



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FERNANDA MARIANO GARCIA DE SOUZA RODRIGUES

**DIVERSIDADE E FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DE X-STRS NA
POPULAÇÃO DO ESPÍRITO SANTO E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA
ELUCIDAÇÃO DE CASOS FORENSES COMPLEXOS**

VITÓRIA

2023

FERNANDA MARIANO GARCIA DE SOUZA RODRIGUES

**DIVERSIDADE E FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DE X-STRS NA
POPULAÇÃO DO ESPÍRITO SANTO E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA
ELUCIDAÇÃO DE CASOS FORENSES COMPLEXOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lúri Drumond Louro

Vitória, ES

2023

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

R696d Rodrigues, Fernanda Mariano Garcia de Souza, 1991-
Diversidade e frequência haplotípica de X-STRs na população do espírito santo e sua contribuição para elucidação de casos forenses complexos / Fernanda Mariano Garcia de Souza Rodrigues. - 2023.
113 f. : il.

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

1. genética forense. 2. biologia molecular. I. Louro, Iúri Drumond. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

FERNANDA MARIANO GARCIA DE SOUZA RODRIGUES

**DIVERSIDADE E FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DE X-STRS NA
POPULAÇÃO DO ESPÍRITO SANTO E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA
ELUCIDAÇÃO DE CASOS FORENSES COMPLEXOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Apresentada em 03 de março de 2023.

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profa. Dra. Débora Dummer Meira

Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo

Profa. Dra. Flavia de Paula

Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Instituição: Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Cintia Fridman

Instituição: Universidade de São Paulo

VITÓRIA, ES

2023

DEDICATÓRIA

Para meu filho Pedro, minha motivação diária.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar comigo e me dar força para continuar. Deus é bom o tempo todo!

Ao meu marido, pelo amor, compreensão e suporte nos períodos mais complicados e difíceis que passei, por me ouvir, acolher e muitas vezes me guiar. Ao nosso filho Pedro, por me dar a motivação necessária, alegria e leveza para seguir em frente.

Aos meus pais, irmãs, sobrinhos e sogros, cada um me ajudou da melhor maneira que pôde e eu sou extremamente grata por isso.

Estou aqui por vocês!

Ao meu orientador Lúri, pela oportunidade de fazer parte dessa equipe maravilhosa que é o NGHМ (desde 2013), muito obrigada por todo suporte.

A todos do NGHМ, por toda parceria e ajuda, em especial à Raquel Reis e ao Victor Stange, que foram essenciais para a conclusão desse trabalho, sem vocês não conseguiria.

Aos responsáveis pelo Laboratório de DNA da Polícia Científica do ES e do Laboratório de Diagnóstico por DNA – UERJ, que me permitiram realizar as análises necessárias e ainda receber orientações preciosas, muito obrigada à toda equipe do LDD em especial a Patrícia e João pelo acolhimento e à professora Leonor pela ajuda.

À professora Débora Dummer, por toda disponibilidade e parceria que teve comigo, e também por aceitar meu convite para banca.

Ao professor Elizeu Fagundes, por abrir as portas do LDD, pelas contribuições na qualificação e por aceitar o novo convite para compor a banca para defesa da tese.

Às professoras Flavia de Paula e Cintia Fridman por aceitarem o convite para fazer parte da minha banca de avaliação, tenho certeza que aproveitarei muito as sugestões e críticas de vocês.

Ainda agradeço ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da UFES, às agências de apoio e financiamento CAPES pela bolsa de estudos concedida e FAPES por financiar o projeto.

ΕΠΪΓΡΑΦΕ

"So, carry on... There's a meaning to life".

(Angra – Angels Cry)

RESUMO

GARCIA, F.M.S.R. **Diversidade e frequência haplotípica de X-STRs na população do Espírito Santo e sua contribuição para elucidação de casos forenses complexos.** 2023. 113f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

Os marcadores genéticos do tipo microssatélite (em inglês: *Short Tandem Repeats* - STR) são o centro da identificação genética humana, sendo os marcadores STRs em cromossomos autossômicos e no cromossomo Y os mais utilizados. No entanto, em algumas situações forenses como casos com suspeita de incesto, paternidade sem amostra materna para comparação, vestígios com mistura de DNA, a utilização de apenas esses marcadores, pode não ser suficiente para a resolução desses casos. O estudo dos marcadores STRs do cromossomo sexual X (X-STRs) aumenta significativamente a probabilidade de identificação ao complementar os dados obtidos para marcadores autossômicos e do cromossomo Y. Todavia, atualmente não existem protocolos validados para este fim e tampouco dados populacionais necessários para as análises estatísticas que devem constar na emissão de laudos periciais. Assim, o objetivo geral desse trabalho foi realizar o levantamento macrorregional das frequências haplotípicas de 12 *loci* de X-STRs no Espírito Santo, para estimar a diversidade genética, a dinâmica de populações e promover o ganho de poder estatístico e a atualização destas informações em bancos de dados internacionais. Neste sentido, o levantamento das frequências haplotípicas dos X-STRs foi feito com um grupo amostral de 571 indivíduos não aparentados nascidos nas 4 macrorregiões do estado, de modo a obter uma estimativa fidedigna da diversidade genética do ES. Analisando o conjunto de 12 X-STRs, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as macrorregiões do estado. As frequências alélicas e haplotípicas encontradas aqui, possuem altas taxas de variabilidade alélica e haplotípica demonstrando que este conjunto de X-STR é bastante informativo no quesito de discriminação de indivíduos, podendo contribuir na construção do conhecimento e da importância do uso do cromossomo X na rotina de laboratórios que utilizam a tecnologia do DNA na identificação humana.

Palavras-chave: Argus X-12, frequência alélica, X-STRs Espírito Santo, X-STRs Brasil.

DIVERSITY AND HAPLOTYPE FREQUENCY OF X-STRS IN THE POPULATION OF ESPÍRITO SANTO AND THEIR CONTRIBUTION TO THE ELUCIDATION OF COMPLEX FORENSIC CASES.

ABSTRACT

GARCIA, F.M.S.R. Diversity and haplotype frequency of X-STRs in the population of Espírito Santo and their contribution to the elucidation of complex forensic cases. 2023. 113. Thesis (Doctoral in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Genetic markers Short Tandem Repeats (STR) are the center of human genetic identification, STR markers on autosomal chromosomes and on the Y chromosome being the most used. However, in some forensic situations, such as cases of suspected incest, paternity without a maternal sample for comparison, traces with mixed DNA, the use of only these markers may not be enough to solve these cases. The study of STRs markers of the X sex chromosome (X-STRs) significantly increases the probability of identification by complementing the data obtained for autosomal and Y chromosome markers. Statistical analyzes that must be included in the issuance of expert reports. Thus, the general objective of this work is to carry out a macro-regional survey of the haplotype frequencies of 12 loci of X-STRs in Espírito Santo, to estimate the genetic diversity, the dynamics of populations and promote the gain of statistical power and the updating of this information in databases international data. In this sense, the survey of haplotype frequencies of X-STRs was carried out with a sample group of 571 unrelated individuals born in the 4 macro-regions of the state, in order to obtain a reliable estimate of the genetic diversity of ES. Analyzing the set of 12 X-STRs, no statistically significant differences were found between the macro regions of the state. The allele and haplotype frequencies found here have high rates of allelic and haplotype variability, demonstrating that this X-STR set is very informative in terms of individual discrimination, and may contribute to building knowledge and the importance of using the X chromosome in routine of laboratories that use DNA technology in human identification.

Keywords: Argus X-12, allele frequency, X-STRs Espírito Santo, X-STRs Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização geográfica do Estado do Espírito Santo	39
Figura 2: Ideograma do Cromossomo X	43
Figura 3: Eletroferograma do controle positivo.....	48
Figura 4: Eletroferograma do ladder.....	49
Figura 5: Eletroferograma da amostra F176.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura de polimorfismos tipo STRs.	20
Tabela 2: Estudos populacionais de X-STR nos últimos 10 anos.	32
Tabela 3: Alelos da escada alélica do kit Investigator Argus X-12	42
Tabela 4: Protocolo adaptado da análise de PCR.....	46
Tabela 5: Frequência alélica dos marcadores x-strs do kit investigador argus x-12 ..	52
Tabela 6: Frequência de alelos diferentes em populações.	55
Tabela 7: Alelos mais frequentes em diferentes populações.	56
Tabela 8: Alelos menos frequentes em diferentes populações.	57
Tabela 9: Grupos de ligação dos haplótipos	58
Tabela 10: Frequência haplotípica dos marcadores X-STRs	58
Tabela 11: Diversidade haplotípica dentro da população do ES.....	66
Tabela 12: Teste de desequilíbrio de ligação entre pares de <i>loci</i>	68
Tabela 13: F_{ST} da população do ES dividido em 5 grupos.....	69
Tabela 14: F_{ST} entre diferentes populações mundiais.....	70
Tabela 15: Distribuição dos poderes de exclusão e discriminação dos indivíduos. ..	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMOVA	Análise de variância molecular
cM	Centi-Morgan
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ES	Espírito Santo
FBI	Departamento Federal de investigação (do inglês <i>Federal Bureau of Investigation</i>)
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês <i>Human Leucocyte Antigen</i>)
Ibd	Idênticos por descendência (do inglês <i>identical by descent</i>)
ISFG	<i>International Society for Forensic Genetics</i>
LD	Desequilíbrio de ligação (do inglês <i>Linkage disequilibrium</i>)
LG	Grupo de ligação (do inglês <i>Linkage group</i>)
MEC	Chance Média de Exclusão (do inglês <i>Mean paternity exclusion change</i>)
MEC _D	Chance Média de Exclusão para duos
MEC _{PGM}	Chance Média de Exclusão para avó paterna
MEC _T	Chance Média de Exclusão para trios
mtDNA	DNA mitocondrial
NGHM	Núcleo de Genética Humana e Molecular
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAR	Região pseudoautossômica (do inglês <i>Pseudoautosomal region</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>)
PD	Poder de discriminação
PE	Poder de Exclusão
PD _F	Poder de discriminação feminino
PD _M	Poder de discriminação masculino
PDR	Plano Diretor de regional
RFU	Unidades relativas de fluorescência (do inglês <i>Relative fluorescence units</i>)
SESA	Secretaria de Estado de Saúde
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês <i>Single nucleotide polymorphism</i>)
STR	Repetições em tandem curtas (do inglês <i>Short tandem repeats</i>)
TP	Teste de paternidade
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
VNTR	Repetição em tandem de número variável (do inglês <i>Variable Number of Tandem Repeat</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. IDENTIFICAÇÃO HUMANA	16
2.2. CROMOSSOMO X: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	21
2.3. MARCADORES X-STRs:.....	23
2.4. APLICABILIDADE DOS DADOS DE X-STR	24
2.4.1. <i>Casos complexos usando X-STRs</i>	25
2.4.2. <i>Casos de incesto</i>	26
2.4.3. <i>Paternidade</i>	28
2.5. ESTUDOS POPULACIONAIS.....	30
2.6. PARÂMETROS FORENSES.....	33
3. HIPÓTESE	35
4. OBJETIVOS	36
4.1. OBJETIVO GERAL	36
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS E ASPECTOS ÉTICOS.....	37
5.2. COLETA DAS AMOSTRAS.....	39
5.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	40
5.4. GENOTIPAGEM DOS MARCADORES X-STR	41
5.4.1. <i>Investigator Argus X-12</i>	41
5.4.2. <i>Reação em Cadeia da Polimerase - PCR</i>	44
5.4.3. <i>Eletroforese Capilar</i>	44
5.4.4. <i>Análise e Interpretação dos resultados</i>	44
5.4.5. <i>Análise estatística</i>	45
5.5. SUBMISSÃO AO BANCO DE DADOS	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1. PADRONIZAÇÃO DO KIT ARGUS X-12	46
6.2. VARIABILIDADE GENÉTICA NA POPULAÇÃO DO ES.....	51
6.2.1. <i>Frequência Alélica</i>	51
6.2.2. <i>Frequência haplotípica</i>	58
6.3. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS MARCADORES X-STRS	67
6.4. DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES	69
6.5. PARÂMETROS DE EFICIÊNCIA FORENSE.....	70
6.6. SUBMISSÃO AO BANCO DE DADOS	72
7. CONCLUSÕES	73
8. REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE 1 – TABELA HAPLÓTIPOS COMPLETOS DA POPULAÇÃO DO ES.	87
ANEXO 1 – CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1	99
ANEXO 2 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2	100
ANEXO 3 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.	101
ANEXO 4 – QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS	112
ANEXO 6 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO AO BANCO DE DADOS.	113

1. INTRODUÇÃO

A identificação humana é importante para cumprir exigências de necessidades civis, administrativas e judiciais, o que exige uma forma de comprovação confiável e única, devendo ser distinguível durante a vida e também em morte (WOOD, 2006).

O conhecimento gerado pelas ciências forenses inclui a construção de bancos de dados que servem como ferramentas otimizadas para o armazenamento, busca e cruzamento de informações.

Para o âmbito forense, a identificação por meio de marcadores genéticos do indivíduo é o mais indicado para casos onde a simples observação não é o suficiente (PRIMORAC & SCHANFIELD, 2000).

Os marcadores do tipo *Short Tandem Repeats* (STRs) de cromossomos autossômicos são os mais amplamente utilizados na prática forense, no entanto, a conclusão de alguns casos, podem ser deficientes apenas com as informações desses marcadores. Nas situações mais complexas, as informações desses marcadores precisam ser complementadas com outros, destacando os STRs localizados no cromossomo sexual humano X (X-STRs).

A introdução dos X-STRs na genética forense tem uma história recente (SZIBOR *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 2005; SZIBOR, 2007). Esses marcadores possuem uma herança particular: mulheres possuem dois cromossomos X e os homens são hemizigóticos, recebendo o X individual da mãe. Isso os torna adequados em casos com deficiência de indivíduos na análise de parentesco, principalmente em testes de paternidade envolvendo filhas, podendo ser utilizado material genético de familiares tais como tios da linhagem paterna, irmãs, meias-irmãs com o pai em comum e avó paterna (EDELMANN *et al.*, 2004; AQUINO *et al.*, 2009; POSYNICK *et al.*, 2019).

Sua análise também é importante na solução de casos de separação de crianças na infância, com o mesmo suposto pai; em casos de incesto ou em testes de paternidade em que um pai e seu filho são os prováveis pais de uma criança e em casos de estupro quando a mãe não está disponível (SZIBOR, 2007).

Quando um vestígio apresenta mistura de material genético de indivíduos de ambos os sexos, onde o perfil procurado é o feminino, o estado hemizigoto masculino para X-STRs torna estes marcadores vantajosos, se comparados aos autossômicos (SZIBOR *et al.*, 2003). Assim, o cromossomo X humano é usado de forma a complementar eficientemente os dados em uma análise envolvendo marcadores autossômicos e uniparentais (como os do cromossomo sexual Y – Y-STRs e o DNA mitocondrial - mtDNA).

No que se refere à disponibilidade de informações de X-STRs da população espírito santense em bancos de dados, existe um estudo publicado por Martins *et al.* (2010). No entanto, apresenta limitações quanto ao número de amostras (245 indivíduos), frente aos critérios estabelecidos por Gusmão *et al.* (2017), e sua distribuição geográfica (circunscrita à capital).

Deste modo, é importante estabelecer tanto o protocolo de análise molecular e estatística dos X-STRs quanto seus dados de frequência haplotípica no estado do Espírito Santo (ES), em uma tentativa pioneira de viabilizar sua implementação na prática forense do estado.

Parte da revisão de literatura desenvolvida neste trabalho, foi publicada com o título “*Forensic applications of markers present on the X chromossome*” no periódico internacional “*Genes*” Classificado como A2 pelo Qualis CAPES no quadriênio de 2017-2020 (Anexo 1).

Assim como os resultados aqui obtidos, foram submetidos na forma de artigo intitulado “*Analysis of 12 X-STRs loci in a population from southeastern Brazil*” no periódico “*Forensic Science International: Genetics*” Classificado como A1 pelo Qualis CAPES no quadriênio de 2017-2020, estando sob revisão até o momento (Anexo 2).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IDENTIFICAÇÃO HUMANA

O processo que leva a determinação que uma pessoa é única, através do estabelecimento de um conjunto de caracteres que a difere de todas as outras e a define igual somente a ela mesma, é chamado de identificação humana (FRANÇA, 2005; SWEET, 2001). Essa identificação é importante mediante as exigências de necessidades civis, administrativas e judiciais, o que exige uma forma de comprovação confiável e única.

Segundo Silva & Passos (2006) e Araújo *et al.* (2013), para que esta comprovação não fuja ao seu objetivo, alguns critérios devem ser obedecidos, são eles:

- As características não devem se alterar com o tempo (Imutabilidade);
- Os dados devem ser perenes, ou seja, durar por toda a vida (Perenidade);
- A distinção entre as variáveis tem que ser precisa e clara entre as pessoas (Variabilidade);
- A comparação entre os dados analisados para identificação, deve ser feita de forma sistemática e precisa (Classificabilidade).

Essa mesma identificação pessoal durante a vida, tem que poder ser determinada após a morte, seja para conforto dos familiares da vítima seja para resoluções de questões jurídicas.

Algumas situações *post-mortem* em que o corpo está bem preservado, as características físicas que individualizem a pessoa, como reconhecimento facial, tatuagens, cicatrizes, impressão digital ou a dentição, podem ser usadas para tal identificação, desde que haja registros prévios dessas características (WOOD, 2006).

Porém, há casos que não existe a possibilidade desse tipo de identificação, onde há somente a ossada, ou quando o corpo já está em um estado de decomposição muito elevado, casos de afogamento, carbonização, amputações, portanto, faz-se necessária a análise de outras características únicas, que nesse caso poderá utilizar-

se das características ímpares do material genético, o ácido desoxirribonucleico – DNA (PRIMORAC & SCHANFIELD, 2000).

Cerca de 99,9% do genoma humano é igual em todos os indivíduos, sendo que o 0,1% restante é o que confere toda diferença entre os seres humanos, sendo a chave para identificação pessoal através do genoma (BUTLER, 2011).

As informações geradas por estas análises de DNA, apresentam informações mais que relevantes para investigações policiais, tornando-se uma poderosa ferramenta pericial (DIAS-FILHO *et al.*, 2020).

Com a ampliação dos conhecimentos de biologia molecular, a genética está cada vez mais envolvida dentro dos tribunais, como em casos de paternidade e em confronto de vestígios deixados na cena de crime com os suspeitos.

Segundo Chengtao (2018), a genética forense passou por quatro fases ao longo desse tempo, caracterizadas pelo uso de marcadores morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares.

Anterior aos estudos de marcadores moleculares, outros polimorfismos genéticos foram utilizados para investigações forenses, como é o caso de polimorfismos proteicos, de grupos sanguíneos, proteínas de complexo de histocompatibilidade (HLA), imunoglobulinas e outras proteínas plasmáticas ou presentes nas hemácias (RINCON, 2009; MARTINS, 2007).

Um exemplo da utilização desses polimorfismos passados, foi a utilização dos tipos sanguíneos do sistema ABO para exclusão de indivíduos, iniciando uma sólida base científica fundamental à genética forense. (DIAS-FILHO *et al.*, 2020).

Apesar desses polimorfismos terem sido amplamente utilizados, existiam diversas limitações, principalmente se tratando da identificação individual, que os avanços da biologia molecular puderam suprir, se tornando uma ferramenta indispensável para investigações criminais e exames de vínculo de parentesco genético (DIAS-FILHO *et al.*, 2020).

As décadas de 1970 e 1980 foram cruciais para o desenvolvimento das principais técnicas moleculares que tornaram possível o avanço da genética forense para a identificação humana.

Pode-se citar como esses avanços, a análise de polimorfismos de minissatélites, por Alec Jeffreys, o aprimoramento da técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, em inglês: *Polymerase Chain Reaction*), por Kery Mullis, o sequenciamento de moléculas de DNA, por Frederick Sanger, e o desenvolvimento do projeto Genoma Humano (DIAS-FILHO, FRANCEZ, 2018).

Entre esses avanços, o desenvolvimento da PCR foi um dos marcos mais importantes, principalmente na área forense, já que a maioria dos vestígios encontrados em cenas de crime, apresentam quantidades de DNA reduzidas, muitas vezes degradadas ou até contaminadas.

A partir de então, a identidade genética pelo DNA, começou a ser amplamente aplicada para demonstrar a autoria de crimes, exonerar inocentes, identificar corpos e restos humanos em grandes desastres, determinar paternidade com alto grau de confiabilidade, elucidar trocas de bebês em maternidade, entre outros (PENA, 2005).

Nos testes de identificação humana por DNA, são estudadas regiões hipervariáveis do material genético, que apresentam dois tipos de polimorfismos: o de sequência e o de comprimento.

Os polimorfismos de sequência ocorrem com a substituição de um ou mais nucleotídeos em uma sequência de DNA, enquanto o de comprimento decorre de inserções ou deleções de um ou mais nucleotídeos em uma região do DNA. Para que estas variações sejam consideradas polimorfismos e não mutação, leva-se em conta sua prevalência na população, quando a frequência da variação é menor que 1% considera-se mutação, 1% ou mais é considerado polimorfismo (MARTINS, 2011; KARKI *et al.*, 2015).

Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP em inglês: *Single Nucleotide Polymorphism*) são variações de apenas um nucleotídeo na sequência de DNA, e são os mais frequentes entre os polimorfismos de sequência, podendo estar presentes tanto em genes quanto em regiões não codificantes do genoma (BUTLER, 2011; GRIFFITHS *et al.* 2022; JIAN *et al.*, 2021).

Possui a vantagem de ter baixa taxa de mutação, o que é importante para o uso em testes de parentesco, e pode ser reconhecido mesmo em quantidades especialmente pequenas de material genético, sendo excelentes características para uso forense,

porém, por possuírem baixa taxa de mutação, seria necessária uma altíssima quantidade de SNPs analisados para identificação de indivíduos, o que é uma desvantagem significativa (TOMAS *et al.*, 2010; HABIBI *et al.*, 2019).

Os SNPs mais utilizados na área forense são na identificação de haplótipos do mtDNA e cromossomo Y, e que recentemente começaram a serem utilizados como identificação de vítimas de desastres com DNA altamente degradado, por possuírem informações sobre ancestralidade, há a possibilidade da inferência da ascendência biogeográfica de indivíduos, e também características fenotípicas (AMBERS *et al.*, 2016).

Dentre os polimorfismos de comprimento, os mais frequentes são os marcadores minissatélites (VNTR em inglês: *Variant Number of Tandem Repeat*), e os microsatélites (STR em inglês: *Short Tandem Repeat*), que são repetições consecutivas de unidades constituídas por aproximadamente 8 a 100 pares de base (VNTR) ou 2 a 7 pares de base (STR) (BUTLER, 2012; GRIFFITHS *et al.*, 2022; GILL *et al.*, 2020).

Os STRs representam aproximadamente 3% do genoma humano, sendo os mais vastamente utilizados nas análises forenses, por apresentarem características que facilitam a identificação humana, como ser altamente polimórfico, resultando na alta capacidade de discriminação entre os indivíduos, sua fácil e rápida amplificação através de PCR, tem a possibilidade de analisar vários fragmentos em uma única reação, além de serem mais facilmente amplificados mesmo em amostras degradadas, devido seu tamanho (GOODWIN, LINACRE, HADI, 2010; GOMES *et al.*, 2020).

O STR segue uma nomenclatura específica baseado na sequência que compõe a unidade repetitiva, por exemplo "GATA", ou, caso esteja em uma sequência gênica podem ter a nomenclatura relacionada a este gene, como STRTH01, que está localizado no íntron 01 do gene da Tirosina Hidroxilase, porém, a nomenclatura clássica é composta por diversos elementos que estão descritos na tabela 1 (BUTLER, 2005).

Tabela 1: Nomenclatura de polimorfismos tipo STRs.

Exemplo	Definição
DXS8378	D: Significa DNA de onde foi retirado.
	X: cromossomo que o marcador está localizado.
	S: <i>single copy sequence</i> – sequência de cópia única.
	8378: o <i>locus</i> que o marcador foi descrito.

Os polimorfismos do tipo STR foram usados pela primeira vez como marcador molecular no início da década de 90, em testes de paternidade humana. O primeiro kit STR de amplificação *multiplex* forense foi desenvolvido pelo Serviço de Ciências Forenses da Grã-Bretanha com quatro *loci* genéticos: TH01, vWA, FES/FPD e F13A1, sendo que atualmente os kits comerciais geralmente detectam de 15 a 20 *loci* (CHENGTAO, 2018).

Normalmente, para testes de paternidade e identificação humana, a análise de cerca de 20 STRs autossômicos é o suficiente, entretanto, em situações em que o resultado estatístico é inconclusivo, outros marcadores genéticos são necessários para complementar as análises (PINTO *et al.*, 2013b; YUAN *et al.*, 2014).

Atualmente o FBI (em inglês: *Federal Bureau of Investigation*) adota e recomenda a utilização de uma quantidade padrão de *loci* de STRs para identificação humana, que por muitos anos foi de pelo menos 13 regiões autossômicas e o gene da amelogenina (BUTLER e HILL, 2012). Porém, recentemente o FBI passou a recomendar a utilização de um conjunto de pelo menos 20 marcadores para um melhor desempenho em casos de amostras forenses que envolvam misturas (HARES, 2012; KATSANIS e WAGNER, 2013).

A sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG) recomenda que marcadores microsatélites só sejam aplicados na prática forense mediante estudos das propriedades genético-populacionais e somente se estiverem em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, apresentarem alto nível de polimorfismo, assim como possuírem desequilíbrio de ligação conhecido (SZIBOR, 2007).

Ainda levando em consideração casos complexos, independentemente da quantidade utilizada de marcadores STRs autossômicos, as informações podem ser limitadas e não realizar a efetiva identificação do indivíduo. Nesses casos, marcadores em cromossomos sexuais, visam complementar as informações geradas pelos STRs

autossômicos (BECKER *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008; NADEEM *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008; GUSMÃO *et al.*, 2009).

2.2. CROMOSSOMO X: CARACTERÍSTICAS GERAIS

O cromossomo X possui aproximadamente 155Mb e cerca de 1100 genes identificados, o que representa cerca de 5% do genoma humano, sendo considerado um dos maiores dentre os cromossomos humanos, porém com a menor densidade de genes (BUTLER, 2012; GUEN *et al.*, 2021).

Características específicas são encontradas nesse cromossomo em relação aos autossômicos, como por exemplo, nos indivíduos do sexo feminino, o cromossomo X está em homozigose, enquanto nos indivíduos do sexo masculino está em hemizigose (GRIFFITHS *et al.*, 2022; MONTEIRO *et al.*, 2021).

Além disso, sua herança também é particularmente diferente, no sexo masculino, o cromossomo X é (quase inteiramente) transmitido para as filhas meninas como um bloco inalterado, enquanto nas mulheres, os dois cromossomos X presentes podem se recombinar durante a meiose da mesma forma que os autossômicos, e o novo cromossomo reembaralhado é então transmitido para descendentes femininos e masculinos (GOMES *et al.*, 2020; DIEGOLI, 2015; ZHANG *et al.*, 2021).

No entanto, alguma recombinação entre os cromossomos X e Y nos homens é mantida garantindo a segregação adequada na meiose. Essa recombinação ocorre apenas dentro de duas zonas subteloméricas homólogas dos cromossomos, conhecidas como regiões pseudoautossômicas (PAR) (DIEGOLI, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2021). Nos humanos há duas dessas regiões, conhecidas como PAR1 e PAR2, e acredita-se que as duas PARs apresentam origens e propriedades muito diferentes (MONTEIRO *et al.*, 2021).

Como forma de compensar o desequilíbrio da dosagem gênica entre os diferentes gêneros, em indivíduos femininos, um dos cromossomos X herdados é inativado durante os processos de divisão mitótica somática, embora cerca de 25% dos genes desse cromossomo escapem da inativação devido sua localização fora da região de

recombinação (CHOW *et al.*, 2005; STABELLINI, 2008; MALUF e RIEGEL, 2011; BUTLER, 2012; LIU, 2019).

Outra característica do cromossomo X é que ele possui um maior desequilíbrio de ligação, uma vez que se recombinam apenas na meiose feminina, além de possuir uma taxa de mutação global inferior aos autossomos, por estar presente em dose dupla nas mulheres e apenas uma cópia nos homens (ZARRABEITIA *et al.*, 2009; TILLMAR *et al.*, 2017).

Desequilíbrio de ligação (LD) acontece quando a associação dos alelos de dois *loci* adjacentes não são distribuídos aleatoriamente, ou seja, quando a segregação ocorre em blocos de *loci* que estão próximos geneticamente (WEISS e CLARK, 2002; SLATKIN, 2008; TILLMAR *et al.*, 2008).

A distância genética é medida por centi-Morgan, sendo que cada centi-Morgan (cM) equivale a 1 recombinação esperada por 100 meioses. Espera-se, portanto, que marcadores separados por uma distância maior que 1cM tenha uma segregação independente, portanto é previsto que não esteja em desequilíbrio de ligação. (SZIBOR, 2007, GRIFFITHS *et al.*, 2022).

A distância genética não é o único fator que determina o desequilíbrio de ligação, outros fatores como seleção natural, efeito fundados, miscigenação e deriva genética também podem influenciar no desequilíbrio (SZIBOR *et al.*, 2003; ZARRABEITIA *et al.*, 2006).

Essas características fazem com que polimorfismos presentes no cromossomo X sejam uma poderosa ferramenta em práticas forenses e genética de população, ajudando a solucionar casos complexos, identificação de pessoas desaparecidas, investigação de incesto, entre outras questões em que as informações dos marcadores autossômicos não são suficientes para resolução.

2.3. MARCADORES X-STRs:

Mais de 30 marcadores STRs já foram caracterizados em humanos, permitindo estudos populacionais e análises de parentesco. Para a prática forense, fez-se um estudo de desequilíbrio de ligação entre os *loci* testados na população de interesse garantindo eficiência no resultado (GUSMÃO *et al.*, 2009).

Ao longo dos anos, a particular estrutura e propriedades singulares do cromossomo X, tem aumentado o uso de seus marcadores pela genética forense e análises de genética populacional. O conhecimento obtido por esses marcadores pode ser usado isoladamente ou como análises em conjunto com marcadores autossômicos, do cromossomo Y e mtDNA (GOMES *et al.*, 2020; ALI *et al.*, 2021).

Pela diferença entre os padrões de herança dos cromossomos X e Y em relação aos autossômicos, as informações que os marcadores dos cromossomos sexuais oferecem, são diferentes entre si, porém complementares. Marcadores Y-STRs já estão bem documentados e amplamente aceitos pela comunidade científica e tribunais. O mesmo não ocorre com as análises de marcadores do cromossomo X (DIEGOLI e COBLE, 2011; SZIBOR *et al.*, 2003).

Embora ainda não amplamente utilizados, os marcadores X-STRs são grandes ferramentas adicionais em casos onde STRs autossômicos e/ou Y-STR não são informativos, especialmente em casos complexos de parentesco (SZIBOR, 2007; GUSMÃO *et al.*, 2011; JIA *et al.*, 2021).

Todos indivíduos, independente do gênero, herdam um cromossomo X materno recombinado (resultante da meiose nas células germinativas feminina) e as filhas herdam um cromossomo X paterno inalterado, devido à falta de recombinação (com exceção das regiões PAR1 e PAR2) (GOMES *et al.*, 2020).

Essa falta de recombinação nos indivíduos do sexo masculino, permite a identificação direta de haplótipos, tornando um eficiente marcador em caso de investigação de parentesco, em que o descendente é do sexo feminino (POSYNICK *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2012).

Estudos populacionais relacionados a genotipagem de X-STRs tiveram um aumento significativo no final da década de 90 até aproximadamente 2008, quando houve uma desaceleração (GOMES *et al.*, 2020).

Para obtenção de dados como frequências alélicas e outros parâmetros forenses, foram criados alguns bancos de dados sendo o de maior destaque o ChrX-STR (<https://www.chrx-str.org/xdb/index.jsf>) (SZIBOR, HERING e EDELMANN, 2006).

2.4. APLICABILIDADE DOS DADOS DE X-STR

Os X-STRs podem ser utilizados isoladamente, ou ainda complementar a análise dos marcadores autossômicos e do cromossomo Y de forma eficaz (NADEEM *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Em casos em que os marcadores usualmente utilizados para identificação humana não são informativos o suficiente para distinguir os indivíduos ou confrontar amostras, os X-STRs podem ser utilizados.

Butler (2012), Szibor (2007) e Pinto (2013a) citaram alguns exemplos de casos que podem se beneficiar com o uso do X-STRs, como em casos complexos de parentesco que envolve pelo menos uma mulher; Paternidade quando a filha é mulher, sem a mãe presente; Teste de meia-irmã onde o pai é o parente comum; Comparação entre avós paternas e netas; Teste de paternidade em casos de incesto; Traços de DNA feminino em fundo masculino.

Um exemplo de utilização vantajosa dos marcadores do cromossomo X, é o caso de parentesco entre meias-irmãs cujo parente comum é o pai, mesmo sem o pai presente, pode-se investigar essa relação confrontando o material genético do cromossomo X da suposta avó (paterna) com o das irmãs, já que pelo padrão de herança do cromossomo X, o suposto pai (SP) receberia da sua mãe (suposta avó - SA), suas características cromossômicas de X, e como esse não sofre recombinação com o cromossomo Y do SP, o cromossomo X do SP é passado para suas filhas, quase que, idêntico ao que recebeu da SA.

Embora a aplicabilidade destes polimorfismos do cromossomo X seja bastante ampla e informativa em situações complicadas, pouco se sabe ainda sobre a sua variação em diferentes populações do mundo, sendo necessário grandes estudos populacionais.

2.4.1. Casos complexos usando X-STRs

Desde as últimas décadas, os marcadores STRs autossômicos são o padrão ouro na genética forense, sendo a melhor opção para a maioria dos casos de identificação genética, testes de paternidade e outras análises de parentesco. Apesar de sua confiabilidade e alto poder discriminativo, em alguns casos particulares, os marcadores autossômicos apresentam pouca informação mesmo com um alto número de polimorfismos tipados (ALONSO, 2012).

Nesses casos, o uso de Y-STRs e X-STRs como marcadores adicionais, poderia aumentar a confiabilidade à evidência genética devido às suas características de herança e diferentes padrões de recombinação (PRINZ *et al.*, 2007; TILMAR *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2020). Informações genéticas adicionais podem aumentar os valores estatísticos em análises das relações parentais e reduzir as chances de falsas atribuições (CARBONI *et al.*, 2014).

Marcadores de cromossomo X raramente têm sido empregados em práticas forenses, embora tais marcadores sejam especialmente eficientes para resolver casos sem solução até o momento (SZIBOR *et al.*, 2003).

X-STRs são particularmente úteis em casos de parentesco complexos onde apenas alguns indivíduos e/ou parentes distantes estão disponíveis para análise genética (ALONSO, 2012). Eles também são usados em casos de pessoas desaparecidas/situações de desastres em massa, para identificar vítimas onde amostras de referência direta não estão disponíveis e parentes mais distantes devem ser usados (BUTLER, 2011).

O cenário em que o suposto pai não está disponível para análise genética é o tipo mais comum de teste de parentesco complexo, geralmente devido às disputas de herança financeira para provar a filiação ao suposto pai falecido (ALONSO, 2012).

O pai transmitirá sua cópia do Cromossomo X apenas para as filhas, e todas as irmãs compartilharão pelo menos um alelo por *locus* para esse cromossomo. Nesse contexto, a investigação de irmãs ou meias-irmãs pode excluir ou incluir a paternidade, mesmo que o DNA dos pais não esteja disponível, através da genotipagem da suposta avó (SZIBOR, 2007).

Outro exemplo de alta complexidade é o cenário onde dois supostos pais são pai e filho, nesse caso, marcadores presentes no cromossomo X seriam mais eficientes do que STRs autossômicos, já que pai e filho não compartilham nenhum alelo cromossômico X.

Para apoiar o desenvolvimento de X-STRs, as pesquisas realizadas apresentaram a descoberta de novos marcadores e sistemas *multiplex* altamente promissores para uso forense (ZHANG *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2021; XIAO *et al.*, 2021; HAKIM *et al.*, 2021) e a extensão de dados de haplótipos locais através de estudos de viabilidade e poder discriminatório de X-STRs (HERING *et al.*, 2020; TAO *et al.*, 2020; FERRAGUT *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020; BOTTINELLI *et al.*, 2022).

Apesar de mais de 20 anos de uso e pesquisa do X-STR em genética forense, ainda há uma demanda contínua por dados genéticos de alta qualidade para apoiar novos estudos e expandir a aplicação desses marcadores gonossômicos.

2.4.2. Casos de incesto

O incesto é geralmente definido como o intercuro entre parentes de primeiro grau (como pai-filha, mãe-filho ou irmão-irmã), que têm 30-50% de seus genes em comum (JAKOVSKI *et al.*, 2011). A definição, no entanto, pode ser ampliada com a adição de atividade sexual entre tio-sobrinha, avô e netos (COVINGTON *et al.* 1989, YUKSEL *et al.*, 2008).

Filhos de pais consanguíneos podem herdar dois alelos idênticos por descendência (ibd do inglês: *identical by descent*) em qualquer *locus*, apresentar aumento de genótipos homozigotos e maior risco de doenças autossômicas recessivas (WENK, 2007). A diminuição da heterozigosidade populacional ao longo das gerações é esperada na cultura que encoraja casamentos consanguíneos entre parentes de sangue específicos (por exemplo, tio-sobrinha) (WOODS *et al.*, 2006).

No Brasil e em muitos outros países do mundo, o incesto por si só não é crime. No entanto, nos casos em que se utilize violência ou ameaças graves, em que o ato seja praticado com menores de 14 anos, com alguém que, por doença ou deficiência mental, não tenha o discernimento necessário para praticar o ato, ou que, por qualquer outro motivo, não pode oferecer resistência, a atividade sexual pode ser considerada crime de estupro ou estupro de pessoa vulnerável (DECRETO DE LEI Nº 2.848, 1940 – artigos 213 e 217A). Nesses casos, surge o interesse jurídico, dada a natureza criminosa do fato, havendo a necessidade de se fazer uso de ferramentas de DNA forense.

Swabs vaginais e orais são comumente coletados quando há suspeita de atividade criminosa incestuosa logo após os eventos, o que pode permitir a recuperação de material espermático do suspeito e a comparação de perfis genéticos (vítima-agressor).

O abuso sexual infantil é um problema de saúde pública mundial considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma emergência silenciosa de saúde (WHO, 2011). As vítimas de incesto geralmente não falam sobre a situação por vergonha, culpa e medo. Com isso, casos de incesto raramente são relatados (EMRE *et al.*, 2015). Além disso, tentar encobrir casos de incesto por parte das famílias é uma realidade bem conhecida.

Em muitos casos de estupro, o esperma não está disponível em *swabs* vaginais e a única evidência genética resultante pode ser produto da concepção (JAKOVSKI *et al.*, 2011). Sendo que nos casos em que o estupro leva à gravidez, é possível comparar os perfis genéticos do suposto pai, mãe e feto.

Em muitas circunstâncias, perfis de DNA de *loci* STR autossômicos podem ser usados de forma confiável para resolver casos criminais e de paternidade focados em

homens. Porém em casos incestuosos os STRs do cromossomo X podem ser mais apropriados (SZIBOR, 2007).

Em algumas investigações criminais de paternidade, o alto índice de homozigose apresentado pela criança pode levantar a suspeita de uma situação incestuosa.

A análise do perfil de X-STR, no caso de uma filha, é bastante informativa, mesmo na ausência do perfil genético do pai. Quando o pai da filha é também o pai da mãe (incesto pai-filha), a criança será homozigota para todos os marcadores X-STRs ou apresentará o mesmo genótipo da mãe (GOMES *et al.*, 2020).

Quando o filho é do sexo masculino, a análise de X-STRs não é útil no caso de testes de paternidade criminal, pois o filho não terá herdado o cromossomo X paterno, mas sim um cromossomo Y. No entanto, pode servir como complemento em casos de testes criminais de maternidade.

As frequências estimadas de incesto variam de 0,5 a 2 por cento, mas as estimativas variam por definição e pelo método de encontrar casos (SISKIND, 1975). A maioria dos incestos são de menores de idade, cujas vítimas acabam por agravar as consequências sociais e psiquiátricas (EMRE *et al.*, 2015). Assim, é imprescindível que o poder público conscientize nesses casos e adote protocolos multidisciplinares e especializados para acompanhamento das vítimas, principalmente as mais jovens, visando tratamento e reabilitação integral (EMRE *et al.*, 2015).

2.4.3. Paternidade

Comumente os casos de paternidade também são solucionados com a análise de STRs autossômicos, porém em alguns casos mais complexos, é necessário o complemento da análise através de outros marcadores.

Com os avanços tecnológicos atuais, espera-se que surja uma demanda específica por testes de parentesco onde apenas parentes remotos estão disponíveis para testes (SZIBOR, 2007) e há uma infinidade de aplicações para testes de paternidade, como esclarecimento de relacionamentos bilaterais (NOTHNAGEL; SCHMIDTKE;

KRAWCZAK, 2010), determinação de parentesco em processos de imigração e identificação de linhagens parentais (WENK, 2004).

Desta forma, o teste de paternidade (TP) pode ser aplicado em vários casos forenses, no entanto, vale destacar que o envolvimento do genótipo da mãe gera um aumento no poder de identificação do pai biológico (NOTHNAGEL; SCHMIDTKE; KRAWCZAK, 2010).

Assim, a inserção de marcadores baseados em sequências STRs e variações da sequência de DNA mitocondrial vinculadas à análise de cromossomos sexuais (X e Y), proporcionam maior eficiência do TP em relação aos marcadores autossômicos (SZIBOR, 2007; AULER-BITTENCOURT *et al.*, 2015) e isso se deve ao fato de que marcadores do cromossomo X podem atribuir membros de longas distâncias em relação às bandas do cromossomo X, fornecendo informações qualitativas (SZIBOR, 2007).

Como descrito por Gomes *et al.* (2020) os marcadores cromossômicos X podem ser utilizados para complementar informações autossômicas quando resultados estatísticos inconclusivos ou fracos são alcançados em testes de parentalidade padrão em que a hipótese alternativa é que os indivíduos não são parentes e isso pode ser devido à baixa qualidade ou baixa quantidade de DNA em amostras degradadas, resultando em poucos marcadores analisados ou em diferentes circunstâncias em que são encontradas poucas incompatibilidades mendelianas.

Além disso X-STRs são úteis para a identificação de pais ausentes e relações sanguíneas complexas e, em um estudo recente, foram identificados novos loci STR para uso como marcadores de DNA através da realização de análises de polimorfismos e haplótipos. (NISHI *et al.*, 2022).

Finalmente, a tipagem autossômica de STRs provavelmente continuará a ser a principal técnica utilizada nos laboratórios forenses no futuro e os marcadores X-STRs já provaram ser ferramentas complementares úteis ao arsenal forense.

A necessidade de resolver crimes de agressão sexual, assim como analisar cenários de parentesco em áreas como imigração, paternidade, pessoas desaparecidas e desastres em massa continuará sendo uma parte importante do impacto que a ciência forense tem na sociedade, especialmente porque as questões que envolvem tais

situações tem se tornado cada vez mais complicadas e, novas tecnologias, como o sequenciamento de nova geração, tornará a implementação laboratorial de sistemas de marcadores X-STR mais acessível (DIEGOLI, 2015; NISHI *et al.*, 2022).

Além disso, seguir as práticas estabelecidas através da adoção e posterior caracterização da tipagem e aplicação de X-STR irá produzir o desenvolvimento de ferramentas adicionais, como *softwares* que fornecerão funções de cálculo de probabilidade de parentesco/pedigrees utilizando dados de marcadores X-STRs, para facilitar sua implementação laboratorial, proporcionando uma rica área para o futuro da pesquisa forense.

2.5. ESTUDOS POPULACIONAIS

Diante da grande contribuição dos marcadores presentes no cromossomo X em análises forenses é importante estudos genéticos em diversas populações humanas, a fim da obtenção de dados de frequências alélicas para tais marcadores, para sua utilização em exames forenses de DNA de maneira fidedigna e robusta.

A genética de populações é de grande interesse para ciências forenses, por ser necessário conhecer parâmetros estatísticos populacionais de referência para se concluir laudos periciais de DNA (BEIGUELMAN, 2008).

Para a identificação precisa de indivíduos de determinada população, é imprescindível estudos prévios de frequências alélicas em diferentes marcadores em nível regional, em diferentes populações a fim de obter os marcadores com maior poder informativo (FRANCEZ *et al.*, 2011).

Marcadores encontrados nos cromossomos autossômicos e Y, já são amplamente descritos e utilizados nesta prática, e sabendo da singularidade proporcionada pelos marcadores X-STR, diversos grupos de pesquisa realizaram estudos para avaliar a distribuição populacional de países como Brasil, Suíça, Itália, Índia, Croácia, países do continente africano, entre outros (MARTINS *et al.*, 2017; KAKKAR *et al.*, 2020; MRSIC *et al.*, 2018; BINI *et al.*, 2021; BOTTINELLI *et al.*, 2022; ROBINO *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 2017). No entanto, a maioria dos estudos se concentra em populações

asiáticas (GU e LI, 2006; KANG e LI, 2006; LIU *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; e da Europa (ROBINO *et al.*, 2006; ZARRABEITIA, MIJARES e RIANCHO, 2007; ALER *et al.*, 2007; TURRINA e ATZEI, 2007; BECKER *et al.*, 2008; ZALÁN *et al.*, 2008; FRACASSO *et al.*, 2008).

Nos casos citados, o kit de amplificação escolhido foi o *kit Investigator Argus X-12* (Qiagen), sendo o sistema de amplificação mais utilizado.

Vários grupos de pesquisa focaram no desenvolvimento de kits de amplificação com maior número de marcadores. Zhang *et al.*, (2021) desenvolveram e validaram o sistema de amplificação *multiplex* TYPER-X19 que consiste em 18 *loci* STR no cromossomo X (DXS9895, DXS8378, DXS9902, DXS6810, DXS7132, DXS10079, DXS6789, DXS7424, DXS101, DXS67683, DXS7, HPRTB, GATA31E08, DXS8377 e DXS7423) e amelogenina.

Também são usados kits *multiplex* internos contendo muitos marcadores altamente polimórficos. O *decaplex* GHEP-ISFG foi desenvolvido por Gusmão *et al.* (2009) contém 10 marcadores X-STR: DXS8378, DXS9902, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS6789, DXS7133, GATA172D05, GATA31E08 e DXS7423. O estudo analisou as frequências alélicas de populações ibéricas e latino-americanas e o kit demonstrou eficiência e desempenho robusto.

A Tabela 2, lista alguns estudos populacionais que exploram marcadores X-STR publicados nos últimos dez anos.

Tabela 2: Estudos populacionais de X-STR nos últimos 10 anos.

População	Kit	Nº de marcadores	Ano de publicação	Ref.
Suíça	Investigator Argus X-12 kit (Qiagen)	12	2021	Bottinelli <i>et al.</i> , 2022
China	The Microreader™ 19X Direct ID System	19	2021	Xiao <i>et al.</i> , 2021
China	TYPER-X19 multiplex Assay	18	2021	Zhang <i>et al.</i> , 2021
China	19 X-STR typing system (in-house)	19	2021	Jia <i>et al.</i> , 2021
Mediterrâneo Ocidental	Investigator Argus X-12 kit (Qiagen)	12	2021	Ferragut <i>et al.</i> , 2021
Índia	Investigator Argus X-12 QS kit (Qiagen)	12	2020	Kakkar <i>et al.</i> , 2020
Eritrea	Investigator Argus X-12 kit (Qiagen)	12	2020	Bini <i>et al.</i> , 2021
Alemanha	Investigator Argus X-12 kit (Qiagen) (6 marcadores in-house)	18	2020	Hering <i>et al.</i> , 2020
Argentina	Investigator Argus X-12 kit (Qiagen)	12	2019	Garcia <i>et al.</i> , 2019
México	GHEP-ISFG decaplex (in-house)	10	2018	Mariscal <i>et al.</i> , 2018
Itália	Investigator Argus X-12 kit (Qiagen)	12	2018	Robino <i>et al.</i> , 2018
Coácia	Investigator Argus X-12 kit (Qiagen)	12	2018	Mrsic <i>et al.</i> , 2018
Brasil	GHEP-ISFG decaplex (in-house)	10	2017	Martins <i>et al.</i> , 2017
Guiné-Bissau	Investigator Argus X-12 kit (Qiagen)	12	2017	Gomes <i>et al.</i> , 2017
Emirados Árabes	Investigator Argus X-12 kit (Qiagen)	12	2017	Almarri, Lootah, 2017
EUA	15 X-chromosomal STR markers (in-house)	15	2014	Diegoli <i>et al.</i> , 2014
Japão	18 X-chromosomal STR (in-house)	18	2013	Nakamura <i>et al.</i> , 2013
Europa e Ásia	Investigator Argus X-12 kit (Qiagen)	12	2012	Nothnagel <i>et al.</i> , 2012

Embora os marcadores X-STR sejam extremamente eficientes para análises populacionais, a ausência de um banco de dados para coleta, armazenamento e uso de frequências de alelos ou haplótipos X STR é um fator que dificulta seu uso (DIEGOLI, 2015; GOMES *et al.*, 2020). Até o momento, as principais formas de obtenção desses dados são por meio da consulta de publicações na base de dados

PubMed, anais de conferências da *International Society for Forensic Genetics* (ISFG) e do site *Forensic ChrX Research* (DIEGOLI, 2015; MARTINS *et al.*, 2017).

Além disso, vários países não possuem dados compilados e armazenados para X-STR. A maior escassez é observada em áreas como África Subsaariana e América. Por outro lado, a China fez progressos significativos nesse sentido nos últimos anos. O país possui uma grande quantidade de informações e estudos sobre o marcador X-STR para sua população (GOMES *et al.*, 2020).

O uso de marcadores X-STR em estudos populacionais é promissor, mas para avançar no assunto são essenciais mais estudos sobre as distribuições de frequência de haplótipos, taxas de mutação e LD. Considerando essas observações, será possível construir um banco de dados de X-STR humano eficaz que contenha dados abrangentes de diferentes populações em diferentes partes do mundo.

2.6. PARÂMETROS FORENSES

Para que uma evidência de DNA seja considerada representativa para resolução de casos forenses, ou mesmo testes de paternidade, deve-se considerar a eficiência dos marcadores selecionados para determinada população (TILLMAR, 2010).

Essa eficiência é mensurada por meio de sua habilidade de excluir um homem aleatório na população como pai da criança, sabendo que este não é o pai. Essa probabilidade é conhecida como “poder de exclusão” (PE) ou “chance média de exclusão (MEC) (PINTO *et al.*, 2013b).

A chance média de exclusão (MEC) foi introduzida por Krüger *et al.* (1968), para tipos de marcadores autossômicos em trios envolvendo mãe, filho e suposto pai. Este parâmetro não é adequado para marcadores do cromossomo X, exceto para casos de deficiência em que a avó paterna é investigada em vez do suposto pai (MEC_{PGM}) (SZIBOR *et al.*, 2003).

Em 1998, Desmarais e colaboradores introduziram uma possibilidade de cálculo de MEC para trios (MEC_T) e duos (MEC_D), bem como do poder de discriminação em indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino para esses marcadores.

Considerando-se uma situação de paternidade com o trio (mãe, filha e suposto pai), o MEC_T indica a probabilidade média de um indivíduo qualquer da população e não relacionado à criança testada ser excluído da paternidade. O mesmo é válido para MEC_D porém nesta situação tem-se apenas pai e filha.

O Poder de Discriminação (PD) consiste na probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na população apresentarem genótipos diferentes entre si para um determinado marcador.

3. HIPÓTESE

Antes da aplicação de qualquer marcador genético por laboratórios que realizam análises para identificação humana, são necessários estudos da diversidade dos marcadores selecionados, seu poder discriminativo e a genética da população em questão.

Sabendo da importância dos estudos dos marcadores genéticos, do conhecimento sobre a variação e frequência de polimorfismos em diferentes populações, e a ausência de estudos relevantes de caracterização de X-STR em populações que englobe todo ES, buscou-se realizar tal levantamento para esta população.

Sob uma perspectiva da biotecnologia, esses dados populacionais são muito importantes para conferir peso estatístico a testes com marcadores moleculares, como o de X-STR.

Os dados obtidos a partir dessa pesquisa permitirão a inclusão da análise desses marcadores no âmbito dos testes forenses realizados no ES, o que vai assegurar uma análise estatística fidedigna e assim podendo ser implementado pela Polícia Civil do estado do ES, após devida validação, contribuindo com a resolução de casos pendentes como por exemplo, de indivíduos com alto grau de parentesco e ausência paterna.

Portanto, a hipótese levantada neste estudo é que um maior número amostral coletado em diferentes macrorregiões do Espírito Santo possa caracterizar a distribuição dos haplótipos de X-STR e sua dinâmica populacional, aumentando a robustez dos dados para análises estatísticas, sendo o mais fidedigno das frequências dos marcadores na população em questão.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Realizar o levantamento macrorregional das frequências haplotípicas de 12 *loci* de X-STRs no Espírito Santo no intuito de estimar a diversidade genética, a dinâmica das populações e promover o ganho de poder estatístico e a atualização dessas informações em bancos de dados internacionais.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mapear os haplótipos de 12 X-STRs nas 4 macrorregiões do ES seguindo os critérios internacionais de 2017 para geração de dados populacionais;
- Estabelecer as frequências de 12 X-STRs da população espírito-santense;
- Comparar as frequências haplotípicas entre as macrorregiões do ES e entre estados vizinhos, quando disponíveis dados do mesmo conjunto de marcadores;
- Comparar as frequências haplotípicas entre o ES e diferentes países, quando disponíveis os dados do mesmo conjunto de marcadores;
- Adicionar as informações de frequência ao banco de dados internacional *ChrX-STR.org 2.0*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS E ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa consiste em um estudo observacional de corte transversal e possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde – CIAS Unimed/Vitória (CAAE: 79664817.4.0000.5061) (Anexo 3).

A amostra foi dividida entre material biológico e dados pessoais/ancestralidade, obtidos com auxílio de uma lanceta descartável estéril e/ou por meio de *swab* bucal e preenchimento de um formulário com dados pessoais (nome, sexo, endereço, telefone de contato e email) e referentes à ancestralidade, autodeclaração étnica e cidade natal (Anexo 4). As coletas ocorreram somente após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foram selecionados 571 indivíduos adultos (≥ 18 anos) do sexo masculino, não aparentados, nascidos no ES, divididos proporcionalmente entre as 4 macrorregiões de Planejamento do ES. A seleção amostral deste trabalho obedeceu aos parâmetros internacionais para geração e publicação de dados populacionais de marcadores forenses, definidos por Gusmão *et al.* (2017) que são: pelo menos 500 indivíduos do sexo masculino, para permitir uma estimativa direta da frequência de haplótipos e análise de LD; mínimo de 12 marcadores; somente amostras com genótipo/haplótipo completo (GUSMÃO *et al.*, 2017).

A escolha por apenas indivíduos do sexo masculino se deu por esse trabalho fazer parte de um projeto maior, no qual um dos critérios era possuir o cromossomo Y, desse modo as coletas foram realizadas apenas em homens. Apesar de não possuir representantes do outro sexo, estudos como o de Januário (2021) demonstrou não haver diferença estatística entre análises com homens e mulheres ou apenas homens.

As macrorregiões foram divididas de acordo com o mapa do novo Plano Diretor de Regional (PDR) redesenhado pela Secretaria de Estado de Saúde (SESA) (Figura 1) e descritas na Lei nº 9.768 do dia 26 de dezembro de 2011, divididas da seguinte maneira:

Macrorregião metropolitana: Cariacica, Serra, Viana, Vitória, Vila Velha, Fundão, Guarapari, Afonso Cláudio, Brejetuba, Conceição do Castelo, Domingos Martins, Laranja da Terra, Marechal Floriano, Venda Nova do Imigrante, Itaguaçu, Itarana, Santa Leopoldina, Santa Maria de Jetibá e Santa Teresa;

Macrorregião norte: Conceição da Barra, Pedro Canário, São Mateus, Montanha, Mucurici, Pinheiros, Ponto Belo, Jaguaré, Boa Esperança, Água Doce do Norte, Barra de São Francisco, Ecoporanga, Mantenedópolis, Vila Pavão, Águia Branca e Nova Venécia;

Macrorregião central: Alto Rio Novo, Baixo Guandu, Colatina, Pancas, Governador Lindenberg, Marilândia, São Domingos do Norte, São Gabriel da Palha, Vila Valério, São Roque do Canaã, Aracruz, Ibiracú, João Neiva, Linhares, Rio Bananal e Sooretama;

Macrorregião sul: Cachoeiro de Itapemirim, Vargem Alta, Castelo, Atílio Vivacqua, Mimoso do Sul, Muqui, Apiacá, Jerônimo Monteiro, Divino São Lourenço, Dolores do Rio Preto, Guaçuí, Ibitirama, Muniz Freire, Irupi, São José do Calçado, Alegre, Bom Jesus do Norte, Iúna, Ibatiba, Alfredo Chaves, Anchieta, Iconha, Piúma, Itapemirim, Rio Novo do Sul, Marataízes e Presidente Kennedy.



Figura 1: **Localização geográfica do Estado do Espírito Santo dividido em 4 macrorregiões. Mapa do Espírito Santo e suas macrorregiões, destacado da região Sudeste, destacado do mapa do Brasil.**
Fonte: Banco de Imagens: Instituto Jones dos Santos Neves –IJSN: <http://www.ijsn.es.gov.br/mapas/>.
Destacado na figura em preto o nome e o número amostral de cada macrorregião, em vermelho o número amostral em cada região e total do grupo de pomeranos.

5.2. COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas por um pesquisador capacitado, atendendo todos os cuidados de biossegurança e assepsia, em diferentes *campi* da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (Goiabeiras, Maruípe, Alegre e São Mateus), com o preenchimento do questionário e coleta de *swab* oral e/ou sangue periférico com ajuda do papel FTA.

Após a coleta, o questionário e o material biológico foram devidamente identificados e transportados para o Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) do Departamento de Ciências Biológicas da UFES *campus* de Goiabeiras, onde foram

mantidas a -20°C (*swab*) e a temperatura ambiente (papel FTA) até que fossem submetidas à extração de DNA.

As informações obtidas dos formulários foram compiladas de forma a manter o anonimato dos voluntários.

Foram coletados o total de 571 amostras, divididos em 83 indivíduos pertencentes à macrorregião central, 181 da macrorregião metropolitana, 99 da macrorregião norte, 117 da macrorregião sul e ainda 91 amostras da população de pomeranos.

As amostras utilizadas como controles no estudo foram provenientes do próprio kit de amplificação (*Control DNA 9947A*).

Os processos de compilação dos dados, extração do material genético, quantificação e PCR, foram realizados no NGHМ-UFES, enquanto que a eletroforese capilar para obtenção dos perfis genéticos foi realizada no Laboratório de DNA Criminal da Polícia Civil do Espírito Santo e Laboratório de Diagnósticos por DNA da Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

5.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A extração de DNA do papel FTA e do *swab* de algodão foi feita de acordo com o protocolo adaptado de Sambrook (1989) por isolamento com fenol-clorofórmio, por ser o que apresentou maior eficiência dentre os isolamentos testados.

A preparação do papel FTA consistiu em recortá-lo em pequenos círculos (*punchs*) a região onde se encontrava o sangue depositado, utilizando o cortador *Harris Uni-core*. Foi depositado 4 ou 5 *punchs* de cada amostra em tubos *ependorfs* de 1,5ml identificados de acordo com a identificação no papel FTA.

O *swab* que estava armazenado em recipiente de plástico próprio, foi realocado também para tubos *ependorfs* de 1,5ml seguindo a mesma identificação.

A partir deste momento, todos os materiais foram tratados da mesma maneira. Foi adicionado 500 μL de tampão de extração, composto por Tris, EDTA dissódico, NaCl e SDS, e 6,5 μL de proteinase K (20mg/mL) em cada amostra, invertendo o microtubo

para homogeneizar manualmente, sendo incubado em seguida em banho maria a 56°C *overnight*.

No mesmo tubo, foi adicionado 500 µL de fenol-clorofórmio pH 9, que foi agitado através do vortex e centrifugado a 18000g por 8 minutos. Após a centrifugação as partes orgânicas e aquosa se separam, então a parte aquosa (onde se encontra o DNA) foi transferida para um novo tubo contendo 60 µL de NaCl 5M.

Nesse novo tubo foi acrescentado 1mL de álcool isopropílico gelado e novamente homogeneizado à mão a fim de precipitar o DNA. Após esse processo, houve uma nova centrifugação a 15350g por 15 minutos e posteriormente descartando todo o líquido, invertendo o tubo de uma vez só no descarte.

No próximo passo acrescentou-se 200µL de Etanol 70% e houve uma nova centrifugação a 15350g por 3min.

Após o descarte do líquido, os tubos abertos foram invertidos sobre papel toalha até a secagem completa, seguindo da ressuspensão do DNA acrescentando 50µL de água ultrapura no tubo, incubação em banho maria a 37°C por 15 minutos e finalmente armazenado em geladeira a 4°C.

Em seguida todas as amostras foram quantificadas pelo espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop™ (*Thermo Scientific*) e em casos necessários, foram diluídas com água ultrapura, para padronizar sua concentração de DNA entre 0,2 e 0,5 ng de DNA, que é o recomendado pelo fabricante do kit utilizado.

5.4. GENOTIPAGEM DOS MARCADORES X-STR

5.4.1. Investigator Argus X-12

As amostras foram analisadas para um conjunto de 12 marcadores X-STRs amplificados simultaneamente via PCR com o kit comercial *Investigator Argus X-12* (QIAGEN). As regiões analisadas são altamente informativas para testes de

parentesco, genética populacional e estudos antropológicos. Além disso, é adequado para a análise de manchas forenses, como vestígios femininos em amostras com misturas de DNA. Os *loci* do *Investigador Argus X-12* são agrupados em 4 grupos de ligação e, portanto, cada conjunto de 3 marcadores é tratado como um haplótipo.

A tabela 3 apresenta a lista de alelos que estão incluídos na escada alélica do kit escolhido, enquanto a figura 2 apresenta o ideograma do cromossomo X, demonstrando a localização física de cada *loci* analisado no kit.

Tabela 3: Alelos da escada alélica do kit Investigador Argus X-12

Marcador X-STR	Alelos incluídos na escada alélica	Haplótipo
DXS8378	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
DXS10135	12.1, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37.2, 39.2	Xp22 (1)
DXS10148	13.3, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22.1, 23.1, 24.1, 25.1, 26.1, 27.1, 28.1, 29.1, 30.1, 31, 33.1, 38.1	
DXS7132	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	
DXS10074	4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 16.2, 17, 18, 19, 20, 21	Xp11 (2)
DXS10079	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27	
HPRTB	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	
DXS10101	21, 24, 24.2, 25, 25.2, 26, 26.2, 27, 27.2, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 36	Xq26 (3)
DXS10103	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22	
DXS7423	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	
DXS10134	28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 38.3, 39.3, 40.3, 41.3, 42.3, 43.3, 44.3	Xq28 (4)
DXS10146	21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35.2, 39.2, 40.2, 41.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2	

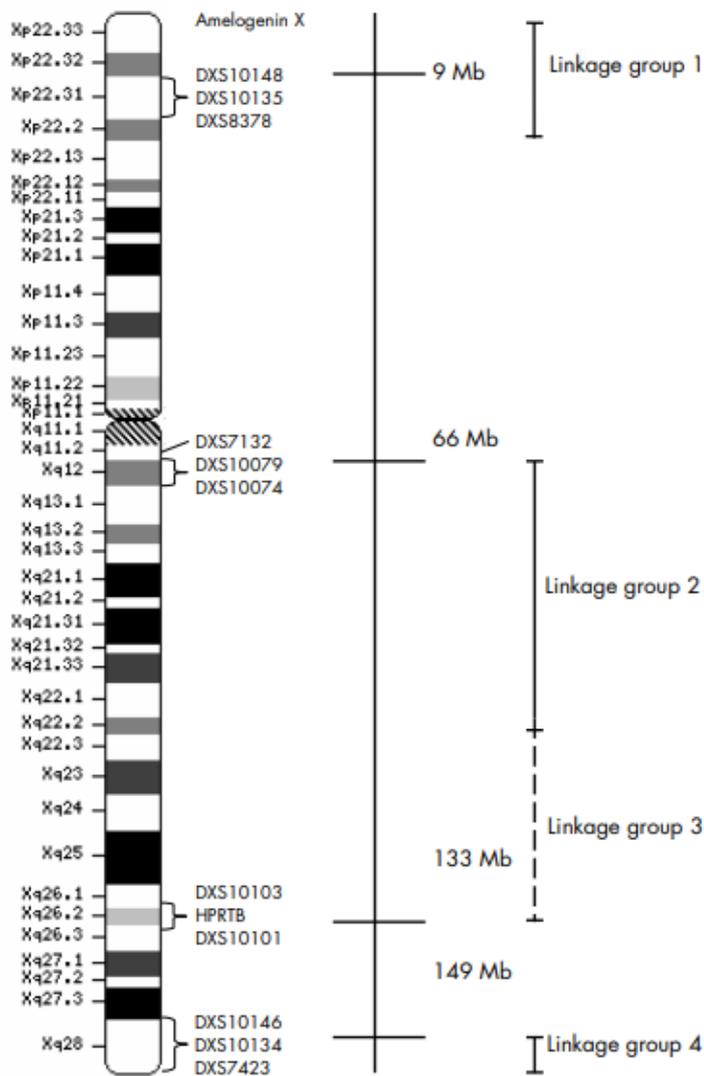


Figura 2: Ideograma do Cromossomo X demonstrando a localização dos 4 grupos de ligação analisadas.

Fonte: Investigator Argus X-12 – Handbook (Qiagen, 2015).

5.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

As regiões do cromossomo X analisadas neste estudo foram amplificadas por PCR em um termociclador Veriti® da marca *Applied Biosystems*, utilizando-se o kit de amplificação de marcadores de X-STR *Investigator Argus X-12 QS* (QIAGEN).

A reação de PCR foi realizada a partir de adaptação da metodologia descrita pelo fabricante. Foi utilizado um volume de reação correspondente a um quinto do volume 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, fornecido pelo próprio kit.

5.4.3. Eletroforese Capilar

Após a reação de PCR, os *amplicons* foram preparados para a eletroforese capilar em uma microplaca 96 poços contendo um mix de 12 µl Hi-Di Formamida + 0,5 µl DNA *Size Standard* 550 (BTO) em cada poço com 1 µl de produto de PCR ou *Ladder*.

A eletroforese capilar foi realizada no analisador genético *ABI PRISM® 3500* (*Thermo Fisher Scientific*) com polímero POP-4™, seguindo os parâmetros do fabricante.

5.4.4. Análise e Interpretação dos resultados

Os fragmentos amplificados foram analisados em conjunto por haplótipo, utilizando o software *GeneMapper® ID-X v 1.4* (*Applied Biosystems*).

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) seguindo o protocolo do fabricante que indica o uso entre 50-200 RFU.

Artefatos de corrida, *Off ladders*, *pull ups* e *spikes* foram removidos mecanicamente após análise criteriosa.

5.4.5. Análise estatística

Parâmetros de frequência e diversidade haplotípicas, distâncias genéticas (F_{ST}), análise de variância molecular (AMOVA), heterozigosidade estimados e desequilíbrio de ligação foram analisados por meio do programa *Arlequin* v 3.5.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010).

Parâmetros forenses como poder de discriminação feminina (PD_F) e masculina (PD_M), Chance Média de Exclusão (MEC), conteúdo de informação do polimorfismo foram calculados com o site *ChrX-STR.org*.

É importante destacar que o teste de aderência ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, não pôde ser testado pela população amostral ser totalmente composta por homens, portanto há sempre apenas um alelo para cada marcador por possuírem somente um cromossomo X.

5.5. SUBMISSÃO AO BANCO DE DADOS

O banco de dados *ChrX-STR.org 2.0* tem como objetivo fornecer um banco de dados de haplótipos *ChrX-STRs* através de dados populacionais publicados de vários países.

Os dados disponíveis no banco de dados, são apenas dados publicados em periódicos científicos revisados por pares pelos quais os respectivos autores são responsáveis.

Marcadores intimamente ligados mostram regularmente um desequilíbrio de ligação. Portanto, as frequências dos haplótipos não podem ser calculadas pela multiplicação das frequências dos alelos envolvidos no haplótipo, mas devem ser determinadas por estudos populacionais.

Para esse fim, o banco de dados *ChrX-STR.org 2.0* apresenta frequências de haplótipos de várias populações para clusters STR selecionados.

Após análise estatística e submissão para publicação, as frequências haplotípicas encontradas aqui, foram submetidas ao banco de dados.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. PADRONIZAÇÃO DO KIT ARGUS X-12

Foi realizada uma padronização específica para a diminuição da quantidade de reagente, mas mantendo sempre a proporção e concentração recomendada pelo fabricante.

Os valores utilizados e os recomendados pelo fabricante estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Protocolo adaptado da análise de PCR

Reagente	Protocolo do fabricante	Protocolo adaptado
	Volume	Volume
<i>Fast Reaction Mix 2.0</i>	7,5 µl	2,0 µl
<i>Primer Mix</i>	2,5 µl	0,5 µl
<i>Nuclease-free water</i>	Variável	Variável
<i>Template DNA</i>	0,2-2 ng	0,2-2 ng
Volume final	25 µl	5 µl

Antes de seguir com o processamento de um grande número de amostras, foi realizado o teste com o controle positivo, *ladder* e cerca de 20 amostras para confirmar a eficiência mesmo com o volume reduzido.

Como mostrado nas figuras 3, 4 e 5 as ampliações do controle positivo (*Control DNA 9947A* proveniente do kit), os *ladders* e a amostra teste F176 respectivamente, tiveram a amplificação com qualidade satisfatória, indicado pela letra “Q” no início do eletroferograma, que é um controle de qualidade presente no próprio kit, e com isso, seguiram-se as análises.

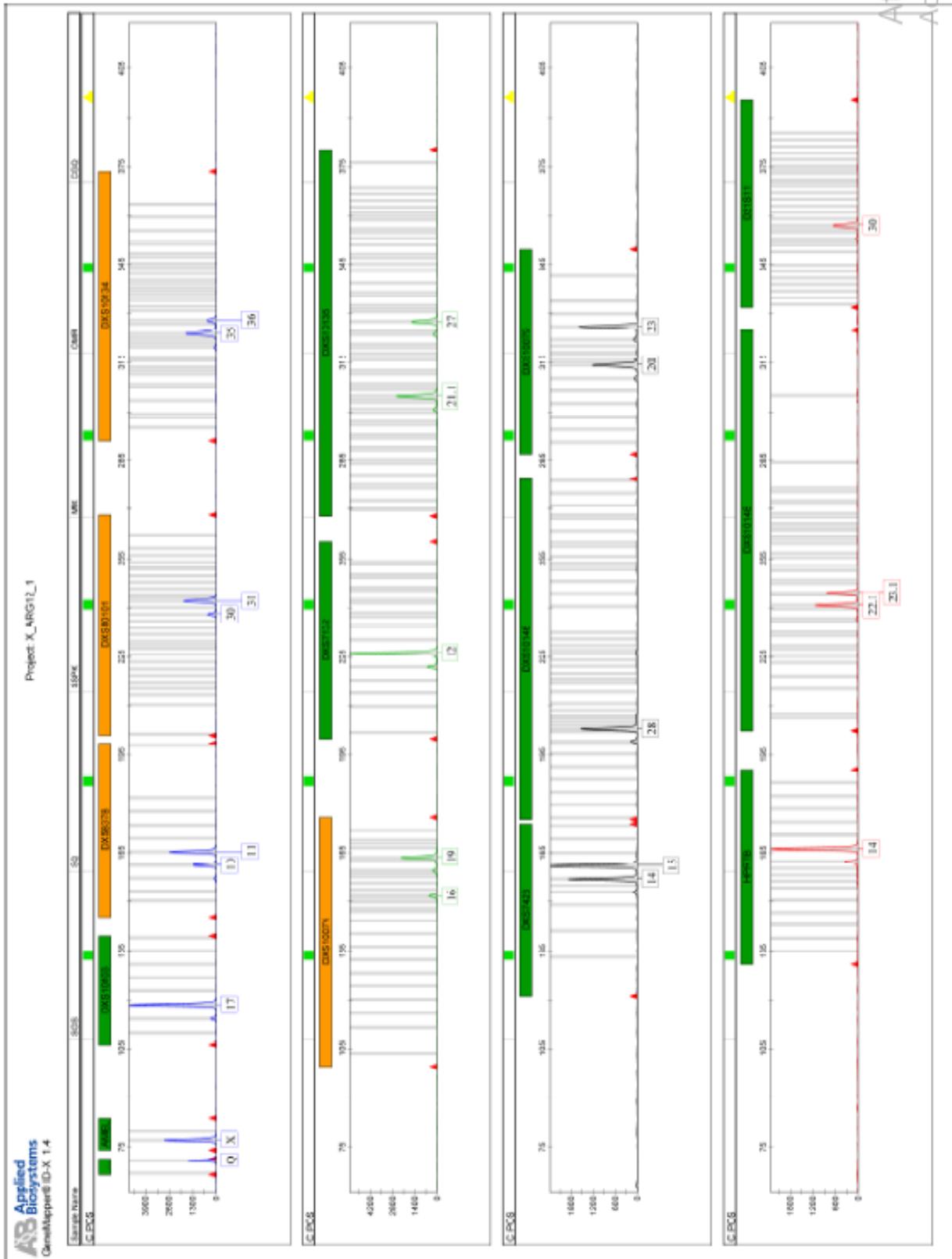




Figura 4: Eletroferograma do ladder.



Figura 5: Eletroferograma da amostra F176

6.2. VARIABILIDADE GENÉTICA NA POPULAÇÃO DO ES

Para as análises estatísticas algumas amostras tiveram que ser excluídas devido sua baixa qualidade após a análise dos eletroferogramas (baixa concentração de DNA \leq 0,2ng). Do total de 571 amostras analisadas, 51 foram descartadas restando um total de 520.

Para alguns testes específicos, a população analisada foi dividida em 5 grupos, correspondendo as 4 macrorregiões do estado (Norte, Sul, Central e Metropolitana) mais um grupo que corresponde a população pomerana.

Imigrantes da antiga região da Pomerânia, vieram para o Espírito Santo durante o século XIX e formaram uma das maiores comunidades de descendentes de pomeranos do Brasil e do mundo. Essa população preserva diversos aspectos tradicionais de sua cultura, sendo uma população mais fechada, possivelmente com a genética também preservada, por isso a importância de estudá-los como um grupo a parte.

6.2.1. Frequência Alélica

A frequência alélica foi calculada através do programa *Arlequin 3.5.2* e está descrita na tabela 6. A população estudada apresentou 105 alelos diferentes considerando todos os 12 marcadores. O alelo de maior e menor frequência dentro de cada marcador está demonstrado em verde (maior) e vermelho (menor) na tabela 5.

Tabela 5: Frequência alélica dos marcadores x-STRs do kit investigador argus x-12, organizados segundo seu grupo de ligação.

	LG1			LG2			LG3		LG4			
ALELO	DXS8378	DXS10135	DXS10148	DXS10074	DXS7132	DXS10079	DXS10103	DXS10101	HPRTB	DXS10134	DXS7423	DXS10146
7				0.059615					0.001923			
8	0.001923			0.105769							0.001923	
9	0.013462			0.003846					0.013462			
10	0.365385			0.003846	0.001923				0.013462			
11	0.288462			0.005769	0.011538				0.126923			
12	0.288462			0.017308	0.094231				0.265385			
12.1									0.001923			
12.2	0.001923											
13	0.040385			0.038462	0.282692	0.005769			0.328846		0.080769	
13.3			0.019231									
14	0.040385			0.048077	0.307692	0.019231			0.175000		0.346154	
14.1					0.001923							
15		0.003846		0.098077	0.209615	0.021154	0.009615		0.063462		0.384615	
15.1											0.001923	
15.2				0.001923								
15.3					0.003846							
16		0.005769	0.001923	0.221154	0.057692	0.019231	0.113462		0.007692		0.150000	
16.2				0.001923								
16.3					0.025000							
17		0.023077	0.011538	0.184615	0.001923	0.044231	0.113462		0.001923		0.034615	
17.1		0.009615	0.001923									
17.2				0.001923								
17.3				0.001923								
18		0.038462	0.157692	0.148077		0.136538	0.205769					
18.1		0.009615		0.001923								
18.3					0.001923							
19		0.048077	0.034615	0.046154		0.238462	0.411538					
19.1		0.026923										
20		0.075000	0.015385	0.009615		0.275000	0.121154					
20.1		0.023077	0.003846									
21		0.103846	0.001923			0.155769	0.025000					
21.1		0.030769	0.011538									
22		0.073077	0.001923			0.076923						
22.1		0.023077	0.013462									
22.2		0.001923										
22.3			0.001923									
23		0.082692	0.028846			0.005769						0.005769
23.1		0.003846	0.046154									
24		0.057692	0.026923			0.001923						0.015385
24.1		0.003846	0.086538									
24.2								0.011538				

25	0.067308	0.015385			0.053846
25.1	0.003846	0.150000			
26	0.065385	0.003846	0.001923		0.071154
26.1		0.146154			
26.2			0.005769		
27	0.053846	0.005769			0.113462
27.1		0.073077			
27.2		0.005769	0.030769		
27.3					0.003846
28	0.044231		0.053846	0.001923	0.144231
28.1		0.042308			0.001923
28.2		0.003846	0.088462		
29	0.040385	0.003846	0.050000	0.001923	0.159615
29.1		0.023077			
29.2			0.103846		
30	0.038462	0.005769	0.073077	0.017308	0.094231
30.1		0.015385			
30.2			0.130769		0.001923
31	0.011538	0.005769	0.111538	0.011538	0.050000
31.1		0.003846			
31.2			0.100000		
32	0.017308	0.003846	0.119231	0.013462	0.015385
32.1				0.001923	
32.2			0.023077		
33	0.005769		0.057692	0.050000	0.011538
33.2			0.009615		
34			0.017308	0.107692	0.005769
34.1	0.001923			0.001923	
34.2			0.001923	0.001923	0.009615
35			0.007692	0.169231	
35.1				0.001923	
35.2					0.003846
36			0.001923	0.213462	
36.2	0.001923			0.003846	0.015385
37				0.165385	
37.2				0.001923	0.003846
37.3				0.009615	
38				0.073077	
38.1				0.001923	
38.2				0.001923	0.019231
38.3				0.011538	
39		0.001923		0.036538	
39.1		0.001923			
39.2				0.001923	0.025000
39.3				0.021154	
40				0.003846	

40.1	0.009615		
40.2			0.036538
40.3		0.028846	
41.1	0.005769		
41.2			0.032692
41.3		0.032692	
42.1	0.005769		
42.2			0.013462
42.3		0.005769	
43.1	0.001923		
43.2			0.038462
43.3		0.003846	
44.2			0.021154
44.3			0.001923
45.2			0.017308
45.3		0.001923	
46.2			0.009615
47.2			0.003846

Em verde destacando os alelos de maiores frequências entre cada marcador, e em vermelho o de menor frequência.

Fazendo um comparativo entre a frequência alélica do ES com a frequência dos mesmos marcadores mas para outras populações, como a de São Paulo (SP) estudada por Januário (2021) com 423 indivíduos, a mexicana (MEX) analisada por Cortes-Trujillo *et al.*, (2019) com número amostral de 933 homens, alemã (ALE) com 700 homens analisados por Hering *et al.*, (2020) a população argentina (ARG) representada por 457 homens no trabalho de Garcia *et al.*, (2019), 514 indivíduos homens chineses (CHI) do trabalho de Xing *et al.*, (2019), 79 homens da população italiana (ITA), estudada por Inturri *et al.* (2011), 652 homens da Suécia (SUE) no trabalho de Ferragut *et al.*, (2015), Rebala *et al.* (2015) quando analisou 360 homens da Belarus (BEL), e finalmente 116 homens da Espanha (ESP) e 111 homens de Portugal (POR) analisados por Pinto (2012), através das observações desses estudos, nota-se que não há grande diferença numérica entre a quantidade de alelos diferentes em cada marcador por população, assim como a quantidade total de alelos por LG, como observado na tabela 6.

Os marcadores com a menor diversidade alélica são o DXS10103 (LG3) e DXS7423 (LG4) com apenas 7 alelos, enquanto o DXS10148 (LG1) possui 45 alelos diferentes (tabela 6).

Tabela 6: Frequência de alelos diferentes em populações.

Números de alelos diferentes											
	ES	SP	MEX	ALE	ARG	CHI	ITA	SUE	BEL	ESP	POR
Grupo de Ligação 1											
DXS8378	8	6	8	7	6	6	5	6	5	5	4
DXS10135	31	29	32	31	33	23	19	30	28	25	18
DXS10148	45	36	23	29	23	22	13	22	18	15	14
TOTAL	84	71	63	67	62	51	37	58	51	45	51
Grupo de Ligação 2											
DXS10074	19	15	19	21	17	8	11	16	12	10	8
DXS7132	12	11	7	11	13	7	6	9	7	6	5
DXS10079	12	11	11	16	12	10	10	13	9	10	8
TOTAL	43	37	37	48	42	25	27	38	28	26	21
Grupo de Ligação 3											
DXS10103	7	7	8	7	8	7	7	7	7	7	7
DXS10101	20	19	20	25	20	18	13	20	19	17	13
HPRTB	11	9	9	9	9	7	6	8	10	7	6
TOTAL	38	35	37	41	37	32	26	35	36	31	26
Grupo de Ligação 4											
DXS10134	30	22	22	33	30	15	15	24	23	20	14
DXS7423	7	6	5	9	9	5	6	5	5	6	4
DXS10146	30	30	27	29	25	16	17	25	21	21	14
TOTAL	67	58	54	71	64	36	38	54	49	47	32

Em verde os grupos de ligação com a maior quantidade de alelos e em vermelho com a menor quantidade.

ES = Espírito Santo, SP = São Paulo, MEX = México, ALE = Alemanha, ARG = Argentina, CHI = China, ITA = Itália, SUE = Suécia, BEL = Belarus, ESP = Espanha, POR = Portugal.

O LG1 foi o grupo de ligação mais polimórfico nas populações do ES, SP, MEX, CHI, SUE, BEL e POR, enquanto nas populações ALE, ARG, ITA e ESP o grupo com mais variantes foi o LG4.

O grupo de ligação 3 é o que possui menor variabilidade alélica para a maioria das populações (ES, SP, MEX, ALE, ARG, ITA e SUE), nas outras populações analisadas o grupo de ligação 2 é o menos variável, como demonstrado na tabela 6.

Há também semelhança entre quais alelos são os mais frequentes nas populações comparadas. Como observado nas tabelas 7 e 8, os alelos mais e menos frequentes nas diferentes populações muitas vezes coincidem, como é o caso do alelo 15 do marcador DXS7423 (LG4) que é o mais frequente em todas as populações.

Tabela 7: Alelos mais frequentes em diferentes populações.

MAIOR FREQUÊNCIA										
	ES	MEX	ALE	ARG	CHI	ITA	SUE	BEL	ESP	POR
GRUPO LIGAÇÃO 1										
DXS8378	10	10	10	10	10	11	11	11	11	11
DXS10135	21	21	22	21,22	22	21	25	24	22	28
DXS10148	18	18	25.1	18	25.1	25.1	25.1	25.1	26.1	27.1
GRUPO LIGAÇÃO 2										
DXS10074	16	17	17	17	17	17	17	17	17	18
DXS7132	14	14	14	14	14	14	14	14	14	13
DXS10079	20	20	19	20	20	20	20	20	19, 20	20
GRUPO LIGAÇÃO 3										
DXS10103	19	16	19	16	19	19	19	19	19	19
DXS10101	30.2	32	30.2	32	31	31	30.2	30.2	30.2	30.2
HPRTB	13	13	12	13	13	12	12	12	12	12
GRUPO LIGAÇÃO 4										
DXS10134	36	35	36	35	36	35	36	36	36	35
DXS7423	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
DXS10146	29	29	29	28	28	28	29	28	29	29

População de SP não foi analisada por não possuir esses dados para comparação.

Tabela 8: Alelos menos frequentes em diferentes populações.

MENOR FREQUÊNCIA										
	ES	MEX	ALE	ARG	CHI	ITA	SUE	BEL	ESP	POR
GRUPO LIGAÇÃO 1										
DXS8378	12.2, 8	15	8, 14	14	14	9	14	9	9	13
DXS10135	22.2, 34.1, 36.2	17.1, 34, 35, 36	15, 36, 37	14, 35, 38	33,17.1, 19.1, 23.2	19.1, 22.1, 16, 33	34, 35, 16.1,22.3, 33.2,24.1	20.3, 24.1, 24.3,	19, 17.1, 20.1, 25.1, 32.1	19,21, 26, 27, 23.1
DXS10148	16, 17.1, 22, 22.3	26, 28, 28.2, 29	16.1, 20.1	16.1,2 0.1	31, 26.2, 27.2	19, 20, 30.1	31, 17,32, 13.3,31.2	22,13.3, 20.1, 21.2	13.3, 32.1	28, 22.1, 29.1
GRUPO LIGAÇÃO 2										
DXS10074	16.2, 17.3, 18.1	10, 16.1, 33, 37	10, 16.2, 21	10	14	10, 15.2, 14, 20	12, 21, 15.2, 16.2, 18.2	11	7, 9, 20, 21	19/
DXS7132	10, 14.1, 18.3	19	11	18	11	11	13.3, 14.3	11	11	16
DXS10079	24	24, 30, 31	24	24, 27	15, 24	19.1, 21.3, 17, 22, 23	24	15	23, 18.2	16
GRUPO LIGAÇÃO 3										
DXS10103	15	21	22	22	21	19.2,21	15	15	15	21
DXS10101	26, 34.2, 36	26, 34.2, 36	24,36	25.2	26	29, 34	28.3	24.2, 39.2	27, 34, 26.2, 33.2	30, 33, 33.2
HPRTB	7, 12.1, 17	9, 17	8	8	17	10	9	11.2	10	8, 16
GRUPO LIGAÇÃO 4										
DXS10134	28, 29, 32.1, 34.1	28, 29, 32.1, 34.1	33.2, 37.2, 47.1	28, 29, 31.1, 34.1	39.3	28.1, 37.3, 38.1, 39.3, 42.3, 44.3, 30,	30, 40, 36.1, 39.2, 44.3	29, 30, 31, 36.1, 37.2, 38.2, 42.3, 43.3	30, 31, 32, 39, 35.3, 36.2, 37.2, 45.3	32, 33, 39, 37.3, 43.3
DXS7423	8, 12, 15.1	10, 19	17	24,25, 26	17	12	17	17	12	13
DXS10146	28.1, 30.2, 44.3	27.3, 29.1, 33.2, 34	31.2, 32.2, 48.2	28.1, 37.2,4 6.2	45.2	26.1, 29.2, 41.2, 43.2, 47.2,	22,31.2,32 .2,37.2, 47.2	32, 24.2, 31.2, 32.2, 38.2, 45.2	35.2, 36.2, 43.2, 45.2, 47.2	25, 38.2, 44.2, 45.2

População de SP não foi analisada por não possuir esses dados para comparação.

6.2.2. Frequência haplotípica

Os marcadores dos 12 X-STRs do kit *argus* são agrupados em 4 grupos de ligação (*Linkage group*): LG1, LG2, LG3 e LG4 como mostrados na tabela 9.

Tabela 9: Grupos de ligação dos haplótipos

Grupos de ligação	Haplótipos
LG1	DXS8378, DXS10135, DXS10148
LG2	DXS10074, DXS7132, DXS10079
LG3	DXS10103, DXS10101, HPRTB
LG4	DXS10134, DXS7423, DXS10146

Em relação às análises de frequência haplotípica dos marcadores X-STRs estudados na população do ES, o grupo de ligação com mais diversidade haplotípica foi o LG1 com 363 haplótipos diferentes, e o LG3 apresentou ser menos polimórfico (199) (Tabela 10).

Tabela 10: Frequência haplotípica dos marcadores X-STRs do kit Investigator Argus X-12, organizados segundo seu grupo de ligação.

LG1				LG2				LG3				LG4			
Haplótipo		Frequência		Haplótipo		Frequência		Haplótipo		Frequência		Haplótipo		Frequência	
11	28	23.1	0.0038	19	7	13	0.0058	11	20	29.2	0.0058	13	25	37	0.0058
10	24	27.2	0.0019	21	17	13	0.0058	13	17	30	0.0058	14	26	36	0.0038
10	27	18	0.0038	18	15	15	0.0019	12	18	26.2	0.0019	14	27	36	0.0250
10	19.1	18	0.0038	20	8	13	0.0096	14	20	28.2	0.0038	14	31	36	0.0096
12	19.1	13.3	0.0058	21	8	14	0.0058	13	16	34	0.0019	15	29	36	0.0212
10	20	18	0.0058	20	7	12	0.0038	12	19	28	0.0250	14	40.2	36	0.0019
10	26	28.1	0.0038	21	15	15	0.0019	11	18	30.2	0.0058	15	30	35	0.0077
12	21	21.1	0.0019	19	16	14	0.0154	11	19	29.2	0.0231	14	46.2	34	0.0019
12	17.1	24	0.0019	19	17	13	0.0135	13	18	32.2	0.0058	14	40.2	41.3	0.0019
10	18	24	0.0019	14	17	14	0.0019	9	19	33	0.0038	14	29	35	0.0135
11	22	32	0.0019	21	7	14	0.0038	12	20	28	0.0115	16	29	35	0.0058
11	20.1	27.1	0.0019	20	18	14	0.0192	11	19	30.2	0.0212	15	28	38	0.0115
10	27	26.1	0.0077	20	16	13	0.0173	14	17	30	0.0038	14	28	34	0.0038
11	24	25.1	0.0019	21	18	14	0.0077	12	19	30.2	0.0269	15	42.2	42.3	0.0038
10	28	25	0.0019	20	17	13	0.0212	12	19	31.2	0.0038	14	27	39	0.0038
10	22.1	24.1	0.0038	20	17	12	0.0019	13	18	27.2	0.0019	14	39.2	39.3	0.0038
12	24	28.1	0.0019	20	16	15	0.0038	13	19	29	0.0212	16	40.2	36	0.0019

10	19	18	0.0058	21	18	15.3	0.0019	14	20	30.2	0.0019	15	28	34	0.0096
11	28	25.1	0.0038	16	18	13	0.0038	13	19	28.2	0.0135	14	41.2	35	0.0038
10	25	24.1	0.0077	20	18	16	0.0019	14	20	31.2	0.0077	16	28	34	0.0038
12	18	26.1	0.0019	21	12	15	0.0019	12	20	31.2	0.0096	16	29	37	0.0038
10	24	26.1	0.0058	18	18	14	0.0019	12	20	29	0.0038	16	43.2	37	0.0058
10	18	26.1	0.0058	19	17	14	0.0096	14	17	31	0.0173	15	25	38	0.0019
12	23	19	0.0019	18	18	15	0.0038	14	19	34.2	0.0019	15	31	37	0.0038
10	22	19	0.0019	20	13	15	0.0058	12	20	29.2	0.0058	14	29	33	0.0096
12	34.1	20	0.0019	21	14	13	0.0038	14	20	24.2	0.0019	15	29	35	0.0115
12	17.1	26.1	0.0019	18	7	14	0.0058	13	20	28.2	0.0077	13	40.2	36	0.0019
11	32	18	0.0019	18	8	13	0.0096	12	18	30.2	0.0058	15	36.2	36	0.0038
10	29	22.1	0.0019	17	18	16	0.0019	13	16	31	0.0135	15	23	36	0.0019
11	27	18	0.0058	18	15	14	0.0077	14	16	32	0.0058	15	27	36	0.0077
10	22	26.1	0.0077	19	8	15	0.0077	13	18	29	0.0019	14	45.2	40.3	0.0019
12	19	25.1	0.0058	16	8	12	0.0019	12	17	32	0.0058	14	27	38	0.0096
12	17	19	0.0019	20	16	14	0.0250	13	17	32	0.0115	14	44.2	38.3	0.0019
11	21	28.1	0.0038	17	19	14	0.0058	13	19	32	0.0115	15	24	38	0.0019
12	32	27.1	0.0019	20	14	15	0.0058	13	19	31.2	0.0173	13	25	32.1	0.0019
11	19.1	42.1	0.0019	20	15	14	0.0058	13	20	30.2	0.0096	15	41.2	41.3	0.0019
10	24	25.1	0.0038	19	15	14	0.0077	12	21	30.2	0.0058	16	30	38.2	0.0019
12	24	23	0.0058	17	7	14.1	0.0019	13	17	31	0.0154	15	29	36.2	0.0019
11	21	32	0.0019	22	14	14	0.0019	12	19	29.2	0.0250	15	28	39	0.0038
11	20	22.3	0.0019	18	20	15	0.0019	14	18	31.2	0.0115	15	26	34	0.0019
10	22	25.1	0.0058	20	15	13	0.0096	14	19	31.2	0.0096	13	34	36	0.0019
12	22.1	27.1	0.0019	19	16	13	0.0173	7	17	32	0.0019	15	28	37	0.0115
10	21	24.1	0.0058	19	16	17	0.0019	13	19	24.2	0.0038	14	31	39.3	0.0019
10	20	27.1	0.0019	18	8	12	0.0058	12	19	33	0.0038	15	31	36	0.0038
10	23	20.1	0.0019	22	17	16	0.0038	12	16	28.2	0.0077	15	25	35	0.0038
11	23	23	0.0038	18	18	16	0.0019	13	19	30	0.0077	14	28	40.3	0.0019
11	29	25.1	0.0058	19	7	14	0.0058	13	19	30.2	0.0135	14	31	35	0.0038
11	17	18	0.0019	20	13	14	0.0077	13	17	31.2	0.0019	16	46.2	37	0.0019
12	21.1	18	0.0058	14	18	11	0.0019	12	18	27.2	0.0038	15	30.2	34	0.0019
10	25	27.1	0.0019	19	14	15	0.0058	11	17	33	0.0019	15	25	36	0.0077
11	22	18	0.0058	17	15	12	0.0019	13	20	32	0.0019	14	29	38	0.0038
10	23	23.1	0.0058	18	17	13	0.0038	12	19	29	0.0058	14	29	36	0.0058
12	25	19	0.0038	15	17	14	0.0019	11	19	28.2	0.0115	15	30	34	0.0038
11	20	18	0.0019	13	16	14	0.0019	13	18	32	0.0135	13	28	35	0.0019
12	20	29.1	0.0038	17	15	16	0.0019	14	16	34	0.0038	14	45.2	36	0.0019
10	23	24.1	0.0077	18	8	15	0.0058	13	16	28.2	0.0038	13	26	35	0.0019
11	26	19	0.0019	18	16	13	0.0096	12	19	28.2	0.0115	16	39.2	39	0.0019
10	21	18	0.0058	21	17	14	0.0077	11	20	30.2	0.0019	13	43.2	39	0.0019
10	30	25.1	0.0058	20	19	13	0.0019	13	20	31.2	0.0077	14	29	41.3	0.0019
11	26	29.1	0.0019	19	15	16	0.0019	12	16	31	0.0019	16	41.2	35	0.0058
11	22	27.1	0.0038	18	17	15	0.0096	15	16	31	0.0038	15	29	33	0.0019
11	24	23	0.0019	20	17	15	0.0038	14	17	32	0.0058	14	28	35	0.0135
9	23	28.1	0.0019	22	17	13	0.0019	14	19	29	0.0077	14	30	34	0.0038

10	20	28.1	0.0019	22	16	13	0.0058	12	19	32.2	0.0077	16	45.2	40.3	0.0019
11	23	24.1	0.0058	18	20	13	0.0019	13	16	33	0.0135	14	40.2	35	0.0019
12	19	26.1	0.0019	21	16	12	0.0058	15	16	32.2	0.0019	14	33	35	0.0019
10	21	28.1	0.0019	21	13	15	0.0019	12	21	28.2	0.0019	16	26	34	0.0058
10	21	24	0.0077	21	18	16.3	0.0038	10	21	31.2	0.0019	16	31	37	0.0019
12	21	29.1	0.0019	22	18	13	0.0058	14	20	32	0.0038	17	26	40.3	0.0019
11	21.1	24.1	0.0019	13	15	13	0.0019	13	19	33.2	0.0058	17	43.2	36	0.0019
12	18	18	0.0038	20	7	15	0.0058	13	19	31	0.0038	15	26	38.1	0.0019
12	22	18	0.0038	19	15	13	0.0077	14	18	31	0.0038	13	46.2	37	0.0019
12	19	19	0.0019	19	17.3	13	0.0019	11	16	33	0.0019	15	27	41.3	0.0019
10	23	28.1	0.0058	18	9	13	0.0019	15	16	32	0.0077	16	28	37	0.0038
10	22	22.1	0.0019	21	15	13	0.0096	12	16	33	0.0038	15	29	34.1	0.0019
10	30	25	0.0038	22	17	15	0.0019	15	17	32	0.0058	16	33	30	0.0038
10	20	24.1	0.0038	15	17	13	0.0038	13	19	29.2	0.0096	15	34.2	37	0.0019
12	18	28.1	0.0038	19	8	13	0.0077	13	21	31.2	0.0019	15	30	43.3	0.0019
12	21	22.1	0.0038	21	17	15	0.0115	14	19	30.2	0.0096	15	24	37	0.0019
11	30	26.1	0.0019	21	17	12	0.0019	15	18	30	0.0038	17	29	33	0.0019
12	24	26.1	0.0038	19	17	15	0.0154	14	17	29	0.0019	15	27	34	0.0096
10	24.1	43.1	0.0019	21	16	13	0.0096	11	18	29.2	0.0077	16	26	33	0.0019
10	27	23.1	0.0019	21	14	14	0.0038	12	18	30	0.0038	16	45.2	38	0.0019
11	20	25.1	0.0077	20	16	11	0.0019	14	19	31	0.0096	14	28	33	0.0058
12	29	23.1	0.0019	18	18	13	0.0077	11	19	27.2	0.0038	13	27	35	0.0038
10	26	19	0.0019	19	12	13	0.0077	14	19	30	0.0058	14	27	35	0.0077
11	23	23.1	0.0019	21	16	16.3	0.0038	14	19	33.2	0.0038	15	47.2	37	0.0019
12	26	26.1	0.0096	20	19	14	0.0058	13	18	30	0.0154	15	26	36	0.0058
11	23	19	0.0019	19	18	16.3	0.0019	15	20	31.2	0.0038	16	30	34	0.0038
11	19	27.1	0.0019	17	7	13	0.0038	12	18	28.2	0.0058	16	26	35	0.0038
10	26	25.1	0.0038	18	16	14	0.0115	15	17	31	0.0038	16	44.2	34	0.0019
12	24	20	0.0019	19	18	12	0.0058	12	20	27.2	0.0019	13	32	39	0.0019
10	19.1	23.1	0.0019	16	16	16	0.0019	11	19	33	0.0058	13	29	35	0.0038
10	28	21	0.0019	22	14	13	0.0019	12	19	26.2	0.0019	14	27	37	0.0058
12	34	18	0.0019	19	17	12	0.0096	11	18	27.2	0.0038	14	26	39	0.0019
11	25	24	0.0019	22	7	15	0.0019	10	19	30.2	0.0019	14	24	28	0.0019
10	28	23.1	0.0019	22	17	14	0.0077	13	19	34	0.0019	15	40.2	37	0.0019
10	26	21.1	0.0019	18	16	15	0.0038	121	19	28	0.0019	14	29	32	0.0038
10	22.1	28.1	0.0019	19	15	15	0.0019	12	17	26.2	0.0019	16	40.2	41.3	0.0058
11	29	20	0.0019	19	17	16	0.0019	13	18	31	0.0058	15	27	37	0.0077
11	26	18	0.0058	22	8	15	0.0038	14	19	28	0.0038	15	39.2	36	0.0019
11	31	27.1	0.0019	20	17	10	0.0019	14	18	30	0.0058	15	41.2	39.3	0.0019
10	19	23.1	0.0038	21	18	13	0.0038	15	19	30.2	0.0058	15	26	37	0.0115
11	26	27.1	0.0019	14	16	16.3	0.0038	12	21	29.2	0.0019	14	30	36	0.0077
10	26	26.1	0.0019	22	16	14	0.0096	13	16	32	0.0058	15	33	31	0.0019
12	25	18	0.0058	14	17	15	0.0019	13	20	29.2	0.0115	15	31	35	0.0038
12	29	24.1	0.0038	17	14	13	0.0019	16	17	31	0.0019	14	28	41.3	0.0019
12	20	30	0.0038	19	18.1	16.3	0.0019	12	19	24.2	0.0038	14	29	37	0.0077
13	21	26.1	0.0019	21	16	15	0.0077	14	15	33	0.0038	15	40.2	34	0.0058

11	23	26.1	0.0019	16	16	14	0.0038	17	18	31	0.0019	16	36.2	31	0.0019
9	20	25.1	0.0019	19	8	12	0.0077	14	16	31	0.0019	15	32	37	0.0019
12	17	18	0.0019	20	8	15	0.0115	13	20	27.2	0.0019	13	37.2	38	0.0019
10	25	23.1	0.0019	21	16	14	0.0115	13	19	27.2	0.0038	14	31	34	0.0019
10	21	29.1	0.0038	20	18	13	0.0115	15	17	35	0.0019	14	30	30	0.0077
12	26	23.1	0.0019	20	7	13	0.0058	13	17	28.2	0.0019	15.1	45.2	34	0.0019
12	28	18	0.0019	17	16	15	0.0038	13	20	30	0.0019	15	29	34	0.0038
11	24	26.1	0.0038	14	19	14	0.0019	15	18	32	0.0019	14	26	35	0.0038
12	20	25.1	0.0038	19	16	15	0.0115	12	18	31	0.0038	16	29	34	0.0038
11	22.1	25.1	0.0019	20	20	14	0.0019	13	16	29.2	0.0019	14	30	33	0.0038
12	30	27.1	0.0019	21	18	16	0.0019	11	18	31.2	0.0019	14	43.2	36	0.0019
10	23	26.1	0.0077	17	8	13	0.0019	14	16	35	0.0038	15	31	33	0.0019
13	18	26.1	0.0038	18	8	14	0.0058	13	20	31	0.0038	16	38.2	30	0.0019
10	23	30.1	0.0019	19	18	14	0.0154	9	18	30.2	0.0058	13	29	39	0.0019
10	25	25.1	0.0019	22	15	16	0.0019	15	16	34	0.0019	15	28	36	0.0096
10	24	23.1	0.0019	15	18	15	0.0038	10	16	28	0.0019	14	28	36	0.0135
9	25	25.1	0.0019	15	8	14	0.0019	12	18	31.2	0.0096	14	28	38.3	0.0019
11	29	18	0.0058	18	15	13	0.0038	14	17	33	0.0019	17	44.2	35	0.0019
12	17	25.1	0.0058	13	15	15	0.0019	16	19	30	0.0019	15	36.2	37.3	0.0019
11	30	25.1	0.0038	19	7	15	0.0038	12	17	31.2	0.0038	17	25	37	0.0019
10	18.1	29	0.0019	16	17	14	0.0058	10	18	31	0.0019	16	30	35	0.0019
12	17.1	27.1	0.0019	17	17	12	0.0019	13	19	33	0.0038	16	24	37	0.0019
10	21	20	0.0019	17	8	14	0.0038	12	20	34	0.0019	15	34.2	39	0.0019
12	21	26.1	0.0058	14	15	15	0.0019	14	19	32	0.0058	16	43.2	33	0.0019
12	27	39.1	0.0019	18	19	14	0.0019	12	19	30	0.0038	14	30	35	0.0038
12	18	27.1	0.0019	21	13	13	0.0019	12	16	30.2	0.0038	14	45.2	34	0.0019
12	24	23.1	0.0019	20	10	13	0.0019	12	18	29.2	0.0058	15	38.2	36	0.0038
13	20	26.1	0.0019	21	13	12	0.0019	11	18	33	0.0038	16	44.2	37	0.0019
11	34	19	0.0019	20	19	15	0.0077	11	18	28.2	0.0115	15	30	36	0.0038
12	20.1	18	0.0019	18	16	12	0.0077	13	19	28	0.0058	15	30	32	0.0038
12	25	25.1	0.0038	21	20	13	0.0019	14	18	36	0.0019	14	30	37	0.0058
12	27	26.1	0.0038	17	18	12	0.0019	14	20	29.2	0.0019	14	34.2	36	0.0019
11	20.1	18	0.0019	19	19	15.3	0.0019	15	15	31	0.0019	15	44.2	37	0.0019
10	30	18	0.0038	21	19	13	0.0019	13	16	30.2	0.0019	16	27	35	0.0058
12	17	31	0.0019	19	20	12	0.0019	15	18	34	0.0019	15	29	31	0.0019
10	22	27.1	0.0038	20	12	14	0.0019	13	18	30.2	0.0038	14	24	34.2	0.0019
10	19	25.1	0.0058	21	15.2	16	0.0019	15	18	29	0.0019	15	39.2	38.3	0.0019
11	26	25.1	0.0019	14	18	15	0.0038	13	17	33	0.0038	16	30	38	0.0038
10	25	19	0.0019	19	12	15	0.0019	13	17	30.2	0.0019	15	29	39	0.0019
11	21	27.1	0.0058	20	16	12	0.0058	12	16	32.2	0.0019	15	44.2	34	0.0019
10	27	29.1	0.0019	22	13	15	0.0038	11	18	34	0.0038	15	27	35	0.0077
11	20.1	26.1	0.0019	17	16	14	0.0019	10	18	28.2	0.0019	17	29	36	0.0019
11	22	25.1	0.0019	20	13	13	0.0019	10	19	28.2	0.0038	14	43.2	38.3	0.0019
10	21	25.1	0.0058	20	19	16	0.0038	12	20	31	0.0019	14	29	39	0.0019
8	26	26.1	0.0019	21	18	18.3	0.0019	14	16	33	0.0019	17	28	35.1	0.0019
11	25.1	13.3	0.0019	18	13	13	0.0019	15	18	33	0.0019	14	27	34	0.0019

10	25	26.1	0.0038	19	19	15	0.0019	11	18	32	0.0038	14	42.2	35	0.0019
12	23.1	18	0.0019	19	16	16	0.0019	12	21	28	0.0019	15	29	37	0.0019
11	22	23	0.0058	17	13	15	0.0019	14	21	31	0.0019	15	31	34	0.0058
11	22.1	23	0.0019	20	14	14	0.0058	15	18	31.2	0.0019	17	30	36	0.0038
10	30	24	0.0019	21	17	16.3	0.0019	14	20	27.2	0.0019	14	43.2	35	0.0019
12	27	23	0.0019	22	19	16.3	0.0038	16	16	32	0.0019	15	29	32	0.0019
10	26	24	0.0019	21	19	15	0.0038	12	19	31	0.0058	14	28	38	0.0019
12	23	24.1	0.0038	24	18	13	0.0019	9	21	30	0.0019	15	23	34	0.0019
12	25	17	0.0038	19	11	11	0.0019	15	17	29	0.0019	15	45.2	40	0.0019
11	19	25.1	0.0019	20	14	13	0.0058	13	18	31.2	0.0058	13	29	36	0.0096
11	32	27.2	0.0019	18	7	12	0.0019	9	19	31	0.0019	13	26	37	0.0019
13	31	26.1	0.0019	20	8	16	0.0038	15	19	32	0.0019	15	31	32	0.0019
13	27	23.1	0.0019	20	16	16	0.0058	11	18	35	0.0019	15	26	35	0.0058
10	19.1	29.1	0.0019	21	15	14	0.0019	13	19	32.2	0.0038	14	25	37	0.0077
10	25	18	0.0038	18	17	14	0.0058	12	19	27.2	0.0038	15	43.2	37	0.0038
10	28	26.1	0.0019	18	7	15	0.0019	12	19	32	0.0019	14	24	33	0.0038
11	22.1	18	0.0019	19	8	16	0.0019	14	21	30.2	0.0019	16	31	29	0.0019
10	21.1	26.1	0.0038	19	19	14	0.0019	13	19	26	0.0019	14	25	39.3	0.0019
12	16	28.1	0.0019	19	18	16	0.0019	12	21	27.2	0.0019	14	34	35	0.0019
10	22.2	27.1	0.0019	22	18	14	0.0038	12	16	32	0.0038	15	25	38.3	0.0019
13	23	18	0.0038	19	13	14	0.0038	15	17	30	0.0058	15	30	37	0.0115
12	21.1	20	0.0019	20	15	12	0.0019	12	20	32	0.0019	16	39.2	36	0.0019
11	22	24.1	0.0038	19	14	11	0.0019	13	21	30.2	0.0019	17	25	36	0.0019
11	25	24.1	0.0019	22	18	16.3	0.0019	13	16	30	0.0019	15	45.2	37	0.0019
11	19.1	41.1	0.0019	20	17	14	0.0077	13	17	29	0.0019	15	29	38	0.0096
14	24	27.1	0.0019	23	13	14	0.0019	12	18	32	0.0019	14	35.2	31	0.0019
10	25	17.1	0.0019	21	7	13	0.0038	13	15	32	0.0019	8	27	30	0.0019
11	22	26.1	0.0038	22	13	14	0.0019	14	18	32	0.0096	17	27	37	0.0019
10	29	29.1	0.0019	21	14	15	0.0019	12	18	28	0.0019	16	40.2	40.3	0.0038
12	28	28.2	0.0019	21	18	15	0.0038	13	15	31	0.0019	14	25	36	0.0038
10	23	18	0.0115	18	15	16	0.0058	11	19	32.2	0.0019	14	41.2	37	0.0038
13	24	27.1	0.0019	19	7	12	0.0019	11	20	32	0.0019	16	25	36	0.0077
12	21	30.1	0.0019	19	18	13	0.0058	13	16	27.2	0.0019	16	28	35	0.0038
10	29	25.1	0.0058	20	15	16	0.0019	14	19	28.2	0.0019	13	28	34	0.0019
10	19.1	28.1	0.0019	22	17	12	0.0019	13	18	29.2	0.0019	16	27	36	0.0019
11	18	18	0.0019	23	15	14	0.0019	14	16	29	0.0019	16	37.2	33	0.0019
11	21	18	0.0058	20	9	12	0.0019	16	17	33	0.0019	15	38.2	31	0.0019
10	21.1	25.1	0.0038	19	12	16	0.0019	15	18	31	0.0019	16	29	41.3	0.0019
13	20.1	18	0.0019	21	10	15	0.0019	11	16	30	0.0019	14	26	39.3	0.0019
13	28	31.1	0.0019	20	14	12	0.0019	14	19	29.2	0.0019	15	28	35	0.0077
12	29	27.1	0.0019	15	17	12	0.0019	12	16	30	0.0019	14	26	38	0.0019
12	22	25	0.0019	19	14	12	0.0019	12	18	24.2	0.0019	15	32	41.3	0.0019
11	28	30.1	0.0019	22	19	14	0.0019	14	19	29.2	0.0019	15	43.2	40.3	0.0077
12	28	25.1	0.0038	19	14	13	0.0019	12	18	24.2	0.0019	14	29	34	0.0077
11	18	13.3	0.0019	22	16	12	0.0019					17	23	37.3	0.0019
11	22.1	19	0.0019	19	15	12	0.0019					14	26	37	0.0038

12	32	25.1	0.0019	14	18	14	0.0019	13	31	39	0.0019
11	27	25.1	0.0019	20	18	15	0.0077	13	41.2	35	0.0038
12.2	26	18	0.0019	20	11	14	0.0019	16	42.2	41.3	0.0019
10	20	25.1	0.0115	22	11	14	0.0019	15	41.2	35	0.0019
12	21	18	0.0038	17	8	16	0.0019	14	32	38	0.0019
11	24.1	21.1	0.0019	20	17	16	0.0019	14	40.2	38	0.0019
12	18.1	25.1	0.0019	15	17	15	0.0019	14	34	36	0.0019
11	25	26.1	0.0038	19	14	14	0.0019	17	28	35	0.0019
12	18	39	0.0019	21	8	15	0.0019	14	25	34	0.0019
13	26	27.1	0.0019	21	15	16.3	0.0019	13	28	38	0.0019
12	27	25.1	0.0038	18	18	12	0.0019	14	35.2	37	0.0019
11	23	29.1	0.0019	20	15	15	0.0019	14	34.2	34	0.0019
10	25	16	0.0019	20	17.2	15	0.0019	16	29	33	0.0038
10	19	26.1	0.0019	16	16	13	0.0019	16	28	33	0.0019
10	24	24.1	0.0019	21	12	12	0.0019	14	42.2	37.2	0.0019
12	20.1	26.1	0.0038	20	17	11	0.0019	16	40.2	35	0.0019
10	22	24	0.0019	17	15	14	0.0019	14	30	38	0.0019
11	25	13.3	0.0019	22	15	14	0.0038	13	36.2	35	0.0019
10	17.1	18	0.0019	20	8	14	0.0038	15	26	39.3	0.0019
11	21.1	20.1	0.0019	15	17	16	0.0019	13	39.2	39	0.0019
10	22	31	0.0019	20	16.2	15	0.0019	15	44.2	36	0.0038
12	21	25	0.0019	19	8	14	0.0019	15	40.2	39.3	0.0019
9	33	23	0.0019	17	16	13	0.0019	15	33	38	0.0019
12	27	30.1	0.0019	19	16	12	0.0019	14	32	36	0.0019
11	20	26.1	0.0038	17	17	14	0.0019	15	43.2	38	0.0019
12	22	30.1	0.0019	22	15	13	0.0019	14	47.2	35	0.0019
12	18	40.1	0.0038	18	17	12	0.0019	14	43.2	37	0.0019
13	21	18	0.0038	15	18	13	0.0019	15	40.2	36	0.0019
10	21	26.1	0.0038	15	16	14	0.0019	13	28	37	0.0038
10	26	40.1	0.0019	21	7	15	0.0019	16	31	34	0.0019
11	21.1	42.1	0.0019	23	17	13	0.0019	15	41.2	36	0.0019
12	26	29.1	0.0019	20	13	11	0.0019	15	43.2	36	0.0019
11	23	25.1	0.0019	20	13	11	0.0018	15	42.2	41.3	0.0019
13	32	30.1	0.0019					13	27	37	0.0058
10	29	24.1	0.0019					14	41.2	39.2	0.0019
10	29	26	0.0019					15	39.2	35	0.0038
11	27	23	0.0019					17	29	37.3	0.0019
10	28	27.1	0.0038					15	29	40.3	0.0038
10	17	26.1	0.0038					15	27	38	0.0019
11	22	23.1	0.0019					16	28	38	0.0019
10	22.1	26.1	0.0019					17	44.2	36	0.0019
11	22	40.1	0.0019					15	28	33	0.0019
11	20	24.1	0.0019					14	38.2	33	0.0058
12	20	26.1	0.0038					15	41.2	39	0.0038
12	26	25.1	0.0019					15	27.3	34	0.0019
11	16	18	0.0019					15	38.2	41.3	0.0038

13	24	26.1	0.0019	16	44.3	40.3	0.0019
11	20.1	28.1	0.0019	16	30	37.3	0.0019
11	21	30	0.0019	16	41.2	38	0.0019
12	25	29	0.0019	14	32	39	0.0058
10	21	19	0.0019	13	38.2	34	0.0019
12	19.1	25.1	0.0019	16	28	36.2	0.0019
12	19	18	0.0058	14	29	37.3	0.0019
10	22	28.1	0.0019	14	44.2	39.3	0.0019
11	21.1	13.3	0.0019	14	39.2	36	0.0019
10	15	23.1	0.0019	14	28	37	0.0038
11	17.1	18	0.0019	16	28.1	41.3	0.0019
11	23	27.1	0.0038	15	26	42.3	0.0019
12	26	41.1	0.0019	15	31	30	0.0019
12	31	25.1	0.0019	16	42.2	45.3	0.0019
12	22.1	26.1	0.0019	14	36.2	37	0.0038
12	36.2	20	0.0019	15	30	39.3	0.0019
10	21.1	17	0.0038	15	30	38	0.0019
11	21	42.1	0.0019	17	24	36	0.0019
10	19.1	20	0.0019	17	28	36	0.0019
11	20	27.1	0.0038	17	28	37	0.0019
11	30	19	0.0019	14	45.2	32	0.0019
13	33	25.1	0.0019	14	40.2	38.3	0.0019
10	28	17	0.0019	15	39.2	41.3	0.0019
12	21	25.1	0.0019	14	46.2	43.3	0.0019
10	17	22	0.0019	15	34.2	40	0.0019
10	20.1	24.1	0.0019	15	39.2	37	0.0019
12	19	28.1	0.0019	14	33	33	0.0019
11	22.1	41.1	0.0019	16	30	36	0.0019
11	21	40.1	0.0019	14	27.3	36	0.0019
10	18	23.1	0.0019	15	28	40.3	0.0038
11	20.1	25.1	0.0019	14	43.2	39.3	0.0019
12	27	28.2	0.0019	15	39.2	34	0.0019
12	17	23.1	0.0019	13	25	38	0.0019
12	30	18	0.0038	16	25	37	0.0019
11	18.1	18	0.0019	13	31	36	0.0019
12	24	19	0.0019	15	27	31	0.0019
11	18	24.1	0.0019	13	44.2	34	0.0019
12	21	27.2	0.0019	15	43.2	35	0.0019
12	21.1	24.1	0.0019	13	30	37	0.0019
11	24	24.1	0.0019	15	46.2	35	0.0019
12	29	26.1	0.0019	13	26	34	0.0019
10	32	24.1	0.0019	14	36.2	38	0.0019
11	19	18	0.0019	13	26	36	0.0019
10	27	27.1	0.0019	15	28	41.3	0.0019
12	30	23	0.0019	16	26	37	0.0019
13	26	24.1	0.0019	13	26	34	0.0019

10	19.1	27.1	0.0019	14	36.2	38	0.0019
13	26	26.1	0.0019	13	26	36	0.0019
12	20.1	27	0.0019	15	28	41.3	0.0019
11	19.1	24.1	0.0019	16	26	37	0.0019
12	22	27	0.0019				
11	21	19	0.0038				
11	24	18	0.0019				
12	29	24	0.0019				
13	32	24.1	0.0019				
11	28	21.1	0.0058				
11	32	25.1	0.0019				
10	18.1	13.3	0.0038				
12	25	23.1	0.0019				
12	31	28.1	0.0019				
11	33	26.1	0.0019				
10	15	24.1	0.0019				
12	27	22.1	0.0019				
11	27	26.1	0.0038				
10	25.1	27.1	0.0019				
12	23	27.1	0.0019				
12	31	30.1	0.0019				
13	31	25.1	0.0019				
11	28	18	0.0019				
12	17	27.1	0.0019				
11	27	26	0.0019				
10	22.1	25	0.0019				
12	22	24	0.0019				
11	20	25	0.0019				
11	28	27.1	0.0019				
14	24	25.1	0.0019				
11	25	22.1	0.0019				
12	21	24.1	0.0019				
9	22	23.1	0.0019				
12	30	25.1	0.0038				
11	30	24.1	0.0038				
10	20	26.1	0.0019				
9	21	24.1	0.0019				
12	23	18	0.0019				
10	18	27	0.0019				
10	23.1	24.1	0.0019				
12	24	25.1	0.0019				
9	20.1	18	0.0019				
11	23	24	0.0019				
11	28	24.1	0.0019				
11	25	25.1	0.0019				
12	19	25	0.0019				

10	21	13.3	0.0019
12	21.1	25.1	0.0019
11	26	23	0.0019
11	24	20	0.0019
11	29	26.1	0.0019
10	19	22.1	0.0019
10	20	30.1	0.0019
10	19	28.1	0.0019
11	21	26.1	0.0019
12	26	28.1	0.0019
11	25	29.1	0.0019
10	20	31.1	0.0019
10	26	24.1	0.0019
10	20	24	0.0019
11	25	27.1	0.0019
10	26	23.1	0.0019
10	22	18	0.0019
12	19	27.1	0.0019
10	32	31	0.0019
11	27	19	0.0019
11	16	17	0.0019
12	24	27.1	0.0019
11	16	17	0.0018
12	24	27.1	0.0018

Em verde os haplótipos de maior frequência.

Quanto maior a variabilidade de haplótipos encontrada, e maior relação de haplótipos únicos, mais informativo em relação a identificação de indivíduos esse haplótipo pode ser. Levando em consideração esse número de haplótipos diferentes encontrados na população estudada, o grupo de ligação mais informativo na população do ES foi o LG1, com o maior número de haplótipos diferentes (363) sendo desses, 71,62% de haplótipos únicos (tabela 11).

Tabela 11: Diversidade haplotípica dentro da população do ES.

Grupo de Ligação	Número de haplótipos diferentes	Número de haplótipos únicos	Frequência do haplótipo mais comum %
1	363	260 (71,62%)	1,15
2	234	128 (54,70%)	2,50
3	199	85 (45,22%)	2,69
4	297	192 (65,31%)	2,50

Comparando com a população de SP (JANUÁRIO, 2021), encontrou-se grande similaridade entre as proporções de haplótipos diferentes, sendo o mais informativo o LG1 com 86% de haplótipos únicos.

Nas populações argentina, chinesa e mexicana, o LG mais informativo também foi o LG1, porém se observou que nas populações do ES e SP, as proporções de haplótipos únicos foram bem maiores em comparação a estas populações, argentina (58% de haplótipos únicos), chinesa (63%), e mexicana com (56%) (HERING *et al.*, 2020; GARCIA *et al.*, 2019; CORTES-TRUJILLO *et al.*, 2019; XING *et al.*, 2019).

Essa alta variação de haplótipos encontrados na população brasileira, pode indicar uma relação com a alta taxa de miscigenação dessa população, na qual ocorre uma mistura gênica maior, surgido novos haplótipos.

O grupo de ligação com menor diversidade haplotípica do ES foi o LG3 com 199 haplótipos diferentes 45,22% de haplótipos únicos, assim como na população de SP (55% de haplótipos únicos), enquanto nas outras populações o menos diversificado foi o LG2.

6.3. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS MARCADORES X-STRS

Um dos requisitos para utilização de dados de marcadores genéticos em análises populacionais, identificação de indivíduos, é possuir o desequilíbrio de ligação conhecido na população estudada. O LD para o conjunto de marcadores analisados nesse trabalho foi testado na população do ES e está apresentado na tabela 12.

Tabela 12: Teste de desequilíbrio de ligação entre pares de *loci*.

p-values	DXS10103	DXS10101	HPRTB	DXS10148	DXS8378	DXS10135	DXS10134	DXS7423	DXS10146	DXS10074	DXS7132	DXS10079
DXS10103												
DXS10101	0.000000											
HPRTB	0.000000	0.000000										
DXS10148	0.650000	0.131782	0.002178									
DXS8378	0.608614	0.263960	0.959406	0.804455								
DXS10135	0.000000	0.265941	0.532574	0.000000	0.120396							
DXS10134	0.810000	0.602475	0.767228	0.788119	0.363861	0.320495						
DXS7423	0.503663	0.455743	0.475644	0.355347	0.117525	0.938911	0.007129					
DXS10146	0.479604	0.000000	0.044455	0.058119	0.038812	0.732376	0.000000	0.895941				
DXS10074	0.192376	0.000000	0.040198	0.173267	0.484356	0.000594	0.204653	0.390990	0.760198			
DXS7132	0.154455	0.954653	0.189703	0.000000	0.662376	0.873465	0.482277	0.125149	0.651782	0.037921		
DXS10079	0.538020	0.451683	0.122475	0.097228	0.506832	0.141287	0.875842	0.289703	0.257921	0.905941	0.142772	

Em vermelho valores estatisticamente significativos ($p < 0,00075$ Após correção de Bonferroni).

É esperado que os marcadores do mesmo haplótipo sejam encontrados em desequilíbrio, porém em alguns marcadores não foram encontradas tais associações, o que pode indicar uma baixa quantidade de amostras.

Nesse estudo, após a correção de Bonferroni ($p > 0,00075$) foi encontrado um LD entre os marcadores do grupo de ligação 1 como esperado, entre os marcadores DXS10148- DXS10135 do LG2 e entre os marcadores DXS10134-DXS10146 pertencentes ao LG3, porém também foi significativa o LD entre os marcadores DXS10135-DXS10103, DXS10101- DXS10146, DXS10101- DXS10074, DXS10148-DXS7132 e DXS10135- DXS10074 que estão em haplótipos diferentes.

A maioria dos grupos que analisaram esse conjunto de X-STRs, também encontraram desequilíbrio de ligação em *loci* de diferentes grupos de ligação.

Dentre os marcadores de diferentes LG que foram encontrados em desequilíbrio de ligação por Ferragut *et al.*, (2021) e Picornel *et al.*, (2011), encontram-se os *loci* DXS10101- DXS10146, que também foram encontrados nesse trabalho.

Além dos pares de *loci* em LD encontrados aqui, outros pares diferentes foram encontrados por Januário (2021), Gomes *et al.* (2017), Robino *et al.* (2018), Hering *et al.* (2020), García *et al.* (2019), Xing *et al.* (2018).

O único trabalho que encontrou desequilíbrio de ligação apenas entre os marcadores do mês LG, foi Córtes-Trujillo *et al.* (2019).

Contudo, as expectativas de ligação aqui foram baseadas apenas em distâncias físicas entre *loci*, mas sabe-se que outros fatores podem influenciar esse LD, como seleção, mutação, deriva genética, efeito fundador, miscigenação ou subdivisão populacional (ZARRABEITIA *et al.*, 2006).

6.4. DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES

Os dados haplotípicos encontrados foram pareados com diferentes populações para a análise de distância genética (F_{ST}).

O primeiro teste de comparação foi entre os 5 grupos dentro da população do ES (Central, Metropolitana, Norte, Sul e Pomeranos) (tabela 13).

Não foram encontradas distâncias genéticas significativas entre estes grupos populacionais.

Tabela 13: F_{ST} da população do ES dividido em 5 grupos.

	Central	Metropolitana	Norte	Sul	Pomerana
Central	*	P=0.27938	P=0.75775	P= 0.33739	P=0.33987
Metropolitana	0.00078	*	P=0.16305	P=0.03623	P=0.03396
Norte	-0.00147	0.00134	*	P=0.54005	P=0.50213
Sul	0.00066	0.00249	-0.00027	*	P=0.23998
Pomerana	0.00085	0.00376	-0.00021	0.00129	*

Abaixo da diagonal valores F_{ST} , acima da diagonal valores de p. (Valor significativo: $p < 0,005$ Após correção de Bonferroni).

O segundo teste, foi entre as distâncias dos outros grupos populacionais (Espírito Santo, Alemanha, Argentina, México, China, Itália, Suécia, Belarus, Espanha e Portugal) (tabela 14).

Tabela 14: F_{ST} entre diferentes populações mundiais.

	ES	ALE	ARG	MEX	CHI	ITA	SUE	BEL	ESP	POR
ES	*	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
ALE	0.00200	*	0.00000	0.00000	0.00000	0.0040	0.0039	0.00000	0.0046	0.00000
ARG	0.00575	0.00786	*	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
MEX	0.01509	0.01775	0.00401	*	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
CHI	0.01403	0.01554	0.00847	0.00758	*	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
ITA	0.00091	-0.00059	0.00713	0.01841	0.01497	*	0.0048	0.0047	0.0037	0.0013
SUE	0.00155	0.00026	0.00705	0.01700	0.01589	-0.00060	*	0.00000	0.0033	0.00000
BEL	0.00252	-0.00024	0.00846	0.01970	0.01752	0.00051	0.00072	*	0.00000	0.00000
ESP	0.00282	0.00054	0.01032	0.01887	0.01444	-0.00175	0.00110	0.00238	*	0.0017
POR	0.00675	0.00647	0.01663	0.02694	0.02489	0.00528	0.00536	0.00760	0.00347	*

Abaixo da diagonal valores F_{ST} , acima da diagonal valores de p. Em vermelho valores estatisticamente significativos ($p < 0,00111$ Após correção de Bonferroni.)

A maior distância da população do ES encontrada foi entre o México e a menor entre Itália. A maior distância considerando todos os grupos, foi entre Portugal e México, a menor entre Suécia e Alemanha.

Contudo, todas as distâncias encontradas demonstram somente uma pequena diferenciação genética ($F_{ST} < 0,05$).

Não obstante, a proximidade entre Espírito Santo e Itália encontrada nesse estudo, pode ser explicada por razão da alta taxa de imigrantes italianos que desembarcaram no estado desde o século XIX (CELIN, 2019), o que também está representado no questionário aplicado aos voluntários deste trabalho, na qual a maioria dos indivíduos responderam possuir ao menos um ascendente (avós paternos ou maternos) italiano, ou de família italiana.

6.5. PARÂMETROS DE EFICIÊNCIA FORENSE

Para o cálculo da eficiência forense utilizou-se o banco de dados de X-STRs (ChX-STR – <http://www.chrx-str.org/>), para definir o Poder de Discriminação Feminina (PD_F), Poder de Discriminação Masculina (PD_M) e MEC para as seguintes situações: - MEC_T : Chance média de exclusão em trios envolvendo filha, - MEC_D : Chance média de exclusão na ausência (duo – pai/filha), como descrito por Desmarais *et al.* (1998).

Com base nas distribuições de frequência estimadas, foram calculados parâmetros estatísticos de relevância forense para cada *locus* e demonstrado na tabela 15.

Tabela 15: Distribuição dos poderes de exclusão e discriminação dos indivíduos.

	Grupo de Ligação 1			Grupo de Ligação 2		
	DXS10148	DXS10135	DXS8378	DXS7132	DXS10079	DXS10074
Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC)	0,902896	0,941689	0,640402	0,73388	0,793948	0,855734
Homozigoze (h)	0,090582	0,055508	0,300896	0,230312	0,182387	0,130771
Heterozigoze (HET)	0,909418	0,944492	0,699104	0,769688	0,817613	0,869229
Poder de Exclusão (PE)	0,814698	0,886873	0,426875	0,544046	0,632129	0,733097
	Poder de Discriminação					
PD feminino	0,985274	0,994115	0,850759	0,911149	0,94307	0,969404
PD masculino	0,909418	0,944492	0,699104	0,769688	0,817613	0,869229
	Chance Média de Exclusão de Paternidade					
MEC Krüger:	0,81994	0,870916	0,430902	0,557232	0,643265	0,738568
MEC Desmarais Trio	0,902896	0,941689	0,640402	0,73388	0,793948	0,855734
MEC Desmarais Duo	0,830575	0,892736	0,495066	0,601017	0,675603	0,759321
	Grupo de Ligação 3			Grupo de Ligação 4		
	DXS10103	HPRTB	DXS10101	DXS10146	DXS10134	DXS7423
Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC)	0,734744	0,741197	0,902908	0,904107	0,85457	0,656058
Homozigoze (h)	0,232888	0,225156	0,090024	0,08952	0,132309	0,293184
Heterozigoze (HET)	0,767112	0,774844	0,909976	0,91048	0,867691	0,706816
Poder de Exclusão (PE)	0,539494	0,553216	0,815844	0,816876	0,730016	0,438882
	Poder de Discriminação					
PD feminino	0,913395	0,915658	0,984827	0,985614	0,969373	0,863286
PD masculino	0,767112	0,774844	0,909976	0,91048	0,867691	0,706816
	Chance Média de Exclusão de Paternidade					
MEC Krüger	0,560762	0,567132	0,817366	0,821843	0,738643	0,460039
MEC Desmarais Trio	0,734744	0,741197	0,902908	0,904107	0,85457	0,656058
MEC Desmarais Duo	0,601377	0,60939	0,829334	0,83231	0,758404	0,512716

Neste trabalho, o PD_F variou entre 0.850759 para o marcador DSX10135 (LG1) e 0.994115 para o marcador DSX8379 (LG1) e o PD_M ficou entre 0.699104 e 0.944492 para os mesmos marcadores. Esses resultados também foram encontrados no trabalho de Garcia *et al.*, (2019) na população da Argentina.

O marcador DSX10135 possui o maior valor de MEC_D e MEC_T , PD_F e PD_M e o marcador DSX8378 o menor valor para todos esses parâmetros.

Martins *et al.*, (2010) quando analisou a população de Vitória com um conjunto de 10 marcadores X-STR, o maior valor encontrado para MEC_T foi de 0.812 e MEC_D 0.699, PD_F de 0.952 e PD_M de 0.831.

6.6. SUBMISSÃO AO BANCO DE DADOS

Para submissão ao banco de dados ChrX-STR.org 2.0, foi enviado o formulário próprio para envio de haplótipos, disponível no próprio site.

Até o presente momento, a população do ES enviada não está disponível no banco de dados.

O comprovante de submissão encontra-se em anexo nesse documento (anexo 6).

7. CONCLUSÕES

Nesse trabalho nós analisamos 12 marcadores X-STRs incluídos no kit comercial mais utilizado mundialmente.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados do Espírito Santo (macrorregiões: norte, central, metropolitana, sul e pomeranos).

A estimativa da frequência e da distribuição dos X-STRs na população espírito-santense é importante para estabelecer uma base de dados aplicável à identificação humana.

Os resultados das frequências alélicas e haplotípicas apresentadas aqui, demonstram que este conjunto de X-STR é bastante informativos no quesito de discriminação de indivíduos, por possuir altas taxas de variabilidade alélica e haplotípica.

Foi encontrado desequilíbrio de ligação entre loci de diferentes grupos de ligação, além do esperado que é entre os mesmos grupos de ligação.

Os resultados desta pesquisa sugerem quem a população do ES está geneticamente mais próxima à população italiana e mais longe da mexicana, entre as populações analisadas nesse estudo.

Espera-se que este trabalho possa contribuir na construção do conhecimento e da importância do uso do cromossomo X na rotina de laboratórios que utilizam a tecnologia do DNA na identificação humana.

A geração de dados populacionais de X-STRs coopera para a excelência da prática forense pelas polícias científicas do país. A adoção de um novo método de análise tende a melhorar o índice de sucesso na identificação de suspeitos e na determinação de vínculo parental, além de permitir a elucidação de casos ainda não solucionados.

Esperamos então que trabalhos semelhantes possam ser desenvolvidos para melhorar a precisão das estimativas de frequências para a população brasileira.

8. REFERÊNCIAS

ALER, M. *et al.* **Genetic data of 10 X-STRs in a Spanish population sample.** *Forensic Sci Int.* 173:193-6. 2007.

ALI, A. *et al.* **X chromosomal analysis in population genetics and forensic science: a mini review.** *Genetika*, Vol 53, No.3, 1379-1386. 2021.

ALMARRI, M.A.; LOOTAH, R.A. **Allelic and haplotype diversity of 12 X-STRs in the United Arab Emirates.** *Forensic Sci Int Genet.* 33:e4–e6. 2017.

ALONSO A. (ed) **DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics, Methods in Molecular Biology**, vol. 830, Springer Science + Business Media, LLC. 2012.

AMBERS, A. D. *et al.* **More comprehensive forensic genetic marker analyses for accurate human remains identification using massively parallel DNA sequencing.** *BMC genomics*, v.17, p.21-30, 2016.

AQUINO J, *et al.* **A X-chromosome STR hexaplex as a powerful tool in deficiency paternity cases.** *Forensic Sci Int Genet . Suppl Ser 2*, p. 45-46, 2009.

ARAÚJO, L.G. *et al.* **Human identification of victims of mass disasters: the importance and role of Forensic Dentistry Human identification of victims of mass disasters: the importance and role of Forensic Dentistry.** *RFO* 18:224-229. 2013.

AULER-BITTENCOURT, E. *et al.* **Exploring the applicability of analysing X chromosome STRs in Brazilian admixed population.** *Science & Justice*, v. 55, n. 5, p. 323-328, 2015.

BECKER, D. *et al.* **Population genetic evaluation of eight Xchromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit.** *Forensic Sci Int Genet.* 2:69-74. 2008.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações.** Ribeirão Preto. SBG 48-49. 2008.

BINI, C. *et al.* **Haplotype data and forensic evaluation of 23 Y-STR and 12 X-STR loci in eight ethnic groups from Eritrea.** Int J Legal Med;135:449–453.2021.

BOTTINELLI, M. *et al.* **Population genetic analysis of 12 X-chromosomal STRs in a Swiss sample.** Int J Legal Med 136, 561–563, 2022.

BUTLER, J.M. **Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR markers.** 2 ed. London: Elsevier Academic Press. 2005.

BUTLER, J. M. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology,** 1 ed. London: Elsevier Academic Press, 2011.

BUTLER, J.M.; HILL, C.R. **Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis.** Forensic Sci. Rev. 21:15–26.2012.

BUTLER, J. M. **Short Tandem Repeat (STR) Loci and Kits. Advanced Topics in Forensic DNA Typing.** 99–139. 2012.

CARBONI, I. *et al.* **Improving complex kinship analyses with additional STR loci.** Electrophoresis, 35: 3145-3151. 2014.

CELIN, J. L. **Imigração italiana no Espírito Santo: Aspectos históricos e sinais contemporâneos.** Revista GeoNordeste. n3. p56-75. 2019.

CHEN, D.P. *et al.* **Use of X-linked short tandem repeats loci to confirm mutations in parentage caseworks.** Clin Chim Acta 408:29-33. 2009.

CHENGTAO, L. **Forensic genetics.** Forensic Sciences Research, 3(2), p. 103-104, 2018.

CHOW, J.C. *et al.* **Silencing of the mammalian X chromosome.** Review Genomics Human Genetics 6:69–92.2005.

CORTÉS-TRUJILLO, I. *et al.* **Allele and haplotype frequencies of 12 X-STRs in Mexican population.** Forensic Science International: Genetics. 38 e11-e13.2019.

COVINGTON, C. H. **Incest: The Psychological Problem and the Biological Contradiction.** Issues Ment. Health Nurs. 10, 69–87. 1989.

DESMARAIS, *et al.* **Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA).** J. Forensic Sci., v.43, p.1046–1049, 1998.

DIAS-FILHO, C. R.; FRANCEZ, P. A. C. **Introdução à biologia forense.** 2. ed. Campinas: Millennium Editora, 2018.

DIAS-FILHO, C. R. *et al.* **Introdução à genética forense,** 1. ed. Campinas: Millennium Editora, 2020.

DIEGOLI, T. M.; COBLE, M. D. **Development and characterization of two mini-X chromosomal short tandem repeat multiplexes.** Forensic Science International: Genetics, v. 5, p. 415–421, 2011.

DIEGOLI, T.M.; LINACRE, A.; COBLE, M.D. **Population genetic data for 15 X chromosomal short tandem repeat markers in three U.S. populations.** Forensic Sci Int Genet. 2014.

DIEGOLI, T.M. **Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes.** Forensic Science International: Genetics, v. 18, 2015.

EDELMANN, J. *et al.* **Advantages of X chromosomal microsatellites in deficiency paternity testing: Presentation of cases.** Int Congr. Ser 1261, p. 257-259, 2004.

EMRE, R. *et al.* **Evaluation of incest cases of Turkey in terms of DNA profiling difficulties.** J. Forensic Leg. Med. 36, 16–21, 2015.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E. **Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** Mol Ecol Resour. v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FERRAGUT, J.F. *et al.* **Genetic diversity of 12 X-chromosomal short tandem repeats in Jewish populations.** Forensic Science International: Genetics Supplement Series 5 e327–e329, 2015.

FERRAGUT, J.F. *et al.* **Exploring the Western Mediterranean through X-chromosome.** Int J Legal Med 135, 787–790, 2021.

FRACASSO, T. *et al.* **An X-STR meiosis study in Kurds and Germans: allele frequencies and mutation rates.** Int J Legal Med.122:353-356. 2008.

FRANÇA, G. V. **Fundamentos de Medicina Legal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

FRANCEZ, P.A.C. *et al.* **Allelic frequencies and statistical data obtained from 12 codis STR loci in an admixed population of the Brazilian Amazon.** Genetics and Molecular Biology 34:35-39. 2011.

GARCÍA, M.G. *et al.* **X-chromosome data for 12 STRs: Towards an Argentinian database of forensic haplotype frequencies.** Forensic Sci Int Genet. 2019.

GILL, P. *et al.* **Forensic genetics: the basics. Forensic Practitioner's Guide to the Interpretation of Complex DNA Profiles.** 1–53. 2020.

GOMES, I. *et al.* **Genetic characterization of Guinea-Bissau using a 12 X-chromosomal STR system: Inferences from a multiethnic population.** *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 31:89–94. 2017.

GOMES, I. *et al.* **Twenty Years Later: A Comprehensive Review of the X Chromosome Use in Forensic Genetics.** *Front. Genet.* 11:926. 2020.

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

GRIFFITHS, A.J.F. *et al.* **Introdução à Genética.** 12. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2022.

GU, S.; LI, S. **X-chromosome STRs analysis of Ewenke ethnic population.** *Forensic Science International* 158:72–75.2006.

GUEN, Y. L. *et al.* **Common X-Chromosome Variants Are Associated with Parkinson Disease Risk.** *Ann Neurol.* 90(1): 22–34. 2021.

GUSMÃO, L. *et al.* **A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR Decaplex: Data on 15 Iberian and Latin American populations.** *Int J Legal Med.* v. 123, p. 227-234, 2009.

GUSMÃO, L. *et al.* **Capillary Electrophoresis of an X-Chromosome STR Decaplex for Kinship Deficiency Cases.** *Methods Mol Biol.*, 57–71. 2011.

GUSMÃO, L. *et al.* **Revised guidelines for the publication of genetic population data.** *Forensic Sci Int Genet.* v. 30, p. 160-163, 2017.

HABIBI, S. *et al.* **Evaluation of ten SNP Markers for Human Identification and Paternity Analysis in Persian Population.** *Iranian journal of biotechnology*, v.17, n.3, p. e2148, 2019.

HAKIM, H. M. *et al.* **Population data and genetic characteristics of 12 X-STR loci using the Investigator® Argus X-12 Quality Sensor kit for the Kedayan population of Borneo in Malaysia.** *Int. J. Legal Med.* 135, 1433–1435, 2021.

HARES, D.R. **Expanding the codis core loci in the United States.** *Forensic Science International: Genetics* 6:52-54. 2012.

HERING, S.; KLIMOVA, A.; EDELMANN, J. **German population data for 18 X-STRs: a hexaplex PCR adding two clusters of X-STRs to the Argus X-12 set and expanding the German haplotype databases.** *Int J Legal Med* 134, 2061–2062, 2020.

INTURRI, S. *et al.* **Linkage and linkage disequilibrium analysis of X-STRs in Italian families.** *Forensic Sci Int Genet.* Mar;5(2):152-4. 2011.

QIAGEN. **Investigator® Argus X-12 QS Handbook** . Qiagen. 2015.

JANUARIO, B.B. **Avaliação de diferentes conjuntos de marcadores do cromossomo X na população residente do estado de São Paulo.** 2021. Tese (Doutorado em biotecnologia) – Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2021.

JAKOVSKI, Z. *et al.* **Forensic DNA expertise of incest in early period of pregnancy.** *J. Forensic Leg. Med.* 18, 34–37, 2011.

JIA, J. *et al.* **Development and validation of a multiplex 19 X-Chromosomal short tandem repeats typing system for forensic purposes.** *Sci Rep* 11, 609, 2021.

JIAN, H. *et al.* **A Novel SNP-STR System Based on a Capillary Electrophoresis Platform.** *Front. Genet.* 12:636821, 2021.

KAKKAR, S. *et al.* **Genetic diversity of X-STR markers in Jat Sikh population of Punjab, India and its comparison with other 39 global populations.** *Ann Hum Biol* [Internet]. 47:490–497, 2020.

KARKI, R. *et al.* **Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics.** BMC Med Genomics, v. 8, n.37, p.1-7, 2015.

KANG, L.; LI, S. **X-chromosome STR polymorphism of Luoba Ethnic Group living in Tibet (SW China).** Forensic Science International 156: 88–90, 2006.

KATSANIS, S. H.; WAGNER, J. K. **Characterization of the Standard and Recommended CODIS Markers.** J Forensic Sci 58, 2013.

KRÜGER, J. *et al.* **Zur Verwendung der sauren Erythrocytenphosphatase bei der Vaterschaftsbegutachtung.** Dtsch Z Gerichtl Med. v. 64. n. 2. p. 127–46. 1968.

LIU, Q.L. *et al.* **Development of a five ChX STRs loci typing system.** Int J Legal Med 122:261-265, 2008.

LIU, W. S. **Mammalian Sex Chromosome Structure, Gene Content, and Function in Male Fertility.** Annu Rev Anim Biosci. 7:103-124, 2019.

MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética Humana.** 1. ed. Editora Artmed. Porto Alegre. p.334. 2011.

MARISCAL, R. *et al.* **Forensic parameters of the X-STR Decaplex system in Mexican populations.** Leg Med, 2018.

MARTINS, A. M. **Análise genético-histórica de haplótipos do cromossomo Y humano no nordeste brasileiro.** 2007. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 190 p, 2007.

MARTINS, J.A. *et al.* **Genetic profile characterization of 10 X-STRs in four populations of the southeastern region of Brazil.** Int J Legal Med. v. 124, n. 5, p. 427-432, 2010.

MARTINS, J. A. *et al.* **Genetic characterization of an X-STR decaplex system in the State of Mato Grosso, Brazil: distribution, forensic efficiency and population structure.** *Int J Legal Med.* 131:1523–1530, 2017.

MARTINS, J.A.M.L. **Estudo de polimorfismos do cromossomo X na população da região Sudeste do Brasil.** 2011. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2011.

MONTEIRO, B. *et al.* **Evolutionary dynamics of the human pseudoautosomal regions.** *PLoS Genet.* 17(4):e1009532. 2021.

MRŠIĆ, G. *et al.* **Expanded Croatian 12 X-STR loci database with an overview of anomalous profiles.** *Forensic Sci Int Genet.* 34:249–256, 2018.

NADEEM, A. *et al.* **Development of pentaplex PCR and genetic analysis of X chromosomal STRs in Punjabi population of Pakistan.** *Mol Biol Rep.* 367:1671-1675, 2008.

NAKAMURA, Y. *et al.* **Multiplex PCR for 18 X-chromosomal STRs in Japanese population.** *Leg Med [Internet].* 15:164–170, 2013.

NISHI, T. *et al.* **Polymorphism and haplotype analysis of three novel short tandem repeat loci in the p11.4 region of human X chromosome.** *International Journal of Legal Medicine*, v.136, p. 513-518, 2022.

NOTHNAGEL, M.; SCHMIDTKE, J.; KRAWCZAK, M. **Potentials and limits of pairwise kinship analysis using autosomal short tandem repeat loci.** *International journal of legal medicine*, v. 124, n. 3, p. 205-215, 2010.

NOTHNAGEL, M. *et al.* **Collaborative genetic mapping of 12 forensic short tandem repeat (STR) loci on the human X chromosome.** *Forensic Sci Int Genet.* 6:778–784, 2012.

PENA, S. D. **Reasons for banishing the concept of race from Brazilian medicine.** *Hist Cienc Saude Manguinhos*, 12(2), p. 321-346, 2005.

PEREIRA, R. *et al.* **A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR.** *Int J Legal Med*, v. 126, n. 1, p. 97-105, 2012.

PICORNELL, A. *et al.* **X-chromosomal haplotype frequencies of four linkage groups in a North African population.** *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, v 3, l. 1, p. 19-20, 2011.

PINTO, J. F. O. C. **Leonese dialects in the Portuguese-Spanish border: a population genetic study through the analysis of X-chromosomal markers.** *Dissertação (Mestrado em Biodiversidade, Genética e Evolução)*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Portugal, 2012.

PINTO, N. *et al.* **Estimating relatedness with no prior specification of any genealogy: The role of the X-chromosome.** *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, v. 4, n. 1, p. e252-e253, 2013a.

PINTO, N. *et al.* **Paternity exclusion power: Comparative behaviour of autosomal and X-chromosomal markers in standard and deficient cases with inbreeding.** *Forensic Science International: Genetics*, v.7, p.290–295, 2013b.

POSYNICK, B. J.; BROWN, C. J. **Escape From X-Chromosome Inactivation: Na Evolutionary Perspective.** *Front. Cell Dev. Biol.*, v. 7, p. 241, 2019.

PRIMORAC, D.; SCHANFIELD, M.S. **Application of forensic DNA testing in the legal system.** *Croatian Medical Journal*, v. 41-1, p. 32-46, 2000.

PRINZ, M. *et al.* **DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for**

disaster victim identification (DVI). Forensic Science International: Genetics, Vol. 1, Is 1, 2007.

REBALA, K. *et al.* **Variation of X-chromosomal microsatellites in Belarus within the context of their genetic diversity in Europe.** Forensic Sci Int Genet. May;16:105-111, 2015.

WHO - Regional Committee for Africa. **Child sexual abuse: a silent health emergency: report of the Regional Director.** 2011.

RIBEIRO, E.M. *et al.* **A multiplex PCR for 11 X chromosome STR markers and population data from a Brazilian Amazon Region.** Forensic Science International: Genetics 2:154-158, 2008.

RINCON, D. **Estudos de DNA mitocondrial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira.** Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Biologia/Genética). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ROBINO, C. *et al.* **Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 12 X-chromosomal STR loci in a northwestern Italian population sample.** Int. J. Legal Med. 120:315-318, 2006.

ROBINO, C. *et al.* **Allele and haplotype diversity of 12 X-STRs in Sardinia.** Forensic Sci Int Genet [Internet]. 33:e1–e3, 2018.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning: a laboratory 435 manual.** Cold Spring Harb. Lab. Press. 1989.

SHIN, S. H. *et al.* **Genetic analysis of 18 X linked short tandem repeat markers in Korean population.** Forensic Sci Int. v. 147, p. 35-41, 2005.

SILVA, L. A. F.; PASSOS, N. S. **DNA Forense: Coleta de Amostra Biológica em Locais de Crime para Estudo do DNA.** Maceió: UFAL. 2006.

SISKIND, V. **Bias in estimating the frequency of incest.** *Ann. Hum. Genet.* 38, 355–359, 1975.

SLATKIN, M. **Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future.** *Nat Rev Genet*, v.9, p.477–485, 2008.

STABELLINI, R. **Análise Funcional dos Genes Xist e DNMT1 na manutenção do processo de Inativação do Cromossomo X em humano através do silenciamento gênico por RNAi.** São Paulo, p.143. 2008.

SWEET, D. **Why a dentist for identification?** *Dent. Clin. North Am.*, v. 45, n. 2, p. 237-251, 2001.

SZIBOR, R. *et al.* **Use of X-linked markers for forensic purposes.** *Int J Legal Med.* v. 117, p. 67-74, 2003.

SZIBOR, R.; HERING, S.; EDELMANN, J. **A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online.** *Int J Legal Med*, 120, 2006.

SZIBOR, R. **X-chromosomal markers: past, present and future.** *Forensic Sci Int Genet*, 1, 93–99, 2007.

TAO, R. *et al.* **Genetic Investigation and Phylogenetic Analysis of Three Chinese Ethnic Groups Using 16 X Chromosome STR Loci.** *Ann. Hum. Biol.* 47 (1), 59–64, 2020.

TILLMAR, A. **Populations and Statistics in Forensic Genetics.** Tese (Doutorado). 55f. Faculty of Health Sciences da Linköping University. 2010.

TILLMAR, A. O. *et al.* **DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Guidelines on the use of X-STRs in kinship analysis.** *Forensic Sci Int Genet.* 29:269-275, 2017.

TILLMAR, A. O. *et al.* **Analysis of linkage and linkage disequilibrium for eight X-STR markers.** *Forensic Science International: Genetics*, v. 3, n.1, p.37-41, 2008.

TOMAS, C. *et al.* **Forensic usefulness of a 25 X-chromosome single-nucleotide polymorphism marker set.** *Transfusion*, 50, 2258–2265, 2010.

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

WEISS, K. M. CLARK, A. G. **Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits.** *TRENDS in Genetics*, v. 18, p. 19-24, 2002.

WENK, R. E. **Testing for parentage and kinship. Current opinion in hematology,** v. 11, n. 5, p. 357-361, 2004.

WENK, R. E. **Incest indices from microsatellite genotypes of mother-child pairs.** *Transfusion (Paris)* 0, 071121030748007-??? (2007).

WOOD, R. E. **Forensic aspects of maxillofacial radiology.** *Forensic Sci. Int.*, v. 159, p. 47-55, 2006.

WOODS, C. G. *et al.* **Quantification of Homozygosity in Consanguineous Individuals with Autosomal Recessive Disease.** *Am. J. Hum. Genet.* 78, 889–896, 2006.

XIAO, C. *et al.* **Validation and forensic application of a new 19 X-STR loci multiplex system.** *Leg Med [Internet]*. 53:101957, 2021.

XING, J. *et al.* **Genetic analysis of 12 X-STRs for forensic purposes in Liaoning Manchu population from China.** *Gene*. Jan 30;683:153-158, 2019.

YANG, Q. *et al.* **Identification and Characterization of Nine Novel X-Chromosomal Short Tandem Repeats on Xp21.1, Xq21.31, and Xq23 Regions.** *Front. Genet.* 12:784605, 2021.

YUAN, L. *et al.* **Population genetics analysis of 38 STR loci in the she population from Fujian province of China.** *Legal Medicine*, v. 16, p. 314-318, 2014.

YUKSEL, B. *et al.* **What should the management of incest pregnancies be? An ethical view presented via three cases.** *Reprod. Biomed. Online* 17, 52–54, 2008.

ZALÁN, A. *et al.* **Hungarian population data of eight X-linked markers in four linkage groups.** *Forensic Science International* 175: 73–78, 2008.

ZARRABEITIA, M. T. *et al.* **Study of six X-linked tetranucleotide microsatellites: population data from five Spanish regions.** *Int J Legal Med* ,v.120, p.147–150, 2006.

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

ZARRABEITIA, M.T. *et al.* **Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations.** *Forensic Science International: Genetics* 3:63-66, 2009.

ZHANG, Y. *et al.* **Development and validation of a new 18 X-STR typing assay for forensic applications.** *Electrophoresis*. 42:766–773, 2021.

ZHANG, Y. *et al.* **Comparative evaluation of autosomal STRs and X-chromosome STRs as a complement of autosomal STRs in kinship testing in Southern Han Chinese.** *Annals of Human Biology*, 2020.

ZHANG, Y. D. *et al.* **Allele and Haplotype Diversity of New Multiplex of 19 ChrX-STR Loci in Han Population from Guanzhong Region (China).** *Electrophoresis* 37 (12), 1669–1675, 2016.

APÊNDICE 1 – Tabela haplótipos completos da população do Espírito Santo.

ID	Population	Region	DXS10103	DXS8378	DXS10101	DXS10134	DXS10074	DXS7132	DXS10135	DXS7423	DXS10146	DXS10079	HPRTB	DXS10148
F2	General Population	Central	20	11	29.2	37	7	13	28	13	25	19	11	23.1
F8	General Population	Central	17	10	30	36	17	13	24	14	26	21	13	27.2
F20	General Population	Central	18	10	26.2	36	15	15	27	14	27	18	12	18
F25	General Population	Central	20	10	28.2	36	8	13	19.1	14	31	20	14	18
F26	General Population	Central	16	12	34	36	8	14	19.1	15	29	21	13	13.3
F29	General Population	Central	19	10	28	36	7	12	20	14	40.2	20	12	18
F37	General Population	Central	18	10	30.2	35	15	15	26	15	30	21	11	28.1
F38	General Population	Central	19	12	29.2	34	16	14	21	14	46.2	19	11	21.1
F42	General Population	Central	18	12	32.2	41.3	17	13	17.1	14	40.2	19	13	24
F57	General Population	Central	19	10	33	35	17	14	18	14	29	14	9	24
F58	General Population	Central	20	11	28	35	7	14	22	16	29	21	12	32
F67	General Population	Central	19	11	30.2	38	18	14	20.1	15	28	20	11	27.1
F69	General Population	Central	17	10	30	34	16	13	27	14	28	20	14	26.1
F72	General Population	Central	19	11	30.2	42.3	18	14	24	15	42.2	21	12	25.1
F79	General Population	Central	19	10	31.2	39	17	13	28	14	27	20	12	25
F84	General Population	Central	18	10	27.2	39.3	17	12	22.1	14	39.2	20	13	24.1
F89	General Population	Central	19	12	30.2	36	16	15	24	16	40.2	20	11	28.1
F91	General Population	Central	19	10	29	34	18	15.3	19	15	28	21	13	18
F101	General Population	Central	20	11	30.2	35	18	13	28	14	41.2	16	14	25.1
F115	General Population	Central	19	10	28.2	34	18	16	25	16	28	20	13	24.1
F145	General Population	Central	20	12	31.2	35	12	15	18	14	29	21	14	26.1
F146	General Population	Central	20	10	31.2	36	18	14	24	14	27	18	12	26.1
F148	General Population	Central	20	10	29	37	17	14	18	16	29	19	12	26.1
F149	General Population	Central	17	11	31	37	18	15	28	16	43.2	18	14	23.1
F150	General Population	Central	19	12	34.2	36	13	15	23	14	27	20	14	19
F155	General Population	Central	20	10	29.2	38	14	13	22	15	25	21	12	19
F156	General Population	Central	16	12	31	35	18	13	19	17	29	0	14	25.1
F157	General Population	Central	20	12	24.2	37	7	14	34.1	15	31	18	14	20
F160	General Population	Central	20	12	28.2	33	8	13	17.1	14	29	18	13	26.1
F161	General Population	Central	18	11	30.2	33	18	16	32	14	29	17	12	18
F163	General Population	Central	20	10	31.2	37	15	14	29	16	43.2	18	12	22.1
F164	General Population	Central	16	11	31	35	18	14	27	15	30	21	13	18
F165	General Population	Central	20	10	31.2	35	8	15	22	15	29	19	12	26.1
F166	General Population	Central	19	12	28.2	36	8	12	19	13	40.2	16	13	25.1
F168	General Population	Central	16	12	32	35	16	14	17	14	29	20	14	19
F169	General Population	Central	18	10	29	36	19	14	24	15	36.2	17	13	26.1
F170	General Population	Central	17	11	32	36	7	14	21	15	23	21	12	28.1
F171	General Population	Central	17	12	32	36	18	14	32	15	27	21	13	27.1
F174	General Population	Central	19	11	32	40.3	14	15	19.1	14	45.2	20	13	42.1
F175	General Population	Central	19	10	31.2	38	16	13	24	14	27	20	13	25.1

F176	General Population	Central	20	12	30.2	38.3	15	14	24	14	44.2	20	13	23
F177	General Population	Central	21	11	30.2	38	15	14	21	15	24	19	12	32
F179	General Population	Central	17	11	31	32.1	7	14.1	20	13	25	17	13	22.3
F181	General Population	Central	19	10	29.2	36	14	14	22	15	29	22	12	25.1
F182	General Population	Central	18	10	31.2	41.3	20	15	22	15	41.2	18	14	25.1
F183	General Population	Central	19	12	31.2	38.2	15	13	22.1	16	30	20	13	27.1
F184	General Population	Central	19	10	31.2	36.2	16	13	21	15	29	19	14	24.1
F187	General Population	Central	17	10	32	39	16	17	20	15	28	19	7	27.1
F188	General Population	Central	19	10	29.2	34	8	12	23	15	26	18	11	20.1
F189	General Population	Central	19	11	24.2	36	16	14	23	13	34	20	13	23
F190	General Population	Central	19	10	30.2	37	17	16	27	15	28	22	11	26.1
F191	General Population	Central	20	11	28	39.3	18	16	29	14	31	18	12	25.1
F193	General Population	Central	19	11	33	36	7	14	17	15	31	19	12	18
F194	General Population	Central	16	12	31	35	14	15	21.1	15	25	20	13	18
F200	General Population	Central	17	10	31	40.3	13	14	25	14	28	20	14	27.1
F206	General Population	Central	16	11	28.2	35	18	11	22	14	31	14	12	18
F209	General Population	Central	19	10	30	38	14	15	23	15	28	19	13	23.1
F216	General Population	Central	19	12	30.2	37	15	12	25	16	46.2	17	13	19
F240	General Population	Central	19	11	29	34	16	14	20	15	30.2	19	13	18
F241	General Population	Central	17	12	31.2	36	17	13	20	15	25	18	13	29.1
F244	General Population	Central	18	10	27.2	35	17	14	23	15	29	15	12	24.1
F245	General Population	Central	17	10	33	38	16	14	22	14	29	13	11	26.1
F246	General Population	Central	19	11	28.2	36	15	16	26	14	29	17	13	19
F250	General Population	Central	20	10	32	37	8	15	21	16	29	18	13	18
F255	General Population	Central	19	10	29	34	16	13	30	15	30	18	12	25.1
F267	General Population	Central	19	11	28.2	35	17	14	26	13	28	21	11	29.1
F271	General Population	Central	18	11	32.2	36	17	14	22	14	45.2	19	13	27.1
F274	General Population	Central	18	11	32	35	19	13	24	13	26	20	13	23
F279	General Population	Central	16	9	34	36	15	16	23	14	27	19	14	28.1
F284	General Population	Central	16	10	28.2	37	17	15	20	15	28	18	13	28.1
F287	General Population	Central	19	11	28.2	39	18	15	23	16	39.2	18	11	24.1
F290	General Population	Central	19	12	28.2	39	17	15	19	13	43.2	20	12	26.1
F295	General Population	Central	16	10	28.2	41.3	8	13	21	14	29	20	12	28.1
F299	General Population	Central	19	10	29.2	35	17	13	21	16	41.2	22	11	24
F300	General Population	Central	20	12	30.2	33	16	13	21	15	29	22	11	29.1
F302	General Population	Central	19	11	29.2	36	20	13	21.1	14	27	18	12	24.1
F311	General Population	Central	20	12	31.2	35	16	12	18	14	28	21	13	18
F315	General Population	Central	19	12	29	34	13	15	22	14	30	21	13	18
F321	General Population	Central	16	12	31	40.3	18	16.3	19	16	45.2	21	12	19
F326	General Population	Central	16	10	31	35	18	13	23	14	40.2	22	15	28.1
F328	General Population	Central	20	10	30.2	35	15	13	22	14	33	13	13	22.1
F340	General Population	Central	18	10	27.2	35	7	15	30	15	29	20	12	25
F1	General Population	metropolitan	17	10	32	34	17	15	20	16	26	18	13	24.1
F4	General Population	metropolitan	18	12	30.2	37	16	13	18	16	31	20	12	28.1
F5	General Population	metropolitan	20	12	31.2	40.3	15	13	21	17	26	19	14	22.1
F6	General Population	metropolitan	19	11	28.2	36	17.3	13	30	17	43.2	19	11	26.1

F7	General Population	metropolitan	17	12	32	38.1	9	13	24	15	26	18	14	26.1
F9	General Population	metropolitan	19	10	29	37	15	13	24.1	13	46.2	21	14	43.1
F10	General Population	metropolitan	18	10	32.2	41.3	17	15	27	15	27	22	13	23.1
F11	General Population	metropolitan	20	11	28.2	37	13	14	20	16	28	20	14	25.1
F12	General Population	metropolitan	17	10	31	34.1	17	13	23	15	29	15	13	24.1
F13	General Population	metropolitan	19	12	32.2	30	16	13	29	16	33	22	12	23.1
F14	General Population	metropolitan	16	10	33	37	8	13	21	15	34.2	19	13	24
F15	General Population	metropolitan	19	10	30.2	43.3	17	13	26	15	30	19	12	19
F16	General Population	metropolitan	16	11	32.2	37	16	13	23	15	24	20	15	23.1
F17	General Population	metropolitan	19	12	28.2	33	8	13	26	17	29	18	12	26.1
F18	General Population	metropolitan	21	11	28.2	34	17	15	23	15	27	21	12	19
F19	General Population	metropolitan	16	11	31	34	17	12	19	15	28	21	13	27.1
F21	General Population	metropolitan	21	10	31.2	37	17	14	26	16	28	19	10	25.1
F23	General Population	metropolitan	19	12	32	33	17	15	19.1	16	26	19	13	13.3
F24	General Population	metropolitan	20	12	32	38	16	13	24	16	45.2	21	14	20
F28	General Population	metropolitan	19	10	33.2	33	14	14	19.1	14	28	21	13	23.1
F30	General Population	metropolitan	19	10	29	35	16	11	28	13	27	20	14	21
F31	General Population	metropolitan	19	12	29.2	35	18	13	34	14	27	18	12	18
F34	General Population	metropolitan	19	11	31	37	12	13	25	15	47.2	19	13	24
F35	General Population	metropolitan	19	10	28	36	16	16.3	28	15	26	21	12	23.1
F36	General Population	metropolitan	19	10	28	34	19	14	26	16	30	20	12	21.1
F39	General Population	metropolitan	18	10	31	35	18	16.3	22.1	16	26	19	14	28.1
F43	General Population	metropolitan	16	11	33	34	8	12	29	16	44.2	18	11	20
F44	General Population	metropolitan	16	11	32	39	15	14	26	13	32	19	15	18
F45	General Population	metropolitan	16	11	33	35	7	13	31	14	27	17	12	27.1
F46	General Population	metropolitan	17	10	32	35	16	14	19	13	29	18	15	23.1
F47	General Population	metropolitan	19	11	29.2	37	14	13	26	14	27	21	13	27.1
F48	General Population	metropolitan	21	10	31.2	35	18	12	26	14	29	19	13	26.1
F49	General Population	metropolitan	19	12	30.2	39	17	14	25	14	26	21	14	18
F50	General Population	metropolitan	18	12	30	38	16	16	29	15	28	16	15	24.1
F51	General Population	metropolitan	17	12	29	28	14	13	20	14	24	22	14	30
F52	General Population	metropolitan	18	13	29.2	37	17	12	21	15	40.2	19	11	26.1
F54	General Population	metropolitan	18	10	30	35	17	13	22.1	15	29	20	12	24.1
F56	General Population	metropolitan	19	11	31	32	7	13	23	14	29	19	14	26.1
F62	General Population	metropolitan	19	9	30.2	41.3	15	14	20	16	40.2	18	12	25.1
F66	General Population	metropolitan	19	12	28	37	7	15	17	15	27	22	12	18
F70	General Population	metropolitan	19	10	27.2	36	19	14	24	15	39.2	20	11	26.1
F73	General Population	metropolitan	19	12	30	39.3	17	14	24	15	41.2	22	14	26.1
F74	General Population	metropolitan	19	10	30.2	37	8	15	25	15	26	19	12	23.1
F75	General Population	metropolitan	16	10	31	36	15	13	21	14	30	21	15	29.1
F76	General Population	metropolitan	19	12	30	31	16	15	26	15	33	18	13	23.1
F77	General Population	metropolitan	19	12	33.2	35	17	16	28	15	31	22	14	18
F80	General Population	metropolitan	18	11	30	41.3	15	15	24	14	28	19	13	26.1
F85	General Population	metropolitan	20	12	31.2	37	18	14	20	15	27	20	15	25.1
F88	General Population	metropolitan	18	11	28.2	35	17	13	22.1	13	27	20	12	25.1
F92	General Population	metropolitan	17	12	31	33	15	13	30	14	29	20	15	27.1

F93	General Population	metropolitan	17	10	31	37	15	14	23	14	29	18	14	26.1
F94	General Population	metropolitan	20	13	27.2	34	17	16	18	15	40.2	19	12	26.1
F96	General Population	metropolitan	16	10	28.2	31	8	15	23	16	36.2	22	12	30.1
F97	General Population	metropolitan	17	10	32	36	17	10	25	15	27	20	15	25.1
F99	General Population	metropolitan	19	10	33	37	18	13	24	15	32	21	11	23.1
F100	General Population	metropolitan	19	11	26.2	38	16	16.3	29	13	37.2	14	12	25.1
F103	General Population	metropolitan	18	9	27.2	34	16	14	25	14	31	22	11	25.1
F105	General Population	metropolitan	19	10	30.2	34	17	15	21	15	27	14	10	24
F106	General Population	metropolitan	19	11	34	30	14	13	29	14	30	17	13	18
F119	General Population	metropolitan	19	12	28	34	18.1	16.3	17	15.1	45.2	19	12.1	25.1
F120	General Population	metropolitan	19	11	29.2	34	17	15	30	15	29	18	11	25.1
F121	General Population	metropolitan	19	10	24.2	35	16	15	18.1	14	26	21	13	29
F125	General Population	metropolitan	17	12	26.2	34	16	14	17.1	15	27	16	12	27.1
F130	General Population	metropolitan	19	12	29.2	30	8	12	17	14	30	19	11	25.1
F135	General Population	metropolitan	20	10	30.2	34	15	14	21	16	29	19	13	20
F138	General Population	metropolitan	19	12	30.2	33	8	15	21	14	30	20	14	26.1
F139	General Population	metropolitan	20	12	29.2	36	16	14	27	14	31	21	12	39.1
F140	General Population	metropolitan	18	12	31	39.3	8	14	18	14	39.2	21	13	27.1
F141	General Population	metropolitan	16	11	28.2	36	18	13	21	14	43.2	20	12	28.1
F142	General Population	metropolitan	19	12	30.2	36	7	13	24	14	31	20	12	23.1
F167	General Population	metropolitan	19	13	28	33	15	13	20	15	31	19	14	26.1
F178	General Population	metropolitan	19	11	30.2	35	18	14	34	14	29	21	13	19
F185	General Population	metropolitan	19	12	29	30	16	15	17	16	38.2	17	13	25.1
F192	General Population	metropolitan	18	12	30	39	19	14	20.1	13	29	14	14	18
F195	General Population	metropolitan	19	12	30.2	36	16	15	25	15	28	17	15	25.1
F196	General Population	metropolitan	17	12	31	36	16	15	27	14	29	19	13	26.1
F197	General Population	metropolitan	21	11	29.2	36	20	14	20.1	14	28	20	12	18
F198	General Population	metropolitan	19	10	31.2	38.3	18	16	30	14	28	21	14	18
F199	General Population	metropolitan	17	10	35	35	13	15	30	15	29	0	15	0
F201	General Population	metropolitan	20	12	30.2	35	17	14	17	17	44.2	22	13	31
F202	General Population	metropolitan	20	10	29.2	37.3	16	14	22	15	36.2	20	12	27.1
F203	General Population	metropolitan	16	10	32	37	8	13	19	17	25	17	13	25.1
F205	General Population	metropolitan	20	11	29.2	35	17	15	26	16	30	19	13	25.1
F207	General Population	metropolitan	16	10	32	37	7	14	19	16	24	19	15	25.1
F208	General Population	metropolitan	17	10	31	35	16	13	25	13	29	19	16	19
F210	General Population	metropolitan	19	10	24.2	39	8	14	25	15	34.2	18	12	24.1
F211	General Population	metropolitan	17	11	30	35	18	14	21	14	27	19	14	27.1
F213	General Population	metropolitan	15	10	33	33	15	16	27	14	29	22	14	29.1
F214	General Population	metropolitan	18	12	31	33	7	13	19	16	43.2	20	17	25.1
F215	General Population	metropolitan	18	11	29.2	35	18	15	20.1	14	30	15	11	26.1
F217	General Population	metropolitan	16	11	31	34	8	14	22	14	45.2	15	14	25.1
F219	General Population	metropolitan	16	10	33	36	17	15	30	15	38.2	21	13	25.1
F220	General Population	metropolitan	20	10	27.2	39	15	13	21	14	27	18	13	25.1
F221	General Population	metropolitan	19	12	30.2	34	8	13	19	15	28	19	11	25.1
F222	General Population	metropolitan	19	8	27.2	35	17	14	26	16	29	21	13	26.1
F223	General Population	metropolitan	17	10	35	35	16	14	30	15	29	16	15	25.1

F225	General Population	metropolitan	17	11	28.2	37	15	15	25.1	15	28	13	13	13.3
F226	General Population	metropolitan	18	10	29	37	14	0	18	15	36.2	21	13	28.1
F227	General Population	metropolitan	17	10	32	37	17	14	25	16	44.2	19	14	26.1
F229	General Population	metropolitan	20	12	30	36	8	15	23.1	15	30	22	13	18
F230	General Population	metropolitan	18	10	32	32	7	15	26	15	30	19	15	28.1
F232	General Population	metropolitan	19	11	29.2	37	16	16.3	22	14	30	21	11	23
F233	General Population	metropolitan	17	11	31	36	14	14	22.1	14	34.2	21	14	23
F234	General Population	metropolitan	18	10	31	34	18	13	30	15	27	21	12	24
F235	General Population	metropolitan	16	11	29.2	36	17	14	0	14	26	21	11	27.1
F236	General Population	metropolitan	16	12	29.2	36	17	14	27	15	29	16	13	23
F237	General Population	metropolitan	18	10	31.2	37	17	15	26	15	44.2	18	11	24
F238	General Population	metropolitan	16	12	32	36	17	12	23	15	25	17	15	24.1
F335	General Population	metropolitan	18	12	31	35	16	14	25	16	27	18	13	17
N003	General Population	metropolitan	19	11	28.2	31	8	12	19	15	29	19	13	25.1
N005	General Population	metropolitan	16	11	35	34.2	16	14	32	14	24	18	14	27.2
N010	General Population	metropolitan	20	13	28.2	35	8	14	31	14	28	17	13	26.1
N011	General Population	metropolitan	17	13	32	38.3	17	15	27	15	39.2	21	13	23.1
N012	General Population	metropolitan	20	10	29.2	38	16	13	19.1	16	30	18	11	29.1
N014	General Population	metropolitan	16	10	33	37	15	15	25	15	27	14	13	18
N015	General Population	metropolitan	20	10	31	39	16	13	28	15	29	19	13	26.1
N016	General Population	metropolitan	19	11	29.2	34	19	14	22.1	15	40.2	18	13	18
N017	General Population	metropolitan	16	10	31	34	7	14	21.1	16	29	18	13	26.1
N018	General Population	metropolitan	18	12	30.2	34	18	15	16	15	44.2	15	9	28.1
N019	General Population	metropolitan	20	10	31.2	35	13	13	22.2	15	27	21	13	27.1
N020	General Population	metropolitan	19	13	28	36	8	12	23	15	29	19	12	18
N021	General Population	metropolitan	18	12	31.2	36	13	14	21.1	17	29	20	14	20
N023	General Population	metropolitan	19	11	31	38.3	10	13	22	14	43.2	20	14	24.1
N024	General Population	metropolitan	17	11	31	35	16	15	22	15	25	19	13	18
N026	General Population	metropolitan	16	11	34	39	13	12	30	14	29	21	15	25.1
N027	General Population	metropolitan	18	11	31.2	35.1	19	15	25	17	28	20	14	24.1
N028	General Population	metropolitan	16	11	28	34	8	13	19.1	14	27	18	10	41.1
N029	General Population	metropolitan	16	10	32	38	16	14	23	14	29	22	14	26.1
N030	General Population	metropolitan	18	14	31.2	35	18	12	24	14	42.2	19	12	27.1
N031	General Population	metropolitan	19	10	29	37	13	15	23	15	29	20	14	23.1
N032	General Population	metropolitan	17	11	33	36	16	14	22	15	28	20	14	23
N033	General Population	metropolitan	19	10	30	34	16	12	25	15	31	18	16	17.1
N035	General Population	metropolitan	17	11	31.2	34	20	13	22	15	31	21	12	26.1
N036	General Population	metropolitan	19	10	28	36	17	13	29	17	30	19	12	29.1
N038	General Population	metropolitan	19	12	29.2	34	16	13	28	16	26	18	11	28.2
N040	General Population	metropolitan	18	11	31	30	12	13	20	16	33	19	10	25.1
N041	General Population	metropolitan	17	10	31	35	18	12	23	14	43.2	17	13	18
N044	General Population	metropolitan	20	13	30.2	36	15	13	24	15	30	19	13	27.1
N045	General Population	metropolitan	19	12	33	36	19	15.3	21	14	27	19	13	30.1
N046	General Population	metropolitan	19	10	29	32	19	13	29	15	29	21	13	25.1
N047	General Population	metropolitan	20	11	28.2	38	15	13	22	14	28	19	13	27.1
N049	General Population	metropolitan	19	12	30.2	38	20	12	21	16	30	19	12	26.1

N050	General Population	metropolitan	20	10	34	34	12	14	19.1	15	23	20	12	28.1
N052	General Population	metropolitan	18	11	31.2	37	15.2	16	18	15	27	21	14	18
N054	General Population	metropolitan	18	11	31	40	17	14	21	15	45.2	22	12	18
N055	General Population	metropolitan	19	10	32	36	18	15	20	13	29	14	14	18
N058	General Population	metropolitan	17	10	31	37	8	13	21.1	13	26	19	14	25.1
N062	General Population	metropolitan	19	13	29	33	16	13	20.1	14	28	22	13	18
N064	General Population	metropolitan	19	13	30.2	36	12	15	28	15	28	19	13	31.1
N067	General Population	metropolitan	19	12	30	32	16	12	29	15	31	20	12	27.1
N070	General Population	metropolitan	18	12	31.2	35	13	15	25	15	26	22	14	19
N075	General Population	metropolitan	16	12	30.2	36	16	14	22	15	27	17	12	25
N078	General Population	metropolitan	16	12	33	37	13	13	20	14	25	20	13	29.1
N083	General Population	metropolitan	20	11	31.2	37	19	16	28	15	43.2	20	12	30.1
N089	General Population	metropolitan	19	12	30.2	37	18	14	28	15	28	19	15	25.1
N090	General Population	metropolitan	18	13	29.2	35	18	18.3	23	15	30	21	12	18
N091	General Population	metropolitan	18	12	33	33	13	13	25	14	24	18	11	17
N092	General Population	metropolitan	18	10	28.2	34	17	14	29	15	40.2	19	11	25.1
N094	General Population	metropolitan	19	10	28	29	19	15	22	16	31	19	13	26.1
N095	General Population	metropolitan	20	11	29.2	39.3	16	16	18	14	25	19	13	13.3
N099	General Population	metropolitan	17	11	32	35	13	15	22.1	14	34	17	13	19
N100	General Population	metropolitan	19	10	32.2	37	16	15	25	15	28	21	12	24.1
N105	General Population	metropolitan	18	12	36	38.3	14	14	32	15	25	20	14	25.1
N108	General Population	metropolitan	18	11	30.2	36	17	12	27	15	29	19	9	25.1
N109	General Population	metropolitan	20	12.2	29.2	37	17	16.3	26	15	30	21	14	18
N110	General Population	metropolitan	19	11	31	38	19	16.3	22	14	27	22	14	23
N111	General Population	metropolitan	15	10	31	36	19	15	23	16	39.2	21	15	26.1
N112	General Population	metropolitan	16	11	30.2	38	19	16.3	23	14	27	22	13	23
N113	General Population	metropolitan	19	10	32	36	18	13	20	17	25	24	13	25.1
N114	General Population	metropolitan	18	12	34	37	11	11	21	15	45.2	19	15	18
F22	General Population	North	19	11	29.2	37	14	13	24.1	15	43.2	20	13	21.1
F33	General Population	North	16	12	32	38	17	13	18.1	15	29	21	13	25.1
F61	General Population	North	18	11	30.2	37	17	13	29	14	30	20	13	25.1
F63	General Population	North	19	11	28	31	7	12	25	14	35.2	18	12	26.1
F64	General Population	North	18	12	29	30	14	14	18	8	27	20	15	39
F65	General Population	North	18	10	30	36	17	15	18	15	25	18	13	26.1
F83	General Population	North	17	13	33	35	17	13	26	14	27	19	13	27.1
F86	General Population	North	19	10	28	36	16	12	25	14	28	21	13	18
F98	General Population	North	17	12	30.2	35	16	15	27	15	27	19	13	25.1
F117	General Population	North	19	11	31.2	35	8	16	23	16	41.2	20	13	29.1
F153	General Population	North	19	12	28.2	36	16	14	21	15	28	21	11	18
F158	General Population	North	16	10	32.2	37	15	13	25	17	27	18	12	16
F162	General Population	North	17	10	31	40.3	13	15	21	16	40.2	22	14	24
F173	General Population	North	16	11	33	36	8	17	19	14	29	0	14	27.1
F180	General Population	North	17	11	32	36	7	15	22	12	33	20	13	0
F186	General Population	North	19	10	28	42.3	16	14	19	15	42.2	20	12	26.1
F212	General Population	North	18	10	30	35	16	16	24	14	26	20	14	24.1
F239	General Population	North	16	12	31	36	15	14	20.1	14	25	21	13	26.1

F242	General Population	North	18	13	34	30	19	14	18	14	30	20	11	26.1
F243	General Population	North	19	10	33	37	17	14	22	14	41.2	18	9	24
F247	General Population	North	18	11	31.2	36	7	15	25	16	25	18	12	13.3
F248	General Population	North	16	10	33	35	8	16	17.1	16	28	19	13	18
F249	General Population	North	17	11	31	37	17	13	21.1	14	25	20	13	20.1
F251	General Population	North	19	10	31.2	34	19	14	23	13	28	19	13	18
F252	General Population	North	19	12	24.2	36	18	16	19.1	16	27	19	12	13.3
F253	General Population	North	18	10	28.2	36	18	14	22	14	27	22	10	31
F254	General Population	North	19	12	28.2	36	15	13	21	15	29	20	10	25
F256	General Population	North	20	9	31	33	13	14	33	16	37.2	19	12	23
F258	General Population	North	19	12	29.2	35	15	12	28	15	31	20	11	25.1
F259	General Population	North	18	12	30.2	36	19	15	27	14	28	20	12	30.1
F260	General Population	North	16	11	34	31	8	15	20	15	38.2	20	14	26.1
F261	General Population	North	16	12	32	38	16	14	22	15	29	19	15	30.1
F263	General Population	North	19	11	31.2	37	18	14	29	15	30	20	14	18
F264	General Population	North	19	11	29	41.3	14	11	22	16	29	19	13	24.1
F265	General Population	North	16	12	33	39.3	18	14	24	14	26	20	14	23
F266	General Population	North	19	10	29.2	36	8	14	21	15	29	18	12	25.1
F268	General Population	North	18	12	33	35	16	13	18	15	28	20	15	40.1
F269	General Population	North	18	13	32	35	16	14	21	15	28	22	11	18
F270	General Population	North	19	10	29	38	16	15	21	14	26	19	13	26.1
F272	General Population	North	18	10	31.2	41.3	13	14	26	15	32	19	12	40.1
F273	General Population	North	19	11	30.2	40.3	14	13	21.1	15	43.2	20	14	42.1
F275	General Population	North	18	12	32	36	17	13	26	14	30	21	13	29.1
F276	General Population	North	18	12	31.2	36	15	13	26	15	36.2	21	14	26.1
F277	General Population	North	17	11	33	34	17	12	23	14	29	19	13	25.1
F278	General Population	North	19	13	29.2	37.3	18	16.3	32	17	23	22	11	30.1
F281	General Population	North	20	10	31.2	37	17	14	29	14	26	20	13	24.1
F282	General Population	North	18	10	30	36	18	13	29	15	27	20	13	26
F283	General Population	North	21	11	28	34	16	14	27	16	30	19	12	23
F285	General Population	North	19	11	30.2	39	13	14	23	13	31	23	11	24.1
F286	General Population	North	19	12	28.2	35	7	13	27	14	31	21	12	25.1
F288	General Population	North	19	10	30	37	17	13	28	15	26	18	12	27.1
F289	General Population	North	20	10	29.2	35	16	14	17	13	41.2	20	13	26.1
F291	General Population	North	21	11	31	41.3	13	14	22	16	42.2	22	14	23.1
F292	General Population	North	19	10	29	35	14	15	22.1	15	41.2	19	13	26.1
F293	General Population	North	18	12	29.2	38	19	15	20	14	32	20	12	30
F294	General Population	North	19	11	32.2	38	7	15	22	14	40.2	20	12	40.1
F296	General Population	North	20	12	28	36	17	14	18	14	34	20	12	40.1
F297	General Population	North	20	11	31.2	35	18	14	20	15	30	19	12	24.1
F298	General Population	North	20	10	29.2	35	16	14	17	13	41.2	20	13	26.1
F301	General Population	North	18	12	29.2	35	14	15	20	17	28	20	11	26.1
F303	General Population	North	19	12	31	33	14	15	26	14	28	21	14	25.1
F304	General Population	North	18	11	32	34	12	13	16	14	25	19	13	18
F305	General Population	North	19	10	30	36	7	12	21	14	30	20	13	26.1
F306	General Population	North	19	10	29.2	35	14	15	27	15	26	19	11	26.1

F307	General Population	North	19	13	29	38	18	15	24	13	28	21	13	26.1
F308	General Population	North	19	11	30	37	15	16	20.1	14	35.2	18	13	28.1
F309	General Population	North	20	10	32	34	7	12	22	14	29	19	14	25.1
F310	General Population	North	18	11	33	36	16	14	21	13	29	21	11	30
F312	General Population	North	18	12	30	36	7	13	25	14	28	17	13	29
F313	General Population	North	18	10	31.2	35	19	15	21	14	28	20	15	19
F314	General Population	North	20	10	27.2	34	16	14	19	14	34.2	20	14	25.1
F316	General Population	North	19	12	30.2	36	18	13	19.1	15	29	19	15	25.1
F317	General Population	North	16	12	32	35	15	16	19	16	28	20	16	18
F318	General Population	North	19	10	31	36	15	14	22	14	25	20	12	28.1
F319	General Population	North	17	10	31	35	16	13	27	14	28	20	14	18
F322	General Population	North	21	11	30	37	15	14	21.1	15	31	19	9	13.3
F323	General Population	North	17	10	29	33	17	12	15	16	29	22	15	23.1
F324	General Population	North	18	11	31.2	33	17	15	17.1	16	28	19	13	18
F325	General Population	North	17	11	31	35	8	12	23	16	29	19	14	27.1
F327	General Population	North	19	12	31	37.2	15	14	26	14	42.2	23	9	41.1
F329	General Population	North	19	12	28.2	35	9	12	23	16	40.2	20	12	24.1
F332	General Population	North	17	12	31	38	18	14	31	14	30	20	13	25.1
F333	General Population	North	19	12	29.2	35	18	14	22.1	14	28	19	12	26.1
F334	General Population	North	19	12	30	37	12	16	36.2	14	41.2	19	14	20
F337	General Population	North	19	10	33	37	16	12	21.1	13	25	20	11	17
F338	General Population	North	19	10	32	35	10	15	22	13	36.2	21	15	26.1
F339	General Population	North	18	10	28.2	37	14	12	23	15	30	20	12	23.1
F341	General Population	North	16	11	32	39.3	17	12	23	15	26	15	13	27.1
F342	General Population	North	18	10	32	39	8	13	18	13	39.2	18	13	26.1
F344	General Population	North	18	10	30	37	18	14	20	15	30	20	13	24.1
F345	General Population	North	19	10	32	36	8	15	20	15	44.2	19	14	25.1
F346	General Population	North	19	11	29.2	39.3	14	12	21	15	40.2	19	11	42.1
F347	General Population	North	18	10	35	38	7	13	19.1	15	33	21	11	20
F348	General Population	North	19	11	28	36	18	13	20	14	27	18	12	27.1
F349	General Population	North	16	10	30	33	18	13	?	15	29	19	12	22.1
F350	General Population	North	16	11	31	36	18	13	30	16	25	19	13	19
F27	General Population	South	18	13	31.2	36	19	14	33	14	32	22	13	25.1
F40	General Population	South	19	10	32.2	35	18	14	23	15	27	19	13	28.1
F41	General Population	South	20	12	31.2	38	16	13	26	15	43.2	19	14	26.1
F55	General Population	South	19	10	32.2	35	14	13	28	14	47.2	19	12	17
F59	General Population	South	19	10	29.2	30	17	13	23	14	30	15	12	28.1
F68	General Population	South	20	12	28.2	35	17	12	21	16	27	19	13	25.1
F71	General Population	South	19	10	27.2	37	16	12	17	14	43.2	22	12	22
F78	General Population	South	19	10	32	35	16	14	20.1	14	29	22	13	24.1
F81	General Population	South	19	12	32	36	15	12	19	15	40.2	19	12	28.1
F82	General Population	South	19	10	33	37	12	13	19	14	29	19	13	18
F87	General Population	South	19	11	30.2	34	8	16	26	14	30	20	14	18
F90	General Population	South	19	11	28	37	8	13	22.1	13	28	18	14	41.1
F95	General Population	South	21	11	30.2	34	14	13	21	16	31	20	14	40.1
F102	General Population	South	19	10	30.2	38	17	13	18	15	29	20	11	23.1

F104	General Population	South	18	10	30	37	17	13	21	14	27	19	15	18
F107	General Population	South	19	11	26	36	18	13	20.1	15	41.2	16	13	25.1
F108	General Population	South	21	10	27.2	38	16	13	19	14	27	21	12	18
F109	General Population	South	16	12	33	36	18	14	27	15	43.2	14	12	28.2
F110	General Population	South	19	12	29.2	40.3	17	14	17	16	40.2	20	13	23.1
F111	General Population	South	16	12	32	41.3	13	15	30	15	42.2	20	12	18
F112	General Population	South	17	11	31	33	18	15	18.1	16	29	20	15	18
F113	General Population	South	19	12	32	34	17	15	24	15	31	19	14	19
F114	General Population	South	17	11	30	36	16	13	27	14	28	19	15	18
F116	General Population	South	18	11	30	37	16	15	18	15	26	19	13	24.1
F118	General Population	South	20	12	32	37	8	15	20.1	13	27	20	12	26.1
F122	General Population	South	19	12	31.2	37	17	15	21	13	27	19	13	27.2
F123	General Population	South	19	12	30.2	39.2	11	14	21.1	14	41.2	20	11	24.1
F124	General Population	South	21	12	30.2	35	11	14	27	15	39.2	22	13	26.1
F126	General Population	South	16	11	30	36	8	16	24	16	25	17	13	24.1
F127	General Population	South	19	12	29	37.3	18	13	29	17	29	19	13	26.1
F128	General Population	South	18	11	32	40.3	17	16	23	15	29	20	13	24.1
F129	General Population	South	20	10	29.2	37	8	15	32	15	30	18	13	24.1
F131	General Population	South	17	11	32	34	17	15	19	14	28	15	15	18
F132	General Population	South	19	10	31.2	37	19	14	23	14	27	17	13	24.1
F133	General Population	South	19	12	30.2	36	19	16	21.1	15	38.2	20	12	18
F134	General Population	South	19	12	30.2	33	8	15	21	14	30	20	14	26.1
F137	General Population	South	20	11	28	34	8	15	20	15	27	18	12	25.1
F143	General Population	South	17	10	29	33	7	15	26	14	29	19	13	25.1
F144	General Population	South	18	10	30.2	38	15	16	27	15	27	18	13	27.1
F147	General Population	South	19	12	28.2	38	16	12	30	16	28	18	12	23
F151	General Population	South	19	13	29	36	15	16	26	17	44.2	18	12	24.1
F152	General Population	South	18	12	29.2	36	18	13	25	15	26	20	11	25.1
F154	General Population	South	18	10	30	34	14	14	19.1	16	28	20	14	27.1
002A	General Population	South	17	13	30	33	18	14	26	15	28	19	13	26.1
009A	General Population	South	20	12	31	33	14	14	20.1	14	38.2	19	13	27
088A	General Population	South	18	10	27.2	34	8	15	29	14	29	21	11	25.1
095A	General Population	South	19	10	28	39	8	13	25	15	41.2	19	12	24.1
098A	General Population	South	18	11	32	34	17	13	22	15	27.3	20	12	18
107A	General Population	South	19	11	30.2	41.3	16	13	28	15	38.2	19	12	25.1
112A	General Population	South	19	11	28.2	40.3	17	13	19.1	16	44.3	20	13	24.1
124A	General Population	South	16	12	32	37.3	16	12	22	16	30	21	14	27
132A	General Population	South	18	11	30	36	15	16.3	21	15	29	21	13	19
141A	General Population	South	15	11	32	33	18	13	24	14	24	20	13	18
147A	General Population	South	19	12	30.2	38	18	12	29	16	41.2	18	12	24
161A	General Population	South	19	13	31.2	40.3	16	13	32	15	43.2	18	13	24.1
164A	General Population	South	19	11	28	36	16	14	28	14	30	18	12	21.1
180A	General Population	South	20	11	28	39	16	14	28	14	32	18	12	21.1
183A	General Population	South	18	11	32	41.3	15	15	32	15	38.2	20	14	25.1
188A	General Population	South	17	10	31.2	39	18	13	18.1	14	32	22	12	13.3
190A	General Population	South	20	11	28	39	16	14	28	14	32	18	12	21.1

192A	General Population	South	18	12	28	34	16	13	25	13	38.2	21	12	23.1
199A	General Population	South	18	12	30.2	33	18	14	31	14	38.2	20	11	28.1
204A	General Population	South	19	10	32	37	18	14	23	14	30	20	13	18
209A	General Population	South	18	10	31	36.2	16	16	21	16	28	20	13	18
214A	General Population	South	18	12	30.2	33	18	14	20	14	38.2	20	11	25.1
221A	General Population	South	19	11	28.2	37	18	14	33	14	26	22	13	26.1
223A	General Population	South	19	10	28	37	18	15	28	15	28	20	13	27.1
229A	General Population	South	19	11	30.2	36	16	15	29	15	29	21	12	18
247A	General Population	South	15	10	33	37.3	17	15	30	14	29	20	14	25
255A	General Population	South	19	10	28	38	17.2	15	23	15	29	20	12	18
258A	General Population	South	19	10	30.2	39.3	16	13	15	14	44.2	20	12	24.1
260A	General Population	South	18	12	31.2	36	18	15	22	14	39.2	14	12	18
273A	General Population	South	18	12	32	35	16	13	27	16	26	16	14	22.1
277A	General Population	South	21	11	30.2	37	12	12	27	14	28	21	12	26.1
279A	General Population	South	19	11	28	36	8	15	24	14	27	20	12	26.1
287A	General Population	South	18	10	31	41.3	17	11	20	16	28.1	20	14	18
289A	General Population	South	19	10	30.2	40.3	15	13	25.1	15	43.2	21	11	27.1
293A	General Population	South	19	12	29.2	38	18	12	29	15	28	19	12	24.1
299A	General Population	South	18	10	30	40.3	15	14	20	15	43.2	20	13	25.1
319A	General Population	South	18	12	32	42.3	7	14	18	15	26	19	13	18
331A	General Population	South	15	12	31	36	8	13	23	14	31	20	13	27.1
337A	General Population	South	19	10	33	37	16	12	21.1	13	25	20	11	17
339A	General Population	South	20	11	34	38.3	8	15		15	39.2	20	14	26.1
344A	General Population	South	19	12	27.2	34	17	14	31	15	28	16	11	30.1
348A	General Population	South	19	13	28.2	39	18	14	31	15	28	20	10	25.1
385A	General Population	South	21	12	30.2	30	17	15	19	15	31	21	12	18
396A	General Population	South	16	12	31	39	15	13	20	15	41.2	21	13	26.1
399A	General Population	South	19	10	32.2	45.3	17	12	21	16	42.2	19	11	24.1
403A	General Population	South	19	11	31.2	32	7	13	28	14	29	20	13	18
406A	General Population	South	19	12	29.2	37	19	14	17	14	29	17	12	27.1
407A	General Population	South	19	11	30.2	37	17	14	27	14	36.2	20	11	26
410A	General Population	South	19	10	29	39.3	15	14	21	15	30	17	12	29.1
413A	General Population	South	19	11	30.2	37	18	15	27	14	36.2	20	11	26.1
427A	General Population	South	17	10	31	38	16	13	22.1	15	30	21	14	25
436A	General Population	South	16	12	33	36	16	14	22	17	24	19	13	24
440A	General Population	South	19	11	30	36	16	14	20	17	28	19	14	25
448A	General Population	South	18	11	28.2	35	16	16.3	28	14	28	14	11	27.1
450A	General Population	South	19	10	32	37	8	14	21	13	27	17	13	25.1
452A	General Population	South	20	14	29	36	17	15	24	16	25	19	12	25.1
456A	General Population	South	17	11	32	37	16	16	25	17	28	20	13	22.1
463A	General Population	South	20	12	32	36	18	16.3	21	14	29	21	11	24.1
470A	General Population	South	19	9	33	32	8	14	22	14	45.2	21	12	23.1
475A	General Population	South	19	12	29.2	34	8	15	30	15	29	19	11	25.1
482A	General Population	South	18	11	30	36	18	15	30	14	31	21	12	24.1
485A	General Population	South	19	10	31.2	38.3	16	13	20	14	40.2	19	13	26.1
493A	General Population	South	19	11	33.2	41.3	16	13	21	15	39.2	20	13	18

495A	General Population	South	19	9	29.2	37	15	14	21	15	30	18	12	24.1
503A	General Population	South	19	12	28.2	36	16	13	23	17	30	21	13	18
515A	General Population	South	17	10	30	35	7	15	18	14	28	20	15	27
518A	General Population	south	19	10	29.2	32	17	15	23.1	15	30	21	12	24.1
520A	General Population	South	18	10	31.2	41.3	17	15	19	16	40.2	21	12	23.1
528A	General Population	South	19	12	29.2	43.3	19	15	26	14	46.2	21	12	26.1
541A	General Population	South	18	10	34	40	16	13	18.1	15	34.2	19	11	13.3
557A	General Population	South	16	10	27.2	37	16	13	25	14	25	18	13	26.1
578A	General Population	South	19	10	28.2	34	15	14	23	15	30	22	14	26.1
IP001	Pomeranian	Central	19	11	29.2	36	15	13	20	15	44.2	20	12	25.1
IP004	Pomeranian	metropolitan	19	12	30.2	37	17	13	24	15	39.2	20	12	25.1
IP005	Pomeranian	metropolitan	19	12	30.2	33	8	14	30	14	33	20	13	18
IP008	Pomeranian	metropolitan	17	9	31	37	15	13	20.1	16	43.2	20	13	18
IP010	Pomeranian	metropolitan	19	10	33.2	37	17	16	23	15	26	15	13	24.1
IP012	Pomeranian	metropolitan	19	12	31.2	37	17	14	25	15	26	16	14	18
IP013	Pomeranian	metropolitan	18	11	29.2	36	8	14	30	16	30	18	13	24.1
IP018	Pomeranian	Central	16	11	29	36	18	13	22	15	29	20	14	26.1
IP021	Pomeranian	metropolitan	19	11	32.2	36	16.2	15	23	14	27.3	20	13	24
IP025	Pomeranian	metropolitan	19	11	33.2	36	18	13	28	15	25	20	14	24.1
IP026	Pomeranian	metropolitan	19	11	27.2	35	16	12	25	14	29	18	13	25.1
IP038	Pomeranian	metropolitan	17	12	33	35	18	14	19	15	26	19	16	25
IP039	Pomeranian	North	19	10	31	36	17	14	21	15	31	18	14	13.3
IP040	Pomeranian	metropolitan	19	12	29.2	34	8	14	24	14	29	19	12	23
IP045	Pomeranian	North	18	10	31	41.3	18	13	23	16	40.2	18	15	18
IP048	Pomeranian	metropolitan	20	12	29.2	36	16	13	21.1	15	28	20	11	18
IP049	Pomeranian	metropolitan	17	10	32	40.3	7	13	24	15	28	19	12	25.1
IP050	Pomeranian	metropolitan	19	12	28.2	39.3	8	12	21.1	14	43.2	18	12	25.1
048P	Pomeranian	metropolitan	18	13	32	35	16	14	21	15	28	22	11	18
069P	Pomeranian	metropolitan	19	12	30.2	34	16	13	21	15	39.2	17	12	22.1
071P	Pomeranian	metropolitan	19	10	31	36	16	12	23	14	27	19	12	18
072P	Pomeranian	metropolitan	18	11	32	36	15	14	27	14	28	22	14	18
073P	Pomeranian	metropolitan	19	11	31	34	13	14	26	15	28	20	12	23
074P	Pomeranian	metropolitan	19	10	29.2	36	18	15	24	16	26	19	13	0
082P	Pomeranian	metropolitan	17	11	32	36	17	14	24	14	27	17	14	20
085P	Pomeranian	metropolitan	19	12	31.2	35	8	13	25	15	28	20	12	18
109P	Pomeranian	metropolitan	19	11	30.2	34	8	13	29	16	26	20	13	26.1
116P	Pomeranian	metropolitan	19	10	31.2	35	16	13	19	15	27	19	14	22.1
124P	Pomeranian	metropolitan	16	10	30	35	16	14	20	15	29	21	11	25.1
125P	Pomeranian	metropolitan	20	11	31.2	37	17	13	26	14	25	20	14	18
126P	Pomeranian	metropolitan	18	10	28.2	35	17	15	20	14	30	19	11	30.1
127P	Pomeranian	metropolitan	19	10	28.2	36	7	14	30	14	26	18	11	18
128P	Pomeranian	metropolitan	19	10	30.2	38	16	14	19	13	25	20	12	28.1
129P	Pomeranian	metropolitan	17	11	30	37	16	14	20	16	25	21	13	26.1
130P	Pomeranian	metropolitan	16	11	28.2	37	18	14	21	14	28	19	13	26.1
131P	Pomeranian	metropolitan	19	12	29.2	37	15	13	26	13	28	22	14	26.1
132P	Pomeranian	metropolitan	20	10	31.2	36	16	14	21.1	13	31	20	15	25.1

133P	Pomeranian	metropolitan	20	12	31.2	31	16	14	26	15	27	19	13	28.1
134P	Pomeranian	metropolitan	18	11	30.2	38	18	13	25	15	28	18	9	29.1
135P	Pomeranian	metropolitan	19	10	31	35	17	12	20	16	27	18	13	31.1
136P	Pomeranian	metropolitan	19	10	30.2	36	16	14	20	14	27	20	13	25.1
137P	Pomeranian	metropolitan	18	11	28.2	40.3	18	15	25	15	29	20	11	26.1
138P	Pomeranian	metropolitan	18	12	29.2	36	16	12	19	13	29	18	12	18
139P	Pomeranian	metropolitan	16	11	33	38	18	13	20	14	27	15	13	27.1
140P	Pomeranian	metropolitan	17	12	30	36	16	14	30	14	28	21	15	25.1
141P	Pomeranian	metropolitan	18	10	32	34	8	15	26	13	44.2	20	13	24.1
142P	Pomeranian	metropolitan	16	10	30	35	16	14	20	14	41.2	15	12	24
143P	Pomeranian	metropolitan	17	10	32	36	17	13	21	13	29	19	13	24.1
144P	Pomeranian	metropolitan	18	11	32	38	8	14	21	15	29	20	14	27.1
145P	Pomeranian	metropolitan	19	10	28.2	37	16	15	21.1	15	26	20	11	26.1
146P	Pomeranian	metropolitan	18	11	29.2	36	?	14	26	13	29	20	12	26.1
147P	Pomeranian	metropolitan	19	11	27.2	36	7	15	25	13	30	21	12	27.1
148P	Pomeranian	metropolitan	16	10	32	35	17	13	26	15	43.2	23	12	23.1
149P	Pomeranian	metropolitan	18	11	28.2	37	17	15	21	13	30	19	11	19
150P	Pomeranian	metropolitan	16	10	35	35	17	13	22	15	46.2	19	14	18
151P	Pomeranian	metropolitan	17	10	32	40.3	16	14	20	15	28	20	12	25.1
152P	Pomeranian	metropolitan	18	12	28.2	34	16	15	19	13	26	21	11	27.1
153P	Pomeranian	metropolitan	18	12	32	38	16	14	18	15	28	20	14	28.1
154P	Pomeranian	metropolitan	18	11	31.2	36	16	14	21	14	27	19	13	27.1
155P	Pomeranian	metropolitan	19	10	29	38	17	14	32	14	36.2	21	14	31
156P	Pomeranian	metropolitan	19	10	29.2	35	17	14	27	16	41.2	18	13	26.1
157P	Pomeranian	metropolitan	19	11	30.2	35	18	13	27	15	39.2	22	11	19
158P	Pomeranian	metropolitan	18	11	28.2	36	16	15	21	13	26	19	12	18
159P	Pomeranian	metropolitan	20	10	29.2	37	17	14	22	14	29	22	13	27.1
161P	Pomeranian	metropolitan	18	11	24.2	41.3	17	13	16	15	28	20	12	17
162P	Pomeranian	metropolitan	16	12	30.2	37	13	11	24	16	26	20	12	27.1
163P	Pomeranian	metropolitan	19	10	30.2	36	16	15	19.1	15	26	18	13	18

ANEXO 1 – Certificado de publicação do artigo 1: *Forensic applications of markers presente on the X chromossome.*
(Requisito para defesa – revista *qualis* A2)


genes
 an Open Access Journal by MDPI





CERTIFICATE OF PUBLICATION

Certificate of publication for the article titled:
Forensic Applications of Markers Present on the X Chromosome

Authored by:
 Fernanda M. Garcia; Bárbara G. O. Bessa; Eldamária V. W. dos Santos; Julia D. P. Pereira; Lyvia N. R. Alves; Lucas A. Vianna;
 Matheus C. Casotti; Raquel S. R. Trabach; Victor S. Stange; Débora D. Meira; Iuri D. Louro

Published in:
Genes **2022**, Volume 13, Issue 9, 1597


 Academic Open Access Publishing
 since 1996
 Basel, February 2023

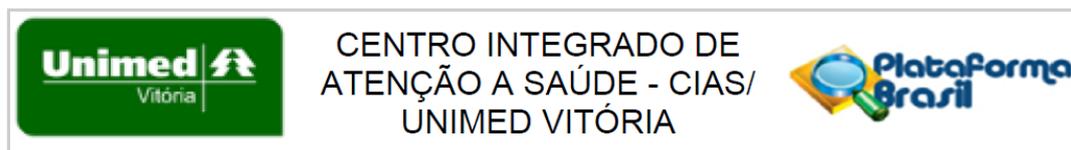
ANEXO 2 – Comprovante de submissão do artigo 2: *Analysis of 12 X-STRs loci in a population from southeastern Brazil.*
(artigo sob revisão)

Forensic Science International: Genetics
Analysis of 12 X-STRs loci in a population from southeastern Brazil
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	FSIGEN-D-22-00310
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Forensic Population Genetics
Keywords:	Argus X-12; haplotype frequency; allele frequency; Brazilian population
Corresponding Author:	Fernanda Mariano Garcia, Master Federal University of Espirito Santo BRAZIL
First Author:	Fernanda Mariano Garcia, Master
Order of Authors:	Fernanda Mariano Garcia, Master Raquel S. R. Trabach, Doctor Victor S. Stange, Doctor Bruno C. de Araujo, Doctor Matheus C. Casotti Débora D. Meira, Doctor Elizeu F. Carvalho, Doctor Leonor Gusmão, Doctor Íuri D. Louro, Doctor
Abstract:	Short tandem repeat (STR) markers present on the X chromosome have high potential for solving complex cases of kinship analysis and individual identification. To achieve such purposes, allele and haplotype frequencies for the specific population are necessary. Nonetheless, such frequencies are not always available. Therefore, we obtained haplotypes from 530 unrelated males from four different geographic regions of Espirito Santo – Brazil, using the Investigator Argus X-12 kit. Forensic parameters for linked groups of four X-STR loci are reported.
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	

Ativar o Wiir

ANEXO 3 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de viabilidade da implementação de novos marcadores moleculares forenses na rotina da Polícia Civil do ES.

Pesquisador: LAUZIENE ANDRADE SOARES

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 79664817.4.0000.5061

Instituição Proponente: DNALAB CONSULTORIA GENETICA E EXAMES LABORATORIAIS LTDA - ME

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESPIRITO SANTO - FAPES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.547.343

Apresentação do Projeto:

Esta pesquisa consistirá em um estudo observacional de corte transversal. O estudo dos marcadores moleculares forenses mtDNA, X-STRs e Y-STRS será realizado por meio do levantamento de suas frequências haplotípicas com base em 650 indivíduos não aparentados (250 mulheres e 400 homens) nascidos nas 4 macrorregiões do estado, de modo a obter uma estimativa fidedigna da diversidade genética do estado. O número amostral foi definido com base em parâmetros internacionais para geração e publicação de dados populacionais de marcadores forenses (GUSMÃO et al., 2017). A coleta de amostras ocorrerá em campi da UFES e do IFES distribuídos em diferentes municípios das macrorregiões norte (São Mateus), sul (Alegre), central (Linhares) e metropolitana (Vitória). A amostragem será feita proporcionalmente entre as macrorregiões. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos participantes, dados pessoais (nome, sexo, endereço, telefone de contato e e-mail) e referentes à ancestralidade, autodeclaração racial e cidade natal serão obtidos por meio de questionário. As amostras biológicas consistirão de 3-4 gotas de sangue depositadas em cartões de papel filtro FTA Elute Card (Whatman) e o DNA será extraído conforme recomendações do fabricante. As amostras serão analisadas para os segmentos hipervariáveis (HVS) 1, 2 e 3, presentes na região controle do mtDNA; para um conjunto de 12 X- STRs contemplados no kit comercial Investigador

Endereço: Rua Marins Alvarino, 365

Bairro: Itararé

CEP: 29.047-660

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-5348

Fax: (27)3335-5331

E-mail: cep@unimedvx.com.br



Continuação do Parecer: 2.547.343

Esta pesquisa oferece baixos riscos tanto para os participantes quanto para os pesquisadores envolvidos, pois inclui uma metodologia de coleta de material biológico minimamente invasiva e protocolos tradicionais de análise molecular. Os riscos existentes estão relacionados ao contato dos pesquisadores com materiais perfuro cortantes (ponteiras de micropipetas, tesoura), reagentes químicos (extração de DNA e eletroforese) e amostras biológicas (sangue periférico). A fim de minimizar qualquer dano, todas as etapas seguirão protocolos de biossegurança, assegurando todos os participantes e pesquisadores envolvidos no estudo. Por questões de confiabilidade e sigilo, os questionários com informações pessoais dos participantes ficarão armazenados com acesso restrito em arquivo morto e sob tutela do pesquisador responsável. As amostras biológicas terão identificação codificada, não expondo a identificação do voluntário da pesquisa.

BENEFÍCIOS

Com esta proposta serão estabelecidos os protocolos de análise de mtDNA e X-STRs, ainda não implementados no estado. Espera-se que após a padronização, seja feita a validação sua por meio da resolução de casos complexos ainda não solucionados pela PC-ES. A inserção dos resultados em seus respectivos bancos atenderá aos novos critérios internacionais para geração e publicação de estudos populacionais não atendidos pelos estudos anteriores.

Uma amostragem que compreenda as 4 macrorregiões resultará em um retrato fidedigno da diversidade de haplótipos de mtDNA e Y-STR e da ancestralidade da população capixaba. Sabe-se que grupos étnicos diferem quanto a sua susceptibilidade a doenças de modo que a informação sobre a ancestralidade genética poderá ser relevante no planejamento de políticas públicas voltadas à prevenção. Sob aspectos sócio-etnológicos, esta pesquisa ajudará a compreender como os dados de ancestralidade e autodeclaração racial se sobrepõem numa população em que, desde sua formação, coexistem aspectos socioculturais de origens historicamente distintas.

Os dados de X-STRs poderão ter grande utilidade na prática clínica como já verificado na sarcoidose e nos cânceres de ovário e gastrointestinais e no diagnóstico genético de hemofilia e de síndromes ligadas ao X como Klinefelter e Turner. Os resultados serão submetidos aos bancos de dados EMPOP, YHRD e ChrX-STR.org 2.0. Este é um

parâmetro positivo quanto à relevância e utilidade científica dos produtos desta pesquisa, uma vez que melhorará significativamente a representatividade e a qualidade das informações do ES na comunidade científica. As informações geradas poderão servir de base para futuras abordagens desta ou de outras áreas do conhecimento, como explicitado a seguir.

Endereço: Rua Marins Alvarino, 365
 Bairro: Itararé CEP: 29.047-660
 UF: ES Município: VITORIA
 Telefone: (27)3335-5348 Fax: (27)3335-5331 E-mail: cep@unimedvx.com.br



Continuação do Parecer: 2.547.343

Considerando que o LDNACr não realiza testes de mtDNA e X-STRs e que os dados publicados previamente acerca desses marcadores apresentam limitações, este projeto também se configura numa tentativa pioneira de estabelecer estes protocolos numa instituição capixaba de modo que os métodos de análise padronizados poderão ser compartilhados com outras entidades. A sociedade será beneficiada com o ganho de eficiência e confiabilidade na prática forense da PC-ES. A adoção de novos métodos de análise tende a melhorar o índice de sucesso na identificação de suspeitos de crimes e na determinação de vínculo parental, além de permitir a elucidação de casos ainda não solucionados devido a limitações técnicas já explicitadas. Durante o andamento da pesquisa, prevê-se a participação em congressos e eventos similares o que configura um modo de exposição dos dados à apreciação de especialistas da mesma área de conhecimento antes da finalização das análises. Os achados e as conclusões finais serão disponibilizados por meio da publicação de artigos científicos em revistas. Por fim, existem poucos pesquisadores brasileiros especializados em genética forense. Neste sentido, esta pesquisa promoverá a formação de estudantes nesta área específica do conhecimento, oportunizando o surgimento de futuros cientistas forenses.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é prevista para realizar-se no Núcleo de Genética Humana e Molecular - NGHM (UFES-Vitória), no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade - NGACB (UFES-Vitória) e no Laboratório de DNA Criminal – LDNACr (Polícia Civil), que apresenta condições técnicas para o desenvolvimento da mesma.

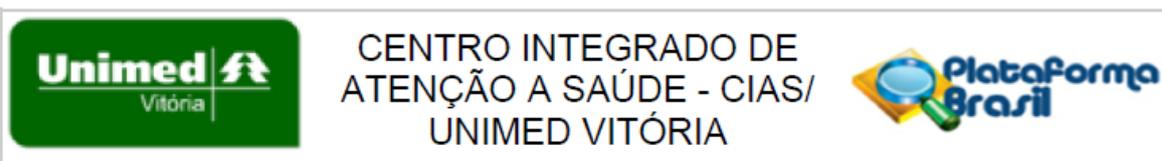
Inclui, adicionalmente, a respectiva declaração de infraestrutura e currículos dos pesquisadores responsáveis e equipe, os quais são condizentes com o projeto pretendido.

O delineamento do projeto é adequado, em nossa análise, parece conter todos os dispositivos necessários para garantir a exploração dos objetivos definidos na pesquisa.

Metodologia Proposta:

Serão selecionados indivíduos adultos (18 anos), não aparentados, nascidos nas macrorregiões do ES e de ambos os sexos (250 mulheres e 400 homens). As amostras biológicas serão coletadas com auxílio de uma lanceta descartável estéril. De 3-4 gotas de sangue periférico serão depositadas em cartões de papel filtro FTA Elute Card (Whatman). A extração do DNA será feita de acordo com as recomendações do

Endereço: Rua Marins Alvarino, 365	CEP: 29.047-660
Bairro: Itararé	
UF: ES	Município: VITORIA
Telefone: (27)3335-5348	Fax: (27)3335-5331
	E-mail: cep@unimedvx.com.br



Continuação do Parecer: 2.547.343

fabricante dos cartões. A análise do mtDNA ocorrerá por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). O sequenciamento utilizará os primers: L15997 (5' CACCATTAGCACCCAAAGCT 3'), L16555 (5'CCCACACGTTCCCCTTAAAT 3'), H639 (5' GGGTGATGTGAGCCCCTGCTA 3') e H016 (5'CCCGTGAGTGGTTAATAGGGT 3')(CARVALHO et al., 2011; PARSON & BANDELT, 2007). Os amplicons serão purificados com ExoSAP-ITTM PCR Product Cleanup Reagent. As reações serão preparadas segundo as recomendações do fabricante do produto BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit. Os produtos de sequenciamento serão purificados e submetidos à eletroforese capilar no equipamento ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer. Para estudo dos Y-STRs e X-STRs serão utilizados, respectivamente, os kits Y-Filer Plus PCR Amplification e Investigator Argus X-12. Os amplicons serão separados por eletroforese capilar no ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer. Para definição dos haplótipos, inferências de ancestralidade e análises estatísticas serão utilizados os seguintes programas: SeqScape v3.0; Arlequin v3.5.1.2; GeneMapper® ID-X v1.4; Genepop; SPSS Statistics v22.0; Powerstats 12; HaploGrep2; Network v4.5.1.0. As análises moleculares serão executadas no Núcleo de Genética Humana e Molecular - NGHM (UFES-Vitória), no Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade - NGACB (UFESVitória) e no Laboratório de DNA Criminal – LDNACr (Polícia Civil). As análises estatísticas serão realizadas pela equipe do NGHM e pesquisadores parceiros da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

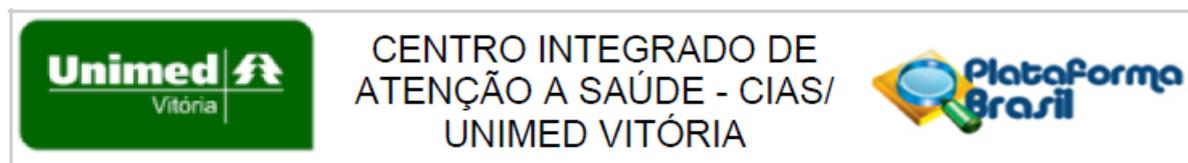
Desfecho Primário:

Ao término do projeto pretende-se obter uma caracterização macrorregional da diversidade de haplótipos de mtDNA, Y-STRs e X-STRs e sua ascendência materna e paterna na população do ES bem como estabelecer parâmetros de execução e análise estatística desses marcadores que viabilizem sua implementação pela PC-ES.

Desfecho Secundário:

Por meio da caracterização expandida dos haplótipos de mtDNA, Y-STRs e X-STRs, deseja-se estabelecer as semelhanças e diferenças entre as estruturas genéticas de cada macrorregião bem como conhecer a influência das populações de estados vizinhos na composição do pool genético capixaba. Com os produtos desta pesquisa, será possível uma atualização dos dados populacionais de mtDNA, Y-STRs e X-STRs para o ES em bancos de dados internacionais. A geração e aprimoramento dos dados de mtDNA, XSTRs e Y-STRs contribuirá para a excelência da prática forense pela PC-ES. A adoção de novos métodos de análise tende a melhorar o índice de sucesso na identificação de suspeitos de

Endereço: Rua Marins Alvarino, 365
 Bairro: Itararé CEP: 29.047-660
 UF: ES Município: VITORIA
 Telefone: (27)3335-5348 Fax: (27)3335-5331 E-mail: cep@unimedvx.com.br



Continuação do Parecer: 2.547.343

crimes e na determinação de vínculo parental, além de permitir a elucidação de casos ainda não solucionados devido a limitações

técnicas já explicitadas. Adicionalmente, cruzando-se dados do questionário e das análises moleculares, será interessante verificar como os dados de ancestralidade materna e paterna e de autodeclaração racial se sobrepõem numa população em que, desde sua formação, coexistem aspectos socioculturais de origens historicamente distintas.

O cronograma previsto é adequado e detalha claramente as etapas do projeto a serem seguidas. O número de indivíduos será de 650 (250 mulheres e 400 homens) em todo o estudo. A amostra da pesquisa foi devidamente calculada. Os critérios de definição da amostra encontram-se explicitados no projeto e são adequados.

O número amostral foi definido com base em parâmetros internacionais para geração e publicação de dados populacionais de marcadores forenses (GUSMÃO et al., 2017).

A coleta de amostras ocorrerá em campi da UFES e do IFES distribuídos em diferentes municípios das macrorregiões norte (São Mateus), sul (Alegre), central (Linhares) e metropolitana (Vitória). A amostragem será feita proporcionalmente entre as macrorregiões. Estas instituições foram escolhidas por tratarem-se de centros nucleadores potencialmente frequentados por indivíduos de diferentes localidades dentro da mesma macrorregião.

Os pacientes não pertencem a grupos especiais tais como índios, crianças, ou outros grupos susceptíveis. Critérios de seleção equitativa de participantes não são aplicáveis ao presente projeto devido a sua natureza, objetivos e delineamento.

Os critérios de inclusão foram explicitados no projeto e são condizentes com o desenho da pesquisa. Serão selecionados indivíduos adultos (18 anos), não aparentados, nascidos no Espírito Santo (englobando as 4 macrorregiões) e de ambos os sexos.

Não há período de wash-out previsto no estudo. O projeto traz descrito procedimento de monitoramento dos dados de segurança durante sua condução, o que se encontra claramente definido. Por questões de confiabilidade e sigilo, os questionários com informações pessoais dos participantes ficarão armazenados com acesso restrito em arquivo morto e sob tutela do pesquisador responsável. As amostras biológicas terão identificação codificada, não expondo a identificação do voluntário da pesquisa.

Endereço: Rua Marins Alvarino, 365
 Bairro: Itararé CEP: 29.047-660
 UF: ES Município: VITORIA
 Telefone: (27)3335-5348 Fax: (27)3335-5331 E-mail: cep@unimedvx.com.br



Continuação do Parecer: 2.547.343

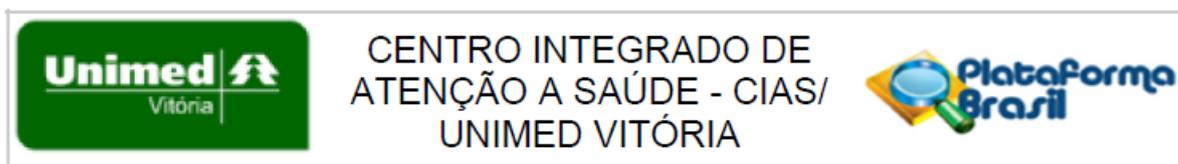
O tratamento e avaliação dos dados são definidos no projeto e apresenta-se coerente com objetivos e delineamento propostos.

Metodologia de Análise de Dados:

Além dos dados pessoais, informações sobre ascendência materna e paterna, cidade natal e autodeclaração racial serão obtidas após a assinatura dos termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e organizadas em bancos de dados do Microsoft Access (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA). Os haplótipos serão definidos a partir do material genético obtido de sangue depositado em cartão de papel filtro FTA Elute Card (Whatman). A associação entre as variáveis categóricas será avaliada pelo teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher utilizando o programa SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Para os dados de mtDNA, o programa SeqScape v. 3.0 (Applied Biosystems) será utilizado para analisar as sequências de cada amostra, compará-las com a Sequência de Referência de Cambridge (rCRS), padrão para mtDNA (ANDREWS et al., 1999) e determinar os haplótipos. Os haplogrupos serão preditos a partir dos haplótipos usando o software HaploGrep2 (KLOSSBRANDSTÄTTER et al., 2011) com base em Phylotree build 17 (VAN OVEN; KAYSER, 2009). Estimativas para frequência haplotípica, diversidade de sequência, diversidade nucleotídica, distância genética e análise de variância molecular (AMOVA) serão realizadas com o programa Arlequin v.3.5.1.2 (EXCOFFIER;

LISCHER, 2010). Para os Y-STRs e X-STRs, os resultados serão analisados com o software GeneMapper® ID-X v 1.4 (Applied Biosystems). As frequências haplotípicas e de diversidade serão estimadas de acordo com Nei (1987) usando Arlequin v 3.5.1.2. Os cálculos de distâncias genéticas (FST), AMOVA, equilíbrio de HardyWeinberg e heterozigosidade esperada e observada serão efetuados no mesmo programa. O desequilíbrio de ligação será testado pelo programa Genepop (Rousset et al., 2008). Para a análise do escalonamento multidimensional (MDS) das distâncias genéticas entre as populações será utilizado SPSS Statistics v 22.0. Parâmetros forenses como poder de discriminação, probabilidade de coincidência e conteúdo de informação polimórfica serão calculados com Powerstats 12 -Promega (TEREBA, 1999). Para os Y-STRs, as relações genéticas entre haplótipos dentro dos haplogrupos específicos, com o propósito de verificar o grau de divergência e identificar um possível haplótipo ancestral, serão construídas com o programa Network 4.5.1.0 (<http://www.fluxus-technology.com>), utilizando o método de median-joining (BANDELT et al., 1999). A referência bibliográfica apresentada é suficiente e adequada, denotando que na elaboração do projeto, os pesquisadores avaliaram com

Endereço: Rua Marins Alvarino, 365
 Bairro: Itararé CEP: 29.047-660
 UF: ES Município: VITORIA
 Telefone: (27)3335-5348 Fax: (27)3335-5331 E-mail: cep@unimedvx.com.br



Continuação do Parecer: 2.547.343

profundidade o tema de investigação proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A privacidade e confidencialidade a que têm direito os participantes da pesquisa são garantidos no projeto pelos seguintes procedimentos: Por questões de confiabilidade e sigilo, os questionários com informações pessoais dos participantes ficarão armazenados com acesso restrito em arquivo morto e sob tutela do pesquisador responsável. As amostras biológicas terão identificação codificada, não expondo a identificação do voluntário da pesquisa. Além disso, foram anexadas declarações de confidencialidade de todos os participantes da pesquisa, com o compromisso que os dados coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados no Núcleo de Genética Humana e Molecular, sob responsabilidade do Dr. Lúri Drumond Louro, até o término da pesquisa, no ano de 2020.

O TCLE contém todos requisitos necessários ao pleno entendimento do projeto.

Recomendações:

Conforme definido na Resolução CNS nº 466 de 2012, cabe ao pesquisador responsável o envio dos relatórios semestrais sobre o andamento do estudo, as notificações de eventos adversos e as emendas caso ocorram modificações no delineamento do projeto aprovado. Ao final do estudo deve-se emitir um relatório final com os resultados obtidos e enviado ao CEP, via Plataforma Brasil, para notificação e registro do encerramento do protocolo de estudo.

Sendo a pesquisadora principal também responsável técnica e a única a responder pela instituição proponente (DNALAB) comprovado pelos anexos:

ANEXO5_Folha_rosto.pdf

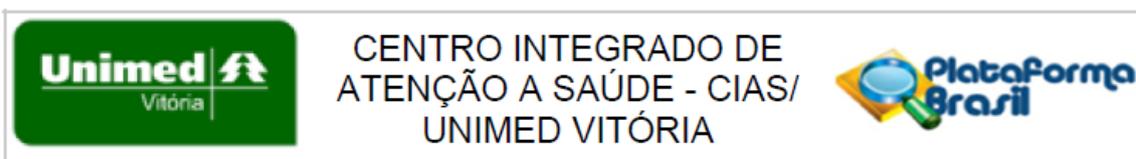
ANEXO7_CRT_Lauziene.pdf

Ressaltamos a importância de manter a confidencialidade e sigilo das informações obtidas durante a pesquisa, uma vez que não há mas nenhuma outra pessoa que possa responder pela instituição.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram devidamente respondidas em forma de carte resposta e anexada a Plataforma Brasil.

Endereço: Rua Marins Alvarino, 365
 Bairro: Itararé CEP: 29.047-660
 UF: ES Município: VITÓRIA
 Telefone: (27)3335-5348 Fax: (27)3335-5331 E-mail: cep@unimedvx.com.br



Continuação do Parecer: 2.547.343

Conforme consta nos anexos:

Carta_Resposta.pdf

ANEXO7_CRT_Lauziene.pdf

ANEXO6_Alvara_Sanitario_DNALab.pdf

ANEXO3_Proposta_Aprovada_FAPES.pdf

ANEXO2_Termo_Outorga.pdf

ANEXO8_Acordo_Instituicoes.pdf

ANEXO4_Orcamento.pdf

ANEXO1_TCLE.pdf

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_985072.pdf (alteração da metodologia)

Cronograma.pdf

ANEXO5_Folha_rosto.pdf

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_985072.pdf	02/01/2018 09:34:40		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	02/01/2018 09:25:35	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	02/01/2018 08:23:26	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	ANEXO7_CRT_Lauziene.pdf	02/01/2018 08:22:27	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	ANEXO6_Alvara_Sanitario_DNALab.pdf	02/01/2018 08:21:54	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	ANEXO3_Proposta_Aprovada_FAPES.pdf	02/01/2018 08:21:18	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Declaração do Patrocinador	ANEXO2_Termo_Outorga.pdf	02/01/2018 08:20:43	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	ANEXO8_Acordo_Instituicoes.pdf	02/01/2018 08:20:14	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Orçamento	ANEXO4_Orcamento.pdf	02/01/2018	LAUZIENE	Aceito

Endereço: Rua Marins Alvarino, 365

Bairro: Itararé

CEP: 29.047-660

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-5348

Fax: (27)3335-5331

E-mail: cep@unimedvx.com.br



Continuação do Parecer: 2.547.343

Orçamento	ANEXO4_Orçamento.pdf	08:18:42	ANDRADE SOARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO1_TCLE.pdf	02/01/2018 08:18:31	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Folha de Rosto	ANEXO5_Folha_rosto.pdf	02/01/2018 08:16:40	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	18/10/2017 10:46:48	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_infraestrutura.pdf	27/09/2017 07:46:04	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Boirrepositorio_UFES.pdf	25/09/2017 14:05:19	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	lattes_LauzieneAndradeSoares.pdf	22/09/2017 10:47:37	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	lattes_VictorSantosStange.pdf	22/09/2017 10:46:04	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	lattes_Raquel.pdf	22/09/2017 10:44:50	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	Lattes_luriDrumondLouro.pdf	22/09/2017 10:44:09	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	QUESTIONARIO.pdf	22/09/2017 10:40:41	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	Anuencia_PCES.pdf	22/09/2017 10:39:38	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_sigilo_confidencialidade_Victor.pdf	22/09/2017 10:37:36	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_sigilo_confidencialidade_Raquel.pdf	22/09/2017 10:37:27	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_sigilo_confidencialidade_Lauziene.pdf	22/09/2017 10:37:16	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_sigilo_confidencialidade_luri.pdf	22/09/2017 10:37:05	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Marins Alvarino, 365

Bairro: Itararé

CEP: 29.047-660

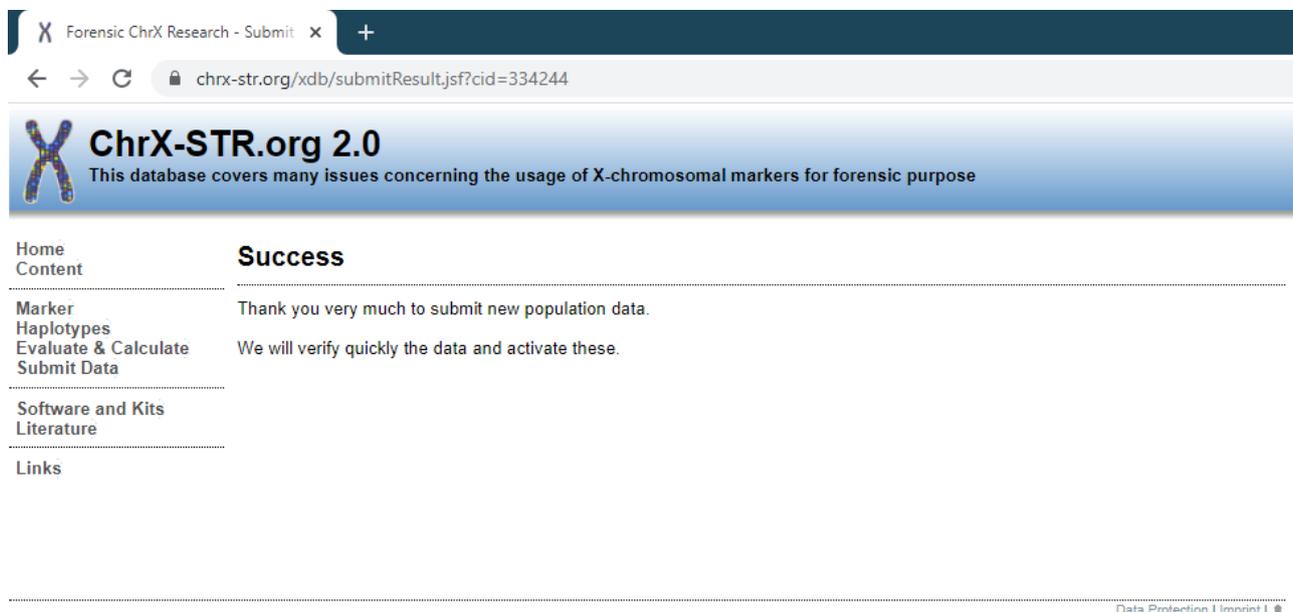
UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-5348

Fax: (27)3335-5331

E-mail: cep@unimedvx.com.br

ANEXO 6 – Comprovante de submissão ao banco de dados *ChrX-STR.org 2.0*.

The screenshot shows a web browser window with the following elements:

- Browser Tab:** Forensic ChrX Research - Submit
- Address Bar:** chrX-str.org/xdb/submitResult.jsf?cid=334244
- Header:** ChrX-STR.org 2.0. Below the logo, it states: "This database covers many issues concerning the usage of X-chromosomal markers for forensic purpose".
- Navigation Menu (Left):**
 - Home
 - Content
 - Marker Haplotypes Evaluate & Calculate Submit Data
 - Software and Kits Literature
 - Links
- Main Content Area:**
 - Success**
 - Thank you very much to submit new population data.
 - We will verify quickly the data and activate these.
- Footer (Right):** Data Protection | Imprint |