed.) - **Genética forense: perspectivas da identificação genética.** Porto : Edições Universidade Fernando Pessoa, 2010. p. 17–78.

PINTO L.M.; OLIVEIRA CL.; SANTOS L.L.; TARAZONA-SANTOS E.. **Molecular characterization and population genetics of non-CODIS microsatellites used for forensic applications in Brazilian population.** Forensic Science International: Genetics. 2013

PRINZ M.. **Advantages and Disadvantages of Y-Short Tandem Repeat Testing in Forensic Casework.** Forensic Sci Rev. 2003 Jul;15(2):191-8.

REBALA K., MIKULICH A.I., TSYBOVSKY I.S., SIVÁKOVÁ D., DZUPINKOVÁ Z., SZCZERKOWSKA-DOBOSZ A., SZCZERKOWSKA Z.. **Y-STR variation among Slavs: evidence for the Slavic homeland in the middle Dnieper basin.** J Hum Genet, 2007. 52(5): p. 406-14.

RÊGO J.J.D.. **Caracterização da distribuição de alelos de loci STR do cromossomo Y com elevada taxa de mutação em uma amostra populacional do Rio de Janeiro.** Dissertação (Mestrado) - UERJ, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências. 2015. pg 109 f.

RÖLKE H.R.. **Descobrimos Raízes – aspectos geográficos, históricos e culturais da Pomerânia.** Vitória: UFES Secretaria de Produção e Difusão Cultural, 1996; pp. 7-19.

ROEWER L.. **Y chromosome STR typing in crime casework.** Forensic Sci Med Pathol, 2009. 5(2): p. 77-84.

ROMERO-MONTOYA L., MARTINEZ-RODRIGUEZ H., PEREZ M. A., e ARGUELLO-GARCIA R.. **Relationship of Spermatoscopy, Prostatic Acid Phosphatase Activity and Prostate-Specific Antigen (P30) Assays with Further DNA Typing in Forensic Samples from Rape Cases.** Forensic Sci Int, v.206, p.111-8, 2011.

SALETTO N.. **Donatários, colonos, índios e jesuítas: O início da colonização no Espírito Santo** 2. ed. rev. - Vitória: Arquivo Público do Estado do Espírito Santo, 2011. 140p. - (Coleção Canaã; v. 13) ISBN 978-85-98928-08-1.

SANCHEZ J.J., BRIÓN M., PARSON W., BLANCO-VEREA A.J., BØRSTING C., LAREU M., NIEDERSTÄTTER H., OBERACHER H., MORLING N., CARRACEDO A.. **Duplications of the Y-chromosome specific loci P25 and 92R7 and forensic implications.** Forensic Sci Int, 2004. 140(2-3): p. 241-50.

SANTOS F.R., PANDYA A., KAYSER M., MITCHELL R.J., LIU A., SINGH L., DESTRO-BISOL G., NOVELLETTO A., QAMAR R., MEHDI S.Q., ADHIKARI R., DE KNIJFF P., TYLER-SMITH C.. **A polymorphic L1 retroposon insertion in the centromere of the human Y chromosome.** *Human Molecular Genetics* 2000, 9 (3): 421-430 p.

SILVA C.I.V.. **Métodos Estatísticos para análise de Y-STRs em Genética Forense.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências, Departamento de Estatística e Investigação Operacional, Universidade de Lisboa. 2011. 105 f.

SINCLAIR A.H.; BERTA P.; PALMER M.S.; HAWKINS J.R.; GRIFFITHS B.L.; SMITH M.J.; FOSTER J.W.; FRISCHAUT A.M.; BADGE R.L.B.; GOODFELLOW P.N.. **A Gene from the Human Sex-Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-Binding Motif.** *Nature*, v. 346, p. 240-244, 1990.

SJERPS M., KLOOSTERMAN A.D.. **Statistical aspects of interpreting DNA profiling in legal cases.** *Statistica Neerlandica*. 57(3) 368-389. 2003

SOARES-VIEIRA J.A.; BILLERBECK A.E.C.; IWAMURAI E.S.M.; MENDONCA B.B.; GUSMÃO L.; OTTO P.A.. **Population and Mutation analysis of Y-STR Loci in a sample From the City of São Paulo.** *Genet Mol. Biol.*, v.31, n3, p.651-656. 2008.

UNDERHILL P.A. and KIVISILD T., **Use of Y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations.** *Annu Rev Genet*, 2007. 41: p. 539-64.

VENTORIM L.. **Espirito Santo – Colonização.** Historiador, disponível em:< <http://classico.velhosamigos.com.br/Reportart/reportart77.html>> acessado em: agosto de 2018.

VIEIRA-SILVA C., DARIO P., RIBEIRO T., LUCAS I., GEADA H., ESPINHEIRA R.. **Y-STR mutational rates determination in South Portugal Caucasian population.** *Forensic Science International:Genetics supplement series*, 2, 60-61, 2009.

WEI W.; AYUB Q.; XUE Y. & TYLER-SMITH C.. **A comparison of Y-chromosomal lineage dating using either resequencing or Y-SNP plus Y-SNP genotyping.** Forensic Science International: Genetics, 7: 568-572. 2013.

WILLARD H.F.. **Tales of the Y Chromosome.** Nature, v.423, p.810-811, 2003.

WILLUWEIT S., ROEWER, L.. **The new Y chromosome haplotype reference database.** ForensicSci.Int.Genet.15(2015):43–48.


# Anexo I

Comprovante de submissão do 1º artigo derivado da tese.

03/12/2018 MS Landing

---


FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL **GENETICS**



Victor Stange | My Journals | Log

---

Home   Reports



PDF



FSIGEN\_2018\_500 | Correspondence

### Stratification among European descent and admixed Brazilian populations of Espírito Santo for 27 Y-STRs

Victor Stange | Universidade Federal do Espírito Santo, Brazil.

Status: **With Editor (0 days)** | Submitted: **02/Dec/2018**


Overview

 Files    Messages

---

**Other Authors** [Show Details](#)


Raquel Silva dos Reis (Universidade Federal do Espírito Santo),  
 Fernanda Garcia (Universidade Federal do Espírito Santo), Mariana  
 Lima Lugon (Laboratório de DNA Forense - PCES), Carolina  
 Mayumi Vieira (Laboratório de DNA Forense - PCES), Eldamaria de  
 Vargas Wolfgramm dos Santos (Universidade Federal do Espírito  
 Santo), Flávia de Paula (Universidade Federal do Espírito Santo),  
 Adriana Madeira (Universidade Federal do Espírito Santo), Iuri  
 Louro (Universidade Federal do Espírito Santo), Leonor Gusmão  
 (Laboratório de DNA Forense)


[Contact Editorial Team](#) 

**Abstract**

**Keywords**

Pomeranians; Y-Chromosome; Forensic Genetics; Haplotype; Frequency Database

Additional Information
 View

References
 View

---

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Terms of Use](#) | [Privacy Policy](#) | [About Us](#)  
 Cookies are set by this site. To decline or learn more, visit our [Cookies](#) page.



# Anexo I

Comprovante de submissão do 2º artigo derivado da tese.

Forensic Science International: Genetics



Research Paper | FSIGEN\_2018\_510

## A view of the maternal inheritance of Espírito Santo populations: the contrast between Admixed and Pomeranian descendant groups

Leonor Gusmão, Adriana Madeira Álvares da Silva, Elaine Stur, Elizeu Carvalho, Fernanda Garcia, Filipa Simão, Iuri Louro, Raquel Reis, Raquel Spinassé Dettogni, Victor Stange

Submitted 07 Dec 2018

Revision Requested 19 Dec 2018 [?](#)

[View PDF >](#)

Alert: keep me informed about the submission status for this manuscript

[Abstract](#)

+

[Decision Letter - Revise: 19 December 2018](#)

+



# Anexo III

Table S1. The Haplotype data of 27 Y-STR loci in Espírito Santo, Brazil . Pomeranians (n=79) followed by the General population (n=330).

ID	Population	Region	DYS576	DYS389I	DYS635	DYS389II	DYS627	DYS460	DYS458	DYS19	YGATAH4	DYS448	DYS391	DYS456	DYS390	DYS438	DYS392	DYS518	DYS570	DYS437	DYS385	DYS449	DYS393	DYS439	DYS481	DYF387S1	DYS533
F08	Pomeranians	central	18	14	23	30	22	10	17	14	12	19	10	16	24	12	13	38	18	15	11, 14	30	12	13	22	36, 36	12
F49	Pomeranians	metropolitan	16	13	23	30	17	11	15	16	12	20	11	16	25	11	11	42	22	14	11, 11	32	13	11	23	38, 38	12
F77	Pomeranians	metropolitan	17	13	23	29	23	11	17	14	11	19	10	16	25	12	13	37	17	15	11, 14	29	13	11	22	35, 37	10
F88	Pomeranians	metropolitan	18	12	23	29	26	11	15	13	12	20	10	16	24	11	15	40	17	14	14, 14	32	12	13	23	35, 40	12
F92	Pomeranians	metropolitan	17	12	21	28	18	12	16	15	11	19	10	13	24	9	11	38	17	16	11, 14	29	13	11	23	38, 38	12
F150	Pomeranians	central	18	13	23	29	22	11	16	14	12	19	11	16	23	12	13	37	18	16	11, 14	29	13	12	22	35, 35	11
F161	Pomeranians	central	18	13	23	30	17	12	17	17	12	20	10	16	24	11	11	42	20	14	10, 14	32	13	11	24	36, 38	12
F166	Pomeranians	central	16	13	23	29	22	11	17	14	12	19	11	16	25	12	13	38	17	15	11, 14	29	13	12	22	36, 36	12
F187	Pomeranians	metropolitan	16	12	21	28	19	11	15	14	10	20	10	16	22	10	11	39	19	16	13, 14	27	13	11	26	38, 39	11
F188	Pomeranians	metropolitan	20	14	21	31	21	11	16	14	11	21	11	16	22	9	11	39	18	15	17, 18	29	12	12	23	40, 40	11
F190	Pomeranians	metropolitan	18	13	23	29	16	11	17	16	12	20	10	17	25	11	11	41	18	14	11, 14	32	13	12	24	36, 38	12
F191	Pomeranians	metropolitan	18	13	24	31	22	10	17	16	11	19	11	13	23	11	13	40	16	15	11, 15	30	12	13	22	36, 36	12
F192	Pomeranians	metropolitan	17	13	21	30	21	9	16	13	12	19	10	17	24	10	11	39	20	14	17, 18	32	13	12	22	35, 38	12
F193	Pomeranians	metropolitan	19	13	24	30	21	11	17	14	12	19	11	15	24	12	13	37	18	15	14, 15	31	13	12	21	35, 35	11
F194	Pomeranians	central	16	13	23	29	22	11	16	14	12	19	11	16	24	12	13	36	17	14	11, 14	30	13	12	22	35, 35	12
F195	Pomeranians	central	20	13	23	30	16	11	16	15	13	20	10	16	25	11	11	43	17	14	10, 14	31	13	10	23	35, 37	12
F196	Pomeranians	metropolitan	16	13	24	29	20	9	15	13	12	20	10	17	24	10	11	42	19	14	16, 18	32	13	12	22	35, 39	12
F197	Pomeranians	metropolitan	16	12	21	28	19	10	15	14	11	20	10	14	23	10	11	37	21	16	14, 14	28	13	11	25	37, 39	11
F198	Pomeranians	metropolitan	15	13	20	30	19	10	16	15	12	21	10	16	22	10	12	37	17	16	14, 14	31	14	12	21	37, 39	9
F199	Pomeranians	central	17	14	21	31	20	11	15	15	10	20	11	14	23	10	12	39	19	14	13, 16	27	14	11	28	37, 38	11
F202	Pomeranians	metropolitan	16	13	23	30	20	10	18	15	12	19	10	14	23	10	14	39	19	14	11, 14	29	14	10	20	35, 35	12
F204	Pomeranians	metropolitan	17	13	25	30	16	11	17	15	12	20	11	16	25	11	11	39	19	14	12, 14	33	13	10	25	36, 38	12
F205	Pomeranians	metropolitan	19	13	24	29	22	11	18	14	13	19	11	16	22	12	13	38	19	15	11, 14	29	13	12	22	33, 36	13
F207	Pomeranians	metropolitan	18	13	25	31	16	11	17	15	12	21	11	16	25	11	16	40	18	14	11, 15	34	13	10	24	36, 38	13
F211	Pomeranians	metropolitan	19	13	23	30	16	10	15	16	14	20	10	16	25	11	11	43	17	14	11, 14	31	13	10	23	36, 37	12
F212	Pomeranians	metropolitan	16	13	23	30	21	9	15	13	12	19	10	16	24	10	11	42	19	14	16, 18	33	14	12	22	35, 38	12
F215	Pomeranians	metropolitan	18	13	23	29	21	11	17	16	12	19	11	16	24	12	13	37	17	14	11, 14	29	13	14	23	35, 36	12
F218	Pomeranians	metropolitan	16	13	23	29	21	11	17	14	12	19	11	17	24	12	13	37	17	15	11, 14	29	13	13	22	35, 36	12
F220	Pomeranians	metropolitan	17	13	23	30	17	11	16	16	13	20	11	17	25	11	11	40	19	14	12, 14	31	13	11	24	36, 39	12
F222	Pomeranians	metropolitan	19	13	24	30	16	11	17	15	12	20	11	16	25	12	11	40	19	14	12, 15	33	13	10	24	37, 38	13
F224	Pomeranians	metropolitan	19	14	21	30	22	11	17, 2	14	11	20	10	15	23	10	11	40	18	14	13, 15	26	12	12	24	34, 38	11
F229	Pomeranians	metropolitan	19	13	23	30	16	11	16	15	13	20	10	16	25	11	11	43	17	14	10, 14	31	13	10	23	35, 37	12
F230	Pomeranians	metropolitan	19	13	25	30	16	11	17	15	12	20	11	16	24	11	11	41	19	14	11, 14	34	13	12	24	36, 37	13
F231	Pomeranians	metropolitan	16	13	24	30	21	11	19	14	12	19	11	15	24	12	13	41	17	15	11, 14	31	13	11	23	35, 36	12
F232	Pomeranians	metropolitan	19	14	23	31	22	11	17	14	12	19	11	16	24	12	13	40	16	15	11, 15	31	13	12	22	35, 36	12
F236	Pomeranians	metropolitan	16	12	21	29	18	10	15	14	11	21	10	14	22	10	11	42	19	15	13, 14	28	13	12	24	38, 38	11
F237	Pomeranians	metropolitan	19	14	23	31	22	11	17	14	12	19	11	16	24	12	13	40	16	15	11, 15	31	13	12	22	35, 36	12
F238	Pomeranians	metropolitan	18	14	24	32	22	10	17	15	11	19	11	13	23	11	13	39	17	15	11, 15	30	13	13	22	36, 36	12
F239	Pomeranians	metropolitan	18	13	24	30	16	11	17	15	12	20	11	16	25	12	11	39	19	14	12, 14	34	13	12	24	36, 39	12
F241	Pomeranians	metropolitan	18	14	23	30	21	10	17	14	12	19	10	16	24	12	13	38	18	15	11, 14	30	12	13	22	36, 37	12
F243	Pomeranians	metropolitan	18	13	24	31	22	10	17	15	11	19	11	13	23	11	13	39	17	15	11, 15	30	13	13	22	36, 36	12

F244	Pomeranians	metropolitan	19	13	25	30	16	11	17	15	12	20	11	16	24	11	11	41	19	14	11,14	34	13	11	24	36,37	12
F245	Pomeranians	metropolitan	19	13	23	30	22	12	17	16	12	19	11	16	24	12	13	39	17	15	11,15	31	13	12	22	36,37	11
F249	Pomeranians	metropolitan	19	13	23	29	22	11	17	14	12	18	11	16	23	12	13	38	19	15	11,14	29	13	12	22	35,37	12
F253	Pomeranians	metropolitan	18	13	25	30	15	11	17	15	12	20	11	16	24	11	11	40	19	14	11,14	34	13	10	25	36,38	13
F254	Pomeranians	metropolitan	18	12	23	28	21	11	19	14	11	19	11	18	23	12	13	37	18	15	11,14	29	13	13	25	35,35	12
F263	Pomeranians	metropolitan	18	13	23	30	16	11	15	17	12	19	10	16	24	11	9	41	18	14	11,14	33	13	10	24	37,38	12
F264	Pomeranians	metropolitan	19	13	23	29	22	11	17	14	12	18	11	16	23	12	13	38	19	15	11,14	30	13	12	22	35,37	12
F265	Pomeranians	metropolitan	17	13	23	29	16	11	16	16	12	19	10	16	26	11	11	42	19	14	11,14	33	13	11	25	37,38	12
F266	Pomeranians	metropolitan	18	13	21	30	19	10	17	15	11	19	10	15	24	10	11	40	18	15	14,15	29	13	13	31	38,38	12
F268	Pomeranians	metropolitan	18	13	23	31	19	11	17	14	11	19	11	16	25	12	13	39	18	14	11,14	30	13	12	23	35,35	11
07P	Pomeranians	metropolitan	17	13	24	31	22	9	15	13	12	21	10	18	23	10	11	40	19	14	16,16	34	13	13	22	36,38	12
21P	Pomeranians	metropolitan	20	13	23	28	24	11	17	15	12	17	10	16	24	12	13	36	17	15	11,14	30	13	10	22	36,36	12
26P	Pomeranians	metropolitan	16	12	22	28	18	11	15	14	10	20	10	15	22	10	11	41	18	16	13,14	27	14	11	26	37,37	11
36P	Pomeranians	metropolitan	17	12	21	29	19	11	19	15	11	20	11	15	22	10	11	38	17	16	12,14	27	14	12	21	38,38	9
37P	Pomeranians	metropolitan	19	13	24	29	16	11	16	15	12	20	10	16	25	11	11	42	19	14	11,14	32	13	11	25	36,38	11
40P	Pomeranians	metropolitan	18	14	23	32	16	11	16	16	14	20	10	16	26	11	11	43	17	14	11,15	31	13	10	23	36,37	12
48P	Pomeranians	metropolitan	20	13	23	29	22	11	16	14	11	19	11	9	24	12	13	39	17	14	11,14	29	13	11	22	35,36	11
49P	Pomeranians	metropolitan	16	14	21	30	21	11	17	14	12	19	12	14	23	10	14	39	21	14	12,13	28	14	10	20	36,36	11
55P	Pomeranians	metropolitan	20	13	23	29	16	11	15	16	11	20	10	16	25	11	11	45	21	14	11,14	34	13	11	25	37,38	12
58P	Pomeranians	metropolitan	17	13	23	29	17	12	16	16	12	20	10	18	25	11	11	44	19	14	11,15	32	13	11	25	36,38	12
64P	Pomeranians	metropolitan	17	13	24	30	16	11	17	15	12	20	11	16	25	12	11	40	20	14	12,14	34	13	10	24	37,38	12
65P	Pomeranians	metropolitan	17	12	21	28	20	10	17	15	11	19	10	13	24	9	11	37	18	16	14,16	29	12	12	23	36,37	11
80P	Pomeranians	metropolitan	18	13	24	29	16	11	17	16	12	20	10	17	25	11	11	42	19	14	11,15	31	13	11	24	36,38	13
83P	Pomeranians	metropolitan	17	12	24	28	21	11	17	14	12	20	11	16	24	12	13	40	17	15	11,16	29	13	12	21	35,36	12
88P	Pomeranians	metropolitan	18	12	22	29	18	11	17	15	11	21	10	15	22	10	11	37	17	16	12,14	27	13	11	22	37,39	9
90P	Pomeranians	metropolitan	16	12	21	28	19	10	15	14	11	20	10	14	23	10	11	37	21	16	14,14	28	13	11	25	37,39	11
96P	Pomeranians	metropolitan	18	13	23	30	16	11	15	15	12	20	10	16	25	11	11	44	17	14	14,14	31	13	10	23	36,37	12
100P	Pomeranians	metropolitan	16	12	21	28	20	11	16	15	12	19	10	13	23	9	11	37	17	16	14,18	28	12	13	23	37,38	12
101P	Pomeranians	metropolitan	16	13	23	29	18	12	17	14	12	19	10	16	25	11	13	38	18	15	11,14	33	13	11	22	35,36	12
102P	Pomeranians	metropolitan	19	13	23	30	23	11	16	14	14	19	11	15	24	12	13	38	19	15	12,14	31	13	11	23	35,35	12
121P	Pomeranians	metropolitan	19	13	23	29	24	10	19	14	12	19	11	15	24	12	13	39	18	15	11,14	30	13	13	22	35,37	12
122P	Pomeranians	metropolitan	19	13	23	29	16	11	15	16	12	20	10	17	25	11	11	46	19	14	11,14	32	13	11	25	36,39	12
IP01	Pomeranians	metropolitan	16	13	22	30	18	10	16	13	12	21	10	15	23	10	11	40	18	14	16,17	30	13	12	25	39,40	10
IP10	Pomeranians	metropolitan	18	13	23	30	17	12	17	17	11	20	10	16	25	14	9	42	17	14	10,15	33	13	10	25	36,38	12
IP12	Pomeranians	metropolitan	19	13	23	29	22	12	17	14	12	19	10	16	24	12	13	37	17	15	11,14	29	13	12	22	36,36	12
IP40	Pomeranians	metropolitan	18	13	23	30	21	11	17	14	11	19	10	15	25	12	13	38	16	15	12,12	29	13	13	22	35,36	12
IP48	Pomeranians	metropolitan	18	13	24	31	16	8	18	15	11	20	11	16	25	6	11	40	20	14	12,12	34	13	11	24	36,38	12
IP49	Pomeranians	metropolitan	17	13	23	29	17	12	16	16	12	20	10	18	25	11	11	43	19	14	11,15	32	13	11	25	36,38	12
F02	General Population	central	18	13	19	30	20	10	16	16	11	20	7	14	25	10	12	40	18	15	15,16	28	15	11	25	37,39	12
F05	General Population	metropolitan	15	12	20	29	17	10	18	15	12	21	10	15	22	10	11	36	18	16	13,16	30	14	11	21	38,40	9
F15	General Population	metropolitan	16	14	23	28	22	11	17	15	12	18	10	16	23	12	13	37	17	15	11,14	29	13	11	24	35,36	12
F17	General Population	metropolitan	18	13	23	29	22	12	16	15	12	19	11	15	24	12	13	37	17	15	13,15	29	14	11	22	35,36	12
F18	General Population	metropolitan	17	12	22	30	21	10	15	13	11	20	10	16	24	11	11	41	21	14	17,18	32	13	10	23	36,37	12
F19	General Population	metropolitan	20	13	19	30	21	11	17	16	11	20	11	14	24	10	12	43	18	15	15,15	28	14	11	25	36,39	10
F20	General Population	central	18	13	23	29	23	10	17	14	12	19	11	17	23	12	13	37	17	15	12,14	34	13	12	23	35,36	12
F21	General Population	metropolitan	20	12	23	28	22	11	17	15	12	19	11	15	24	12	13	36	16	15	11,14	31	13	12	22	35,36	11
F22	General Population	north	18	13	23	29	25	11	17	14	12	19	11	17	25	12	13	38	17	15	11,14	30	13	11	22	35,36	12
F23	General Population	metropolitan	19	14	23	30	21	11	18	14	12	19	10	15	24	12	13	39	17	15	11,14	30	13	12	22	36,36	12
F24	General Population	metropolitan	17	13	20	30	21	11	16	13	11	21	10	16	23	10	11	39	18	14	16,17	34	14	11	21	33,37	11
F25	General Population	central	18	13	23	29	23	11	16	14	13	19	11	16	24	12	14	35	19	15	11,15	31	13	12	23	35,36	12
F26	General Population	central	17	13	23	29	22	11	17	14	12	19	11	16	25	12	13	38	18	15	11,14	29	13	12	22	36,36	12
F27	General Population	south	17	13	23	29	22	11	18	14	12	20	10	14	25	12	13	38	17	15	11,14	33	13	12	22	36,37	12
F28	General Population	metropolitan	19	13	23	29	23	11	17	14	14	19	11	15	24	12	13	39	18	15	11,14	29	13	12	22	35,35	12
F29	General Population	central	19	12	23	29	23	11	17	15	12	17	11	15	25	12	13	38	17	15	11,13	29	13	12	22	35,38	12
F30	General Population	metropolitan	18	12	22	29	21	10	17	15	11	20	10	15	24	9	11	40	18	15	13,15	32	12	10	24	36,37	11
F31	General Population	metropolitan	19	13	23	29	22	10	17	14	13	19	11	16	24	12	13	38	17	15	11,14	29	12	12	22	35,35	12
F32	General Population	metropolitan	18	15	23	32	23	10	17	14	11	18	11	15	24	11	13	39	19	14	11,14	29	13	12	22	36,36	11
F34	General Population	metropolitan	17	13	21	29	21	10	16	14	12	19	11	16	24	12	12	39	14	15	11,11	29	13	12	22	35,36	12
F35	General Population	metropolitan	18	13	25	29	22	10	16	14	12	19	11	14	26	12	12	38	19	15	11,13	29	13	12	21	35,37	12
F36	General Population	metropolitan	17	13																							

F41	General Population	south	19	13	22	30	23	9	15	13	12	21	10	16	24	10	11	40	21	14	16, 19	34	12	12	22	34, 38	12
F42	General Population	central	17	13	23	30	24	11	17	14	12	19	11	17	24	12	13	36	18	15	11, 14	29	13	12	22	35, 36	13
F43	General Population	metropolitan	19	13	23	29	24	11	17	14	12	19	11	18	24	12	13	37	19	15	11, 14	29	13	12	22	34, 36	13
F45	General Population	metropolitan	19	14	21	30	18	11	18	13	12	20	9	18	23	10	11	41	23	14	13, 14	32	13	10	28	36, 37	11
F46	General Population	metropolitan	18	12	21	27	21	11	18	16	12	20	11	18	22	10	11	36	17	15	11, 12	30	13	13	22	34, 37	12
F47	General Population	metropolitan	18	13	23	29	16	11	16	16	12	20	10	16	25	11	10	42	20	14	12, 14	31	13	11	25	37, 38	12
F53	General Population	metropolitan	19	13	23	30	19	11	17	14	12	19	10	16	25	12	13	39	18	14	11, 14	30	13	12	23	35, 35	11
F55	General Population	south	17	12	24	29	20	11	16	16	11	20	10	14	22	10	11	40	16	15	12, 14	29	12	11	26	36, 38	14
F56	General Population	metropolitan	17	13	21	31	18	11	18	17	11	21	10	15	21	11	11	40	17	14	16, 19	31	15	12	26	39, 39	11
F57	General Population	central	18	12	21	29	22	11	17	16	11	21	10	16	21	11	11	41	18	14	16, 18	30	15	11	25	40, 40	11
F58	General Population	central	16	14	21	31	19	10	16	13	12	20	9	14	24	9	11	37	18	14	16, 17	29	13	11	23	37, 39	11
F59	General Population	south	17	13	23	29	22	11	17	14	12	19	11	15	24	13	13	37	17	15	10, 15	31	12	10	22	35, 35	12
F60	General Population	north	18	13	23	29	23	11	18	15	12	19	10	16	22	12	13	37	17	15	11, 14	30	12	11	21	35, 35	13
F61	General Population	north	17	13	22	30	21	10	15	15	10	20	10	15	24	10	11	43	20	14	13, 18	31	12	11	25	36, 36	8
F62	General Population	metropolitan	16	13	23	29	19	11	18	14	12	20	10	15	24	12	13	38	17	15	11, 14	29	13	12	22	36, 36	12
F63	General Population	north	16	13	21	31	18	10	17	15	12	21	10	15	21	11	10	39	19	14	17, 19	30	13	13	28	35, 39	11
F64	General Population	north	19	13	23	29	21	10	17	13	11	19	11	16	23	12	13	36	17	15	11, 14	29	13	12	23	35, 36	12
F65	General Population	north	17	14	22	30	20	11	0	14	11	21	10	14	25	10	11	38	19	14	12, 18	31	12	11	26	37, 38	12
F66	General Population	metropolitan	17	12	23	28	19	10	16	14	12	20	10	14	23	10	11	39	18	16	14, 14	28	13	12	29	37, 37	12
F67	General Population	central	18	13	23	31	24	11	17	14	12	19	11	15	25	12	13	39	17	15	11, 14	29	13	12	21	35, 37	12
F68	General Population	south	18	15	22	31	18	11	19	13	12	19	9	18	23	10	12	43	21	14	13, 14	34	13	10	28	36, 37	11
F70	General Population	metropolitan	16	14	21	30	20	10	17	15	11	19	10	15	23	10	14	38	15	16	12, 18	29	11	12	24	37, 39	12
F71	General Population	south	17	13	22	30	20	9	15	13	11	20	10	18	24	10	11	40	19	14	15, 18	32	14	11	22	35, 37	12
F72	General Population	central	18	13	23	29	21	11	16	14	12	19	11	17	24	12	13	39	16	15	11, 15	28	13	11	22	35, 36	12
F76	General Population	metropolitan	18	12	19	29	20	11	17	17	12	20	10	14	23	10	12	42	17	15	14, 14	30	14	10	24	35, 39	11
F78	General Population	south	18	13	24	29	22	10	17	14	12	19	11	17	24	12	13	38	17	15	11, 15	29	13	13	22	35, 36	13
F79	General Population	central	20	13	23	30	23	11	17	14	11	19	11	16	24	12	13	37	15	15	11, 14	28	13	12	22	36, 36	13
F80	General Population	metropolitan	17	13	23	29	23	11	17	14	12	19	10	15	23	12	13	36	16	14	11, 14	29	13	12	22	35, 36	13
F81	General Population	south	20	13	23	29	23	10	19	15	12	20	11	16	23	12	13	39	16	15	11, 14	30	13	12	22	35, 36	12
F82	General Population	south	18	13	23	29	22	11	17	14	11	18	11	15	24	12	13	38	18	14	11, 12	28	13	11	22	35, 37	12
F83	General Population	north	17	12	21	28	18	11	16	15	11	19	10	13	24	9	11	38	17	16	13, 17	29	13	11	23	38, 38	13
F84	General Population	central	16	13	24	29	21	10	17	14	12	19	11	15	24	12	13	37	17	14	11, 14	29	13	12	22	35, 36	12
F85	General Population	metropolitan	18	13	24	30	22	11	18	14	11	19	11	15	24	12	13	38	18	15	11, 13	29	13	13	22	35, 36	11
F86	General Population	north	16	12	20	28	20	11	16	15	11	18	10	13	24	9	11	36	18	16	15, 18	30	12	13	23	37, 37	12
F87	General Population	south	19	13	24	29	22	11	16	15	12	19	11	15	24	12	13	36	17	15	11, 14	30	13	12	23	34, 37	14
F89	General Population	central	17	12	21	30	19	10	18	13	11	20	10	15	24	10	11	35	19	14	16, 17	33	13	11	26	38, 40	10
F90	General Population	south	16	14	21	29	20	11	16	13	11	19	10	14	23	9	13	36	18	15	13, 17	33	13	11	27	37, 39	12
F91	General Population	central	18	13	23	29	23	11	17	14	12	19	11	15	23	12	13	38	18	15	11, 13	29	13	12	23	34, 36	11
F93	General Population	metropolitan	18	13	23	28	20	11	17	14	11	20	10	15	24	12	13	37	18	15	12, 14	31	13	13	22	36, 36	12
F94	General Population	metropolitan	17	13	21	31	21	11	16	15	13	19	11	16	24	10	11	36	18	15	19, 19	33	13	12	22	35, 40	12
F95	General Population	south	18	13	24	30	22	11	18	14	12	19	11	15	24	12	14	39	17	15	11, 14	29	13	13	22	36, 37	12
F96	General Population	metropolitan	14	12	20	28	17	10	16	15	12	21	10	15	22	10	13	35	17	15	14, 16	30	14	12	21	38, 39	9
F97	General Population	metropolitan	17	14	23	29	23	10	18	14	11	18	10	15	24	12	13	39	17	14	11, 14	29	13	13	22	35, 36	12
F98	General Population	north	19	13	23	29	20	11	17	14	12	19	11	18	24	12	13	36	17	15	11, 14	28	13	13	22	35, 36	12
F99	General Population	metropolitan	16	12	21	29	21	10	14	13	11	20	10	14	24	10	11	40	19	14	17, 18	32	13	10	24	36, 37	12
F100	General Population	metropolitan	18	14	22	33	20	10	20	14	11	20	10	16	23	11	14	35	18	14	14, 17	29	13	11	28	36, 39	11
F101	General Population	central	17	13	23	29	22	10	17	14	12	19	10	16	24	12	13	37	17	15	12, 14	29	13	12	22	35, 37	12
F104	General Population	central	18	13	23	30	23	11	17	14	12	19	12	15	23	12	13	38	19	15	11, 14	29	13	12	23	35, 36	12
F105	General Population	metropolitan	18	13	23	29	22	11	16	14	12	19	10	15	24	12	13	39	18	16	11, 14	28	14	12	21	36, 36	14
F106	General Population	metropolitan	18	14	21	30	18	11	18	13	12	20	10	15	24	10	11	42	22	14	13, 14	32	13	10	28	36, 38	11
F107	General Population	south	18	13	23	29	20	10	16	15	12	21	10	15	23	9	11	39	16	15	13, 20	31	12	12	22	38, 38	10
F108	General Population	south	18	13	23	29	24	11	16	13	11	18	10	15	24	12	13	38	17	14	12, 14	29	13	12	21	35, 36	12
F109	General Population	south	15	14	21	33	19	10	16	13	11	22	10	15	21	11	11	39	17	14	17, 18	30	14	11	26	37, 39	11
F110	General Population	south	17	13	23	29	22	11	16	14	12	19	11	16	24	12	13	39	17	15	11, 14	29	13	13	23	35, 36	12
F111	General Population	south	18	13	23	30	18	11	17	17	11	20	10	16	25	11	11	40	19	14	10, 14	32	13	10	25	38, 38	12
F112	General Population	south	17	14	25	33	20	10	16	14	12	18	10	15	26	11	12	41	20	14	17, 18	33	14	11	27	37, 38	13
F113	General Population	south	16	13	23	29	21	11	16	14	12	19	11	15	24	12	13	39	18	15	11, 14	29	12	12	22	35, 36	12
F114	General Population	south	18	13	23	29	23	11	18	14	12	18	11	16	24	12	13	38	17	15	10, 15	29	13	13	23	35, 36	13
F115	General Population	central	16	13	21	29	22	10	15	14	12	20	10	15	23	10	11	38	18	16	13, 14	28	13	11	22	33, 38	11
F116	General Population	south																									

F122	General Population	south	17	13	24	29	22	11	16	14	12	19	11	15	24	12	13	41	17	15	12, 12	28	13	11	24	35, 37	12
F123	General Population	south	18	13	23	28	23	11	19	17	12	20	12	13	23	10	11	38	18	16	12, 12	32	13	11	17	36, 37	12
F124	General Population	south	18	13	23	32	19	10	16	16	11	19	10	15	24	10	11	39	19	15	15, 15	30	13	13	31	38, 39	13
F125	General Population	south	18	13	24	30	16	11	17	15	12	20	11	16	25	12	11	40	19	14	13, 14	33	13	10	24	38, 38	13
F126	General Population	south	14	14	23	30	20	10	15	15	11	20	10	16	23	10	11	40	14	15	14, 14	28	12	12	21	37, 38	11
F127	General Population	south	19	13	22	30	21	9	16	13	12	20	10	17	24	10	11	41	19	14	16, 18	32	13	12	22	35, 36	12
F129	General Population	south	17	13	24	29	21	10	19	14	12	19	11	15	24	12	13	36	18	15	11, 14	30	13	12	19	35, 36	12
F130	General Population	metropolitan	18	12	22	29	20	10	16	14	12	20	10	15	23	11	14	40	16	14	13, 18	27	13	12	24	35, 40	11
F131	General Population	south	18	13	23	29	24	11	16	14	12	19	10	16	24	12	13	39	16	15	11, 14	30	14	12	22	35, 36	12
F132	General Population	south	17	13	23	29	25	11	17	14	11	19	10	17	24	14	13	42	17	14	12, 14	29	14	12	22	36, 36	13
F134	General Population	south	18	14	24	30	21	11	17	14	12	19	11	17	24	10	13	39	17	15	12, 12	32	13	12	22	35, 36	13
F135	General Population	metropolitan	20	12	23	28	19	10	15	14	11	20	10	13	23	10	11	37	21	16	14, 14	29	13	12	24	38, 38	11
F137	General Population	south	18	13	20	30	20	11	18.2	14	11	20	10	15	24	10	11	37	20	14	14, 18	25	12	11	25	35, 38	12
F138	General Population	metropolitan	18	14	24	30	21	11	17	14	12	19	11	17	24	12	13	39	17	15	11, 14	32	13	12	22	35, 36	12
F139	General Population	metropolitan	20	13	23	29	20	10	18	15	11	19	10	16	24	12	12	36	17	15	12, 15	32	13	13	22	35, 36	12
F140	General Population	metropolitan	14	12	20	29	18	10	15	15	12	21	10	15	22	11	11	36	19	16	14, 14	31	14	11	21	37, 38	9
F141	General Population	metropolitan	20	13	23	29	21	11	16	14	12	20	10	15	24	12	13	39	18	16	11, 12	30	13	11	22	35, 36	12
F142	General Population	metropolitan	14	12	21	28	20	10	14	14	11	20	10	14	23	10	11	37	18	16	13, 16	28	13	11	25	37, 38	11
F144	General Population	south	18	13	23	31	17	10	15	16	13	20	10	16	25	11	11	40	18	14	11, 14	32	14	10	23	37, 38	13
F145	General Population	central	18	13	23	29	21	11	18	14	12	19	11	15	24	11	13	38	20	15	13, 15	28	13	11	22	36, 37	12
F146	General Population	central	19	13	23	29	22	10	17	14	11	18	11	16	23	12	13	38	19	15	11, 14	29	13	12	22	36, 36	12
F147	General Population	south	19	13	23	30	23	11	18	14	11	19	11	17	24	11	13	38	16	15	11, 14	28	13	12	22	36, 36	15
F148	General Population	central	19	13	22	29	24	10	16	15	11	19	10	15	23	11	16	37	17	16	16, 18	29	12	11	24	35, 40	13
F149	General Population	central	18	13	23	29	20	11	16	14	12	19	11	17	24	12	13	39	16	15	11, 15	28	13	11	22	35, 36	12
F151	General Population	south	16	13	24	29	22	10	19	14	12	19	10	15	25	12	14	38	17	15	11, 14	29	13	12	23	36, 36	12
F152	General Population	south	16	14	23	31	21	11	20	14	12	19	11	15	24	11	13	41	17	15	11, 14	31	13	11	23	35, 36	12
F153	General Population	north	20	14	21	30	18	11	17	13	12	20	9	17	24	10	11	40	22	14	14, 14	32	13	10	27	36, 37	11
F154	General Population	south	19	14	23	30	22	10	16	14	12	19	10	16	24	12	14	39	17	15	12, 13	29	13	12	22	34, 36	12
F155	General Population	central	19	14	21	30	18	12	18	13	12	20	9	15	24	10	11	42	23	15	13, 14	32	13	10	27	36, 37	11
F156	General Population	central	17	13	21	29	21	10	15	14	11	21	10	15	21	9	11	40	16	15	13, 15	31	13	11	22	38, 39	11
F157	General Population	central	18	14	20	31	18	11	16	17	10	21	10	15	21	11	11	39	16	14	17, 18	30	15	12	29	38, 39	11
F158	General Population	north	15	12	21	30	18	10	17	15	12	21	10	15	21	11	11	39	19	14	16, 18	27	14	12	27	36, 38	11
F159	General Population	central	18	13	23	29	23	11	17	15	12	19	10	15	24	12	13	39	17	14	11, 14	30	13	12	22	34, 35	13
F160	General Population	central	17	14	22	30	22	11	16	14	12	19	11	17	24	12	13	37	17	15	11, 14	30	13	12	22	35, 36	12
F162	General Population	north	18	12	23	28	23	10	19	14	12	19	10	15	24	12	13	37	17	15	11, 14	30	13	13	22	35, 36	12
F163	General Population	central	19	13	24	31	18	11	15	16	12	20	10	16	25	11	11	42	19	14	11, 14	29	13	11	22	37, 39	12
F164	General Population	central	17	13	23	29	22	11	17	13	10	19	10	15	24	12	13	37	17	15	12, 14	30	13	12	23	36, 36	12
F165	General Population	central	18	14	22	31	23	9	15	13	12	20	10	18	24	10	11	39	20	14	16, 18	33	13	13	21	33, 38	13
F167	General Population	metropolitan	17	13	22	29	19	9	15	13	12	20	10	15	24	10	11	38	22	14	16, 18	32	13	13	22	35, 37	13
F168	General Population	central	17	14	20	30	22	11	18	14	11	19	10	15	24	9	11	39	19	15	12, 12	28	12	11	24	38, 39	11
F169	General Population	central	18	12	23	29	25	11	16	13	12	20	9	16	24	11	15	37	17	14	14, 14	32	12	13	23	35, 40	12
F170	General Population	central	16	13	21	30	21	11	15	15	12	20	10	15	23	10	12	39	20	14	16, 16	29	14	13	26	36, 37	12
F171	General Population	central	17	13	21	30	19	10	17	13	13	20	9	15	24	10	11	36	16	14	16, 19	29	14	12	25	36, 38	11
F172	General Population	metropolitan	19	13	23	29	21	11	17	14	11	18	10	18	24	12	13	37	17	14	11, 15	29	13	12	22	35, 36	12
F173	General Population	north	17	13	21	30	21	10	14	15	12	21	9	16	23	9	11	42	18	14	13, 16	32	12	12	22	36, 39	12
F174	General Population	central	16	13	21	30	18	10	16	15	12	23	10	15	22	10	11	37	17	16	14, 14	32	14	11	22	37, 38	9
F175	General Population	central	17	13	23	29	22	10	16	15	12	19	10	16	23	12	14	39	19	15	11, 14	29	12	13	22	35, 35	12
F176	General Population	central	21	13	23	29	22	11	16	15	12	17	11	15	24	12	13	39	16	15	11, 14	29	13	12	22	35, 37	12
F177	General Population	central	16	13	23	29	22	10	17	14	12	19	10	16	25	12	14	38	19	15	11, 14	29	12	13	22	35, 35	12
F178	General Population	metropolitan	19	13	21	29	18	12	18	13	12	20	9	16	24	10	11	42	23	14	13, 14	32	13	11	27	36, 36	11
F179	General Population	central	17	13	23	28	22	10	17	14	11	19	11	16	24	12	13	40	17	15	11, 14	31	13	13	22	35, 36	12
F180	General Population	north	19	13	22	29	21	10	18	14	12	18	10	15	24	12	13	38	17	15	10, 14	31	13	12	23	34, 36	12
F181	General Population	central	16	13	21	30	18	10	18	15	11	20	10	15	21	11	11	39	18	14	15, 17	28	14	12	23	37, 38	12
F182	General Population	central	18	14	23	30	22	11	18	14	11	18	11	17	25	12	13	39	17	14	11, 15	30	13	12	23	35, 37	12
F183	General Population	central	18	13	21	29	21	10	15	15	11	21	10	15	22	9	11	36	17	15	13, 15	30	12	12	23	39, 42	11
F184	General Population	central	17	13	22	31	18	10	18	13	11	20	10	17	24	10	11	40	20	14	17, 17	32	12	12	26	38, 39	11
F185	General Population	metropolitan	17	14	23	30	23	11	19	15	13	19	10	15	24	12	14	38	19	15	11, 14	30	12	11	22	35, 36	12
F186	General Population	north	17	14	23	30	24	10	16	14	11	18	11	15	25	12	15	38	17	14	11, 14	30	13	11	22	35, 36	12
F189	General Population	metropolitan	18	12	23	28	21	10	15	14	11	20	9	14	23	10	11	39	19	16	13, 14	28	13	11	24	36, 38	

F213	General Population	metropolitan	16	12	21	29	19	10	15	14	10	20	10	15	22	10	11	39	17	16	13, 14	26	13	11	26	38, 38	11	
F214	General Population	metropolitan	17	14	22	31	16	11	17	14	12	20	9	17	23	10	11	41	22	14	12, 14	31	13	10	25	36, 37	11	
F216	General Population	central	16	13	21	30	19	11	16	16	11	21	10	17	21	11	11	40	17	14	17, 18	33	14	12	27	37, 38	11	
F217	General Population	metropolitan	17	11	21	27	19	11	16	14	11	20	10	14	23	10	11, 12	37	19	16	13, 16	29	13	11	25	37, 39	11	
F219	General Population	metropolitan	18	14	23	30	21	11	17	12	13	19	11	15	24	12	13	38	17	15	11, 12	29	13	13	22	35, 36	12	
F221	General Population	metropolitan	15	13	20	29	17	10	16	15	12	21	10	14	22	10	11	36	19	16	13, 14	32	14	11	21	37, 38	9	
F223	General Population	north	16	12	21	28	19	10	15	14	11	20	10	14	23	10	11	37	21	16	14, 14	28	13	11	25	37, 39	11	
F225	General Population	metropolitan	20	13	23	29	22	11	16	13	14	19	11	15	24	12	13	40	18	14	11, 13	30	12	13	22	35, 35	13	
F226	General Population	metropolitan	20	13	23	30	18	10	15	16	12	20	10	16	25	11	11	40	17	14	12, 15	32	13	10	21	38, 38	12	
F227	General Population	metropolitan	19	13	21	30	18	10	15	15	11	21	10	14	21	10	11	40	18	14	15, 17	30	14	14	25	38, 41	12	
F228	General Population	metropolitan	16	13	24	30	21	11	19	14	12	19	11	15	24	12	13	41	17	15	11, 14	31	13	11	23	35, 36	12	
F233	General Population	metropolitan	18	13	23	31	20	10	16	16	11	20	11	15	24	10	11	41	22	15	14, 15	31	13	12	31	39, 41	13	
F234	General Population	metropolitan	20	13	21	30	20	10	17	16	10	20	10	18	24	10	11	39	19	14	13, 17	32	13	11	25	35, 39	12	
F235	General Population	metropolitan	19	13	23	29	21	11	17	15	12	20	10	15	24	12	13	39	17	15	11, 15	30	13	12	23	35, 36	12	
F240	General Population	metropolitan	19	12	23	28	21	11	17	14	12	20	10	16	24	13	13	37	20	15	12, 12	28	13	11	22	35, 37	12	
F242	General Population	north	17	12	21	28	21	10	15	15	12	21	10	15	22	10	11	39	17	16	13, 15	28	13	11	22	37, 39	9	
F246	General Population	metropolitan	17	13	23	29	23	11	17	14	12	19	11	15	24	13	13	37	17	15	10, 14	31	12	10	22	35, 35	12	
F247	General Population	metropolitan	17	12	23	28	22	11	19	14	11	19	11	16	23	12	13	38	18	15	11, 14	30	13	13	22	36, 38	12	
F250	General Population	metropolitan	16	12	21	28	21	10	15	14	11	20	10	15	22	10	11	36	20	16	14, 14	28	13	11	26	38, 38	11	
F251	General Population	metropolitan	16	13	23	29	21	11	18	13	16	12	19	11	15	24	12	13	38	17	15	11, 15	29	13	13	23	35, 36	12
F252	General Population	metropolitan	18	13	24	29	23	11	17	14	12	20	11	15	22	12	13	36	16	14	11, 14	29	13	10	22	35, 36	12	
F255	General Population	metropolitan	18	13	23	31	21	9	16	13	12	21	10	17	24	10	11	41	22	14	16, 18	34	12	12	22	35, 38	12	
F256	General Population	metropolitan	18	14	23	30	23	11	18	14	12	19	11	15	24	12	13	39	18	15	11, 14	29	13	12	22	35, 36	12	
F258	General Population	metropolitan	16	13	21	29	19	10	16	15	11	22	10	15	21	10	11	39	17	16	13, 15	28	14	11	21	38, 39	10	
F259	General Population	metropolitan	18	13	23	31	17	11	15	16	13	20	10	15	25	11	11	40	18	14	11, 14	32	14	10	23	37, 38	12	
F260	General Population	metropolitan	16	13	22	30	18	10	18	15	12	20	10	15	21	11	11	42	21	14	15, 16	34	13	12	27	37, 38	11	
F261	General Population	metropolitan	19	13	23	31	21	9	15	13	12	21	10	17	24	10	11	41	22	14	16, 18	35	12	12	22	35, 38	12	
F262	General Population	metropolitan	18	13	23	29	23	10	17	14	12	19	10	17	23	12	13	38	17	15	12, 14	30	13	13	22	35, 36	12	
N03	General Population	metropolitan	16	14	22	31	21	10	16	13	12	20	9	14	24	9	11	37	18	14	16, 17	29	14	11	23	37, 39	12	
N05	General Population	metropolitan	16	13	21	31	19	10	18	13	11	20	10	15	24	10	11	35	19	14	16, 17	33	13	11	27	39, 40	10	
N10	General Population	no data	19	13	20	29	22	11	17, 2	14	11	20	10	15	23	10	11	39	18	14	14, 18	25	12	13	25	36, 36	11	
N11	General Population	metropolitan	16	13	20	30	20	11	18, 2	14	11	20	10	15	23	10	11	38	18	14	13, 18	26	12	11	25	35, 38	11	
N12	General Population	metropolitan	17	13	23	29	21	10	16	15	12	19	11	15	24	12	14	39	16	15	11, 14	31	13	12	21	35, 36	12	
N14	General Population	metropolitan	17	12	22	28	19	11	16	15	12	19	10	13	25	9	11	39	18	16	13, 18	27	12	11	23	38, 39	12	
N15	General Population	metropolitan	18	13	23	29	23	11	17	14	12	19	11	15	24	12	13	39	17	15	12, 14	30	13	11	19	35, 36	12	
N16	General Population	metropolitan	16	12	21	30	19	11	17	16	12	21	11	16	21	10	11	38	17	16	14, 16	28	13	11	20	39, 41	8	
N17	General Population	metropolitan	17	14	23	30	22	11	17	15	12	19	11	15	24	12	13	37	17	15	11, 14	29	13	12	23	34, 37	14	
N18	General Population	metropolitan	20	13	20	31	20	11	18, 2	14	11	20	10	15	22	10	11	39	18	14	14, 18	26	12	12	24	36, 39	10	
N19	General Population	no data	17	12	23	28	23	11	18	14	11	19	10	16	23	12	13	38	18	15	11, 14	30	13	13	22	36, 38	12	
N20	General Population	metropolitan	16	13	22	31	22	8	14	13	12	19	10	16	23	10	11	40	21	15	16, 18	31	13	12	20	34, 40	12	
N21	General Population	metropolitan	19	13	23	29	21	11	17	14	12	18	10	15	24	12	13	37	17	15	12, 14	30	13	13	22	35, 36	12	
N23	General Population	metropolitan	16	12	22	29	18	11	15	15	12	21	10	15	23	10	11	37	19	16	14, 15	28	14	13	23	37, 38	10	
N24	General Population	metropolitan	20	15	24	32	22	10	17	14	12	19	11	16	24	10	13	37	17	15	11, 14	28	14	13	22	36, 36	11	
N26	General Population	metropolitan	17	13	23	30	17	11	15	15	13	20	10	16	25	11	11	41	19	14	11, 14	32	13	10	23	35, 38	12	
N27	General Population	metropolitan	17	13	20	30	21	11	16	13	11	21	10	16	23	10	11	39	18	14	15, 16	34	14	11	21	33, 37	11	
N28	General Population	metropolitan	17	14	23	30	21	11	16	14	12	19	11	15	24	12	13	39	17	15	11, 14	29	12	11	22	36, 36	12	
N29	General Population	metropolitan	18	13	22	29	23	12	17	14	12	20	10	17	24	9	11	37	18	15	14, 15	32	12	12	22	36, 39	11	
N30	General Population	metropolitan	17	13	21	26	19	10	18	14	11	19	10	15	23	9	13	35	18	14	14, 27	32	13	11	21	38, 39	12	
N31	General Population	metropolitan	17	13	23	28	21	10	16	15	12	19	10	15	25	11	13	37	17	14	12, 12	26	13	14	22	35, 40	13	
N32	General Population	metropolitan	15	13	21	31	20	10	16	15	12	21	11	15	21	12	11	36	20	14	15, 17	28	13	11	28	37, 40	11	
N33	General Population	south	17	14	22	29	21	10	18	17	11	21	9	13	25	10	11	35	17	15	12, 12	28	13	12	22	35, 38	12	
N35	General Population	metropolitan	17	14	24	29	24	10	17	14	13	19	10	15	24	12	14	40	17	15	12, 2, 15	29	12	13	22	34, 38	12	
N36	General Population	metropolitan	16	14	23	30	21	10	17	14	13	20	10	16	25	12	14	36	17	15	11, 14	29	13	12	22	35, 36	12	
N38	General Population	metropolitan	18	13	21	29	21	11	19, 2	14	11	21	11	15	23	10	11	40	19	14	13, 20	30	12	11	28	37, 38	11	
N40	General Population	metropolitan	16	12	22	28	20	10	16	14	11	20	10	14	22	10	11	40	19	16	13, 14	30	13	11	26	37, 38	11	
N41	General Population	metropolitan	18	13	23	29	21	11	17	14	12	19	11	15	23	12	13	38	17	14	11, 14	29	13	11	22	36, 36	12	
N44	General Population	metropolitan	16	13	22	30	20	10	17	16	11	21	10	15	21	11	11	40	17	14	16, 16	29	14	12	23	35, 40	10	
N45	General Population	metropolitan	15	13	22	32	19	11	16	15	13	21	10	15	21	11	11	40	20	14	15, 16	28	13	12	30	35, 39	11	
N46	General Population	metropolitan	17	13	23	29	22	11	20	14	12	19	11	16	25	12	13	37	17	15	12,							

N57	General Population	metropolitan	20	13	23	29	23	11	17	14	13	19	11	14	24	12	13	38	18	15	11, 14	29	14	13	22	35, 35	12
N58	General Population	metropolitan	18	14	23	30	21	10	15	14	12	19	11	16	24	12	13	38	16	15	11, 14	28	13	11	23	35, 36	12
N62	General Population	metropolitan	16	14	23	30	24	11	18	14	13	19	10	16	24	12	13	33	17	15	11, 14	28	13	10	23	35, 36	12
N64	General Population	no data	17	12	21	29	20	10	15	14	11	20	10	14	23	10	11	40	23	16	14, 14	29	13	12	24	37, 38	11
N67	General Population	metropolitan	17	12	21	29	18	11	15	15	12	21	10	15	23	10	11	38	19	16	14, 14	28	14	12	23	38, 38	10
N70	General Population	metropolitan	15	13	21	31	21	9	19	15	12	21	10	15	21	11	11	39	21	14	16, 18	27	13	11	28	37, 39	11
N71	General Population	metropolitan	15	12	25	28	22	11	17	14	11	21	11	15	25	11	11	40	20	14	14, 19	27	13	11	25	38, 38	12
N73	General Population	metropolitan	16	13	22	29	22	10	16	16	12	21	9	15	23	9	11	39	19	14	14, 16	31	12	12	22	37, 39	11
N74	General Population	metropolitan	19	13	23	29	21	10	19	14	12	19	10	15	24	12	13	38	17	15	11, 14	31	12	12	22	35, 36	13
N75	General Population	metropolitan	21	14	23	31	18	11	15	16	12	20	11	17	25	11	11	42	18	14	11, 14	32	13	10	23	37, 38	13
N78	General Population	metropolitan	16	13	21	30	19	11	16	16	11	20	11	15	21	11	11	42	18	14	16, 19	31	14	12	25	37, 39	11
N83	General Population	metropolitan	18	13	23	29	22	11	17	14	12	18	11	15	24	13	13	39	19	15	11, 14	29	13	12	23	35, 37	13
N86	General Population	metropolitan	17	13	23	29	24	11	17	14	11	19	10	16	24	12	13	39	17	14	12, 12	29	14	12	22	36, 36	13
N87	General Population	metropolitan	16	12	21	27	19	11	17	15	12	21	10	18	22	10	11	38	18	16	12, 16	30	14	12	22	38, 39	9
N88	General Population	metropolitan	17	13	22	30	21	9	17	14	11	21	10	17	23	9	11	38	17	14	14, 16	30	13	11	22	39, 42	11
N89	General Population	metropolitan	18	13	23	29	20	11	18	14	12	19	12	15	24	12	13	38	16	15	11, 14	30	13	12	22	36, 36	12
N90	General Population	metropolitan	17	13	21	30	18	11	17	17	11	21	10	15	21	11	11	42	18	13	17, 18	32	15	13	25	39, 40	10
N91	General Population	metropolitan	18	13	22	31	21	10	15	15	10	20	10	15	24	10	11	43	21	14	13, 17	32	12	11	25	36, 36	8
N92	General Population	metropolitan	14	13	22	31	19	11	16	15	12	21	10	15	21	11	11	39	18	14	15, 18	28	13	14	30	36, 39	11
N94	General Population	metropolitan	18	13	23	29	23	11	15	14	12	20	11	16	24	12	13	39	18	15	11, 14	31	13	12	22	35, 35	12
N95	General Population	metropolitan	19	13	24	29	21	11	16	14	12	19	11	17	25	12	13	39	17	15	11, 14	28	13	12	23	35, 38	12
N100	General Population	metropolitan	18	13	23	31	18	10	16	13	13	20	11	16	25	11	14	39	14	15	14, 14	29	13	12	24	35, 38	11
N105	General Population	metropolitan	17	14	24	31	20	9	17	14	11	21	10	17	23	9	11	37	18	14	14, 15	30	13	11	22	39, 42	11
N108	General Population	metropolitan	18	13	23	29	22	10	17	14	11	19	10	15	24	14	13	36	18	15	11, 15	29	13	11	22	36, 36	12
N112	General Population	metropolitan	19	13	23	30	19	10	18	17	12	21	10	16	21	11	10	38	19	14	17, 17	31	13	11	27	37, 38	11
N114	General Population	metropolitan	15	12	23	28	20	11	17	14	11	18	10	15	25	11	11	46	21	14	14, 21	30	13	11	25	38, 38	14
N117	General Population	metropolitan	17	13	23	30	20	10	18	14	11	19	11	16	24	12	13	39	18	15	11, 13	30	13	12	21	35, 36	13
P13	General Population	south	18	14	21	31	23	11	17	15	11	20	10	13	22	10	12	37	17	15	16, 18	29	14	11	25	37, 38	12
2A	General Population	south	18	14	21	31	23	11	17	15	11	20	10	13	22	10	12	37	17	15	16, 18	29	14	11	25	37, 38	12
9A	General Population	south	18	14	21	31	23	11	17	15	11	20	10	13	22	10	12	37	17	15	16, 18	29	14	11	25	37, 38	12
88A	General Population	south	18	13	23	29	20	8	17	14	12	19	11	15	24	12	13	40	18	15	11, 11	29	13	12	22	36, 36	12
95A	General Population	south	16	14	23	30	22	8	17	15	12	19	11	16	23	12	12	38	17	15	11, 13	30	13	13	23	35, 38	12
98A	General Population	south	18	14	21	30	18	11	16	13	12	20	10	16	24	10	11	41	23	14	13, 14	31	13	10	28	36, 37	11
107A	General Population	south	18	12	22	29	18	11	16	15	11	18	10	14	25	9	11	40	18	16	13, 17	30	12	12	23	38, 38	12
112A	General Population	south	18	13	23	29	22	13	17	15	12	18	11	15	25	13	12	37	16	16	12, 15	28	13	12	22	36, 36	11
124A	General Population	south	19	12	23	29	24	12	19	13	12	20	10	16	24	11	15	40	16	14	14, 14	31	12	13	24	34, 40	11
132A	General Population	south	21	12	23	28	21	11	17	15	12	19	11	15	24	12	13	36	16	15	11, 14	31	13	12	22	35, 36	11
147A	General Population	south	21	12	23	28	21	11	17	15	12	19	11	15	24	12	13	36	16	15	11, 14	31	13	12	22	35, 36	11
161A	General Population	south	19	13	23	30	19	10	18	14	12	19	10	16	23	12	13	38	18	15	11, 14	30	13	13	22	34, 37	12
186A	General Population	south	19	14	20	30	23	11	17.2	14	11	20	10	15	23	10	11	39	18	14	13, 18	26	12	11	26	37, 37	11
209A	General Population	south	17	13	25	29	21	11	16	14	12	19	10	15	24	9	9	37	16	14	11, 14	28	14	11	22	35, 36	13
221A	General Population	south	17	12	24	28	21	11	16	14	12	19	10	15	24	12	13	41	18	15	12, 14	28	13	12	23	35, 37	12
223A	General Population	south	18	13	23	30	21	13	17	14	12	19	11	17	24	12	13	40	18	15	11, 14	28	13	13	22	35, 36	12
229A	General Population	south	21	12	23	28	21	10	17	15	12	19	11	15	24	12	13	36	16	15	11, 14	31	13	12	22	35, 36	11
247A	General Population	south	17	14	23	30	21	11	16	14	12	19	11	15	24	16	9	38	17	15	11, 14	29	12	11	22	36, 36	12
255A	General Population	south	16	13	21	31	21	10	18	18	12	21	11	15	21	11	15	39	19	14	17, 17	28	13	11	29	38, 39	11
258A	General Population	south	18	13	23	29	22	11	17	14	13	19	11	15	25	12	9	40	17	14	11, 14	29	13	12	22	36, 36	12
260A	General Population	south	19	13	23	29	24	10	12	14	12	19	10	16	24	12	13	39	17	15	11, 15	29	13	12	24	36, 36	13
277A	General Population	south	17	13	23	29	22	10	17	14	9	19	11	18	24	11	13	36	16	15	11, 11	32	13	12	22	35, 36	13
289A	General Population	south	17	13	23	29	24	11	18	14	12	18.2	11	15	24	12	13	39	18	15	12, 14	30	13	12	21	35, 37	12
331A	General Population	south	17	14	23	30	20	11	17	14	12	19	10	16	24	12	13	38	16	14	11, 14	30	12	11	23	35, 37	13
339A	General Population	south	16	13	22	29	19	11	17	14	12	21	10	15	23	9	11	40	18	15	13, 17	29	12	12	23	38, 41	12
344A	General Population	south	17	13	24	29	22	11	15	14	12	20	11	17	24	12	13	40	18	15, 16	12, 14	28	13	10, 12	23	35, 36	12
385A	General Population	south	16	13	24	29	20	8	15	17	11	19	10	15	23	9	11	38	17	15	12, 16	32	12	10	21	39, 39	12
396A	General Population	south	19	13	24	30	22	10	17	16	11	21	10	15	22	9	11	38	17	15	14, 16	27	12	12	23	39, 39	12
399A	General Population	south	17	13	24	29	24	8	16	14	12	19	11	15	24	12	13	37	17	15	11, 14	31	13	13	22	34, 36	13
403A	General Population	south	17	12	22	29	21	10	15	14	11	20	10	14	23	10	11	40	22	16	14, 14	29	13	11	24	38, 38	11
406A	General Population	south	18	14	21	30	20	10	15	15	11	22	10	15	23	9	11	38	15	15	13, 18	27	12	12	23	36, 37	11
410A	General Population	south	18	13	22	31	20	9	16	15	11	20	10	14	23	10	12	41	19	14	15, 15	27	14				



470A	General Population	south	17	13	21	31	22	9	15	13	12	20	10	16	24	10	11	41	19	14	16, 18	31	13	11	22	36, 37	12
475A	General Population	south	18	13	23	31	17	11	15	16	13	20	10	15	25	11	11	40	18	14	11, 14	32	14	10	23	37, 38	14
482A	General Population	south	17	12	24	28	21	9	16	14	12	19	10	15	24	12	13	41	18	15	12, 14	28	13	12	23	35, 37	12
495A	General Population	south	18	13	23	30	23	11	17	15	11	17	11	16	24	14	13	43	17	15	12, 14	29	13	12	22	35, 35	11
503A	General Population	south	20	13	23	29	20	9	16	14	12	18	11	16	24	12	13	36	16	15	11, 15	31	12	12	23	35, 36	12
515A	General Population	south	18	13	24	29	22	10	17	14	12	19	11	17	24	12	13	37	17	15	11, 14	28	13	13	22	36, 36	11
520A	General Population	south	18	13	24	29	22	10	17	14	12	19	11	17	24	12	13	37	17	15	11, 14	28	13	13	22	36, 36	11
528A	General Population	south	19	15	23	31	24	10	17	14	12	19	11	15	23	12	13	37	17	15	11, 14	28	13	12	22	34, 35	12
557A	General Population	south	18	12	20	28	22	11	16	16	13	21	10	15	22	11	11	37	18	16	14, 15	28	14	11	23	36, 39	9
578A	General Population	south	17	13	23	29	24	11	16	14	12	19	10	15	24	12	13	38	17	15	11, 14	28	13	11	22	36, 37	12
I6	General Population	metropolitan	17	13	23	29	22	11	17	14	11	19	11	15	24	12	13	38	18	15	12, 14	26	13	13	22	36, 37	12
I8	General Population	metropolitan	17	14	22	31	20	9	16	13	12	18	11	17	24	10	11	38	20	14	15, 18	34	14	13	21	33, 38	12
I9	General Population	metropolitan	19	13	23	29	21	10	19	14	11	19	10	15	24	12	13	38	17	15	11, 14	30	12	12	22	35, 36	13
I10	General Population	metropolitan	16	13	21	31	19	11	16	17	10	21	10	16	21	11	11	42	16	14	17, 18	31	15	12	22	38, 38	11
I18	General Population	metropolitan	18	14	21	30	18	12	18	13	12	20	9	14	24	10	11	41	23	15	13, 14	32	13	10	27	36, 37	11
I21	General Population	metropolitan	16	13	21	29	20	10	16	14	11	20	10	14	23	10	11	38	19	16	14, 15	29	13	11	25	37, 39	11
I24	General Population	metropolitan	19	13	24	29	20	10	18	15	12	19	11	16	24	12	13	39	16	15	11, 14	28	14	12	22	35, 38	12
I32	General Population	metropolitan	17	13	22	29	19	10	18	13	12	20	9	16	25	10	11	40	22	14	14, 14	31	13	10	27	36, 37	11
I33	General Population	metropolitan	18	13	21	29	20	11	16	16	11	21	10	16	21	11	11	42	15	14	17, 19	29	14	12	26	38, 39	11
I35	General Population	metropolitan	19	12	22	29	20	10	15	14	12	20	10	15	23	11	14	39	16	14	13, 18	28	12	12	24	34, 39	11
I36	General Population	metropolitan	17	13	20	29	18	11	18	13	12	20	9	16	24	10	11	42	23	14	13, 14	33	13	10	27	36, 37	11
I38	General Population	metropolitan	17	14	23	30	22	11	16	14	11	19	10	15	25	12	13	38	17	15	11, 14	28	13	12	23	35, 37	12
I39	General Population	metropolitan	16	13	24	29	17	11	14	14	11	21	10	15	23	9	11	37	14	15	13, 17	29	12	12	21	36, 38	13
I44	General Population	metropolitan	19	13	24	29	20	10	18	14	12	19	11	17	24	12	13	37	17	15	11, 14	28	13	13	22	36, 36	11
I54	General Population	metropolitan	20	13	23	29	23	12	18	14	11	18	11	15	25	12	13	38	16	14	12, 14	30	13	12	22	34, 37	12
I61	General Population	metropolitan	18	12	23	28	22	11	16	14	12	20	10	15	24	12	13	37	18	15	11, 14	29	12	13	22	35, 36	13
I63	General Population	metropolitan	18	13	24	29	22	11	17	15	14	19	11	15	24	12	13	38	20	14	13, 2, 16	31	13	13	22	36, 39	12
I64	General Population	metropolitan	20	13	23	29, 30	22	10	16	14	11	19	11	15	23	12	13	39	18	15, 16	12, 13	30	13	10, 11	24	37, 37	12
I75	General Population	metropolitan	16	13	22	29	22	10	14	15	12	21	9	15	24	9	11	39	18	14	12, 18	30	12	12	22	36, 41	12
I76	General Population	metropolitan	17	13	24	29	23	11	17	14	12	19	11	16	24	12	13	38	17	15	11, 14	30	13	12	22	36, 36	12
I103	General Population	metropolitan	17	12	23	28	20	11	17	15	11	22	10	14	21	11	11	38	18	16	13, 15	27	14	11	22	38, 38	10
I104	General Population	metropolitan	18	14	23	31	16	11	15	15	12	19	11	17	25	11	11	40	18	14	12, 14	31	13	11	23	37, 39	13
I116	General Population	metropolitan	15	12	24	28	21	12	18	14	11	19	10	15	25	11	11	43	20	14	7, 14	27	13	12	24	38, 38	14
I117	General Population	metropolitan	17	13	22	31	21	9	17	14	11	21	10	17	23	9	11	38	17	14	14, 16	30	13	11	22	39, 42	11
I127	General Population	metropolitan	17	12	22	30	23	10	15	13	11	20	9	14	24	11	11	41	20	14	17, 18	33	13	10	23	36, 37	12
I129	General Population	metropolitan	17	14	21	32	19	10	16	15	12	21	11	15	21	11	11	39	19	14	16, 17	28	13	11	27	37, 39	11
I130	General Population	metropolitan	15	13	23	29	21	10	17	13	9	19	11	15	25	12	13	38	17	15	11, 11	31	13	12	22	35, 36	13
I139	General Population	metropolitan	17	13	20	29	22	11	15	14	11	21	10	15	22	9	11	36	18	15	13, 15	31	12	11	23	38, 39	11
I140	General Population	metropolitan	15	13	21	31	20	10	16	15	11	21	11	15	22	11	11	37	19	14	15, 18	28	13	11	30	37, 41	11
I142	General Population	metropolitan	18	13	23	29	21	11	17	14	12	19	11	16	24	12	13	38	16	15	11, 14	29	13	12	22	35, 36	12
I144	General Population	metropolitan	18	13	23	29	24	11	18	14	13	19	11	16	24	12	13	38	16	15	12, 15	30	13	12	22	35, 36	13
I159	General Population	metropolitan	18	14	22	31	21	9	17	15	12	20	10	17	23	10	11	40	20	14	16, 17	30	13	12	23	35, 39	12
I161	General Population	metropolitan	15	13	21	30	18	10	17	15	12	21	11	15	21	11	11	39	19	14	17, 17	30	13	11	27	36, 38	11